



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της αποτελεσματικότητας του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος
στον έλεγχο της ανάπτυξης επιλεγμένων αλλοιογόνων
και παθογόνων μικροοργανισμών

Ευαγγελία Ι. Κριτή

Επιβλέπων καθηγητής:
Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2023

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της αποτελεσματικότητας του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος
στον έλεγχο της ανάπτυξης επιλεγμένων αλλοιογόνων
και παθογόνων μικροοργανισμών

“Study on the effectiveness of cold atmospheric pressure plasma to
control the growth of selected spoilage and pathogenic microorganisms”

Ευαγγελία Ι. Κριτή

Εξεταστική Επιτροπή:

Ευστάθιος Πανάγου, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής ΓΠΑ

Θεοφάνια Τσιρώνη, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ

Μελέτη της αποτελεσματικότητας του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος στον έλεγχο της ανάπτυξης επιλεγμένων αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών

ΠΜΣ Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας & Ασφάλειας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα είναι μια καινοτόμος τεχνολογία, γνώριμη στην επιστημονική κοινότητα εδώ και αρκετά χρόνια. Είναι περισσότερο γνωστή για τη χρήση της σε εφαρμογές γύρω από τη μηχανική, τη μικροηλεκτρονική και την επιστήμη των υλικών, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει επεκταθεί σε νέα πεδία όπως η ιατρική και τα τρόφιμα. Παράλληλα εξετάζονται και ενδεχόμενα συνδυασμού του ψυχρού πλάσματος με άλλες καινοτόμες μη θερμικές τεχνολογίες και εφαρμογές νανοτεχνολογίας. Παραδείγματα αποτελούν το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο, το παλμικό φως, οι υπέρηχοι, η χρήση νανογαλακτωμάτων νανοσωματιδίων, κ.α..

Στον τομέα των τροφίμων, η συγκεκριμένη τεχνολογία αποτελεί αντικείμενο συστηματικής μελέτης τα τελευταία δέκα χρόνια, κυρίως λόγω της ανάγκης που δημιουργείται για λιγότερο επεξεργασμένα αλλά ταυτόχρονα ασφαλή προϊόντα, της μείωσης του ενεργειακού αποτυπώματος των βιομηχανιών και της εξοικονόμησης ενεργειακών πόρων. Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα μπορεί να αποτελέσει τη λύση στα παραπάνω προβλήματα, ωστόσο ακόμα βρίσκεται στο στάδιο των ερευνών και δεν έχει καταφέρει να εφαρμοστεί σε βιομηχανικό επίπεδο. Χαρακτηρίζεται ως μια «πράσινη» τεχνολογία, φιλική προς το περιβάλλον που δεν καταναλώνει μεγάλα ποσά ενέργειας για να είναι αποτελεσματική. Το πλάσμα αντιπροσωπεύει ένα αρκετά ποικιλόμορφο μίγμα δραστικών παραγόντων (reactive species), οι οποίοι είναι ιοντισμένοι ή ενεργοποιημένοι λόγω της προσθήκης ενέργειας. Σε αυτά οφείλει και την αποτελεσματικότητά του όσον αφορά στη βακτηριοκτόνο δράση του. Οι δυνατότητές του δεν σταματούν εκεί καθώς μπορεί να δράσει ως παράγοντας απενεργοποίησης ενζύμων, να συντελέσει στην υποβάθμιση της συγκέντρωσης φυτοφαρμάκων και τοξινών που μπορεί να υπάρχουν σε κάποιο τρόφιμο, διατηρώντας παράλληλα τις όποιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορεί να διαθέτει, χωρίς να τουποβαθμίσει ποιοτικά. Συνεπώς, μπορεί να αναστείλει πολλούς από τους παράγοντες που προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων, όπως για παράδειγμα διάφοροι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί ή τα ένζυμα που προκαλούν αμαύρωση. Άρα, εκτός από την ασφάλεια των τροφίμων μπορεί να συντελέσει και στη μείωση της σπατάλης τους (food waste), που αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της σύγχρονης εποχής.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα που έχει το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα στον έλεγχο της ανάπτυξης επιλεγμένων αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Αρχικά προσδιορίστηκε με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου σε συνάρτηση με το χρόνο εφαρμογής του ψυχρού πλάσματος και στη συνέχεια με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν, αναπτύχθηκαν μαθηματικά μοντέλα που περιγράφουν την κινητική θανάτωσης αυτών των μικροοργανισμών. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος είναι τύπου jet (kINPen®) και λειτουργεί με χρήση του ευγενούς αερίου αργό (Ar) ως φέρον αέριο, σε συχνότητα 1MHz και ηλεκτρική τάση 2-6 kV. Η χρήση της συγκεκριμένης συσκευής έγινε με την προσαρμογή μιας μεταλλικής κωνικής απόληξης στο ακροφύσιο του jet για πιο ομοιόμορφη διάχυση της ακτινοβολίας του πλάσματος. Οι μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν ήταν οι: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*,

Brochothrix thermosphacta, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides* και *Lactiplantibacillus plantarum* από την κατηγορία των αλλοιογόνων και *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus* από την κατηγορία των παθογόνων. Τα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν την κινητική απενεργοποίησης των μικροοργανισμών ήταν τα: Geeraerd, Weibull, το γραμμικό (Bigelow) και το διαφασικό μοντέλο. Επιπλέον, υπολογίστηκαν και οι κινητικές παράμετροι σε κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα έδειξαν σε γενικές γραμμές μεγαλύτερες μειώσεις στον πληθυσμό των αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε σχέση με τους παθογόνους. Πιο αναλυτικά, μετά το πέρας των 15 λεπτών έκθεσης στην ακτινοβολία του πλάσματος, η συνολική μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων διαμορφώθηκε ως εξής: *P. fragi* 2,12 log₁₀ CFU/mL, *P. fluorescens* 1,77 log₁₀ CFU/mL, *B. thermosphacta* 2,30 log₁₀ CFU/mL, *C. sakazakii* 3,36 log₁₀ CFU/mL, *B. subtilis* 1,58 log₁₀ CFU/mL, *L. plantarum* 1,31 log₁₀ CFU/mL, *L. mesenteroides* 3,80 log₁₀ CFU/mL, που ήταν και η μεγαλύτερη μείωση που σημειώθηκε στο σύνολο των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, *S. Typhimurium* 1,12 log₁₀ CFU/mL, *E. coli* 1,18 log₁₀ CFU/mL, *L. monocytogenes* 1,43 log₁₀ CFU/mL, *B. cereus* 1,32 log₁₀ CFU/mL, *S. aureus* 0,88 log₁₀ CFU/mL και *P. aeruginosa* 0,73 log₁₀ CFU/mL, η οποία εμφάνισε και τη μικρότερη μείωση στον πληθυσμό συγκριτικά με όλους τους προς μελέτη μικροοργανισμούς.

Η επίδραση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε κυτταρικό επίπεδο μελετήθηκε επίσης με τη χρήση φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Συγκεκριμένα, εκτέθηκαν αποικίες από τους μικροοργανισμούς *S. Typhimurium* και *B. cereus* για χρονικό διάστημα 20 λεπτών στο ψυχρό πλάσμα και στη συνέχεια καταγράφηκαν τα φάσματά. Η επίδραση του πλάσματος ήταν εμφανέστερη στα φάσματα του βακτηρίου *B. cereus* καθώς εντοπίστηκαν περισσότερα σημεία διαφοροποίησης μεταξύ του δείγματος χωρίς επεξεργασία και αυτού που εκτέθηκε στο πλάσμα σε σχέση με τα φάσματα του βακτηρίου *S. Typhimurium*, στα οποία δεν φάνηκαν αντίστοιχες διαφοροποιήσεις.

Συμπερασματικά, το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα φαίνεται να έχει επίδραση στους μικροοργανισμούς που εκτίθενται σε αυτό και επιτυγχάνει σε ένα βαθμό την απενεργοποίησή τους. Ωστόσο υπάρχουν διακυμάνσεις στο ποσοστό μείωσης του βακτηριακού φορτίου από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό, γεγονός που υποδεικνύει ότι για να γίνει αποτελεσματικότερη η εφαρμογή του πλάσματος χρειάζεται να βελτιστοποιηθούν οι παράμετροι χρήσης του. Επιπλέον, η επίδραση των δραστικών παραγόντων του πλάσματος σε ζωντανά βακτηριακά κύτταρα φαίνεται ότι μπορεί να εκτιμηθεί και με τη χρήση της μεθόδου της φασματοσκοπίας υπέρυθρου.

Επιστημονική περιοχή: Ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα

Λέξεις κλειδιά: ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα, αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια, κινητική απενεργοποίησης, μαθηματικό μοντέλο

Study on the effectiveness of cold atmospheric pressure plasma to control the growth of selected spoilage and pathogenic microorganisms

*M.Sc. Food Safety & Quality Management Systems
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology & Biotechnology*

ABSTRACT

Cold atmospheric pressure plasma (CAPP) is an emerging novel technology, already known around the scientific community. So far, its use was related to engineering, microelectronics, and materials science, however, in the last few years it has received attention and has found applications into new fields such as medicine, agriculture and the food industry. At the same time, potential combinations of cold plasma with other innovative non-thermal technologies such as pulsed electric field, pulsed light, ultrasound, and nanotechnology applications, such as the use of nanoemulsions, nanoparticles, etc. are also being considered.

In the food sector, this technology has been extensively studied in the last ten years mainly due to the shift towards less processed and at the same time safer foods, the need to reduce the amount of energy used by food industries as well as to operate at more eco-friendly conditions. CAPP can be the solution to the above-mentioned problems; however, it is still at experimental level and has not managed to be applied on an industrial scale. It is characterized as a "green" technology, environmentally-friendly that does not consume large amounts of energy to be efficient. Plasma consists of a mixture of reactive species, which are ionized or activated due to the addition of energy. Those species are responsible for its effectiveness on bacterial inactivation. In addition, its application can be extended to enzyme inactivation, degradation of pesticides and toxins that may be present in the food, while maintaining any antioxidant properties it may have, without affecting its quality. Therefore, it can inhibit many of the factors that cause food spoilage, such as various spoilage microorganisms or the enzymes that cause browning. So, in addition to food safety, it can also contribute in the reduction of food waste, which is one of the biggest problems of the modern era.

In this diploma thesis, the effectiveness of cold atmospheric plasma in controlling the growth of selected spoilage and pathogenic microorganisms was studied. Initially, selected spoilage and pathogenic bacteria were subjected *in vitro* in CAPP treatment for up to 15 min and the changes in the microbial population were determined. Further on, mathematical models were fitted to the collected data to describe the inactivation kinetics of the selected bacteria. The device used to produce the CAPP was a jet type (kINPen®), operating with argon (Ar) as carrier gas at a frequency of 1MHz and an electrical voltage of 2-6 kV. The device was supplemented with a metallic conical tip adjusted to the jet nozzle to achieve a uniform dispersion of the plasma radiation on the surface of the treated sample. The microorganisms studied in this thesis were: *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactiplantibacillus plantarum* concerning the spoilage microorganisms and *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* concerning the pathogens. The mathematical models used to describe the inactivation kinetics of the microorganisms were: Geeraerd, Weibull, linear (Bigelow) and the biphasic model. The results showed generally

higher reductions in the population of spoilage microorganisms compared to pathogens. Moreover, after 15 minutes of exposure to plasma radiation, the total reduction in the bacterial population was as follows: *P. fragi* 2,12 log₁₀ CFU/mL, *P. fluorescens* 1,77 log₁₀ CFU/mL, *B. thermosphacta* 2,30 log₁₀ CFU/mL, *C. sakazakii* 3,36 log₁₀ CFU/mL, *B. subtilis* 1,58 log₁₀ CFU/mL, *L. plantarum* 1,31 log₁₀ CFU/mL, *L. mesenteroides* 3,80 log₁₀ CFU/mL, which was also the highest reduction observed in all the microorganisms examined, *S. Typhimurium* 1,12 log₁₀ CFU/mL, *E. coli* 1,18 log₁₀ CFU/mL, *L. monocytogenes* 1,43 log₁₀ CFU/mL, *B. cereus* 1,32 log₁₀ CFU/mL, *S. aureus* 0,88 log₁₀ CFU/mL, and *P. aeruginosa* 0,73 log₁₀ CFU/mL, which showed the lowest population reduction amongst all.

The effect of CAPP on bacteria cells was also investigated by means of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Specifically, colonies of the microorganisms *S. Typhimurium* and *B. cereus* were exposed to CAPP for a period of 20 minutes and their spectra were recorded in the wavelength region 400-4.000 cm⁻¹. The results showed that plasma treatment had a greater impact on the bacterial cells of *B. cereus*. This conclusion was drawn because there were obvious differences between the spectra of the sample without treatment and the one exposed to plasma radiation. On the contrary the comparison between the recorded spectra of *S. Typhimurium* showed no differences.

In conclusion, CAPP seems to influence the microorganisms exposed to it and results in inactivation to a certain extent. However, there are variations in the percentage of bacterial load reduction from one microorganism to another, which indicates that the parameters of its use need to be optimized to become more effective. In addition, infrared spectroscopy can be used to examine the effect of plasma active agents on living bacterial cells.

Scientific area: Atmospheric pressure plasma

Keywords: cold atmospheric plasma, spoilage and pathogenic bacteria, inactivation kinetics, mathematics model

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου και συγκεκριμένα στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2023. Η συγκεκριμένη μελέτη δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί χωρίς τη βοήθεια ανθρώπων εντός και εκτός του πανεπιστημιακού χώρου, τους οποίους και θα ήθελα να ευχαριστήσω σε αυτό το σημείο.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου και Καθηγητή του ΓΠΑ, κ. Ευστάθιο Πανάγου για την εμπιστοσύνη του να αναλάβω το συγκεκριμένο αντικείμενο έρευνας, το αδιάκοπο ενδιαφέρον του για την εξέλιξη του και τις υποδείξεις και την καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης μελέτης.

Ακόμα, ευχαριστώ την καθηγήτρια κ. Θεοφανία Τσιρώνη και το Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων, για την παροχή του εξοπλισμού του εργαστηρίου τη συνεργασία και τη βοήθεια που παρείχαν, όπως επίσης και την υποψήφια διδάκτορα Αικατερίνη Σπανού για την συνεργασία της στην ομαλή διεξαγωγή του πειράματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ελευθέριο Δροσινό για το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Επιπλέον, ιδιαίτερο ευχαριστώ στον καθηγητή, κύριο Χρήστο Παππά και το Εργαστήριο Γενικής Χημείας, για το χρόνο που αφιέρωσε, τις εποικοδομητικές γνώσεις που μοιράστηκε, τη βοήθεια που μας προσέφερε και το ενδιαφέρον που έδειξε για την παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εξαιρετική συνεργασία τη Βενετία Σαμιώτη, που με την πολύτιμη συμβολή της συντέλεσε στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους γονείς μου που με στηρίζουν σε όλη την πορεία και μου δίνουν τη δυνατότητα να πραγματοποιώ τα όνειρα μου και στην αδερφή μου Δέσποινα, για την υπομονή και την συμπαράσταση της.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	2
1. ΨΥΧΡΟ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ	3
1.1 Εισαγωγή.....	3
1.1.1 Εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων.....	4
1.1.2 Εφαρμογές στον τομέα της Ιατρικής.....	5
1.2 Τεχνικά χαρακτηριστικά πλάσματος.....	5
1.2.1 Κατηγοριοποίηση με βάση τη θερμοκρασία	6
1.3 Ψυχρό Ατμοσφαιρικό Πλάσμα.....	7
1.3.1 Μηχανισμός & Μέθοδοι Παραγωγής Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος.....	7
1.3.2 Σύσταση πλάσματος.....	12
1.4 Η συσκευή kINPen.....	14
1.4.1 Χημεία των αντιδράσεων	16
1.4.2 Αλληλεπίδραση ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος με υγρά.....	17
1.4.3 Δυναμική πλάσματος.....	18
1.4.4 UV ακτινοβολία.....	19
2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΨΥΧΡΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ.....	20
2.1 Επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων	20
2.1.1 Αισθητηριακές ιδιότητες	20
2.1.2 Φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες.....	22
2.1.3 Βιοενεργά συστατικά.....	23
2.1.4 Αντιθρεπτικά	26
2.1.5 Κυτταροτοξικότητα	26
2.2 Επίδραση στα μακρομόρια	27
2.2.1 Επίδραση στα λιπίδια	27
2.2.2 Επίδραση στις πρωτεΐνες.....	28
2.2.3 Επίδραση στους υδατάνθρακες	30
2.2.4 Επίδραση στο γενετικό υλικό	31
2.3 Σύσταση βακτηριακού κυττάρου.....	32
2.3.1 Δομή βακτηριακών κυττάρων	33
2.3.2 Δομή γενετικού υλικού.....	33
2.3.3 Δομή κυτταρικών τοιχωμάτων	34
2.4 Μηχανισμός απενεργοποίησης κυττάρων	35
2.4.1 Επίδραση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε βιοϋμένια και σπόρια.....	38

2.5 Νομοθεσία σχετικά με τις τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων με χρήση ακτινοβολίας	39
3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	41
3.1 Εισαγωγή	41
3.2 Ποσοτική μικροβιολογία	42
3.2.1 Στάδια μικροβιακής αύξησης	42
3.2.2 Μαθηματικά μοντέλα περιγραφής της αύξησης των βακτηρίων.....	43
3.3 Μοντέλα κινητικής απενεργοποίησης	44
3.4 Φασματοσκοπία Υπέρυθρου (Infra-Red Spectroscopy, FTIR)	48
3.5 Στόχος Διπλωματικής Εργασίας.....	51
4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ.....	52
4.1 Εισαγωγή	52
4.2 Μικροβιολογικές Μέθοδοι	52
4.3 Εφαρμογή ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος	55
4.4 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR)	56
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
Μέρος 1 ^ο : Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί	59
Μέρος 2 ^ο : Παθογόνοι μικροοργανισμοί	80
Μέρος 3 ^ο : Αποτελέσματα από την φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR)	101
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	106
6.1 Κινητική απενεργοποίησης μικροοργανισμών και μείωση μικροβιακού φορτίου μέσω της απευθείας εφαρμογής ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.....	106
6.2 Επίδραση της εφαρμογής ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος στα βακτηριακά κύτταρα σύμφωνα με τα φάσματα FTIR	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια τάση του καταναλωτικού κοινού να στρέφεται όλο και περισσότερο σε προϊόντα λιγότερο ή και καθόλου επεξεργασμένα. Παράλληλα, ζητώνται τρόφιμα τα οποία δεν περιέχουν συντηρητικά και επιπλέον έχουν μειωμένες ποσότητες ζάχαρης και αλατιού, ώστε να είναι πιο υγιεινά. Οι αλλαγές αυτές στη συνταγή των προϊόντων όσο ελκυστικές και αν ακούγονται έχουν ουσιαστικά ως αποτέλεσμα τη «διευκόλυνση» της επιβίωσης και ανάπτυξης των διάφορων μικροοργανισμών σε αυτά. Αναδεικνύονται λοιπόν νέα προβλήματα όσον αφορά στην ασφάλεια των καταναλωτών και διαρκώς αναζητούνται τρόποι για να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις τους χωρίς να υπάρχει κίνδυνος για την υγεία τους.

Η παράληψη ορισμένων σταδίων ή μια πιο ήπια μορφή επεξεργασίας μπορεί να έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου που διατρέχουν οι καταναλωτές λόγω τροφιμογενών ασθενειών. Συνεπώς, η βιομηχανία τροφίμων αναζητά συνεχώς νέες μεθόδους επεξεργασίας, οι οποίες δεν θα επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων τους, δεν θα υποβαθμίζουν την ποιότητά των θρεπτικών συστατικών τους και παράλληλα θα είναι εξίσου αποτελεσματικές στην απενεργοποίηση μικροοργανισμών (αλλοιογόνων & παθογόνων) που μπορεί να υπάρχουν σε αυτά. Μία ακόμη πρόκληση που αντιμετωπίζει μια επιχείρηση τροφίμων είναι η αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων της, ώστε αυτά να φτάσουν σε κάθε γωνιά του πλανήτη και παράλληλα να παραμείνουν κατάλληλα προς κατανάλωση. Αυτό είναι ένα αρκετά δύσκολο εγχείρημα και για αυτό χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα ένα ή περισσότερα «εμπόδια», όπως αποκαλούνται για να διατηρηθούν τα τρόφιμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Οι εταιρίες επενδύουν σε νέες και καινοτόμες τεχνολογίες επεξεργασίας που έχουν ως σκοπό την αναχαίτηση της μικροβιακής αύξησης στα τρόφιμα ή χρησιμοποιούνται ως μέθοδοι τροποποίησης των ιδιοτήτων των τροφίμων. Παραδείγματα τέτοιων μεθόδων αποτελούν: η υπέρυψηλη υδροστατική πίεση (high hydrostatic pressure, HHP), οι υπέρηχοι (ultrasonics, US), το παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (pulsed electric field, PEF), η υπεριώδης ακτινοβολία (ultraviolet radiation, UV), το παλμικό φως υψηλής έντασης, η γάμμαακτινοβολία (gamma radiation) και το ψυχρό πλάσμα (coldplasma, CP) (Kopuk et al., 2020; Laroque et al., 2020). Όλες οι προαναφερθείσες τεχνολογίες εμφανίζουν και πλεονεκτήματα και περιορισμούς όσον αφορά την εφαρμογή τους. Συνήθως, οι νέες αυτές τεχνικές είναι πιο ήπιες όσον αφορά την επεξεργασία των τροφίμων και ως συνέπεια αυτού έχουν μικρότερες ενεργειακές απαιτήσεις και σε μακροπρόθεσμο πλάνο θα κοστίσουν λιγότερο από την οπτική της κατανάλωσης ενεργειακών πόρων. Ωστόσο κατά την εφαρμογή ορισμένων παρατηρήθηκε οξείδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων κάτι το οποίο είναι μη επιθυμητό, ενώ δεν μπορεί να παραληφθεί το γεγονός ότι για χρήση τους σε βιομηχανικό επίπεδο απαιτείται μια αρκετά μεγάλη επένδυση.

Η τεχνολογία του ψυχρού πλάσματος φαίνεται ότι κερδίζει σε αρκετά σημεία έναντι των υπολοίπων, παρόλο που δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε τόσο μεγάλο βαθμό στον τομέα των τροφίμων. Βέβαια η εφαρμογή του σε πεδία όπως αυτό της μικροηλεκτρονικής και των πολυμερών δείχνει ότι είναι μια πολλά υποσχόμενη προσθήκη και στον τομέα των τροφίμων.

1. ΨΥΧΡΟ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΙΚΟ ΠΛΑΣΜΑ

1.1 Εισαγωγή

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα χρησιμοποιείται ευρέως ήδη από τα τέλη του 20^{ου} αιώνα σε μια πληθώρα διαφορετικών τεχνολογικών εφαρμογών και με το πέρασ των χρόνων και την εξέλιξη της επιστήμης βρίσκει εφαρμογή και σε νέα πεδία. Είναι αρκετά διαδεδομένο σαν τεχνολογία και βρίσκεται ήδη σε πολλές εφαρμογές που υπάρχουν στην καθημερινότητα των ανθρώπων χωρίς αυτό να είναι γνωστό στις περισσότερες από αυτές.

Η τεχνολογία του πλάσματος εφαρμόζεται σε πεδία όπως οι τηλεπικοινωνίες και η μικροηλεκτρονική όπως επίσης στη βιομηχανία των πολυμερών και γενικότερα στον τομέα της μηχανικής. Αξιοποιήθηκε επίσης για την αποστείρωση ή τον καθαρισμό εξοπλισμού και για την τροποποίηση της επιφάνειας διάφορων υλικών με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων και της λειτουργικότητας τους (Von Woedtke et al., 2013). Τα μικροσίπ είναι μια από τις πιο διαδεδομένες εφαρμογές του καθώς το πλάσμα προσφέρει μεγάλη ακρίβεια και στοχευμένη χρήση σε πολύ μικρές επιφάνειες, συνεπώς είναι ιδανικό για χρήση σε τόσο μικρή κλίμακα (plasma etching). Παραδείγματα αποτελούν επίσης οι επιγραφές νέον, οι τηλεοράσεις plasma και οι ηλεκτροσυγκολλητές τόξου. Ακόμη υπάρχουν αναφορές για χρήση της τεχνολογίας του πλάσματος για την διαχείριση των αποβλήτων και της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (Brandenburg et al., 2010).

Στο πεδίο των τροφίμων η βελτίωση των χαρακτηριστικών των υλικών συσκευασίας τους, καθώς επίσης και η αποστείρωση τους με χρήση πλάσματος είναι μια ακόμη πλευρά των πολλών εφαρμογών που βρίσκονται υπό μελέτη τα τελευταία χρόνια ενώ πλέον αυξάνονται και οι μελέτες που αφορούν την απευθείας έκθεση τροφίμων σε πλάσμα με σκοπό την μεγαλύτερη ασφάλεια τους και την αύξηση της διάρκειας ζωής τους. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το σύστημα Anacail. Η εκκένωση του αερίου μέσα την συσκευασία και η παραγωγή όζοντος επιτρέπει τον καλύτερο έλεγχο του μικροβιακού φορτίου μακροπρόθεσμα. Πέραν αυτών εφαρμογές εξετάζονται και στους τομείς της ιατρικής, της βιοτεχνολογίας και της φαρμακευτικής με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα (Pankaj και Keener, 2017).

1.1.1 Εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων

Όσον αφορά τον τομέα των τροφίμων η χρήση πλάσματος αποτελεί μια καινοτόμο ιδέα, η οποία αν και βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη είναι πολλά υποσχόμενη και βρίσκει εφαρμογή σε πολλές και διαφορετικές πλευρές της βιομηχανίας τροφίμων.

Η πιο γνωστή ίσως εφαρμογή του ψυχρού πλάσματος είναι ως μέσο συντήρησης, δηλαδή ως μια αντιμικροβιακή διεργασία, στην οποία μπορεί να τεθεί μια πληθώρα τροφίμων ειδικότερα εκείνα που είναι ευαίσθητα σε θερμικές διεργασίες, προκειμένου να επιβραδυνθεί η αλλοίωση τους από μικροοργανισμούς (Bora et al., 2022). Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την παράταση της διάρκειας ζωής τροφίμων όπως τα φρούτα και τα λαχανικά, που είναι εξαιρετικά ευαλλοιώτα και αποτελούν μια από τις πιο κύριες πηγές food waste παγκοσμίως. Μια ακόμη πιθανή χρήση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος είναι σε τρόφιμα που βρίσκονται υπό μορφή σκόνης, όπως τα μπαχαρικά ή το γάλα σε σκόνη, στα οποία δρα ως απολυμαντικό μέσο (Domonkos et al., 2021).

Η εφαρμογή του σε υγρά τρόφιμα, όπως ο χυμός έχει επίσης μελετηθεί σε κάποιο βαθμό για την απενεργοποίηση παθογόνων που μπορεί να βρίσκονται σε αυτά και παρόλο που η δράση του πλάσματος έχει μικρό βάθος διείσδυσης αυτό δεν αποτελεί εμπόδιο για την συγκεκριμένη χρήση. Αν και υπάρχει σημαντική μείωση στο κομμάτι του μικροβιακού πληθυσμού των παθογόνων που μελετήθηκαν, υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατεργασία με πλάσμα οδηγεί σε αλλαγές και σε ορισμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (π.χ. pH,

περιεκτικότητα σε βιταμίνες) ενώ δεν έχουν γίνει αρκετές μελέτες σχετικά με το εάν υπάρχουν τοξικά υπολείμματα εξαιτίας της αλληλεπίδρασης του χυμού με το πλάσμα.

Οι μελέτες για την εφαρμογή του πλάσματος έχουν επεκταθεί και στην πρωτογενή καλλιέργεια πάλι ως αντιμικροβιακό μέτρο τόσο απευθείας στα φυτά, όσο και στο νερό που χρησιμοποιείται για το πότισμα τους αλλά και σε επόμενα στάδια επεξεργασίας μέχρι την τελική συσκευασία τους. Το πλάσμα φαίνεται να μειώνει τα ποσοστά τοξινών σε τρόφιμα και να μπορεί να απενεργοποιήσει ορισμένα ένζυμα. Όμως η επιφανειακή του δράση συνδυαστικά με τη δομή του τροφίμου δρα περιοριστικά ειδικά όταν εφαρμόζεται σε ολόκληρους καρπούς, π.χ. φρούτα (Bora et al., 2022).

Προφανώς το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα δεν αποτελεί πανάκεια και δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλους τους τύπους τροφίμων, ούτε να αντικαταστήσει τις ήδη χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Η αποτελεσματικότητα του εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη μορφολογία της επιφάνειας του τροφίμου και τα διάφορα τοπογραφικά χαρακτηριστικά της. Δηλαδή σε ένα τρόφιμο με αρκετά τραχιά και ανισόπεδη επιφάνεια η αποτελεσματικότητα του πλάσματος θα επηρεαστεί αρνητικά και δεν θα είναι το ίδιο αποδοτικό όσο σε ένα τρόφιμο με λεία επιφάνεια. Συνεπώς τα εγγενή χαρακτηριστικά κάθε τροφίμου οφείλουν να ληφθούν υπόψη καθώς διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επίδραση που θα έχει η ακτινοβολία του πλάσματος σε αυτά.

1.1.2 Εφαρμογές στον τομέα της Ιατρικής

Εκτός από τα τρόφιμα, η έρευνα γύρω από τις πιθανές χρήσεις του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος έχει επεκταθεί και σε άλλους τομείς, όπως αυτός της ιατρικής με πολλές εφαρμογές να βρίσκονται υπό έρευνα.

Η απολύμανση και η αποστείρωση εργαλείων ή/και επιφανειών από διάφορα παθογόνα, όπως βακτήρια, ιοί και μύκητες είναι μία από αυτές τις εφαρμογές και είναι αρκετά πιο αποτελεσματική από τις συμβατές μεθόδους που χρησιμοποιούνται συνήθως. Πιο αναλυτικά, η χρήση ατμού, αλκοόλης, UV ακτινοβολίας κ.α. παρουσιάζουν κάποια μειονεκτήματα όσον αφορά την αποτελεσματικότητα τους και μπορούν να προκαλέσουν μη επιθυμητές παρενέργειες όπως ο ερεθισμός του δέρματος του ασθενή ή η καταστροφή των εργαλείων (Domonkos et al., 2021).

Ειδικά για ορισμένους παθογόνους μικροοργανισμούς που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και αποτελούν ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα όσον αφορά τις ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις, όπως ο ανθεκτικός στην μεθικιλίνη σταφυλόκοκκος (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* MRSA) και οι ανθεκτικοί στην βανκομυκίνη εντερόκοκοι, φαίνεται ότι το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αντιμετώπισή τους.

Η χρήση του έχει επεκταθεί και σε άλλους τομείς της ιατρικής, πέρα από το κομμάτι της αποστείρωσης εξοπλισμού. Για παράδειγμα υπάρχουν υπό μελέτη εφαρμογές του που αφορούν την χρήση του ως άμεση θεραπευτική παρέμβαση, όπως η επούλωση πληγών, δεδομένου ότι το πλάσμα δεν λειτουργεί καταστροφικά σε αυτή την περίπτωση για τα κύτταρα του ασθενή, ούτε προκαλεί κάποιο έγκαυμα στην πληγή του. Είναι μια μέθοδος που δεν προκαλεί πολύ έντονο πόνο στον ασθενή και χαρακτηρίζεται από βιοσυμβατότητα και βιοασφάλεια. Επιπλέον εφαρμογές του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος ερευνώνται στον κλάδο της δερματολογίας με εφαρμογές στο κομμάτι της αισθητικής, για τη λείανση και μείωση ρυτίδων και της οδοντιατρικής σε εφαρμογές που αφορούν λεύκανση δοντιών, απομάκρυνση οδοντικής πλάκας κ.α. ενώ μελετάται επίσης και η επίδραση που έχει σε διαφορετικά είδη καρκινικών κυττάρων και συγκεκριμένα στη μείωση του μεγέθους των όγκων, στην καθυστέρηση της μετάστασης και στη θανάτωση των καρκινικών κυττάρων (Morabit et al., 2020).

1.2 Τεχνικά χαρακτηριστικά πλάσματος

Το πλάσμα χαρακτηρίζεται ως η τέταρτη κατάσταση της ύλης (στερεό, υγρό, αέριο & πλάσμα) και στην πραγματικότητα αποτελεί την κυρίαρχη κατάσταση της συνολικής ποσότητας ύλης στο διάστημα αγγίζοντας το 97-99% (Bora et al., 2020). Αν και πήρε το όνομα του από τον Αμερικανό χημικό και φυσικό Irving Langmuir το 1928, η ύπαρξη του ήταν ήδη γνωστή το 1879 από έναν Άγγλο χημικό τον William Crookes. Ο συγκεκριμένος στα πειράματα του εφάρμοζε ηλεκτρικό ρεύμα σε καθοδικό σωλήνα, ο οποίος περιείχε κάποιο ευγενές αέριο, με αποτέλεσμα την παραγωγή φωτός. Έτσι χαρακτήρισε αυτή την νέα μορφή της ύλης ως «ύλη που ακτινοβολεί» (radiant matter). Μερικά χρόνια αργότερα και συγκεκριμένα το 1897 ο J. J. Thomson ήταν εκείνος που ανακάλυψε μέσα από πολύ πρωτοποριακά για την εποχή του πειράματα, ότι αυτή η νέα μορφή της ύλης αποτελείται από φορτισμένα σωματίδια. Παραδείγματα που συναντάμε στην φύση είναι: ο ήλιος και τα υπόλοιπα άστρα, οι κεραυνοί, η ιοντόσφαιρα της γης και το βόρειο σέλας. Επιπλέον υπάρχουν και πλάσματα που έχουν δημιουργηθεί τεχνητά όπως τα φώτα νέον ή οι σφαίρες πλάσματος.

Το πλάσμα οφείλει να πληροί δύο βασικές προϋποθέσεις. Η πρώτη είναι ότι παρόλο που αποτελείται από φορτισμένα σωματίδια είναι σχεδόν ουδέτερο σαν σύνολο (quasi-neutral) και η δεύτερη ότι έχει μια συλλογική συμπεριφορά (collective behavior). Αυτές οι δύο μοναδικές του ιδιότητες το διαχωρίζουν από ένα αέριο. Τόσο ένα αέριο όσο και το πλάσμα είναι ουδέτερα σαν σύνολο, ωστόσο ένα αέριο αποτελείται από επίσης ουδέτερα σωματίδια, σε αντίθεση με το πλάσμα. Ακριβώς επειδή όλα τα σωματίδια του είναι φορτισμένα, οτιδήποτε συμβεί επηρεάζει τα πάντα μέσα σε αυτό. Τέλος, μπορεί να χαρακτηριστεί και ως ιοντισμένο αέριο από το οποίο μπορεί να διέρχεται ηλεκτρισμός.

1.2.1 Κατηγοριοποίηση με βάση τη θερμοκρασία

Ένας από τους τρόπους κατηγοριοποίησης των ειδών πλάσματος που μπορούν να παραχθούν -είτε με τεχνητό είτε με φυσικό τρόπο- είναι με βάση το εάν βρίσκονται ή όχι σε θερμική ισορροπία. Έτσι προκύπτουν δύο είδη το θερμικό (thermal plasma) και το μη θερμικό πλάσμα (non thermal plasma).

Στο θερμό πλάσμα, η θερμοκρασία του οποίου κυμαίνεται μεταξύ 10^7 - 10^9 °C, τα ηλεκτρόνια και τα ιόντα έχουν την ίδια ενέργεια, βρίσκονται δηλαδή σε θερμική ισορροπία (thermal equilibrium), δεν υπάρχει μεταφορά ενέργειας μεταξύ των σωματιδίων και το αέριο είναι ιοντισμένο στο μεγαλύτερο ποσοστό. Τέτοιου είδους πλάσμα συναντάται κυρίως στα φυσικά φαινόμενα (ήλιος, κεραυνοί) και απελευθερώνεται μεγάλο ποσό ενέργειας. Είναι προφανές ότι η χρήση θερμού πλάσματος σε εφαρμογές πάνω σε τρόφιμα θα ήταν καταστροφική για την ποιότητά τους και για αυτόν το λόγο το θερμό πλάσμα χρησιμοποιείται σε εφαρμογές παραγωγής ενέργειας, όπως το πλάσμα σύντηξης (fusion plasma), που παράγει τεράστια ποσά ενέργειας και σε άλλες εφαρμογές όπως για παράδειγμα μηχανήματα πλάσματος κοπής μετάλλων (plasma cutter) που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην ανάπτυξη θερμοκρασιών της τάξης των εκατομμυρίων βαθμών Κελσίου. (Niemira, 2012; Von Woedtke et al., 2013; Tabares και Junkar, 2021)

Σε αντίθεση με ότι αναφέρθηκε παραπάνω, το μη θερμικό πλάσμα δε βρίσκεται σε θερμική ισορροπία ούτε είναι πλήρως ιοντισμένο. Υπάρχει ανομοιομορφία στη κατανομή της ενέργειας (non-equilibrium) στα σωματίδια που το απαρτίζουν, καθώς τα ηλεκτρόνια που υπάρχουν έχουν πολύ υψηλή ενέργεια και θερμοκρασία (5000°C - 10^5 °C) ενώ τα ιόντα και τα ουδέτερα σωματίδια παραμένουν σε χαμηλή θερμοκρασία (25°C - 100°C). Έτσι με κάθε σύγκρουση είναι πιθανό να μεταφερθεί ενέργεια από τα φορτισμένα ηλεκτρόνια στα πιο βαριά σωματίδια με αποτέλεσμα την διέγερση των τελευταίων. Η συνολική θερμοκρασία του ωστόσο παραμένει χαμηλή κάτι που το καθιστά ιδανικό για χρήση σε εφαρμογές που

απαιτούν ήπια επεξεργασία ή διαχείριση θερμικά ευαίσθητων υλικών. Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (cold atmospheric pressure plasma, CAPP) ανήκει στην κατηγορία των μη θερμικών πλάσμάτων και παράγεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμοσφαιρική πίεση.

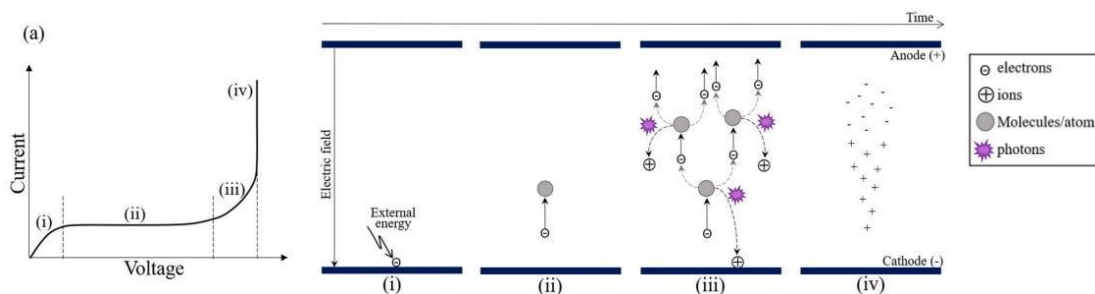
1.3 Ψυχρό Ατμοσφαιρικό Πλάσμα

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (Cold Atmospheric Pressure Plasma, CAPP) είναι μια καινοτόμος τεχνολογία, νέα για τα δεδομένα του κλάδου των τροφίμων, που όμως φαίνεται πολλά υποσχόμενη εάν χρησιμοποιηθεί στα πλαίσια της μείωσης των μικροβιακών κινδύνων ενώ παράλληλα υπάρχουν και μελέτες που δείχνουν ότι μπορεί να συνεισφέρει και στην ενίσχυση των ποιοτικών χαρακτηριστικών σε φρούτα όπως επίσης και στην απενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων (Ahmad et al., 2019).

1.3.1 Μηχανισμός & Μέθοδοι Παραγωγής Ψυχρού Ατμοσφαιρικού Πλάσματος

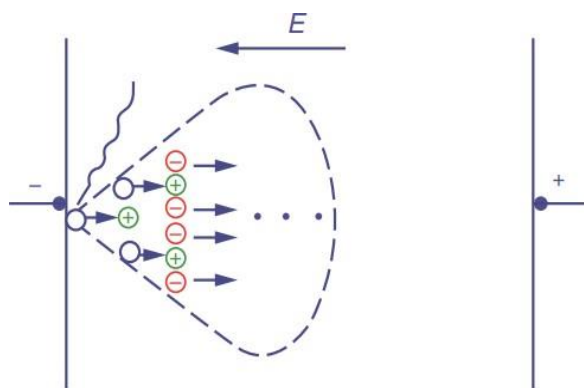
Τα αέρια κάτω από φυσιολογικές συνθήκες δεν είναι αγωγίμα μέσα και χρησιμοποιούνται για τις μονωτικές τους ιδιότητες. Ωστόσο, αυτό δεν συνεπάγεται ότι δεν περιέχουν φορτισμένα σωματίδια στον συνολικό τους όγκο, απλώς αυτά βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις για να επιτρέψουν την διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος. Για παράδειγμα, στην ατμόσφαιρα βρίσκονται περίπου 1000 ιόντα (θετικά και αρνητικά φορτισμένα) ανά κυβικό εκατοστό. Αυτό αλλάζει στην παρουσία ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου, όπου για μια ορισμένη τιμή τάσης (breakdown voltage, V_b) και πάνω το αέριο καθίσταται αγωγίμο (Εικόνα 1.1) (Tabares και Junkar, 2021; Laroque et al., 2022).

Πιο αναλυτικά, με την προσφορά ενέργειας στο σύστημα αυξάνεται η κινητική ενέργεια των μορίων και ηλεκτρόνια απελευθερώνονται από την επιφάνεια της καθόδου. Με την αύξηση της τιμής της τάσης, αυξάνεται και η ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος (i) μέχρι ενός σημείου, όπου φαίνεται να υπάρχει προσωρινά κορεσμός (ii), με την τιμή του ρεύματος να παραμένει σταθερή όσο συνεχίζει να αυξάνεται η τάση μεταξύ ανόδου και καθόδου και τα ηλεκτρόνια μετακινούνται προς την άνοδο, αντίθετα δηλαδή από την φορά του ηλεκτρικού πεδίου. Κατά την μετακίνηση τους συγκρούονται ελαστικά (δηλαδή χωρίς μεταβολή της εσωτερικής τους ενέργειας) με άλλα σωματίδια στον χώρο, χωρίς όμως να είναι σε θέση να τα ιοντίσουν ή να τα διεγείρουν, καθώς δεν έχουν αποκτήσει ακόμα την απαραίτητη ενέργεια. Μόλις καταφέρουν να την αποκτήσουν, οι συγκρούσεις πλέον μετατρέπονται σε ανελαστικές (iii), δημιουργώντας με κάθε σύγκρουση νέα ιόντα και ελεύθερα ηλεκτρόνια, τα οποία μετακινούνται με διαφορετικό τρόπο λόγω διαφορετικού φορτίου και βάρους, συντελώντας στην περαιτέρω αύξηση του ηλεκτρικού ρεύματος (iv).



Εικόνα 1.1: Διάγραμμα έντασης ηλεκτρικού ρεύματος συναρτήσει της εφαρμοζόμενης τάσης (αριστερά), σχηματική απεικόνιση της έναρξης ιοντισμού του αερίου (δεξιά) (Πηγή: Laroque et al., 2022).

Το φαινόμενο κατά το οποίο δημιουργούνται τα πρώτα φορτισμένα σωματίδια και ξεκινάει μια αλυσιδωτή αντίδραση παραγωγής ελεύθερων ηλεκτρονίων και ιόντων περιγράφει η θεωρία του Townsend. Αποτελεί μια ποσοτική θεωρία που αναπτύχθηκε για την περιγραφή του αρχικού σταδίου της εκκένωσης ενός αερίου (Xiao et al., 2016). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι για να πραγματοποιηθεί η εκκένωση του αερίου είναι απαραίτητο να υπάρχουν κάποια αρχικά ελεύθερα ηλεκτρόνια (initial/seed electrons), διότι χωρίς την



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας μιας ηλεκτρονιακής χιονοστιβάδας (Πηγή: Xiao et al., 2016).

παρουσία τους δεν μπορεί να ξεκινήσει η συγκεκριμένη διαδικασία ασχέτως της τιμής της τάσης που εφαρμόζεται μεταξύ των ηλεκτροδίων. Η ύπαρξη των αρχικών ηλεκτρονίων οφείλεται σε φαινόμενα κοσμικής ακτινοβολίας και εκπομπής ραδιενέργειας ή αποτελούν κατάλοιπα φορτίων από προηγούμενες εκκενώσεις. Με βάση λοιπόν αυτή τη θεωρία, η οποία καλείται και θεωρία της ηλεκτρονιακής χιονοστιβάδας λόγω του ραγδαίου πολλαπλασιασμού των φορτισμένων σωματιδίων στο διάκενο μεταξύ των ηλεκτροδίων, συμβαίνουν τα εξής:

- i. Τα ηλεκτρόνια καθώς κινούνται προς την άνοδο συγκρούονται ανελαστικά με τα άτομα του αερίου, τα οποία και ιοντίζουν δημιουργώντας ελεύθερα ηλεκτρόνια και θετικά ιόντα,
- ii. Στη συνέχεια τα θετικά ιόντα που δημιουργούνται, κινούνται προς την κάθοδο και συγκρούονται επίσης με τα άτομα του αερίου, ιοντίζοντας τα και δημιουργώντας ακόμα περισσότερα ελεύθερα ηλεκτρόνια και φορτισμένα θετικά ιόντα,
- iii. Έπειτα σωματίδια όπως κατιόντα προσκρούουν στην κάθοδο, εκπέμποντας τα λεγόμενα δευτερεύοντα ηλεκτρόνια.

Παρατηρείται ότι τα ιόντα διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους με τα πιο μικρά, γρήγορα και ευκίνητα ηλεκτρόνια (10^5 - 10^6 m/s) να βρίσκονται στο μπροστά μέρος του συγκεκριμένου σχηματισμού, το οποίο αποκαλείται και «κεφάλι» της χιονοστιβάδας και τα μεγαλύτερα και πιο βραδυκίνητα θετικά ιόντα (50-500 m/s) να μένουν στο πίσω μέρος ή στην «ουρά» της χιονοστιβάδας. Οπότε όταν τα ηλεκτρόνια φθάνουν στην άνοδο, τα θετικά ιόντα βρίσκονται πρακτικά στην ίδια ακριβώς θέση και δημιουργείται τοπικά ένα μεγάλο θετικό φορτίο (space charge). Η αύξηση των ελεύθερων ηλεκτρονίων που αποκολλώνται από την κάθοδο λόγω του θετικού φορτίου των ιόντων είναι που οδηγεί σε σχηματισμό νέων χιονοστιβάδων με τελικό αποτέλεσμα την ολική διάσπαση του αερίου.

Μόλις η χιονοστιβάδα που δημιουργείται ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια φτάσει ένα κρίσιμο μέγεθος τότε η υπερπληθώρα θετικών φορτίων που υπάρχει στο χώρο αυτό συνδυαστικά με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο (E_0) οδηγούν σε μια εντατικοποίηση του ιοντισμού των ατόμων του αερίου που προκαλεί σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό ιοντισμό και διέγερση των ατόμων του αερίου στο εμπρόσθιο μέρος της χιονοστιβάδας. Ταυτόχρονα, συμβαίνουν και επανενώσεις ηλεκτρονίων με θετικά ιόντα και σαν αποτέλεσμα προκύπτουν φωτόνια, τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν την παραγωγή των λεγόμενων δευτερευόντων ηλεκτρονίων λόγω του φαινομένου του φωτοιοντισμού. Μόλις η ηλεκτρονιακή χιονοστιβάδα διασχίσει την απόσταση μεταξύ των δύο ηλεκτροδίων και σχηματιστεί ανάμεσα τους πολύ υψηλό φορτίο, ενισχύεται τοπικά το ηλεκτρικό πεδίο ($E > E_0$) και

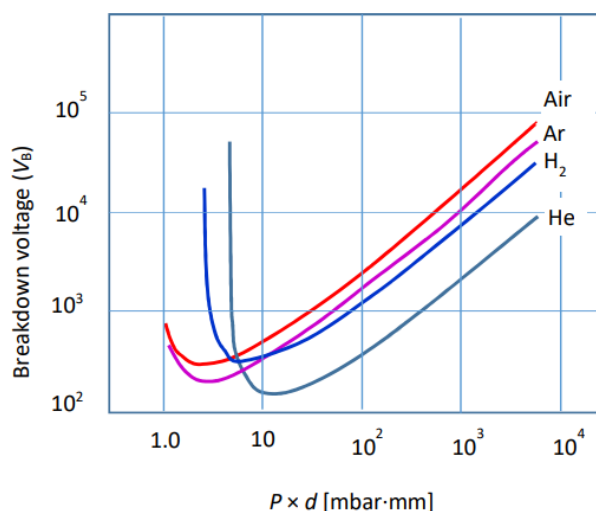
πυροδοτείται η δημιουργία νέων χιονοστιβάδων ηλεκτρονίων. Η διαταραχή του ηλεκτρικού πεδίου και της αύξησης της «ιοντισμένης» περιοχής μεταξύ ανόδου και καθόδου που προκαλείται από την παραπάνω αλληλουχία έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός καναλιού πλάσματος ή streamer. Δεδομένου ότι ηλεκτρόνια και φωτόνια κινούνται με την ταχύτητα του φωτός, προφανώς η διαδικασία ανάπτυξης ενός καναλιού πλάσματος μεταξύ ανόδου και καθόδου γίνεται με αστραπιαία ταχύτητα. Συγκεκριμένα η ηλεκτρική σχάση σε ατμοσφαιρική πίεση λαμβάνει χώρα συνήθως σε μια χρονική κλίμακα της τάξης των δεκάδων νανοδευτερολέπτων (Scholtz et al., 2015; Nwabor et al., 2022).

Στην περίπτωση που η πυκνότητα ιοντισμένων φορτίων που προϋπάρχει είναι μεγαλύτερη και συγκεκριμένα της τάξης των 10^3 - 10^4cm^{-3} για τον αέρα, τότε εμφανίζονται διαφορές σε σχέση με όσα αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα, οι ηλεκτρονιακές χιονοστιβάδες που δημιουργούνται αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και τείνουν να συγχωνεύονται. Αυτό το φαινόμενο ομαλοποιεί τις διαφορές φορτίου που δημιουργούνται κατά τόπους συντελώντας στην πιο ομοιόμορφη κατανομή και πυκνότητα αυτού.

Συνέχεια των παραπάνω αποτελεί η σχέση του Paschen, σύμφωνα με την οποία για ένα συγκεκριμένο αέριο η συνάρτηση της πίεσης (p) και της απόστασης μεταξύ των ηλεκτροδίων (d), καθορίζουν την τάση που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί και να είναι αυτοδιατηρούμενη η ηλεκτρική σχάση του αερίου (Bruggeman et al, 2017). Η σχέση που αποδίδει την τιμή της τάσης αυτής (Breakdown voltage, V_b) είναι η ακόλουθη:

$$V_b = \frac{B \cdot p \cdot d}{C + \ln(p \cdot d)} \quad (1.1)$$

όπου τα B και C είναι σταθερές που εξαρτώνται από το μείγμα αερίων που μελετάται και το υλικό της καθόδου (Tabares and Junkar, 2021).



Εικόνα 1.3: Διάγραμμα της εξάρτησης της τιμής της ηλεκτρικής σχάσης (V_b) από το γινόμενο $p \cdot d$ για διάφορα αέρια. Πηγή: Tabares and Junkar, 2021).

Όπως φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα, η τιμή της τάσης που απαιτείται για την ηλεκτρική σχάση των αερίων παίρνει πολύ μεγάλες τιμές όταν το γινόμενο $p \cdot d$ είναι μικρό και αυτό οφείλεται στον μικρό αριθμό συγκρούσεων που συμβαίνουν, συνεπώς αυξάνεται η απαιτούμενη ενέργεια για την παραγωγή πλάσματος. Ομοίως και όταν το γινόμενο $p \cdot d$ παίρνει μεγάλες τιμές, αυτή τη φορά η αύξηση της απαιτούμενης τάσης οφείλεται στον πολύ μεγάλο αριθμό συγκρούσεων, οι οποίες προκαλούν απώλειες ενέργειας με αποτέλεσμα την αύξηση της ενέργειας που χρειάζεται για να διατηρηθεί το πλάσμα. Είναι εμφανές ότι

όλες οι καμπύλες έχουν παρεμφερές σχήμα και παρουσιάζουν ένα ελάχιστο στην τιμή της τάσης V_b , το οποίο είναι διαφορετικό για κάθε αέριο, ωστόσο η περιοχή που εμφανίζεται αυτό το ελάχιστο μπορεί να περιοριστεί σε μια συγκεκριμένη περιοχή τιμών (μεταξύ των 130 – 1300 Pa·cm (Bruggeman et al, 2017).

Για την επεξεργασία τροφίμων οι κυριότεροι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται από την βιομηχανία για την παραγωγή πλάσματος είναι οι ακόλουθοι (Scholtz et al., 2015; Laroque et al., 2022; Nwabor et al., 2022):

- Dielectric barrier discharge (DBD),
- Plasma jet (PJ),
- Corona discharge (CD),
- Radiofrequency (RF) & microwave (MW) plasma systems.

Dielectric barrier discharge (DBD)

Η εκκένωση μέσω διηλεκτρικού φράγματος για την παραγωγή ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAPP) πραγματοποιείται ανάμεσα σε δύο μεταλλικά ηλεκτρόδια, στο ένα εκ των οποίων εφαρμόζεται υψηλή τάση και το δεύτερο αποτελεί την γείωση του συστήματος. Η απόσταση μεταξύ τους ποικίλει από 0.1 mm έως και μερικά εκατοστά, ενώ ένα ή και τα δύο ηλεκτρόδια μπορεί να είναι επικαλυμμένα με κάποιο διηλεκτρικό υλικό όπως γυαλί, χαλαζία, ή κάποιο κεραμικό ή πολυμερές υλικό. Αναφορικά με τις προδιαγραφές της συγκεκριμένης διάταξης, χρησιμοποιούνται πιέσεις αερίου από 10^4 έως 10^6 Pa και το εύρος των συχνοτήτων κυμαίνεται από 10 έως 50 MHz. Επιπλέον λειτουργεί και με εναλλασσόμενο (AC) και με συνεχές (DC) ρεύμα με το πλάτος τάσης να βρίσκεται από 1 έως 100 kV_{rms}.

Η ευελιξία που υπάρχει όσον αφορά το σχήμα του ηλεκτροδίου αλλά και το υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για την επικάλυψη του, καθιστούν αυτή την μέθοδο παραγωγής πλάσματος μια από τις πιο διαδεδομένες και εύκολες στη χρήση. Αυτό οφείλεται στις πολλές εφαρμογές που προσφέρει αυτή η ευελιξία συνδυαστικά με το μικρό κόστος που έχει εάν εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα. Όσον αφορά τον τομέα των τροφίμων, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η χρήση του σε ήδη συσκευασμένα τρόφιμα, όπως φρούτα, λαχανικά, πουλερικά και γενικότερα κρέατα. Η παραγωγή πλάσματος λαμβάνει χώρα μέσα στη συσκευασία, παρατείνοντας έτσι το χρόνο επαφής των δραστικών του συστατικών (ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου, RONS) με το τρόφιμο και παράλληλα μειώνεται ο κίνδυνος επιμόλυνσης σε μεταγενέστερο στάδιο επεξεργασίας.

Plasma jet (PJ)

Η διαμόρφωση τύπου jet, παράγει ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα, όταν το αέριο διέλθει μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, τα οποία συνήθως έχουν σχήμα δαχτυλιδιού ή είναι ομοαξονικά (Εικόνα 1.4b). Στην περίπτωση των ομοαξονικών ηλεκτροδίων το εσωτερικό είναι αυτό που διεγείρεται με χρήση ραδιοσυχνοτήτων (RF) συνήθως στα 13.56 MHz και είναι υπεύθυνο για την επιτάχυνση των ελεύθερων ηλεκτρονίων που θα συγκρουστούν με τα μόρια του αερίου προς σχηματισμό των δραστικών ενώσεων οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), ενώ το εξωτερικό ηλεκτρόδιο είναι γειωμένο. Καθώς το αέριο εισέρχεται ανάμεσα στα ηλεκτρόδια, ιοντίζεται και εξέρχεται από το ακροφύσιο ως πλάσμα στο περιβάλλον. Τα ηλεκτρόδια βρίσκονται σε απόσταση μερικών χιλιοστών (mm) και οι τάσεις μεταξύ των οποίων λειτουργεί βρίσκονται στα 10^2 έως 10^4 V.

Η εκκένωση που παράγεται από την συγκεκριμένη διάταξη είναι σταθερή και ομοιογενής και το jet είναι εύκολο στη χρήση. Επιπλέον υπάρχουν αναφορές για χρήση του σε τρόφιμα όμως όταν η περιοχή εφαρμογής είναι μεγάλη, υπάρχει περιορισμός λόγω της μικρής ακτίνας που έχει το πλάσμα όταν εξέρχεται από το ακροφύσιο. Σε αυτή την περίπτωση προτείνεται η χρήση μιας διάταξης πολλαπλών jet που θα καλύπτουν την απαιτούμενη περιοχή.

Corona discharge (CD)

Ο συγκεκριμένος τύπος εκκένωσης διαφοροποιείται σε σχέση με τους παραπάνω σε αρκετά σημεία όσον αφορά την διάταξη αλλά και το παραγόμενο πλάσμα. Καταρχάς, τα ηλεκτρόδια είναι ανόμοια μεταξύ τους και πιο συγκεκριμένα το ηλεκτρόδιο στο οποίο εφαρμόζεται η υψηλή τάση είναι κάποιο πολύ μικρό και οξύ σημείο όπως η άκρη από ένα λεπτό καλώδιο και βρίσκεται απέναντι από το γειωμένο ηλεκτρόδιο, το οποίο έχει σχήμα επίπεδο και κυλινδρικό. Επιπλέον με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα μια διάταξη τύπου κορώνα λειτουργεί τόσο με εναλλασσόμενο (AC) όσο και με συνεχές (DC) ρεύμα και οι τάσεις που επιβάλλονται, κυμαίνονται μεταξύ 60 και 100 kV, ενώ το κενό εκκένωσης παίρνει τιμές από 10 έως 30 mm.

Λόγω της κατασκευής της συγκεκριμένης διάταξης το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα που παράγεται, βρίσκεται κυρίως γύρω από το ηλεκτρόδιο στο οποίο εφαρμόζεται τάση και επιπλέον είναι χαρακτηριστικά ανομοιογενές κάτι που περιορίζει το εύρος εφαρμογής του. Συγκριτικά με τις προαναφερθείσες μεθόδους το πλάσμα που παράγεται είναι πιο ενεργητικό και με μεγαλύτερη πυκνότητα από αυτό του διηλεκτρικού φράγματος και όσον αφορά την περιοχή κάλυψης υπερσχύει του jet, συνεπώς βρίσκει περισσότερες εφαρμογές σε τρόφιμα σε σχέση με το τελευταίο.

Radio frequency discharge (RF)

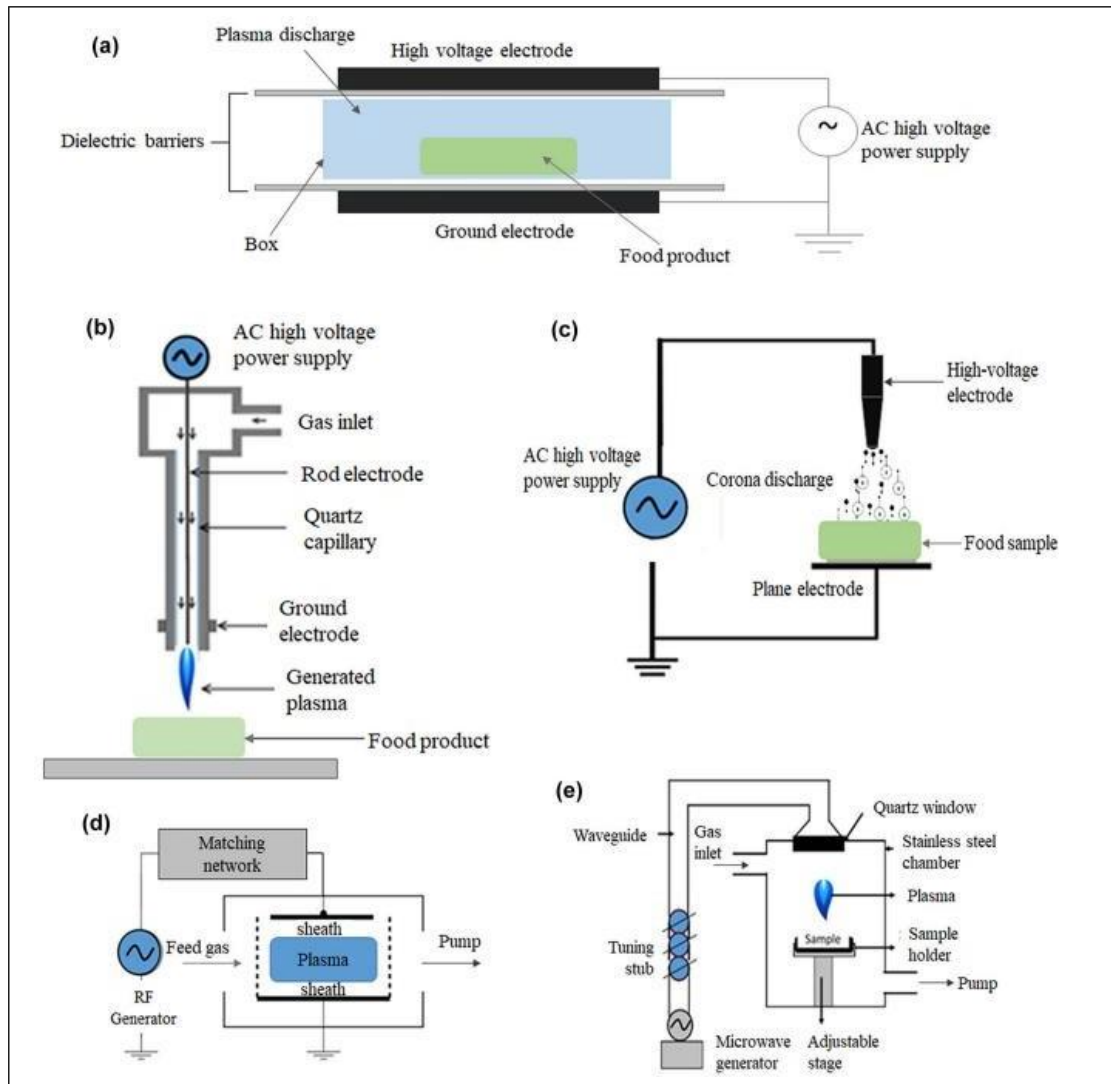
Ένας ακόμη τρόπος παραγωγής ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος είναι με εφαρμογή ενός πεδίου ραδιοσυχνοτήτων σε μια ροή αερίου. Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι που υπάγονται σε αυτή την κατηγορία: το επαγωγικά συζευγμένο πλάσμα (inductively coupled plasma, ICP), το χωρητικά συζευγμένο πλάσμα (capacitively coupled plasma, CCP) και πηγές κυμάτων ηλίου (helicon wave sources) με τους δύο πρώτους να συναντώνται πιο συχνά σε βιομηχανικό επίπεδο.

Στην διάταξη του χωρητικά συζευγμένου πλάσματος (CCP) το αέριο διέρχεται ανάμεσα από δύο ηλεκτρόδια, τα οποία είναι τοποθετημένα παράλληλα μεταξύ τους, σε απόσταση μερικών εκατοστών και βρίσκονται μέσα σε έναν θάλαμο όπου επικρατούν συνθήκες κενού. Μόλις εφαρμοστεί εναλλασσόμενη τάση ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια, υπάρχει παραγωγή ραδιοσυχνοτήτων που έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα τον ιοντισμό του αερίου προς παραγωγή πλάσματος, το οποίο σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα έχει πυκνότητα όσον αφορά τα ηλεκτρόνια και τα ιόντα μεταξύ 10^{15} - 10^{16} m⁻³.

Microwave discharge (MW)

Σε αντίθεση με ότι αναφέρθηκε παραπάνω η συγκεκριμένη διάταξη δεν χρησιμοποιεί ηλεκτρόδια αλλά μια γεννήτρια μικροκυμάτων που καλείται μαγνητόνιο (magnetron), η οποία λειτουργεί σε συχνότητα 2.45 GHz. Τα παραγόμενα κύματα οδηγούνται προς ένα θάλαμο όπου το αέριο που υπάρχει τα απορροφάει και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να θερμαίνεται και να ιοντίζεται, απελευθερώνοντας ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια στη συνέχεια συγκρούονται ανελαστικά απελευθερώνοντας ενέργεια υπό μορφή φωτονίων UV ακτινοβολίας και ορατού φωτός. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που δημιουργείται επιταχύνει τα ηλεκτρόνια από το αέριο και οδηγεί εν τέλη στην δημιουργία πλάσματος.

Στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου συγκαταλέγεται η αυξημένη πυκνότητα ηλεκτρονίων στο ιοντισμένο αέριο και η παραγωγή με μεγάλη αποδοτικότητα πολύ δραστικών συστατικών (reactive species), που είναι και απαραίτητα όσον αφορά την αντιμικροβιακή επίδραση του πλάσματος, όπως θα αναλυθεί και αργότερα. Για αυτό και χρησιμοποιείται σε εφαρμογές που σχετίζονται με αποστείρωση και απολύμανση επιφανειών. Παρόλα αυτά το υψηλό κόστος λειτουργίας και η συνεχής φροντίδα που απαιτεί δεν έχουν επιτρέψει την πολύ ευρεία χρήση του.



Εικόνα 1.4 : Διαφορετικές διατάξεις παραγωγής ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος που έχουν εφαρμογή στον τομέα της ασφάλειας τροφίμων (Πηγή: Nwabor et al., 2022)

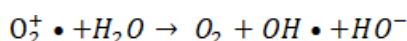
1.3.2 Σύσταση πλάσματος

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (CAPP), το οποίο δημιουργείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμοσφαιρική πίεση απαρτίζεται από ένα μίγμα σωματιδίων - φορτισμένων και μη- και η σύσταση του μίγματος αυτού καθορίζεται από το αέριο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται ως πηγή παραγωγής ορισμένα ευγενή αέρια όπως το Ήλιο (He), το Αργό (Ar) και το Νέον (Ne) είτε αυτούσια είτε μίγμα των παραπάνω με το οξυγόνο (O₂) ενώ ακόμη υπάρχουν αναφορές και για χρήση αζώτου (N₂) και ατμοσφαιρικού αέρα. Επιπλέον η σύσταση του πλάσματος διαφοροποιείται με την παρουσία υγρασίας (Bora et al., 2022; Nwabor et al., 2022).

Η ακτινοβολία του πλάσματος αποτελείται από μια πληθώρα πολύ δραστικών παραγόντων όπως ιόντα (θετικά και αρνητικά φορτισμένα), φωτόνια UV, ελεύθερες ρίζες, ελεύθερα ηλεκτρόνια και γενικότερα φορτισμένα σωματίδια. Ανάμεσα στα πιο δραστικά του συστατικά ανήκουν οι λεγόμενες δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROS) και του αζώτου (RNS). Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται στα ROS, το ατομικό οξυγόνο (O), το

μονήρες οξυγόνο ($^1\text{O}_2$), το διεγερμένο οξυγόνο (O_2^*), το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), το όζον (O_3) και στα RNS, το ατομικό άζωτο (N), το θετικό ιόν του αζώτου (N^+), το διεγερμένο άζωτο (N^*), το μονοξειδίου του αζώτου (NO) και η ελεύθερη ρίζα του ($\text{NO}\cdot$). Στην περίπτωση όπου υπάρχει υγρασία κατά την εκκένωση τότε εμφανίζονται επιπλέον ενώσεις όπως: H_2O^+ , $\text{OH}\cdot$, OH^- και H_2O_2 (Sruthi et al., 2022)

Ανάμεσα στις πιο δραστικές ρίζες που δημιουργούνται κατά την παραγωγή πλάσματος συγκαταλέγονται οι ρίζες υδροξυλίου και συναντώνται σε όλα τα είδη πλάσματος. Η αυξημένη υγρασία συντελεί σε αυξημένο ποσοστό των συγκεκριμένων ριζών στο συνολικό μίγμα όπως έχει ήδη αναφερθεί και η δημιουργία τους είναι αποτέλεσμα τριών διαφορετικών φαινομένων. Μέσω της ηλεκτρονιακής προσβολής των μορίων του νερού που οδηγεί στη διάσπαση του, μέσω ηλεκτρονιακής διέγερσης ατόμων οξυγόνου ή μέσω της αντίδρασης :



Στον Πίνακα 1.1 που ακολουθεί παρατίθενται οι τυπικές τιμές της πυκνότητας των κύριων ειδών ριζών οξυγόνου (ROS), ανάλογα την μέθοδο παραγωγής πλάσματος που επιλέγεται.

Πίνακας 1.1: Τυπικές τιμές για την πυκνότητα των διάφορων ριζών οξυγόνου στο πλάσμα αναλόγως την μέθοδο παραγωγής του (Πηγή: Gaunt et al., 2006).

Πηγή παραγωγής πλάσματος	Τυπική πυκνότητα (cm^{-3})			
	O^+ , O_2^+ , O^\bullet	O	O_3	Φορτισμένα σωματίδια στο πλάσμα
Εκκένωση σε χαμηλή πίεση	10^{10}	10^{14}	$<10^{10}$	$10^8 - 10^{13}$
Εκκένωση τύπου κορώννα	10^{10}	10^{12}	10^{18}	$10^{16}-10^{19}$
Εκκένωση μέσω διηλεκτρικού φράγματος	10^{10}	10^{12}	10^{18}	$10^{12}-10^{15}$
Τζετ	10^{12}	10^{16}	10^{16}	$10^{11}-10^{12}$

Η σύσταση του πλάσματος διαδραματίζει έναν από τους σημαντικότερους ρόλους στην αποτελεσματικότητα που θα έχει εν τέλη, καθώς όσο μεγαλύτερη η «περιεκτικότητα» σε RONS, τόσο μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση έχει βρεθεί ότι έχει (Gaunt et al., 2006). Συνεργιστικά με την σύστασή του και συνεπώς την επιλογή του αερίου που χρησιμοποιείται, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες όπως ο χρόνος έκθεσης στο πλάσμα, η απόσταση των ηλεκτροδίων η τάση και η συχνότητα που χρησιμοποιείται (Laroque et al., 2022), που καθορίζουν το πόσο επιτυχημένη θα είναι τελικά η συγκεκριμένη τεχνολογία όταν χρησιμοποιηθεί. Η επιλογή του βέλτιστου μίγματος αερίων, συνδυαστικά με την επιλογή της κατάλληλης διάταξης για την παραγωγή του ψυχρού πλάσματος είναι εξαιρετικής σημασίας για την επιτυχή χρήση της συγκεκριμένης μεθόδου.

1.4 Η συσκευή kINPen

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAPP) μια συσκευή jet (μοντέλο kINPen® IND) που αποτελείται από την συσκευή παροχής ενέργειας και αερίου, ένα εξάρτημα που παρομοιάζει σε στυλό από το οποίο εξέρχεται το παραγόμενο πλάσμα και ένα σωλήνα μήκους 1 m που τα ενώνει. Το συγκεκριμένο μοντέλο λειτουργεί τόσο με ευγενή αέρια, με μοριακά αέρια όπως οξυγόνο(O₂) ή άζωτο (N₂) αλλά και με συμπιεσμένο ατμοσφαιρικό αέρα ως το φέρον αέριο, προσαρμόζοντας κάθε φορά την κατάλληλη κεφαλή ενώ η θερμοκρασία του αερίου δεν



<https://www.neoplas.eu/en/industry.html>

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.6 το πλάσμα εξέρχεται από το ακροφύσιο με την μορφή ενός φωτεινού «λοφίου» μήκους περίπου 1 cm. Εάν το φέρον αέριο είναι καθαρό άζωτο, τότε το «λοφίο» έχει μήκος μεταξύ 9-13 mm αναλόγως με την εφαρμοζόμενη ροή αερίου. Αν και αυτή η διάταξη επιτρέπει την ευκολότερη και πολύ πιο στοχευμένη χρήση του ακόμα και σε περιπτώσεις που απαιτείται μεγάλη ακρίβεια, μπορεί να αποδειχθεί και αρκετά περιοριστική καθώς δεν μπορεί να καλύψει ομοιόμορφα μεγάλες επιφάνειες.

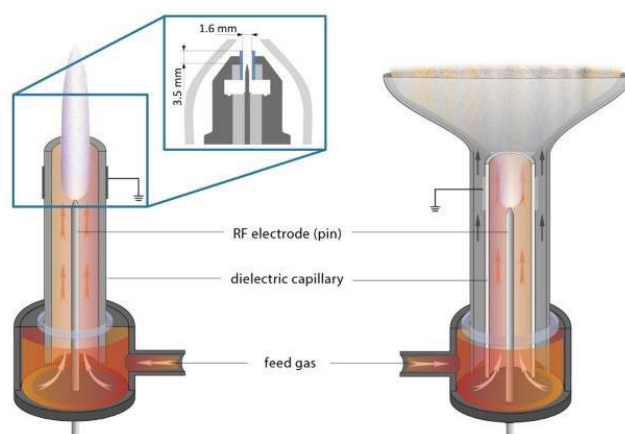
ξεπερνά τους 40⁰ C. Λειτουργεί με ημιτονοειδή συχνότητα ίση με 1 MHz, η ισχύς του συστήματος εκτιμάται περίπου στα 20 W ενώ όσον αφορά τις απώλειες σε ισχύ αυτές δεν ξεπερνούν τα 3.5 W γιατί μέγιστη τάση από 2-6 kV. Επιπλέον, η ροή του αερίου κυμαίνεται συνήθως από 3 έως 5 λίτρα ανά λεπτό (standard liters per minute,slm).



Εικόνα 1.6: Το "λοφίο" που σχηματίζεται κατά την έξοδο του πλάσματος από το ακροφύσιο της κεφαλής (Khlyustova et al., 2021)

Στην παρακάτω εικόνα, απεικονίζεται το αέριο όπως εισέρχεται σε ένα διηλεκτρικό κεραμικό σωλήνα (dielectric capillary), στο εσωτερικό του οποίου υπάρχει το κεντρικό ηλεκτρόδιο διαμέτρου 1mm που καταλήγει σε μια πολύ λεπτή άκρη (tip). Επιπλέον υπάρχει ακόμα ένα ηλεκτρόδιο, το εξωτερικό που αποτελεί την γείωση. Η απόσταση από την άκρη του ηλεκτροδίου (tip) μέχρι το ακροφύσιο (nozzle) είναι ίση με 3.5 mm. Η εσωτερική και εξωτερική διάμετρος του διηλεκτρικού κεραμικού σωλήνα είναι ίσες με 1.6 mm και 2 mm αντίστοιχα.

Ο προσδιορισμός της ακριβούς σύστασης του πλάσματος που εξέρχεται από την συσκευή kINPen στο χώρο και στο χρόνο τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό βαθμό δεν είναι κάτι εύκολο, εξαιτίας των μικρών διαστάσεων αλλά και της υψηλής βαθμίδας πυκνότητας του. Σύμφωνα με τους Reuter et al πραγματοποιήθηκε μια σειρά διαφορετικών διαγνωστικών μεθόδων. Στις άμεσες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν



Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση του εξαρτήματος της συσκευής kINPen, με τις δύο κεφαλές (Πηγή: Reuter et al., 2018).

συγκαταλέγονται η φασματοσκοπία εκπομπής (Optical Emission Spectroscopy, OES), η φασματοσκοπία απορρόφησης (Absorption Spectroscopy, AS), οι μετρήσεις Schlieren, phase-resolved OES και η φασματοσκοπία με λέιζερ για φθορισμό και διασκορπισμό ενώ στις έμμεσες αναφέρεται η φασματοσκοπία απορρόφησης, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των δραστικών ειδών που παράγονται από ένα πολλαπλής διεπεράσεως κύτταρο (multipass cell) και επιπλέον διαγνωστικές μέθοδοι που εφαρμόστηκαν σε στερεή, υγρή και αέρια φάση ειδικά σε βιολογικά συστήματα. Εκτός από τις προαναφερθείσες κατηγορίες εφαρμόστηκαν επίσης χρόνο- ή/και χώρο- εξαρτώμενες (time and/or space-resolved) και χρονικά ή/και χωρικά αθροιστικές (time and/or space-averaged) διαγνωστικές μέθοδοι. Στον Πίνακα 1.2 που ακολουθεί αναγράφονται επιλεγμένες ενώσεις που συγκαταλέγονται στις δραστικές μορφές του οξυγόνου και του άζωτου και παράγονται από την συσκευή kINPen, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω μεθόδους.

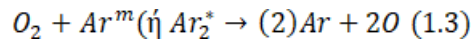
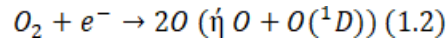
Πίνακας 1.2: Επιλεγμένες ενώσεις που παράγονται από το οξυγόνο (ROS) και το άζωτο (RNS) και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση τους (Πηγή: Reuter et al., 2018).

		Χημικό σύμβολο	Μέθοδος μέτρησης	
ROS	Ρίζες	$O_2 \cdot$ $\cdot OH$ $RO_2 \cdot$ $RO \cdot$ $HO_2 \cdot$	Φασματοσκοπία EPR	
		Μη ρίζες	O_3	Φασματοσκοπία EPR
			$^1O_2, O_2$	Φασματοσκοπία EPR
			H_2O_2 $OCl/HOCl$	Χρωματομετρία Ηλεκτροχημική ανίχνευση
	$ONOO^-/ONOOH$	Ανάλυση χημικής αντίδρασης, χρωματογραφία, χρωματομετρία		
RNS	Ρίζες	$NO \cdot$ $NO_2 \cdot$	Υγρή χρωματογραφία	
	Μη ρίζες	NO^- , HNO NO^+ NO^-/HNO_2 NO_3^-/HNO_3 N_2O_3 NH_4^+	Χρωματομετρία, Χρωματογραφία ιόντων, Φασματοσκοπία μάζας, Ηλεκτροχημική ανίχνευση, Απορρόφηση UV, Φασματοσκοπία AS	

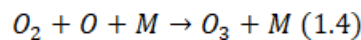
1.4.1 Χημεία των αντιδράσεων

Εκτός από τη σύσταση των δραστικών ενώσεων που υπάρχουν στο πλάσμα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χημεία πίσω από την δημιουργία τους. Για αυτό και έχουν γίνει μελέτες σχετικά με την χημεία των αντιδράσεων που οδηγούν στην παραγωγή τους. Ιδιαίτερη σημασία έχει δοθεί στις δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (RONS) λόγω του κυρίαρχου ρόλου που κατέχουν στις θεραπευτικές εφαρμογές του πλάσματος. Όπως θα αναλυθεί και παρακάτω οι συνθήκες που πρέπει να επικρατούν ώστε να ευνοείται ο σχηματισμός δραστικών ενώσεων του οξυγόνου (ROS) διαφέρει από αυτές που ευνοούν το σχηματισμό δραστικών ριζών του αζώτου (RNS) (Reuter et al., 2018).

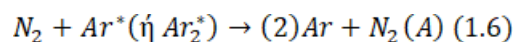
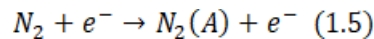
Στα μίγματα που περιέχουν οξυγόνο, το ατομικό οξυγόνο σχηματίζεται κυρίως μέσα στη συσκευή jet και διακρίνονται δύο περιπτώσεις. Εάν το ποσοστό του οξυγόνου στο μίγμα είναι αρκετά χαμηλό (κάτω του 0,2%) τότε το μοριακό οξυγόνο μετατρέπεται σε ατομικό οξυγόνο μέσω της εξίσωσης (1.2) ενώ εάν το ποσοστό είναι μεγαλύτερο (πάνω από 0,2%) τότε το ατομικό οξυγόνο σχηματίζεται με βάση την εξίσωση (1.3) από μετασταθείς ενώσεις (metastables) και διεγέρσεις του Αργού.



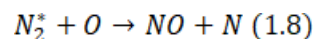
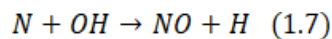
Επιπλέον, η παραγωγή όζοντος, που είναι ένα από τα κυρίαρχα συστατικά του πλάσματος φαίνεται να σχετίζεται και με τα δύο χημικά μονοπάτια (εξισώσεις 1.2 και 1.3) με την βοήθεια ενός σωματιδίου, του επιταχυντή M, μέσω της παρακάτω σχέσης:



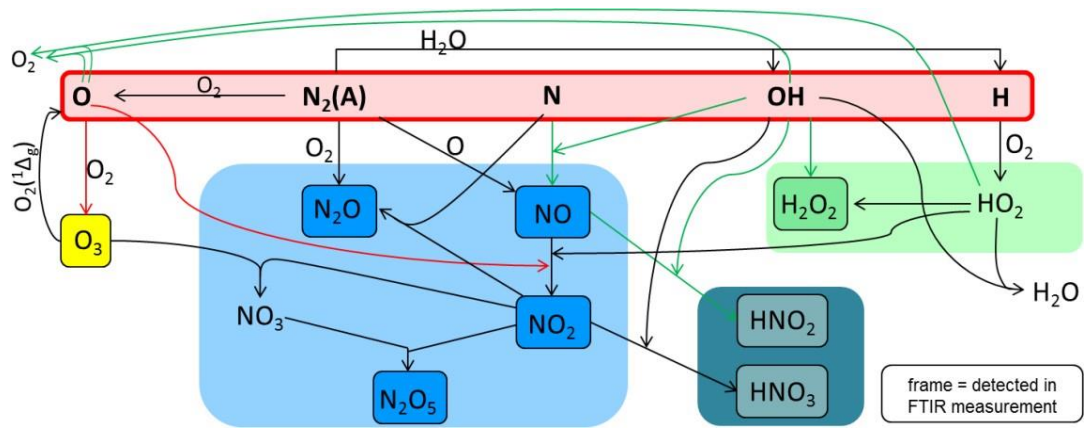
Στην περίπτωση που υπάρχει άζωτο στο μίγμα, τα βασικά χημικά μονοπάτια για τον σχηματισμό των αντίστοιχων διεγερμένων καταστάσεων είναι παρόμοια με αυτά του οξυγόνου όπως φαίνεται και στις εξισώσεις (1.5) και (1.6).



Για την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) υπάρχουν δύο χημικά μονοπάτια, καθένα εκ των οποίων ευνοείται υπό διαφορετικές συνθήκες:



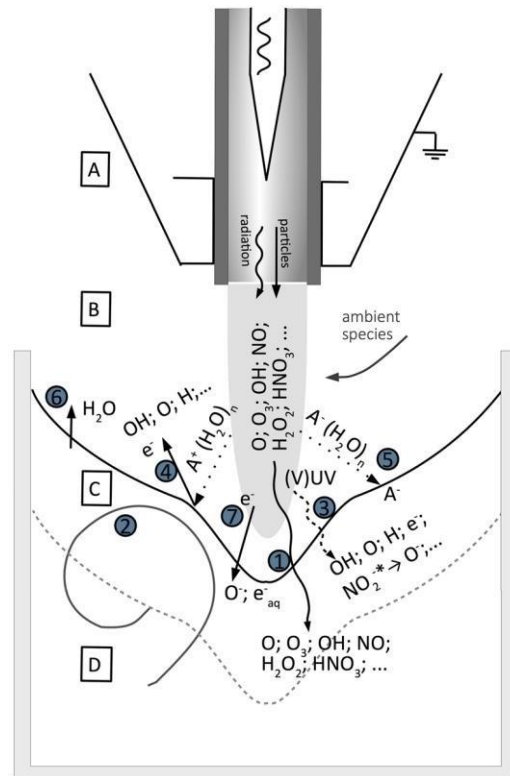
Επιπλέον, αναφέρεται ότι το διοξείδιο του αζώτου (NO₂) δημιουργείται μέσω αντιδράσεων που εμπереύουν τα O, O₃ ή HO₂ και για το υποξείδιο του αζώτου (N₂O) οι χημικές αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα ανάμεσα σε O₂ και μετασταθείς ενώσεις του αζώτου. Στην Εικόνα 1.8 που ακολουθεί, συνοψίζονται όλα όσα αναφέρονται παραπάνω και επιπλέον απεικονίζονται και οι χημικές αντιδράσεις των δευτερευόντων ενώσεων που σχηματίζονται παράλληλα.



Εικόνα 1.8: Κυριότερα χημικά μονοπάτια των αντιδράσεων που προσδιορίστηκαν μέσω ανάλυσης με φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR) (Πηγή: Reuter et al., 2018).

1.4.2 Αλληλεπίδραση ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος με υγρά

Η σχέση μεταξύ της ακτινοβολίας του πλάσματος και ενός υγρού διαλύματος έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας κυρίως λόγω των καινοτόμων ερευνών που αφορούν τον τομέα της ιατρικής. Η αλληλεπίδραση αυτή συνδυάζει αρχές από τα πεδία της βιολογίας της χημείας και της φυσικής και μπορεί να χωριστεί σε τέσσερα διαφορετικά επίπεδα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.9. Το πρώτο επίπεδο (A) αφορά την περιοχή του πυρήνα του πλάσματος στο εσωτερικό τμήμα του jet και αποτελεί για τις αντιδράσεις που θα προκύψουν την αφετηρία όλων των χημικών τους μονοπατιών. Στο δεύτερο επίπεδο (B) συναντάται το «λοφίο» του πλάσματος καθώς αυτό εξέρχεται από το jet και αλληλεπιδρά με την αέρια φάση που υπάρχει στο περιβάλλον. Το τρίτο επίπεδο (C) είναι η διεπιφάνεια υγρού-αερίου-πλάσματος και στο τέταρτο επίπεδο (D) που αφορά την περιοχή του υγρού. Οι περιοχές (B), (C) και (D) συνδέονται μέσω αρκετών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στη διεπιφάνεια όπως για



Εικόνα 1.9: Σχηματική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ πλάσματος και υγρού διαλύματος (Πηγή: Reuter et al., 2018)

παράδειγμα: η μεταφορά μάζας συγκεκριμένων ενώσεων, η φωτόλυση, η εξάτμιση και η πρόσκρουση ή μεταφορά ηλεκτρονίων (Reuter et al., 2018).

1.4.3 Δυναμική πλάσματος

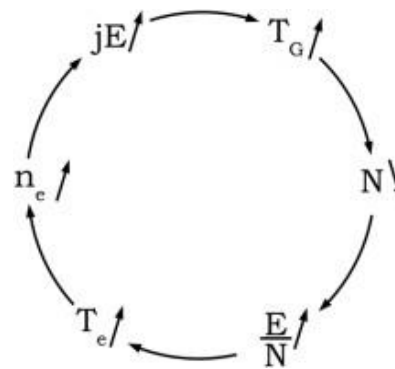
Το ατμοσφαιρικό πλάσμα που παράγεται από την συσκευή kINPen είναι σταθερό, βραχύβιο και χαρακτηρίζεται από ιοντισμό στη νηματώδη έξοδο του. Όπως έχει ήδη αναλυθεί παραπάνω το πλάσμα δημιουργείται όταν μέσω εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου επιταχύνονται τα φορτισμένα σωματίδια, τα οποία μεταφέρουν ένα πόσο της ενέργειας που έχουν αποκτήσει στα άτομα μέσα από τις ανελαστικές συγκρούσεις τους με αυτά και σε μόρια μέσω δονητικής διέγερσης. Η μεταφορά ενέργειας από το ηλεκτρικό πεδίο που εφαρμόζεται στα ηλεκτρόνια είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την ενέργεια που μεταφέρεται από το ηλεκτρικό πεδίο στα ιόντα ή από τα ηλεκτρόνια στα ουδέτερα είδη. Αυτό συμβαίνει λόγω της μεγάλης διαφοράς μάζας μεταξύ των ηλεκτρονίων και των υπόλοιπων σωματιδίων και έχει σαν αποτέλεσμα να υφίσταται μεγάλη ανισοροπία ανάμεσα στην θερμοκρασία των ηλεκτρονίων και στη θερμοκρασία του αερίου. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται σε χαμηλή θερμοκρασία αερίου, πολύ υψηλή αντιδραστικότητα πλάσματος εκτός ισοροπίας (Reuter et al., 2018).

Η παραγωγή ενός ψυχρού και σταθερού πλάσματος σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης απαιτεί την υπέρβαση ορισμένων μηχανισμών που εμποδίζουν την επίτευξη σταθερότητας όπως η αστάθεια λόγω σταδιακού ιοντισμού ή η θερμική αστάθεια. Πιο συγκεκριμένα για την θερμική αστάθεια, η οποία και αναπαρίσταται σχηματικά στην Εικόνα 1.10 (Reuter et al αναφέρουν ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας του αερίου (T_g) προκαλείται μείωση της πυκνότητας των σωματιδίων (N) που έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου $\frac{E}{N}$, δηλαδή

του λόγου του ηλεκτρικού πεδίου προς την πυκνότητα των σωματιδίων. Εν συνεχεία, αυξάνονται διαδοχικά η θερμοκρασία των ηλεκτρονίων (T_e), η πυκνότητα αυτών (n_e) και η τιμή του γινομένου του συνεχούς ρεύματος με το ηλεκτρικό πεδίο ($j \cdot E$), το οποίο ευθύνεται για την αύξηση της θερμοκρασίας αερίου (T_g) οπότε και επαναλαμβάνεται ξανά ο κύκλος της θερμικής αστάθειας αυξάνοντας συνεχώς την θερμοκρασία αερίου λόγω των αλληλένδετων φαινομένων που λαμβάνουν χώρα και παρακινούν την συνεχή επανάληψη του κύκλου.

Για να διατηρηθούν οι επιθυμητές συνθήκες λειτουργίας και να διατηρείται σταθερό το παραγόμενο πλάσμα πρέπει να ισχύουν μια ή

περισσότερες προϋποθέσεις όπως για τη διάταξη των ηλεκτροδίων, η μεταξύ τους απόσταση θα πρέπει να μην υπερβαίνει μια σχετικά μικρή τιμή, το ηλεκτρικό πεδίο να μην παρουσιάζει τοπικά αυξημένες τιμές και να μην εφαρμόζεται για μεγάλα χρονικά διαστήματα αλλά για χρόνους της τάξης των ns και τέλος να υπάρχει σύστημα ψύξης του αερίου εξωτερικά ή/και με συναγωγή προκειμένου να αποφευχθεί η αλληλουχία γεγονότων που απεικονίζεται στην Εικόνα 1.10. Η συσκευή kINPen λειτουργεί με συχνότητα 1 MHz δημιουργώντας παλμούς ρεύματος μικρότερους του 1 ns, διαθέτει επαρκή ψύξη λόγω της υψηλής ροής αερίου και διαθέτει ένα ηλεκτρόδιο με πολύ κοφτερή άκρη στο κέντρο του διηλεκτρικού σωλήνα. Συνεπώς πληροί κάθε προϋπόθεση που αναφέρεται παραπάνω.



Εικόνα 1.10: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου της θερμικής αστάθειας (Πηγή: Reuter et al., 2018)

1.4.4 UV ακτινοβολία

Η ακτινοβολία UV είναι ένας γνωστός τρόπος αδρανοποίησης των βακτηρίων και χρησιμοποιείται ευρέως ως απολυμαντικός παράγοντας. Σύμφωνα με μελέτες η ακτινοβολία αυτή, εφόσον εκπέμπει σε μικρό μήκος κύματος μεταξύ 220-280 nm (López et al., 2019) κοντά δηλαδή στην περιοχή που απορροφά το DNA (260-265 nm), μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο γενετικό υλικό, αναστέλλοντας την μικροβιακή ανάπτυξη. Η αδρανοποίηση επέρχεται όταν η έκθεση των μικροοργανισμών στα φωτόνια της UV ακτινοβολίας γίνει σε τέτοιο βαθμό, που οι μηχανισμοί άμυνας και επιδιόρθωσης που κατέχουν δεν επαρκούν για να διορθώσουν τις βλάβες που προκαλούνται.

Έχουν αναγνωριστεί τέσσερις τρόποι με τους οποίους τα βακτηριακά κύτταρα επιδιορθώνουν τις βλάβες λόγω έκθεσης τους στην UV ακτινοβολία. Αυτοί ονομαστικά είναι: η φωτοενεργοποίηση, η επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (nucleodite excision repair, NER) ο ανασυνδυασμός και επισκευή και η «SOS επισκευή» (SOS response), που είναι και αρκετά επιρρεπής σε σφάλματα. Οι παραπάνω τρόποι επιδιόρθωσης πραγματοποιούνται στα προκαρυωτικά κύτταρα από μια σειρά διαφορετικών ενζύμων, ωστόσο δεν διαθέτουν όλα τα είδη κυττάρων τέτοιους μηχανισμούς. Ενδεικτικά, αναφέρεται η DNA φωτολύση (DNA photolyase), η οποία διατίθεται από κύτταρα που μπορούν να εφαρμόσουν τον μηχανισμό της φωτοενεργοποίησης. Το συγκεκριμένο ένζυμο μέσω απορρόφησης φωτονίων της ορατής ακτινοβολίας επιδιορθώνει βλάβες στο DNA.

Στην περίπτωση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος, η ακτινοβολία UV που παράγεται δεν θεωρείται από την πλειοψηφία των ερευνητών ως κύριος παράγοντας απενεργοποίησης και η επίδραση που έχει στα βακτηριακά κύτταρα χαρακτηρίζεται ως αμελητέα. Οι λόγοι που οδηγούν στο συγκεκριμένο συμπέρασμα συνοψίζονται ως εξής: το μήκος κύματος της ακτινοβολίας UV κατά την παραγωγή του πλάσματος δεν είναι στην περιοχή όπου θα είχε την μεγαλύτερη βακτηριοκτόνο επίδραση και η «δόση» φωτονίων στην οποία εκτίθενται τα βακτηριακά κύτταρα δεν είναι αρκετά μεγάλη καθώς τα ίδια τα μόρια του αερίου απορροφούν ένα μέρος της ακτινοβολίας. Επιπλέον, οι δραστικές ενώσεις που παράγονται κατά την εκκένωση του φέροντος αερίου (RONS) έχουν πολύ πιο μεγάλο αποτύπωμα και επίδραση στα κύτταρα σε σχέση με την ακτινοβολία UV, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι σε άλλα είδη πλάσματος ισχύει το ίδιο. Για παράδειγμα, στο χαμηλής πίεσης πλάσμα (low-pressure plasma) η ακτινοβολία UV θεωρείται ο κυριότερος βακτηριοκτόνος παράγοντας. Εν κατακλείδι, αν και η ακτινοβολία UV χρησιμοποιείται ως μια τεχνολογία απολύμανσης ο μηχανισμός δράσης της διαφέρει από αυτόν της τεχνολογίας του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (Reuter et al., 2018).

2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΨΥΧΡΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΔΙΑΦΟΡΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

2.1 Επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων

2.1.1 Αισθητηριακές ιδιότητες

Οι ιδιότητες που σχετίζονται με τις αισθήσεις του καταναλωτή, δηλαδή το χρώμα, το άρωμα, η υφή και φυσικά η γεύση ενός προϊόντος έχουν καθοριστική σημασία όσον αφορά την αγορά ή όχι του συγκεκριμένου. Ένα τρόφιμο το οποίο δεν είναι ελκυστικό στα μάτια του καταναλωτή δεν θα προτιμηθεί, κάτι που θα οδηγήσει σε οικονομικές απώλειες. Πέραν λοιπόν από την επίδραση που έχει η ακτινοβολία με πλάσμα στα θρεπτικά συστατικά ενός τροφίμου βασικό ρόλο έχει και το εάν επηρεάζει τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά (Wan και Keener, 2018; Sruthi et al., 2022).

▪ Χρώμα

Το χρώμα δίνει πάντα την πρώτη εντύπωση και είναι κριτήριο που σχετίζεται με την καλή ή όχι κατάσταση ενός προϊόντος, συνεπώς ένα τρόφιμο το οποίο έχει χάσει σε κάποιο βαθμό το αναμενόμενο χρώμα του λόγω της επεξεργασίας με πλάσμα δεν θα είναι επιθυμητό. Ο προσδιορισμός της επίδρασης της ακτινοβολίας του πλάσματος στο χρώμα ενός τροφίμου γίνεται με την εξέταση κάποιων συγκεκριμένων δεικτών, οι οποίοι αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες μεταβολές. Αναλυτικότερα στη βιβλιογραφία εξετάζονται οι δείκτες a^* (redness/greenness), b^* (yellowness/blueness) & L^* (lightness). Σε περιπτώσεις που φαινομενικά δεν υπάρχει μεταβολή στο χρώμα εντοπίζονται αλλαγές στους δείκτες, ωστόσο είναι σε τόσο μικρό βαθμό που δεν είναι ορατές με γυμνό μάτι και για αυτό το λόγο δεν γίνονται αντιληπτές.

Πληθώρα πειραμάτων έχει γίνει τόσο σε φρούτα και λαχανικά, διάφορα κρέατα αλλά και σε χυμούς με τα αποτελέσματα να διαφέρουν από περίπτωση σε περίπτωση. Αναλυτικότερα, σε κάποιες κατηγορίες φρούτων και λαχανικών όπως φράουλες, ακτινίδια, μήλα, καρότα και φύλλα μαρουλιού δεν βρέθηκε κάποια ορατή αλλαγή στο χρώμα, ωστόσο όταν οι χρόνοι επεξεργασίας αυξάνονταν τότε σε ορισμένες περιπτώσεις υπήρχαν κάποιες αλλαγές. Η έκθεση φιλέτων ψαριού, που είναι αρκετά ευαίσθητα, σε πλάσμα είχε μεγαλύτερη επίδραση στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά ακόμα και σε χρόνους που δεν ξεπερνούσαν τα δέκα λεπτά (Olatunde et al., 2019b). Ενδιαφέρον έχουν δύο περιπτώσεις όπου το πλάσμα είχε επίδραση, η οποία αξιολογήθηκε ως επιθυμητή στο τελικό αποτέλεσμα. Η πρώτη περίπτωση αφορά κόκκους καστανού ρυζιού στους οποίους η ακτινοβολία πλάσματος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της «φωτεινότητας» τους και η δεύτερη περίπτωση αναφέρεται σε μια παρασκευή χοιρινού όπου η επιθυμητή ερυθρότητα του κρέατος επετεύχθη μόνο με χρήση πλάσματος και όχι με την μέχρι τότε χρησιμοποιούμενη μέθοδο, δηλαδή με προσθήκη χημικών νιτρικών πρόσθετων.

▪ Υφή

Όπως και η όψη έτσι και η υφή ενός προϊόντος είναι εξίσου σημαντική, ίσως και σημαντικότερη αφού καθορίζει το πόσο ευχάριστη θα είναι η εμπειρία του κοινού κατά την κατανάλωση ενός τροφίμου. Σε γενικές γραμμές η υφή των επεξεργασμένων τροφίμων δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά με βάση την βιβλιογραφία, ωστόσο υπάρχουν και ορισμένες περιπτώσεις όπου τα αποτελέσματα της χρήσης πλάσματος είναι πιο εμφανή.

Πιο συγκεκριμένα το πλάσμα δεν φαίνεται να είχε κάποια ιδιαίτερη επίδραση σε φρέσκα φρούτα και λαχανικά όπως μήλα, φράουλες και τοματίνια, ενώ κατά την μελέτη μανιταριών ποικιλίας shiitake τα αποτελέσματα έδειξαν πως ίσως το πλάσμα να μπορεί να παρατείνει την διατήρησή τους για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Αντίθετα, πειράματα που έγιναν σε

μύρτιλα επηρέασαν αρκετά την υφή και την σκληρότητα τους, κάτι που αποδόθηκε στην αύξηση της θερμοκρασίας κατά την επεξεργασία τους και την υψηλή ένταση της ροής του αερίου. Θετικά αποτελέσματα προέκυψαν και από την εφαρμογή ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε φιλέτα ψαριού, όπου και εκεί φαίνεται να ενισχύθηκε η συνοχή του. Τέλος σε διάφορους σπόρους και όσπρια βρέθηκε ότι μετά την επεξεργασία με πλάσμα μειώθηκε η σκληρότητα και ο συνολικός χρόνος που απαιτούνταν για το μούλιασμα και το μαγείρεμα τους κάτι που θεωρήθηκε ως θετική επίδραση στη συγκεκριμένη κατηγορία τροφίμων. Συγκεκριμένη μελέτη που έγινε σε ρύζι (Sarangapani et al., 2016) έδειξε πως είχαν δημιουργηθεί ρωγμές και κοιλότητες στην επιφάνεια των κόκκων που εκτέθηκαν στην ακτινοβολία του πλάσματος. Συνεπώς η επεξεργασία τέτοιων προϊόντων με τις κλασσικές διεργασίες στις οποίες υποβάλλονται όπως η ξήρανση, διευκολύνεται και αυτό κατ' επέκταση συνεπάγεται μικρότερες ενεργειακές δαπάνες για την πραγματοποίησή τους.

▪ Άρωμα

Αυτό που αντιλαμβάνεται ένας οργανισμός ως άρωμα είναι η αλληλεπίδραση των μορίων του αρώματος με τους υποδοχείς της μύτης, οι οποίοι διεγείρονται από τις χημικές ιδιότητες των μορίων αυτών. Η επεξεργασία τροφίμων με πλάσμα μπορεί να αλλοιώσει σε κάποιο βαθμό το άρωμα τους και φαίνεται να έχει ιδιαίτερη επίδραση σε αρώματα που έχουν ως βάση τους μυρωδιές που θυμίζουν ξύλο ή είναι πικάντικες. Οι ενώσεις που επηρεάζονται είναι συνήθως τερπένια (terpenes) και σεσκιτερπένια (sesquiterpenes) που προέρχονται από το λινολεϊκό οξύ. Σε πειράματα που έγιναν πάνω σε αμύγδαλα και μούρα παρατηρήθηκε αλλαγή του αρώματος και στις δύο περιπτώσεις. Συγκεκριμένα στα αμύγδαλα εντοπίστηκαν προϊόντα που οφείλονται στην οξείδωση του ελαϊκού και λινολεϊκού οξέος (C5-C11 αλδεΐδες) όπως επίσης εξααναλδεΐδες (hexanal) και εννεαναλδεΐδες (nonanal) που επίσης συνέβαλαν στην δημιουργία μη επιθυμητών οσμών. Ωστόσο, η επιλογή κατάλληλων συνθηκών θα μπορούσε να λειτουργήσει και θετικά, εφόσον καθοδηγηθούν οι χημικές αντιδράσεις με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργηθούν τα επιθυμητά αρώματα (Bora et al., 2022).

▪ Γεύση

Η γεύση αποτελεί το κυριότερο κριτήριο σε ένα τρόφιμο. Τα ερεθίσματα που λαμβάνει ο οργανισμός μέσω των υποδοχέων της γλώσσας οφείλονται στις διάφορες πτητικές και αρωματικές ενώσεις που βρίσκονται στα τρόφιμα και επηρεάζονται θετικά ή αρνητικά από την οποιαδήποτε επεξεργασία τους. Συνεπώς, η γεύση των προϊόντων που έχουν επεξεργαστεί με ψυχρό πλάσμα αποτελεί έναν από τους βασικότερους παράγοντες όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που θα καθορίσει εάν μπορεί εν τέλη αυτή η καινοτόμα τεχνολογία να αντικαταστήσει τις ήδη χρησιμοποιούμενες μεθόδους, χωρίς να υποβαθμίζεται η γεύση τους.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε φέτες τυριού έδειξαν ότι το πλάσμα μειώνει σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό το μικροβιακό φορτίο ωστόσο, υπήρχε ένα ανώτατο χρονικό όριο όσον αφορά την έκθεση στο πλάσμα. Μετά τα 10 λεπτά η γεύση γινόταν δυσάρεστη γεγονός που αποδόθηκε στην οξείδωση των λιπιδίων που είναι άφθονα στο τυρί από τις ελεύθερες ρίζες. Η οξείδωση των λιπιδίων με την πάροδο του χρόνου επεξεργασίας δημιουργούσε ολόενα και περισσότερα υποπροϊόντα, τα οποία είναι πρόδρομες ενώσεις των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, δηλαδή της καταστραμμένης μορφής των λιπαρών οξέων. Η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών (χρόνος επεξεργασίας, ροή αερίου κ.α.) για κάθε τρόφιμο πρέπει να γίνει με βάση τα χαρακτηριστικά του όπως για παράδειγμα την περιεκτικότητα του σε πρωτεΐνες και λίπη. Βέβαια εκτός από τις αρνητικές για τη γεύση επιπτώσεις που είναι απαραίτητο να συνυπολογιστούν στο τελικό αποτέλεσμα, υπάρχει και η δυνατότητα να επιδιωχθούν αλλαγές που θα βελτιώσουν το τελικό αποτέλεσμα.

2.1.2 Φυσικοχημικές και λειτουργικές ιδιότητες

▪ pH και οξύτητα

Το pH και οξύτητα είναι δύο έννοιες πολύ κοντά η μία στην άλλη, που επηρεάζουν εκτός από το κομμάτι της γεύσης και της υφής ενός τροφίμου και το μικροβιακό του φορτίο. Τρόφιμα με χαμηλό pH-και υψηλή οξύτητα- είναι συνήθως πιο ανθεκτικά σε αλλοιώσεις που οφείλονται σε μικροοργανισμούς. Εξάλλου η τιμή του pH σε ένα τελικό προϊόν λειτουργεί ως παρεμποδιστικός παράγοντας για να επιμηκύνει την διάρκεια ζωής του. Είναι λοιπόν εμφανές το πόσο σημαντικές θα είναι τυχόν αλλαγές που μπορεί να επιφέρει η επεξεργασία με πλάσμα σε ευαλλοιώτα ειδικά τρόφιμα.

Με βάση ορισμένες μελέτες που έχουν διεξαχθεί φαίνεται πως υπάρχουν περιπτώσεις όπου η οξύτητα του επεξεργασμένου προϊόντος δεν επηρεάζεται σχεδόν καθόλου και πρακτικά υπάρχει μια εξισορρόπηση των διακυμάνσεων που προκύπτουν, όπως για παράδειγμα σε χυμούς που περιέχουν κιτρικό, μηλικό ή ασκορβικό οξύ. Υπάρχουν βέβαια και κάποιες περιπτώσεις όπου αυτό δεν ισχύει, όπως σε μελέτες επεξεργασίας κομματιών πατάτας και μούρων (bayberries), όπου παρατηρήθηκε μια ραγδαία αύξηση της τιμής της οξύτητας τους.

Σε γενικές γραμμές αυτό που παρατηρείται είναι αύξηση της οξύτητας του τροφίμου όταν υποβάλλεται σε επεξεργασία με πλάσμα. Η επίδραση που έχει το συγκεκριμένο είδος ακτινοβολίας εξαρτάται από ένα ευρύ σύνολο παραγόντων. Για παράδειγμα το αέριο που χρησιμοποιείται, ο χρόνος έκθεσης και η ένταση στην οποία υποβάλλεται ένα τρόφιμο έχει βρεθεί ότι επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα. Ακόμη επίδραση έχει το εάν ένα τρόφιμο είναι σε υγρή ή στερεά μορφή, η δομή του τροφίμου, το λεγόμενο «food matrix» καθώς επίσης και η ρυθμιστική ικανότητα και οι φυσιολογικές δραστηριότητες των ζωντανών ιστών.

▪ Ολικά διαλυτά στερεά

Σε προϊόντα όπως φρούτα και λαχανικά ο δείκτης των ολικών διαλυτών στερεών (total soluble solids, TSS), ο οποίος έχει ως μονάδα μέτρησης τους βαθμούς Brix έχει ιδιαίτερη βαρύτητα. Αποτελεί ένδειξη της ποιότητας των τροφίμων και πιο συγκεκριμένα δίνει πληροφορίες σχετικά με το πόσο φρέσκο και γλυκό είναι. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα ολικά διαλυτά στερεά αφορούν κυρίως τα σάκχαρα του τροφίμου. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες κατηγορίες ενώσεων που συμπεριλαμβάνονται όπως: μέταλλα, διαλυτά αμινοξέα, λίπη, οργανικά οξέα και φλαβονοειδή (Wan και Keener, 2018).

Οι μελέτες που υπάρχουν γύρω από την επίδραση του πλάσματος στα ολικά διαλυτά στερεά αφορούν φρέσκα και επεξεργασμένα προϊόντα όμως η πλειοψηφία τους αναφέρεται σε οπωροκηπευτικά προϊόντα και χυμούς. Τα μέχρι τώρα γνωστά αποτελέσματα ωστόσο φαίνεται να διαφοροποιούνται αναλόγως το τρόφιμο που μελετάται κάθε φορά. Για παράδειγμα σημειώθηκε αύξηση του δείκτη TSS σε βατόμουρα και αχλάδια μετά την επεξεργασία τους με ψυχρό πλάσμα, η οποία αποδόθηκε στην μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την μελέτη χυμών φράουλας και μήλου, με την αύξηση του δείκτη να πιστώνεται στην μείωση της υγρασίας του προϊόντος, η οποία συμβαίνει λόγω μεταβολικών μεταβολών που προκαλούνται από το ψυχρό πλάσμα. Αντίθετα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν από μελέτη κινέζικων μούρων (Chinese bayberries) επεξεργασμένων με νερό ενεργοποιημένο με πλάσμα (plasma activated water, PAW). Εκεί παρατηρήθηκε μείωση του δείκτη, γεγονός που καταλογίστηκε στην αναστολή του αναπνευστικού ρυθμού των φρούτων λόγω του πλάσματος.

▪ Ιδιότητες Ενυδάτωσης

Η περιεκτικότητα σε υγρασία ενός τροφίμου κατέχει μια πολύ σημαντική θέση ανάμεσα στα χαρακτηριστικά του και μπορεί να εκφραστεί με διάφορους τρόπους. Ορισμένοι από αυτούς είναι: ο βαθμός διόγκωσης (swelling power, SP), ο δείκτης απορρόφησης νερού (water absorption index, WAI) και ο δείκτης υδατοδιαλυτότητας (water solubility index,

WSI). Ειδικότερα το άμυλο είναι από τα συστατικά που εμφανίζουν πληθώρα διαφορετικών συμπεριφορών αναλόγως το επίπεδο ενυδάτωσης του. Συνεργιστικά δε με την θερμική επεξεργασία, τα διαφορετικά επίπεδα ενυδάτωσης του αμύλου επιτρέπουν την δημιουργία προϊόντων με τα επιθυμητά κάθε φορά χαρακτηριστικά. Παράδειγμα αποτελεί η διαδικασία της ζελατινοποίησης, όπου παρουσία περίσσειας νερού και θέρμανσης επιτυγχάνεται η αποδιοργάνωση της μοριακής δομής του αμύλου μέσα στους αμυλόκοκκους προς σχηματισμό μιας ιξώδους μάζας (πάστα αμύλου).

Η επεξεργασία τροφίμων πλούσιων σε άμυλο με ψυχρό πλάσμα έχει αποφέρει μερικά πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, σχετικά με την τροποποίηση των ιδιοτήτων τους. Φαίνεται ότι ο βομβαρδισμός της επιφάνειας των κόκκων του αμύλου με τις δραστικές ενώσεις του πλάσματος αυξάνει την τραχύτητα της επιφάνειας τους και άρα τη διαθέσιμη επιφάνεια επαφής τους με το νερό συνεπώς, συντελεί στην αύξηση της διαβρεξιμότητας των κόκκων. Σαν αποτέλεσμα παρατηρείται μείωση του χρόνου ψήσιματος ενώ εάν δημιουργηθούν κενά στην επιφάνεια του κόκκου, που αποτελείται από αμυλοπηκτίνη, τότε υπάρχει διαρροή της αμυλόζης που βρίσκεται στο εσωτερικό του, μεταβάλλοντας έτσι τα ρεολογικά χαρακτηριστικά και την διαλυτότητά του. Παράλληλα ενισχύεται ο αποπολυμερισμός του αμύλου από τις δραστικές ενώσεις του πλάσματος καθώς αυτές εισέρχονται στο εσωτερικό των κόκκων από τις ρωγμές που δημιουργήθηκαν.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αλεύρι ρυζιού έδειξαν μείωση του βαθμού διόγκωσης ενώ παρατηρήθηκε αύξηση των δεικτών απορρόφησης νερού και υδατοδιαλυτότητας. Ο βαθμός διόγκωσης εξαρτάται από το βαθμό υποβιβασμού του αμύλου και συνδέεται άμεσα με την ικανότητα του να εμπρικλείει νερό στη δομή του. Η αύξηση του δείκτη WAI συνδέεται με την αύξηση του βαθμού καταστροφής του αμύλου και συγκεκριμένα με το ποσοστό αποσύνθεσης των εγγενών κόκκων του. Τέλος, ο δείκτης WSI αυξάνεται με τον σχηματισμό τμημάτων αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης χαμηλού μοριακού βάρους, δηλαδή με τον αποπολυμερισμό του αμύλου και τη διάσπαση των πολυσακχαριτών.

Η μεταβολή της διαλυτότητας του αμύλου είναι συνδυασμός παραγόντων και δεν έχει κάθε φορά το ίδιο αποτέλεσμα. Στους παράγοντες συμπεριλαμβάνονται το είδος του αμύλου, η ευκολία της διάσπασης των μορίων του και η υδροφιλικότητα του. Επιπλέον, οι παράμετροι για την παραγωγή του χρησιμοποιούμενου πλάσματος διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα (Sruthi et al., 2022).

2.1.3 Βιοενεργά συστατικά

- Πολυφαινόλες

Οι φαινολικές ενώσεις των τροφίμων είναι μια κατηγορία ευρέως γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση και την προστασία που παρέχει στα κύτταρα από τη φθορά και τις ελεύθερες ρίζες. Οι ενώσεις αυτές εμπεριέχουν στο μόριο τους έναν βενζολικό δακτύλιο, ο οποίος φέρει τουλάχιστον μία υδροξυλομάδα. Οι πολυφαινόλες είναι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες διαθέτουν δύο ή και περισσότερες φαινόλες συνδεδεμένες μεταξύ τους. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν: οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες, φλαβανόνες, οι ίσοφλαβόνες, οϊανθοκυανιδίες και οι κατεχίνες (ή φλαβανόλες). Ιδιαίτερα πλούσια σε πολυφαινόλες είναι τα φρούτα, τα λαχανικά, οι ξηροί καρποί, διάφορα είδη βοτάνων και μπαχαρικών, όπως το δενδρολίβανο, το κακάο και η κανέλα ενώ πηγή αποτελούν επίσης ο καφές και το κόκκινο κρασί.

Η ακτινοβολία του πλάσματος φαίνεται να έχει σε γενικές γραμμές μια όχι τόσο ευνοϊκή επίδραση στα φαινολικά συστατικά των τροφίμων. Οι δραστικές ενώσεις που υπάρχουν στο πλάσμα και ειδικότερα το όζον, επιδρούν στους αρωματικούς δακτυλίους των φαινολικών ενώσεων, υποβαθμίζοντάς τους μέσω της μετατροπής τους σε υδροξυλωμένες ενώσεις και κινόνες. Σε μελέτες που έγιναν πάνω σε χυμούς (σταφυλιού, μήλου, κ.α.) αλλά και σε σοκολατούχο γάλα σημειώθηκε μείωση του περιεχομένου σε φαινολικά συστατικά. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε και η έκθεση χυμού πορτοκαλιού για μόλις 60 s σε ψυχρόατμοσφαιρικό πλάσμα, όπου η συνολική περιεκτικότητα των φαινολών μειώθηκε κατά 24%. Αντίθετα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν κατά την έκθεση χυμών βατόμουρου και ροδιού. Η

αύξηση που παρατηρήθηκε στις δύο αυτές περιπτώσεις θεωρήθηκε αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός ενζύμου σημαντικού για την σύνθεση φαινολικών συστατικών, της phenylalanine ammonia-lyase (PAL). Στην περίπτωση στερεών τροφίμων, όπως καρύδια, μήλα και μαύρο πιπέρι, οι μεταβολές των φαινολικών ήταν αμελητέες κάτι που αποδόθηκε στην δομή τους, η οποία συμβάλει ανασταλτικά στην δράση των δραστικών ενώσεων του πλάσματος, εξαιτίας του μικρού βάθους διείσδυσης τους. Συμπερασματικά, η δομή του τροφίμου που μελετάται και οι παράμετροι του πλάσματος που χρησιμοποιείται διαδραματίζουν εξίσου σημαντικούς ρόλους στο αποτέλεσμα της επίδρασης των δραστικών ενώσεων του πλάσματος στα φαινολικές ενώσεις. Συνεπώς απαιτείται μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση των παραμέτρων για να αποφευχθεί η μείωση του ποσοστού τους στα τρόφιμα που έχουν εκτεθεί στην ακτινοβολία του πλάσματος.

▪ Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή, αποτελούν μια υποκατηγορία των πολυφαινολικών ενώσεων, τα οποία διαθέτουν δύο αρωματικούς δακτυλίους που συνενώνονται από μια γέφυρα τριών ατόμων άνθρακα. Είναι εξαιρετικά σημαντικά στη διατροφή του ανθρώπου καθώς εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση έχουν αντικαρκινικά και αντιφλεγμονώδη χαρακτηριστικά. Οι διάφορες επεξεργασίες των τροφίμων και ειδικά η θερμική επεξεργασία καταστρέφει τα φλαβονοειδή, στερώντας από τα τρόφιμα τη χημική τους σταθερότητα.

Υπάρχουν μελέτες που καταγράφουν μείωση του ποσοστού φλαβονοειδών σε χυμούς και λαχανικά που εκτέθηκαν στην ακτινοβολία του πλάσματος ενώ αντίθετα σε έρευνα που έγινε, η επεξεργασία με ψυχρό πλάσμα σκόνης κρεμμυδιού δεν επηρέασε τα επίπεδα κουερσετίνης (quercetin), κάτι που δεν συμβαίνει κατά την θερμική επεξεργασία του συγκεκριμένου προϊόντος. Η παρουσία των φλαβονοειδών και άλλων φαινολικών συστατικών εντοπίζεται κυρίως στις μεμβράνες των κυττάρων. Η παρεχόμενη από το πλάσμα ενέργεια φαίνεται να απελευθερώνει αυτές τις ενώσεις με αποτέλεσμα τα εμφανίζεται αύξηση του ποσοστού τους. Ωστόσο, από τη στιγμή που οι ενώσεις αυτές γίνονται διαθέσιμες αποτελούν και στόχο για τις ελεύθερες ρίζες. Ο χρόνος έκθεσης και η ροή του αερίου καθορίζουν την περιεκτικότητα των φλαβονοειδών στο τελικώς επεξεργασμένο προϊόν.

▪ Ανθοκυανίνες

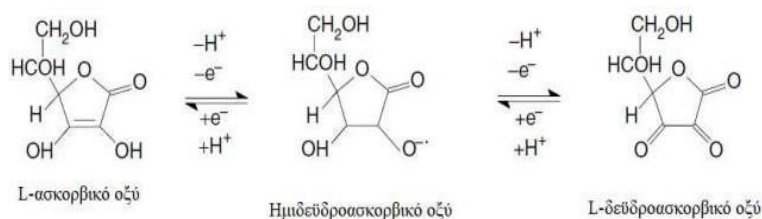
Άλλη μια υποκατηγορία φαινολικών ενώσεων είναι οι ανθοκυανίνες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα των περισσότερων φρούτων και λαχανικών ενώ αποτελούν επίσης αντιοξειδωτικούς παράγοντες με την κατανάλωσή τους να προσφέρει πολλά οφέλη στον οργανισμό. Είναι αρκετά ευαίσθητες στις δραστικές ενώσεις του πλάσματος γεγονός που αποτυπώνεται σε διάφορες μελέτες από την μείωση του ποσοστού τους στα επεξεργασμένα τρόφιμα. Η αύξηση της συχνότητας παραγωγής πλάσματος έχει άμεση επίδραση στις ανθοκυανίνες καθώς παράγει δραστικές ενώσεις με μεγαλύτερη ενέργεια που προκαλούν μεγαλύτερη βλάβη στα συγκεκριμένα φαινολικά συστατικά. Ανάμεσα στις διάφορες ελεύθερες ρίζες, κυρίως η ρίζα του υδροξυλίου και το όζον επιτίθενται στις ανθοκυανίνες, καταστρέφοντας τη δομή των δακτυλίων τους και μετατρέποντάς τες σε γλυκοζυλιωμένες χαλκόνες. Και πάλι οι μελέτες διχάζονται όσον αφορά στην επίδραση του πλάσματος με τις διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα να αποδίδονται και πάλι σε λόγους που σχετίζονται με την απελευθέρωση των φαινολικών συστατικών από την κυτταρική δομή και τις συνθήκες παραγωγής του πλάσματος.

▪ Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι θεμελιώδη συστατικά των τροφίμων, τα οποία απαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες συγκριτικά με άλλες θρεπτικές ύλες όπως οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λίπη, ωστόσο αυτές οι ποσότητες είναι αρκετές για να καλύψουν τις ανάγκες του οργανισμού. Οι επεξεργασίες στις οποίες υποβάλλονται τα τρόφιμα όπως η άλεση, ο

εξευγενισμός, η ξήρανση, ο βρασμός, η κονσερβοποίηση κ.α. όπως επίσης και οι διάφορες χημικές ή ενζυμικές αντιδράσεις που συμβαίνουν έχουν σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της περιεκτικότητας βιταμινών στο τελικό προϊόν. Για αυτό το λόγο και σε πολλά τρόφιμα όπως οι χυμοί, γίνεται μετέπειτα προσθήκη βιταμινών για να αναπληρωθεί σε κάποιο βαθμό το ποσοστό που καταστράφηκε κατά την επεξεργασία. Επιπλέον δεν έχουν όλες οι βιταμίνες την ίδια ανθεκτικότητα. Πιο αναλυτικά, ορισμένες βιταμίνες του συμπλέγματος Β και συγκεκριμένα η βιοτίνη (B7), η ριβοφλαβίνη (B2) και η πυριδοξίνη (B6) φαίνεται να είναι σχετικά πιο σταθερές σε σχέση με την θειαμίνη (B1), το φυλλικό οξύ (B9) και τις βιταμίνες Α, Ε και C (Altemimi et al., 2017).

Η επεξεργασία με πλάσμα φαίνεται ότι μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να αντικαταστήσει την θερμική επεξεργασία, που δρα καταστρεπτικά στις βιταμίνες. Αν και τα αποτελέσματα ποικίλουν αναλόγως των παραμέτρων της επεξεργασίας και του τροφίμου στο οποίο εφαρμόζεται, είναι αξιοσημείωτο ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η ακτινοβολία του πλάσματος φαίνεται να έχει θετική επίδραση στο τελικό προϊόν. Σε μελέτη (Hou et al., 2019) που πραγματοποιήθηκε σε χυμό μπλε μύρτιλου σημειώθηκε μείωση της συγκέντρωσης της βιταμίνης C με την αύξηση του χρόνου επεξεργασίας και της συγκέντρωσης σε οξυγόνο, το οποίο θεωρήθηκε αποτέλεσμα της επίδρασης των ROS. Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Ραίχαο et al. (2019) σε χυμό σιριγκέλα (*Siriguella*), όπου οι ερευνητές παρατήρησαν μείωση της προβιταμίνης Α, αλλά καμία μεταβολή των βιταμινών του συμπλέγματος Β και της βιταμίνης C. Αντίθετα αποτελέσματα φαίνεται να προέκυψαν για την συγκέντρωση της βιταμίνης C σε άλλες μελέτες πάνω σε ξηρούς καρπούς (κάσιους), χυμό πορτοκαλιού και μήλα, όπου φάνηκε να ενισχύεται η συγκέντρωση της συγκεκριμένης βιταμίνης. Αυτό αποδόθηκε και πάλι στις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται από το πλάσμα, οι οποίες φαίνεται σε αυτές τις περιπτώσεις να επαναφέρουν τις οξειδωμένες μορφές του ασκορβικού οξέος σε βιταμίνη C (Εικόνα 2.1).

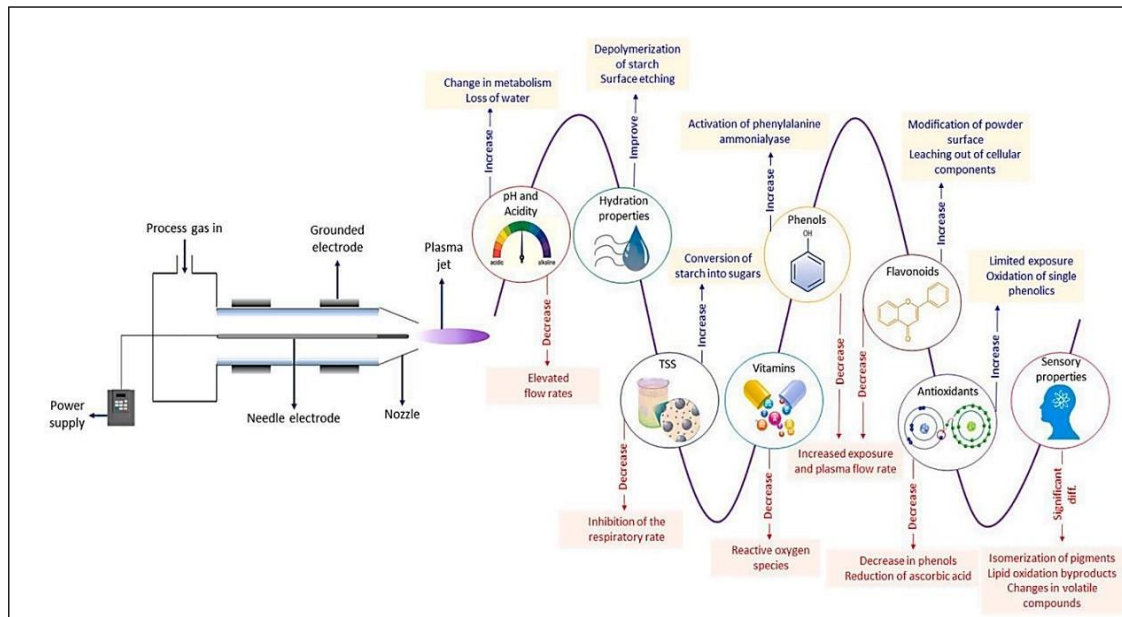


Εικόνα 2.1: Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C) και οι οξειδωμένες μορφές του.

Για να αξιολογηθεί η επίδραση που έχει το πλάσμα στις βιταμίνες πρέπει να συνυπολογιστούν αρκετοί παράγοντες. Αφενός το τρόφιμο στο οποίο εφαρμόζεται και η δομή του έχουν σημαντικό ρόλο, παράλληλα όμως φαίνεται ότι επηρεάζουν εξίσου το τελικό αποτέλεσμα ο χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία, ο αέριος ή το μίγμα αερίων που χρησιμοποιείται, η ροή αυτού και η μέθοδος παραγωγής του πλάσματος.

▪ Αντιοξειδωτικά

Υπάρχουν αρκετές ενώσεις σε φρούτα και λαχανικά, οι οποίες έχουν αντιοξειδωτικό χαρακτήρα με τις κυριότερες να είναι οι φαινολικές ενώσεις, ενώ στην ίδια κατηγορία συμπεριλαμβάνονται και οι βιταμίνες C & E. Η ικανότητα αυτών των ενώσεων να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες και να «απενεργοποιούν» όλες αυτές τις ενώσεις που είναι υπεύθυνες για μια πληθώρα ασθενειών τις καθιστά όχι μόνο επιθυμητές αλλά και απαραίτητες. Οι ερευνητές δεν έχουν καταλήξει σε μια ασφαλή απάντηση σχετικά με το εάν το πλάσμα μειώνει τα αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα. Υπάρχουν ενδείξεις που υποδεικνύουν ότι η έκθεση τροφίμων για περιορισμένο χρονικό διάστημα και με σχετικά ήπια ένταση επηρεάζει ελάχιστα το τελικό προϊόν, ωστόσο η τόσο ήπια επεξεργασία εγείρει αμφιβολίες για τη χρησιμότητα της.



Εικόνα 2.2: Επίδραση του πλάσματος σε διάφορα χαρακτηριστικά των τροφίμων (Πηγή: Sruthi et al., 2022)

2.1.4 Αντιθρεπτικά

Τα αντιθρεπτικά (anti-nutrients) είναι συστατικά, τα οποία απαντώνται σε μεγάλο βαθμό σε όσπρια και δημητριακά και δρουν ανασταλτικά επηρεάζοντας την πέψη και όπως υποδεικνύει και το όνομα τους, εμποδίζουν τον οργανισμό από το να λειτουργήσει σωστά και να απορροφήσει θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, βιταμίνες και μέταλλα. Στην κατηγορία των αντιθρεπτικών συγκαταλέγονται οι τανίνες (tannins), φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται άφθονες στο τσάι και επηρεάζουν την απορρόφηση του σιδήρου, οι σαπωνίνες (saponins), οι ληκτίνες (lectins) ενώ στην ίδια κατηγορία ανήκουν και οι αναστολείς ενζύμων που βοηθούν στη διαδικασία της πέψης (πρωτεάσες). Το κομμάτι των αντιθρεπτικών δεν έχει μελετηθεί σε τόσο μεγάλο βαθμό, όσο τα υπόλοιπα συστατικά των τροφίμων. Βέβαια τα πρώτα αποτελέσματα δείχνουν μείωση του ποσοστού τους μετά από την έκθεση τροφίμων που τα περιέχουν σε πλάσμα. Συγκεκριμένα οι Li et al. (2017) μελετώντας την επίδραση πλάσματος (DBD) στον αναστολέα θρυψίνης σε σόγια (soybean trypsin inhibitor, STI) παρατήρησαν μείωση κατά 86,1% της δραστηριότητας του μετά από 21 λεπτά έκθεσης.

2.1.5 Κυτταροτοξικότητα

Εκτός από τα παραπάνω χαρακτηριστικά των τροφίμων είναι πολύ σημαντικό να εξεταστεί και το ενδεχόμενο το πλάσμα να δημιουργεί αλλαγές κυτταροτοξικής και μεταλλαξιογόνου φύσεως. Η αλληλεπίδραση των δραστικών ενώσεων του πλάσματος με τα τρόφιμα εγείρει ερωτήματα σχετικά με την πιθανότητα δημιουργίας τοξικών ενώσεων που θα μπορούσαν δυνητικά να βλάψουν την υγεία των καταναλωτών και θα οδηγούσαν σε απαγόρευση χρήσης της συγκεκριμένης τεχνολογίας απευθείας πάνω σε τρόφιμα.

Οι μελέτες και τα αποτελέσματα που είναι διαθέσιμα μέχρι στιγμής είναι αρκετά περιορισμένα. Ωστόσο υπάρχουν ορισμένες έρευνες που εξερεύνησαν την πιθανή σχέση του πλάσματος με την δημιουργία τοξικών ενώσεων και το εάν ευνοεί κυτταροτοξικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, οι Wielogorska et al. (2019) ασχολήθηκαν με την επίδραση ψυχρού πλάσματος στις μυκοτοξίνες αραβόσιτου και στα αποτελέσματα τους παρατηρήθηκαν προϊόντα αποδόμησης της αφλατοξίνης Β1 και της ζεαραλεόνης (ZEN). Επιπλέον, οι δοκιμές που έγιναν πάνω σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκαρκινώματος δεν έδειξαν κάποια αύξηση της κυτταροτοξικότητας. Ένα χρόνο πριν οι Zhou et al. (2018) εξέτασαν τα ενδιάμεσα προϊόντα που σχηματίζονται κατά την επεξεργασία μούρων (wolfberry) με ψυχρό πλάσμα και βρήκαν

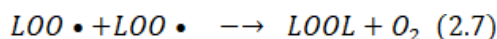
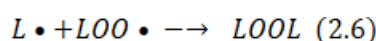
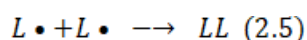
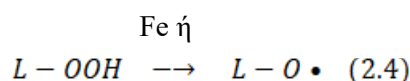
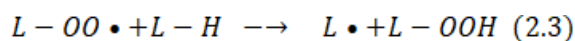
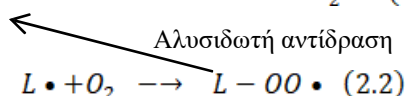
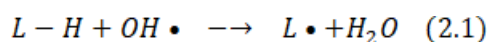
ότι τα υπολείμματα των οργανοφωσφορικών ενώσεων που υπήρχαν στα μούρα δεν εμφάνιζαν τοξικότητα υπό την προϋπόθεση ότι οι συνθήκες στις οποίες λειτουργούσε το πλάσμα ήταν βελτιστοποιημένες. Σε περιπτώσεις που παρατηρήθηκε αύξηση της κυτταροτοξικότητας, υπαίτιες θεωρήθηκαν δραστικές ενώσεις του πλάσματος, οι οποίες μέσω μιας σειράς αντιδράσεων οδηγούν στο σχηματισμό ενώσεων με βακτηριοκτόνο δράση όπως τα οξέα υπεροξυνιτρώδες (peroxynitrous) και υπεροξυνιτρικό (peroxynitrite).

2.2 Επίδραση στα μακρομόρια

2.2.1 Επίδραση στα λιπίδια

Τα λιπίδια είναι από τα πρώτα μακρομόρια που έρχονται σε επαφή με τις δραστικές ενώσεις που βρίσκονται στο πλάσμα, επειδή αποτελούν κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των κυττάρων και κατ' επέκταση είναι και από τα πρώτα που πλήττονται. Οι ρίζες που υπάρχουν στην ακτινοβολία του πλάσματος επιτίθενται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, προκαλώντας ουσιαστικά μια αλυσιδωτή αντίδραση, όπως φαίνεται και στις εξισώσεις που ακολουθούν (Gaunt et al., 2006). Οι δραστικές ενώσεις του οξυγόνου (ROS) είναι εκείνες που συμμετέχουν στην οξειδωση των λιπιδίων και πιο συγκεκριμένα οι: ρίζες του υδροϋπεροξυλίου ($HOO \bullet$), το μονοατομικό οξυγόνο (1O_2) και το όζον (O_3).

Στο πρώτο στάδιο (Εξίσωση 2.1) αυτό της έναρξης της οξειδωσης των λιπιδίων (initiation) οι ελεύθερες ρίζες, που δρουν ως εκκινητές της όλης διαδικασίας, αποσπούν ένα άτομο υδρογόνου από ένα λιπαρό οξύ ($L-H$) και σαν αποτέλεσμα προκύπτει η ελεύθερη ρίζα του λιπαρού οξέος ($L \bullet$) και νερό. Στο δεύτερο στάδιο (Εξισώσεις 2.2 & 2.3) της διάδοσης (propagation) η ρίζα του λιπαρού οξέος αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας την υπεροξυ-ρίζα του λιπαρού οξέος ($L-OO \bullet$), η οποία στη συνέχεια αντιδρά με ένα νέο, άθικτο μόριο λιπαρού οξέος ($L-H$) και σχηματίζει μία νέα ρίζα λιπαρού οξέος και το υδροϋπεροξειδίο ($L-OOH$), δηλαδή ένα υπεροξυ-παράγωγο του λιπαρού οξέος που ουσιαστικά αποτελεί την «κατεστραμμένη» μορφή του και είναι πολύ ασταθές και δραστικό. Σε αυτό το στάδιο οι αντιδράσεις διάδοσης λαμβάνουν χώρα με πολύ μεγάλη ταχύτητα. Παρουσία σιδήρου (Fe) ή χαλκού (Cu) παράγεται επίσης η αλκοξυ- λιπιδική ρίζα καθώς επίσης και αλδεϋδες μικρής αλυσίδας που προκύπτουν μέσω της διάσπασης του υδροϋπεροξειδίου (Εξίσωση 2.4). Στο τελικό στάδιο (termination) αυτό του τερματισμού οι ρίζες αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας αδρανή προϊόντα, τα οποία δεν προκαλούν έναρξη ή διάδοση της αντίδρασης (Εξισώσεις 2.5 έως 2.7).



Με την πάροδο του χρόνου το φαινόμενο της οξειδωσης των λιπιδίων εξελίσσεται όλο και πιο έντονα, καταστρέφοντας τα ίδια και την ικανότητά τους να «μετακινούνται» εντός της μεμβράνης. Ως αποτέλεσμα καταστρέφεται και η συνοχή της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας στο τέλος την είσοδο όλων αυτών των πολύ δραστικών ενώσεων στο εσωτερικό του κυττάρου (Tolouie et al., 2017).

2.2.2 Επίδραση στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες είναι οργανικά μακρομόρια με δομική μονάδα τα αμινοξέα. Η σύνθεση των αμινοξέων προς σχηματισμό πεπτιδίων και πρωτεϊνών πραγματοποιείται μέσω πεπτιδικών δεσμών. Ο ομοιοπολικός αυτός δεσμός δημιουργείται μεταξύ της α-καρβοξυλικής ομάδας του πρώτου αμινοξέος και της α-αμινομάδας του δεύτερου, με ταυτόχρονη απομάκρυνση ενός μορίου νερού. Η αλληλουχία των αμινοξέων, δηλαδή η πρωτοταγής δομή της πρωτεΐνης καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες της και επηρεάζει την δευτεροταγή και τριτοταγή δομή της. Η δευτεροταγής δομή αφορά τον τρόπο με τον οποίο διατάσσονται στο χώρο μικρά τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι διαμορφώσεις αυτές συνήθως έχουν μορφή α-έλικας (alpha-helix), πριονωτής ή β-πτυχωτής δομής (beta-sheet) και τυχαίας σπείρας (randomcoils). Η δευτεροταγής δομή σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου. Τέλος, η τριτοταγής δομή αφορά την τρισδιάστατη οργάνωση μεγάλων τμημάτων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο, εμπεριέχοντας τόσο περιοχές με ή χωρίς καθορισμένη δευτεροταγή δομή. Οι δεσμοί που συγκρατούν το τρισδιάστατο σχήμα των πρωτεϊνών αφορούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πλευρικών ομάδων (R) των αμινοξέων. Αναλυτικότερα υπάρχουν:

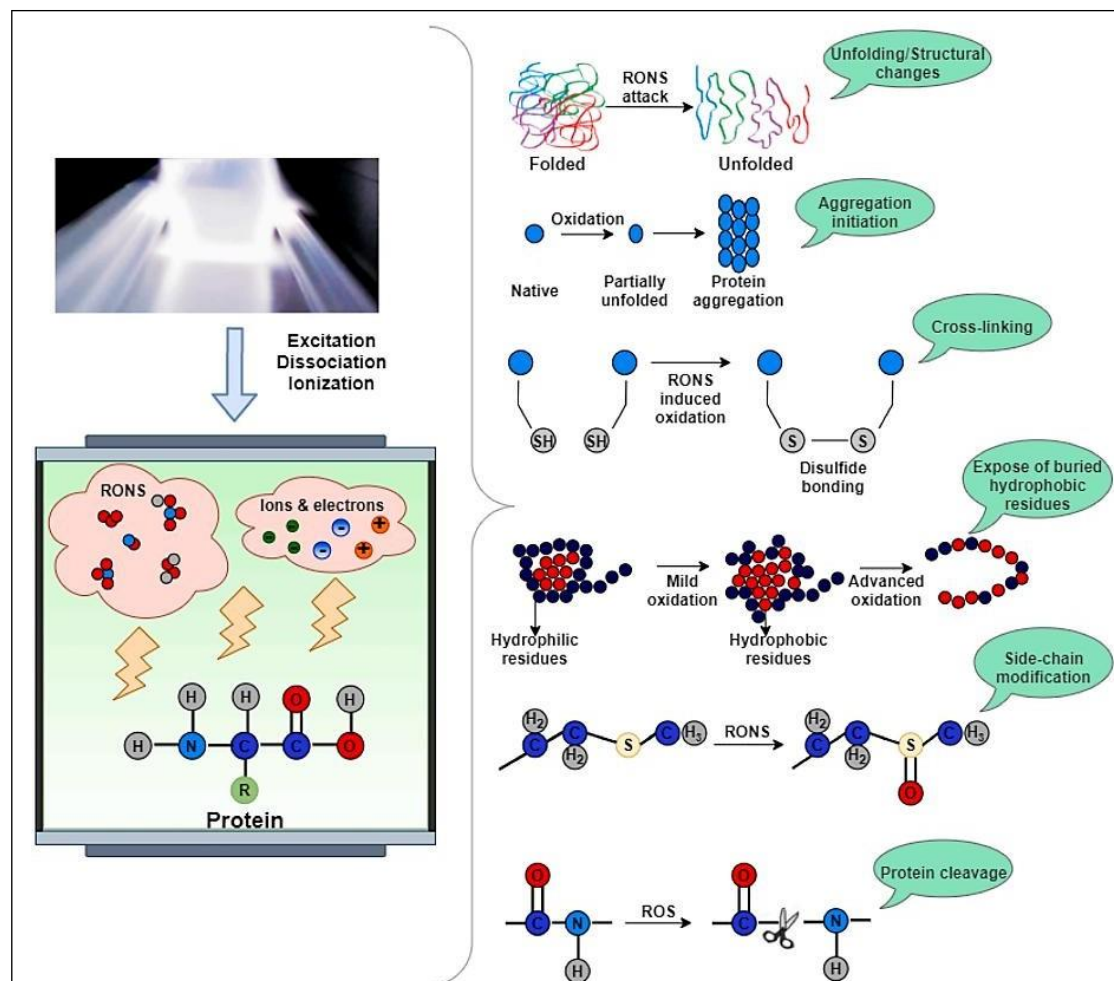
- οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις (ιοντικοί δεσμοί) ή γέφυρες άλατος που εμφανίζονται ανάμεσα σε δύο αντίθετα φορτισμένες πλευρικές ομάδες,
- οι δεσμοί υδρογόνου, που αναπτύσσονται ανάμεσα σε συγκεκριμένες πλευρικές ομάδες, όπως υδροξυλομάδες, καρβοξυλομάδες, αμινομάδες κ.α.
- οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, στις οποίες οι μη πολικές πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων (π.χ. αρωματικές, αλιφατικές) τείνουν να τοποθετούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγουν την αλληλεπίδραση με το νερό και
- οι δισουλφιδικοί δεσμοί ή γέφυρες θείου που εμφανίζονται μεταξύ των πλευρικών ομάδων της κυστεΐνης, η οποία εμπεριέχει την ομάδα -SH.

Οι πρωτεΐνες ανήκουν ανάμεσα στα σημαντικά συστατικά των τροφίμων και αυτό γιατί αποτελούν πηγή αμινοξέων για τον οργανισμό και ειδικότερα αυτών που δεν μπορεί να συνθέσει από μόνος του αλλά αναγκαστικά πρέπει να προέλθουν από την τροφή του, όπως η βαλίνη η μεθιονίνη, η φαινυλαλανίνη κ.α. Τα αμινοξέα θεωρούνται πρόδρομες ενώσεις του αρώματος και του χρώματος ενώ επηρεάζουν και την γεύση των τροφίμων. Συγκεκριμένα τα D-αμινοξέα έχουν γλυκιά γεύση ή είναι τελείως άγευστα σε αντίθεση με τα L-αμινοξέα που έχουν πικρή γεύση. Η πικρή γεύση έχει συνδεθεί με την υδροφοβικότητα που έχουν ορισμένα τμήματα του αμινοξέος και εξηγεί και την γλυκόπικρη γεύση ορισμένων όπως η λυσίνη (Lys), η οποία διαθέτει και πολικό και μη πολικό μέρος. Ακόμη, υπάρχουν πρωτεΐνες, οι οποίες δρουν καταλυτικά σε αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στους ζωντανούς οργανισμούς. Τα ένζυμα, όπως αποκαλείται αυτή η κατηγορία συμμετέχουν στο κύτταρο στις σχετικές με το μεταβολισμό χημικές αντιδράσεις, έχουν σφαιρικό σχήμα και χωρίζονται σε έξι σημαντικές κατηγορίες σύμφωνα με τη φύση της αντίδρασης που καταλύεται. Ορισμένα από αυτά καταλύουν αντιδράσεις στα τρόφιμα συντελώντας στην βελτίωση ή υποβάθμιση της ποιότητάς τους.

Οι δραστικές ενώσεις του πλάσματος επιτίθενται στις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, χωρίς να έχουν προσδιοριστεί συγκεκριμένα ποιες πρωτεΐνες και ένζυμα αποτελούν τους κυριότερους στόχους. Κατά την αλληλεπίδραση τους προκαλείται «ξεδίπλωμα» στις πρωτεΐνες και οξειδώνονται οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων. Επιπλέον, παρατηρείται σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών και τροποποιήσεις σε συγκεκριμένα αμινοξέα των πλευρικών αλυσίδων,

απενεργοποίηση ενζύμων και εμφάνιση φαινομένων crosslinking και συσσωμάτωσης μεταξύ πρωτεϊνών, με το δεύτερο να οφείλεται στη δημιουργία ενδο- και δια-μοριακών δισουλφιδικών δεσμών. Ιδιαίτερα ευαίσθητα φαίνεται να είναι αμινοξέα όπως η μεθειονίνη (Met) και η κυστεΐνη (Cys), που περιέχουν θείο στην πλευρική τους αλυσίδα και αμινοξέα με αρωματικούς δακτυλίους όπως τα: τρυπτοφάνη (Trp), φαινυλαλανίνη (Phe) και τυροσίνη(Tyr) (López et al., 2019). Οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν την μορφή των πρωτεϊνών συνεπώς, βλάπτεται η λειτουργικότητα τους κάτι που επηρεάζει αρνητικά τον κυτταρικό μεταβολισμό, δημιουργώντας καταστροφικές για το κύτταρο συνέπειες (Gaunt et al., 2006).

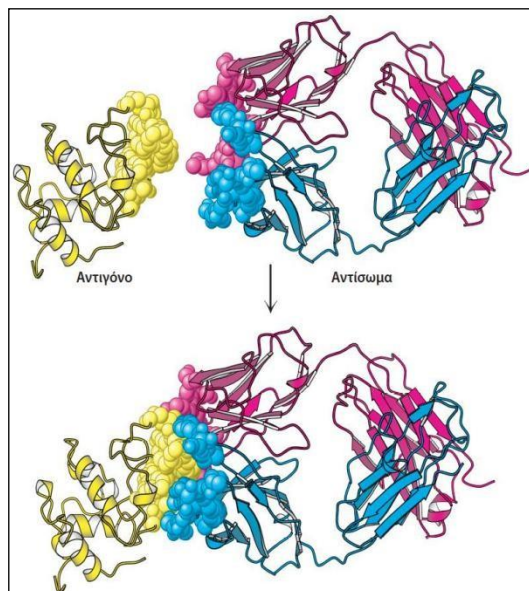
Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι οι δομικές αλλαγές που υφίστανται οι πρωτεΐνες κατά την έκθεση τους στις δραστικές ρίζες του οξυγόνου ή/και του αζώτου μπορεί να είναι τόσο εκτενείς που να οδηγήσουν στην αποσύνθεση της πρωτεΐνης στα δομικά της συστατικά, δηλαδή σε αμινοξέα. Οι ρίζες υπεροξειδίου φαίνεται να επηρεάζουν σε ιδιαίτερα μεγάλο βαθμό πρωτεΐνες που εμπεριέχουν στο μόριο τους σύμπλοκα $(Fe - S)_4$ και γενικότερα τα σημεία ένωσης τα οποία συμπεριλαμβάνουν κάποιο μέταλλο φαίνεται να είναι πιο επιρρεπή στις δραστικές ενώσεις του οξυγόνου. Ακόμη, οι αλδεΐδες που παράγονται από την οξειδωσιών λιπιδίων επιφέρουν βλάβες στις πρωτεΐνες και σε αντίθεση με τις ρίζες, έχουν πολύ μεγαλύτερο χρόνο ζωής και μπορούν να επιτεθούν σε πρωτεΐνες που είναι σε μεγάλη απόσταση από το σημείο δράσης των ελεύθερων ριζών. Οι πολύ οξειδωμένες πρωτεΐνες δεν χρησιμεύουν στο κύτταρο και υπάρχουν στοιχεία που οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνάσης, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου. Συνεπώς, υπάρχει ο κίνδυνος της συσσώρευσης μη λειτουργικών πρωτεϊνών στο κύτταρο κάτι που επηρεάζει αρνητικά τον μεταβολισμό του (Koruk et al., 2022).



Εικόνα 2.3: Επίδραση του ψυχρού πλάσματος στις πρωτεΐνες (Πηγή: Koruk et al., 2022)

2.2.2.1 Επίδραση σε αλλεργιογόνες πρωτεϊνικές δομές

Υπάρχουν ακόμη αναφορές σχετικά με την επίδραση που έχει το πλάσμα σε πρωτεϊνικές δομές που υπάρχουν στα τρόφιμα και προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις. Οι αντιδράσεις οφείλονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ του αντιγονικού προσδιοριστή ή επίτοπου του αλλεργιογόνου με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ενός οργανισμού. Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης δεν έχει αποσαφηνιστεί, ωστόσο οι Koruk et al.(2022) αναφέρουν τέσσερεις τρόπους που έχουν προταθεί από ερευνητές γύρω από τον τρόπο δράσης του ψυχρού πλάσματος στην μεταβολή της δραστηριότητας των αλλεργιογόνων, οι



οποίοι αναλύονται παρακάτω. Πιο αναλυτικά, οι δραστικές ενώσεις του πλάσματος μπορούν να τροποποιήσουν τους αντιγονικούς προσδιοριστές μειώνοντας τη δραστηριότητα τους. Οι επίτοποι ανάλογα με τη μορφή τους γραμμικοί ή διαμορφωτικοί, επηρεάζονται από τον θρυμματισμό των πρωτεϊνικών τμημάτων ή από φαινόμενα crosslinking και συσσωμάτωσης αντίστοιχα. Ακόμα, οι δραστικές ενώσεις μεταβάλλουν την δευτεροταγή δομή των αλλεργιογόνων και επίσης εκθέτουν τα υδρόφοβα τμήματα τους καθιστώντας τα πιο ευάλωτα. Τέλος, όλες οι δομικές αλλαγές που υφίστανται οι πρωτεΐνες και αναφέρονται αναλυτικά παραπάνω συντελούν στην διατάραξη της ακεραιότητας τους και επηρεάζουν τα σημεία υποδοχής των αντισωμάτων.

Εικόνα 2.4: Αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Ένα αντίσωμα δεσμεύει μια πρωτεΐνη-αντιγόνο. Οι δύο επιφάνειες όπου συνδέονται οι δύο πρωτεΐνες είναι συμπληρωματικές

(Πηγή: https://eclass.uth.gr/modules/document/file.php/VET_U_214/5_%CE%95%CE%BE%CE%B5%CF%81%CE%B5%CF%85%CE%BD%CF%8E%CE%BD%CF%84%CE%B1%CF%82_%CF%84%CE%B9%CF%82_%CE%A0%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B5%CE%90%CE%BD%CE%B5%CF%82.pdf).

2.2.3 Επίδραση στους υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι από τα πιο βασικά θρεπτικά συστατικά των τροφίμων και αποτελούν την σημαντικότερη πηγή ενέργειας για τους οργανισμούς καθώς αποδίδουν 4 kcal/g. Εμφανίζουν μια πληθώρα διαφορετικών λειτουργιών στα τρόφιμα όπως για παράδειγμα η χρήση τους ως γλυκαντικές ύλες ή σταθεροποιητές. Ακόμα, συμβάλλουν στη δομή και υφή των τροφίμων, αποτελούν πρόδρομες ενώσεις αρωματικών και χρωστικών ουσιών και χρησιμοποιούνται για τη μείωση της ενεργότητας του νερού ή ως πηγή ενέργειας σε ζυμώσεις. Παραδείγματα αποτελούν: το άμυλο, η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη.

Ο όρος υδατάνθρακας περικλείει ενώσεις που ανήκουν σε κατηγορίες πολύ-υδροξυλιωμένων αλδεϋδών, κετονών, αλκοολών και οξέων αλλά και τα προϊόντα τους από αντιδράσεις πολυμερισμού (με ακεταλικούς δεσμούς), συμπύκνωσης, οξείδωσης, αναγωγής, υδρόλυσης και υποκατάστασης. Δομική μονάδα αποτελούν τα απλά σάκχαρα ή μονοσακχαρίτες, τα οποία ενώνονται με γλυκοζιτικό δεσμό προς σχηματισμό σύνθετων σακχάρων δηλαδή πολυσακχαριτών. Αναλόγως τη φύση της καρβονυλικής ομάδας, οι μονοσακχαρίτες ταξινομούνται σε αλδόζες και κετόζες, ενώ αναλόγως την χωροδιάταξη του μορίου σε L- και D- ισομερή. Οι αλδόζες έχουν στο μόριο τους μια αλδεϋδομάδα ενώ οι κετόζες μια κετονομάδα και ο χαρακτηρισμός L ή D βασίζεται στην θέση της υδροξυλομάδας (αριστερά ή δεξιά στις προβολές κατά Fisher) που ανήκει στο πιο απομακρυσμένο ασύμμετροκέντρο, σε σχέση με το καρβονύλιο.

Οι υδατάνθρακες είναι αρκετά ευάλωτοι στις επιθέσεις των δραστικών ενώσεων του πλάσματος με αρκετές έρευνες να έχουν γίνει έως σήμερα με την πρώτη να εμφανίζεται ήδη από το 1973 (Isbell et al., 1973). Οι μελέτες αυτές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι δραστικές ενώσεις όπως το όζον, το μονατομικό οξυγόνο (singlet oxygen), το νιτρώδες οξύ (HNO_2) και το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-) προκαλούν οξειδωτική αποικοδόμηση των πολυσακχαριτών. Αποτέλεσμα αυτού είναι η ρήξη των πολυσακχαριτικών αλυσίδων, το οποίο πιθανολογείται ότι οδηγεί σε ενζυματική διάσπαση των γλυκοζιτικών δεσμών. Οι δραστικές ενώσεις ευθύνονται και για αλλαγές στη σύνθεση της αλληλουχίας των μονοσακχαριτών των σύνθετων σακχάρων που εκτέθηκαν σε αυτές. Με βάση τα παραπάνω, δύναται να δημιουργούνται πολυμερικά θραύσματα, τα οποία δεν εμφανίζουν τις ίδιες ιδιότητες όπως το πολυμερές από το οποίο προέρχονται.

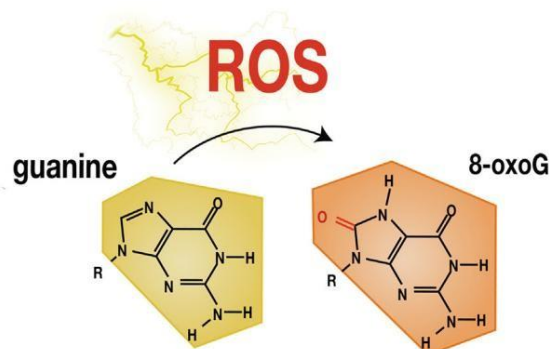
Το άμυλο είναι ένας υδατάνθρακας που χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό στα τρόφιμα και βρίσκει ποικίλες εφαρμογές σε αυτά είτε ως μέσο σύνδεσης σε σάλτσες, σούπες κ.α. είτε ως πρώτη ύλη σε σιρόπια, προϊόντα ζαχαροπλαστικής και αρτοποιίας. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής, μέσο αύξησης του ιξώδους ή ως συνδετικό μέσο (π.χ. σελουκάνικα). Το συγκεκριμένο πολυμερές είναι ένα μίγμα δύο γλυκανών: της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης με δομική μονάδα τη D-γλυκόζη. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από την επεξεργασία αμύλου από ψυχρό πλάσμα δείχνουν ότι εμφανίζονται διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα αναλόγως τον τύπο πλάσματος που χρησιμοποιείται και τη φύση του αμύλου, ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του μοριακού βάρους. Συνοπτικά οι μεταβολές που παρατηρούνται σχετίζονται κυρίως με την οξείδωση του αμύλου, με τον αποπολυμερισμό του, με εμφάνιση φαινομένων διασταυρούμενων συνδέσεων (cross-linking) και με μεταβολή της υδροφιλικότητάς του.

2.2.4 Επίδραση στο γενετικό υλικό

Η απενεργοποίηση των κυττάρων αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στην προσβολή του DNA από τα δραστικά συστατικά του πλάσματος. Κατά την οξείδωση των βάσεων προκαλούνται αλλαγές στην διαμόρφωση της αλληλουχίας των δύο πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων (strands). Αυτό οφείλεται στην μεταβολή των δεσμών υδρογόνου που συνδέουν τις αζωτούχες βάσεις μεταξύ τους λόγω της μετατροπής των πουρινών σε πυριμιδίνες (και αντίστροφα) (López et al., 2019). Η γουανίνη είναι η βάση με το χαμηλότερο δυναμικό ιοντισμού κάτι που την καθιστά τον πρώτο

στόχο του μονατομικού οξυγόνου (singlet oxygen). Η δημιουργία της 8-οξο-7,8-διυδρογουανίνης (8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dG) είναι το αποτέλεσμα της επίδρασης των δραστικών μορφών του οξυγόνου (ROS) στην συγκεκριμένη βάση και χρησιμοποιείται ως δείκτης για το οξειδωτικό στρες (Poetsch, 2020).

Οι δραστικές ενώσεις του οξυγόνου (ROS) κατά την αλληλεπίδρασή τους με τις αλυσίδες του γενετικού υλικού των βακτηρίων προκαλούν βλάβες ακόμα και θρυμματισμό του σε μικρότερα τμήματα DNA. Οι ρίζες επιτίθενται και στην

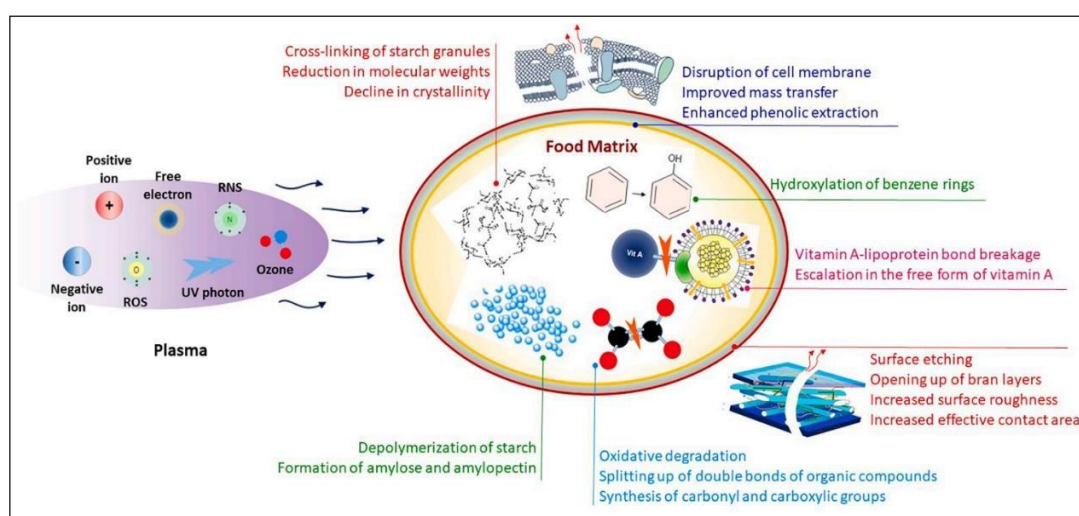


Εικόνα 2.5: Η μετατροπή της βάσης γουανίνη σε 8-οξο-7,8-διυδρογουανίνη που λαμβάνει χώρα κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες (Πηγή: Poetsch, 2020)

ραχοκοκαλιά του DNA και συγκεκριμένα στα σάκχαρα που την αποτελούν (δεοξυριβόζη) καταφέροντας διάσπαση του N-γλυκοζιτικού δεσμού της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας δημιουργώντας αβασικές θέσεις (απουρινικές/απυριμιδινικές θέσεις, AP sites). Ωστόσο, ο πυρήνας του κυττάρου δεν είναι άμεσα εκτεθειμένος στις ελεύθερες ρίζες όπως για παράδειγμα η μεμβράνη του, άρα οι ρίζες που προσβάλλουν τελικά το γενετικό υλικό δεν προέρχονται μόνο από τις δραστικές ενώσεις του πλάσματος αλλά κυρίως από «ενδιάμεσες»

ρίζες. Με άλλα λόγια, η αντίδραση των ROS με το νερό σχηματίζει ρίζες υδροξυλίου ($HO \bullet$), γνωστές για την δραστηριότητά τους και επιπλέον αντιδράσεις που συμβαίνουν παράλληλα όπως η οξειδωση των λιπιδίων συνεισφέρουν στην καταστροφή του γενετικού υλικού μέσω της παραγωγής νέων δραστικών ριζών (Thirumdas et al., 2014).

Οι μικροοργανισμοί διαθέτουν ωστόσο μηχανισμούς για να προστατευθούν και να επιδιορθώσουν μέχρι ενός σημείου τις βλάβες που μπορεί να συμβούν στο γενετικό τους υλικό, όπως για παράδειγμα το σύστημα επιδιόρθωσης της διάσπασης των νουκλεοτιδίων (nucleotide cleavage repair system) (López et al., 2019). Ακόμη, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι κατά την έκθεση τους στο ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα τα βακτηριακά κύτταρα αρχίζουν να εκφράζουν σε πολύ μεγάλο βαθμό γονίδια, τα οποία δρουν ενάντια στην καταστροφή του γενετικού τους υλικού. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι κατά την ενεργοποίηση της λεγόμενης «SOS επισκευής» (SOS response) αναμείχθηκαν 18 διαφορετικά γονίδια ενώ μελέτη που έγινε πάνω σε κύτταρα του μικροοργανισμού *E. coli* έδειξε ότι κατά την έκθεση τους σε πλάσμα με φέρον αέριο το αργό ενεργοποιήθηκαν γονίδια που σχετίζονται με ένζυμα (πολυμεράσες) υπεύθυνα για την επιδιόρθωση του DNA (Sharma et al., 2009).



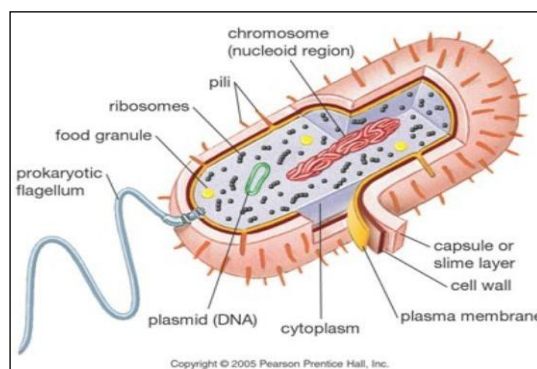
Εικόνα 2.6: Σχηματική απεικόνιση της δράσης που έχουν τα δραστικά συστατικά του πλάσματος στα διάφορα συστατικά των τροφίμων (Sruthi et al., 2022).

2.3 Σύσταση βακτηριακού κυττάρου

Για την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού με τον οποίο δρα η ακτινοβολία του πλάσματος στα κύτταρα και οδηγεί στην πρόκληση φθορών μέχρι και στην θανάτωσή τους είναι απαραίτητο να αναφερθεί η δομή των κυττάρων. Μεγαλύτερη έμφαση δίνεται στην δομή του εξωτερικού περιβλήματος των βακτηρίων, το οποίο αναλύεται σε επίπεδο δομικών συστατικών. Επιπλέον, συμβάλει και στην ανάλυση των φασμάτων υπέρυθρου που καταγράφηκαν προκειμένου να ερμηνευθούν οι μεταβολές που εντοπίζονται στις διάφορες κορυφές τους.

2.3.1 Δομή βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτήρια ανήκουν στην κατηγορία των προκαρυωτικών μικροοργανισμών και απαντώνται σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα, όπως χώμα, νερό ή σε άλλους οργανισμούς. Η μορφή των βακτηριακών κυττάρων έχει ραβδόμορφο, σφαιρικό ή σπειροειδές σχήμα με διάμετρο που κυμαίνεται από 1-10 μm. Το εξωτερικό τους περίβλημα αποτελείται την κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω. Επιπλέον, ορισμένα βακτήρια διαθέτουν έλυτρο εξωτερικά του κυτταρικού τους τοιχώματος, το οποίο εκτός από επιπλέον



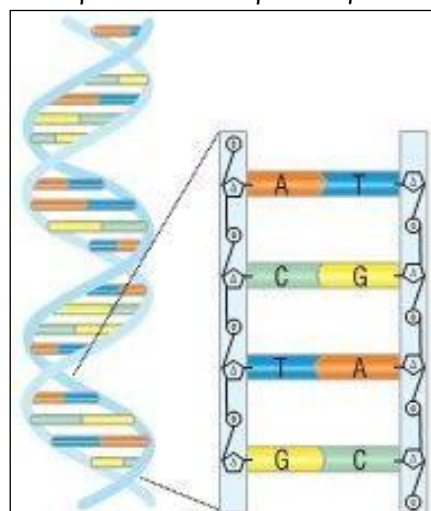
Εικόνα 2.7: Προκαρυωτικό κύτταρο (Πηγή: Γιαβάσης I., 2017)

προστασία χρησιμεύει και ως αποθήκη θρεπτικών συστατικών και νερού. Στο εσωτερικό των κυττάρων, εντός του κυτταροπλάσματος βρίσκονται κυτταρικά οργανίδια (π.χ. ριβοσώματα), διάφορα κοκκία και το γενετικό υλικό του βακτηρίου, το οποίο αποτελείται από δίκλωνο DNA και απαντάται σε δύο μορφές. Η πρώτη είναι στον πυρήνα τους, ο οποίος δεν διαθέτει πυρηνική μεμβράνη και η δεύτερη με τη μορφή πλασμιδίων. Συνεπώς, το γενετικό τους υλικό δεν είναι τόσο προστατευμένο όσο αυτό των ευκαρυωτικών κυττάρων. Τέλος, ορισμένα βακτήρια διαθέτουν ινίδια και μηχανισμούς κίνησης, όπως οι βλεφαρίδες και τα μαστίγια (Φιλίουσης, 2017)

2.3.2 Δομή γενετικού υλικού

Τα βακτήρια ανήκουν στην κατηγορία των προκαρυωτικών μικροοργανισμών συνεπώς έχουν απλούστερη κυτταρική οργάνωση σε σχέση με τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Το γενετικό τους υλικό οργανώνεται στο πυρηνοειδές και όχι σε πυρήνα ενώ ορισμένα βακτήρια διαθέτουν και πλασμίδια, τα οποία βρίσκονται μέσα στο κυτταρόπλασμα. Τα πλασμίδια είναι κυκλικά μόρια DNA, μικρότερου αριθμού ζευγών βάσης από το DNA, που περιέχουν ένα μικρό ποσοστό της γενετικής πληροφορίας και μπορούν να μεταφέρονται από το ένα βακτήριο στο άλλο.

Εν συντομία, η δομή του DNA, όπως έχει περιγραφεί από τους Watson και Crick, αποτελείται από δύο αλυσίδες, οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Δομική μονάδα του DNA είναι το νουκλεοτίδιο. Ένα νουκλεοτίδιο αποτελείται από μια πεντόζη (δεοξυριβόζη) ενωμένη με μια φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχο βάση. Η ένωση πολλών νουκλεοτιδίων μέσω 3'-5' φωσφοδιεστερικού δεσμού οδηγεί στον σχηματισμό μιας αλυσίδας. Η δευτεροταγής δομή του μορίου σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων. Στο DNA οι αζωτούχες βάσεις

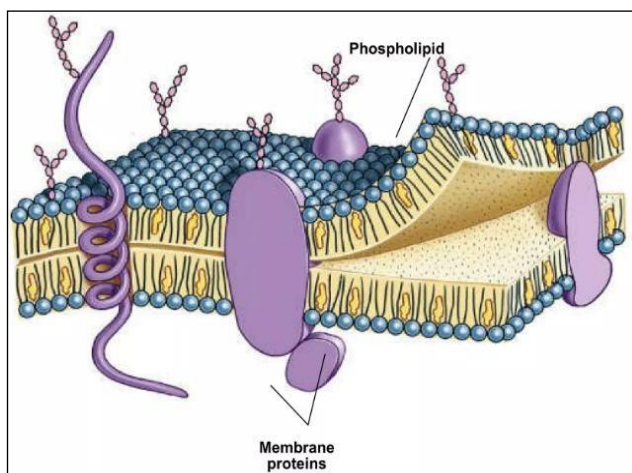


Εικόνα 2.8: Η διπλή έλικα DNA (Πηγή: http://ebooks.edu.gr/ebooks/v/pdf/8547/2552/22-0178-02_Biologia_G-Lykeiou-SpYg_Vivlio-Mathiti-T2/)

είναι οι : αδενίνη (A), γουανίνη (G), κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T) και οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μπορεί να είναι δύο (μεταξύ αδενίνης και θυμίνης) ή τρεις (μεταξύ κυτοσίνης και γουανίνης).

2.3.3 Δομή κυτταρικών τοιχωμάτων

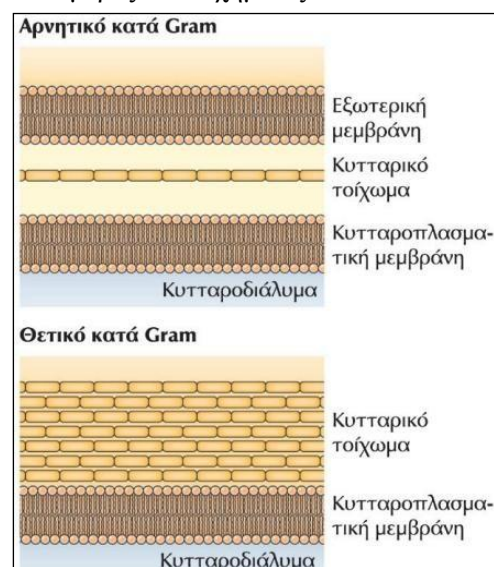
Τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση τα κυτταρικά τους τοιχώματα, τα θετικά και τα αρνητικά κατά Gram. Και στις δύο περιπτώσεις τα κύτταρα διαθέτουν πλασματική μεμβράνη, η οποία οριοθετεί το κύτταρο και περικλείει όλα τα οργάνια στο εσωτερικό της όπως επίσης και κυτταρικό τοίχωμα. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια διαθέτουν ένα σχετικά λεπτό κυτταρικό τοίχωμα και μια επιπλέον εξωτερική μεμβράνη που τους παρέχει μεγαλύτερη προστασία. Τα θετικά κατά Gram αντίθετα δεν έχουν αυτή την επιπρόσθετη μεμβράνη, ωστόσο τα κυτταρικά τους τοιχώματα είναι σαφώς πιο παχιά.



Εικόνα 2.9: Πλασματική μεμβράνη βακτηριακού κυττάρου. Θεωρία του μωσαϊκού (Πηγή: Cooper και Hausman, 2016)

Η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από ένα διπλό στρώμα φωσφολιπιδίων στο οποίο βρίσκονται διάσπαρτες μεμβρανικές πρωτεΐνες σε αναλογία 50 / 50 για τη συγκεκριμένη μεμβράνη. Για την περιγραφή της δομής χρησιμοποιείται το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (fluid mosaic model) σύμφωνα με το οποίο στην μεμβράνη που δημιουργείται από τα λιπίδια είναι ενσωματωμένες οι διάφορες πρωτεΐνες (Εικόνα 2.9). Η διπλή στοιβάδα που σχηματίζουν τα φωσφολιπίδια έχει εκτεθειμένα στην εξωτερική της επιφάνεια τα μη υδρόφοβα μέρη τους δηλαδή τις πολικές κεφαλές ενώ στο εσωτερικό βρίσκονται οι μη πολικές, υδρόφοβες ουρές τους. Οι πρωτεΐνες (ενσωματωμένες και περιφερικές) είναι που προσδίδουν στην κυτταρική μεμβράνη τις ιδιότητες που έχει, όπως για παράδειγμα να λαμβάνει και να αντιδρά σε εξωτερικά ερεθίσματα, να επιτρέπει την μεταφορά μορίων διαμέσου αυτής κ.α. Σαν σύνολο η μεμβράνη είναι πολύ ευκίνητη και τα φωσφολιπίδια μπορούν να κινούνται μέσα στα όρια της διπλής στοιβάδας είτε αλλάζοντας θέση είτε να περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους.

Το κυτταρικό τοίχωμα έχει μια τελείως διαφορετική κατασκευή από αυτή της κυτταρικής μεμβράνης και όσον αφορά τα δομικά του υλικά αλλά και στις ιδιότητες που το χαρακτηρίζουν. Είναι άκαμπτο και σε αυτό οφείλουν τα κύτταρα το σχήμα τους (σφαιρικό, ραβδόμορφο κ.α.). Η βασική πρώτη ύλη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων είναι η πεπτιδογλυκάνη, ένα πολυμερές που σχηματίζεται όταν πολυσακχαριτικές αλυσίδες



(Πηγή: Cooper και Hausman, 2016)

ενώνονται μεταξύ τους εγκάρσια μέσω oligopeptidίων. Οι αλυσίδες αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης (NAG) και N-ακετυλομουραμικού οξέος (NAM) που συνδέονται μεταξύ τους β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Η αλληλουχία των πεπτιδίων που συνδέονται στην N-ακετυλογλυκοζαμίνη με σκοπό την ένωση των αλυσίδων των δύο αμινοσακχάρων διαφέρουν ανάλογα το είδος των βακτηρίων (Hsu et al., 2016).

Τέλος, στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια υπάρχει και μια δεύτερη διαπερατή εξωτερική μεμβράνη, η οποία περικλείει το κυτταρικό τοίχωμα. Η μεμβράνη αυτή αν και αποτελείται επίσης από φωσφολιπίδια διαφοροποιείται σε σχέση με την πλασματική στο ότι περιέχει και έναν λιποπολυσακχαρίτη (LPS), ο οποίος

σταθεροποιεί την εξωτερική μεμβράνη και προσφέρει προστασία στο κύτταρο από διάφορες χημικές ουσίες. Ο συγκεκριμένος λιποπολυσακχαρίτης, ο οποίος συχνά αποκαλείται και ενδοτοξίνη περιέχει στην δομή της αλυσίδας του το λιπίδιο A, το οποίο συμπεριφέρεται ως τοξίνη, προκαλώντας συμπτώματα πυρετού, διάρροιας και εφόσον απελευθερωθεί σε μεγάλες ποσότητες στο αίμα έντονη φλεγμονώδη αντίδραση (endotoxic shock).

2.4 Μηχανισμός απενεργοποίησης κυττάρων

Ο τρόπος με τον οποίο επέρχεται η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών μετά την επίδραση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε αυτούς δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως λόγω της πολυπλοκότητας που διέπει την συγκεκριμένη διαδικασία και τους διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν, ωστόσο υπάρχουν προτεινόμενες θεωρίες σχετικά με την επίδραση που έχει το πλάσμα στα μικροβιακά κύτταρα. Αφενός υπάρχει η θεωρία που αφορά ορισμένες πολύ επιθετικές ενώσεις (ROS, RNS) και τον τρόπο που αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας την διάρρηξη της, ενώ έχει προταθεί και μια θεωρία που υποστηρίζει ότι η οξειδωση σημαντικών βιομορίων όπως πρωτεϊνών, λιπιδίων και DNA έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στην απενεργοποίησή τους. Γενικότερα και με βάση αποτελέσματα από διάφορες έρευνες υποδεικνύεται ότι το πλάσμα «επιτίθεται» με περισσότερους από έναν τρόπους στους μικροοργανισμούς και το επιθυμητό αποτέλεσμα που τελικά επιτυγχάνεται είναι απόρροια της συνέργειάς τους.

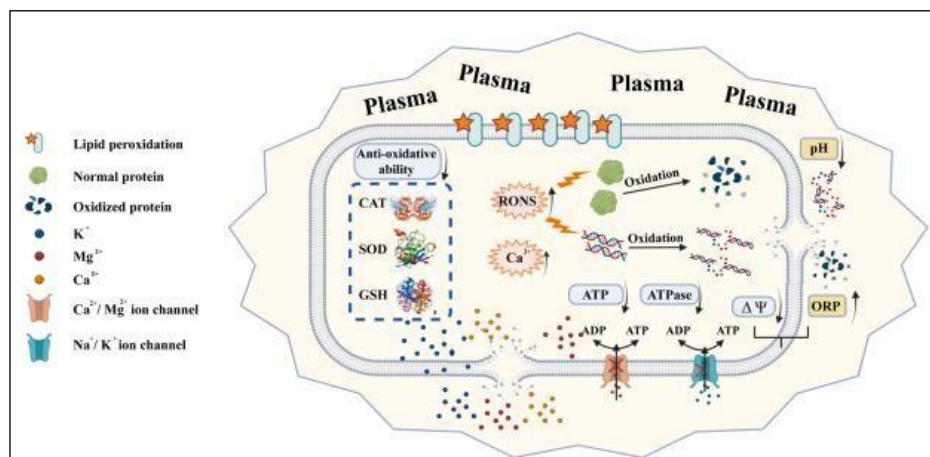
Η σύσταση του πλάσματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες και συγκεκριμένα από τις συνθήκες λειτουργίας όπως το αέριο μίγμα που επιλέγεται και η ροή αυτού, η συχνότητα που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πλάσματος, η πίεση του αερίου και από την διάταξη που επιλέγεται. Ανάμεσα στα συστατικά του πλάσματος που επιφέρουν βλάβες στα κύτταρα βρίσκονται οι ελεύθερες ρίζες, τα φωτόνια της UV ακτινοβολίας, διάφορα θετικά και αρνητικά φορτισμένα ιόντα και ορισμένες δραστικές μορφές του οξυγόνου (ROS) και του αζώτου (RNS) με την πλειοψηφία αυτών να έχει πολύ μικρό χρόνο ημιζωής. Όλα συντελούν στην αντιμικροβιακή δράση του πλάσματος, ωστόσο πολύ σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή αδρανοποίηση διαδραματίζουν τα τελευταία, τα οποία είναι εξαιρετικά επιθετικά. Για αυτό και αέρια μίγματα που περιέχουν οξυγόνο και άζωτο προτιμώνται σε σχέση με μίγματα ευγενών αερίων (π.χ. He, Ar) λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης RONS που δημιουργείται (Zhao et al., 2022b).

Κατά την έκθεση των κυττάρων στο πλάσμα η εξωτερική τους επιφάνεια «βομβαρδίζεται» από ένα μίγμα αυτών των παραγόντων που αναφέρονται παραπάνω. Αρχικά προκαλούν μια σειρά από τραυματισμούς και βλάβες στο εξωτερικό περίβλημα των κυττάρων έως ότου δημιουργηθούν κενά που θα επιτρέψουν την είσοδο όλων αυτών των ενώσεων στο εσωτερικό του. Στην συνέχεια αυτό που επιτυγχάνεται είναι μια γενική αποδιοργάνωση της συνολικής λειτουργίας του κυττάρου, η οποία συμπεριλαμβάνει καταστροφή γενετικού υλικού, ενζύμων σημαντικών για την κυτταρική λειτουργία, πρωτεϊνών και λιπιδίων. Επιπλέον, η ακτινοβολία φαίνεται ότι προκαλεί αλλαγές σε καταστάσεις ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγής και ενεργειακού μεταβολισμού και επηρεάζει αρνητικά την ισορροπία ορισμένων των ιόντων μέσα στο κύτταρο (Olatunde et al., 2019a).

Το πρώτο μέρος του κυττάρου που πλήττεται είναι το εξωτερικό του περίβλημα. Τα RNS δημιουργούν ένα όξινο περιβάλλον και τα ROS και πιο συγκεκριμένα ρίζες υδροξυλίου και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) επιτίθενται στο κυτταρικό τοίχωμα, καταστρέφοντας τους ενδομοριακούς δεσμούς της πεπτιδογλυκάνης (Zhao et al., 2022a) δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο κενά στην συνοχή του. Σε δεύτερο στάδιο επιτίθενται στην κυτταρική μεμβράνη και μέσω της οξειδωσης των λιπιδίων -που την απαρτίζουν- προκαλούν ρήξη αυτής και καταφέρνουν να εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Άπαξ και διεισδύσουν, οξυδραστικές ενώσεις «επιτίθενται» αδιακρίτως σε όλα τα βιομόρια προκαλώντας συνεχώς βλάβες. Οι βλάβες αυτές συμπεριλαμβάνουν την οξειδωση και τον θρυμματισμό των μακρομορίων του κυττάρου (πρωτεΐνες, DNA), όπως επίσης και την διαρροή τους εκτός αυτού. Λόγω της καταστροφής της ακεραιότητας της πλασματικής μεμβράνης παρατηρείται

και διαρροή ιόντων και πιο συγκεκριμένα καλίου (K^+) και μαγνησίου (Mg^{2+}), τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του κυττάρου επειδή συντελούν στην διατήρηση της ενδοκυτταρικής ιοντικής του ισορροπίας.

Σύμφωνα με τους Zhao et al., οι δραστικές ενώσεις του πλάσματος επηρεάζουν και την λειτουργία του ενδοκυτταρικού αντιοξειδωτικού συστήματος, που είναι υπεύθυνο όπως και η κυτταρική μεμβράνη για την προστασία του κυττάρου έναντι διάφορων οξειδωτικών ουσιών. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD (υπεροξειδική διμουτάση), CAT (καταλάση) και το μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό GSH (γλουταθειόνη). Ο ρόλος των ενζύμων είναι η εξάλειψη των δραστικών RONS από το εσωτερικό του περιβάλλον και συγκεκριμένα η υπεροξειδική διμουτάση καταλύει το $\cdot O_2^-$ σε μοριακό οξυγόνο (O_2) και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και στη συνέχεια η καταλάση καταλύει περαιτέρω το υπεροξείδιο σε νερό. Ο ρόλος της γλουταθειόνης αφορά την μη ενζυματική αντιμετώπιση των ROS μέσω της σουλφιδικής ομάδας (-SH) που περιέχεται στο μόριο της. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με την αύξηση του χρόνου έκθεσης του κυττάρου στην ακτινοβολία του πλάσματος, μειώνεται αισθητά η δραστηριότητα τους κάτι που επιτρέπει την συσσώρευση RONS στο εσωτερικό του κυττάρου. Μόλις αυτή η συγκέντρωση ξεπεράσει μια κρίσιμη τιμή το κύτταρο δεν μπορεί να ανταπεξέλθει στην διαχείριση όλου αυτού του φορτίου. Συνεπώς, καταστρέφεται το αντιοξειδωτικό του σύστημα και η φυσιολογική του ισορροπία. Επιπλέον, επηρεάζονται και ορισμένες διεπιφανειακές πρωτεΐνες, όπως η αντλία νατρίου-καλίου, η οποία πρακτικά είναι ένας μηχανισμός ενεργητικής μεταφοράς, ο οποίος συντελεί στην διατήρηση της διαφοράς δυναμικού μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντος της κυτταρικής μεμβράνης. Ακόμα, στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε ότι στα πρώτα λεπτά έκθεσης των κυττάρων στο πλάσμα υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}), γεγονός που θεωρήθηκε ως αντίδραση στο «στρες» που είχαν υποστεί. Μετέπειτα βέβαια η συγκέντρωση αυτή μειώθηκε, εξαιτίας της λύσης του κυττάρου. Στο τελικό στάδιο, δηλαδή όταν δεν προλαβαίνει πια το κύτταρο να επιδιορθώσει τις βλάβες που δημιουργούνται με τον απαραίτητο ρυθμό επέρχεται η θανάτωση του.

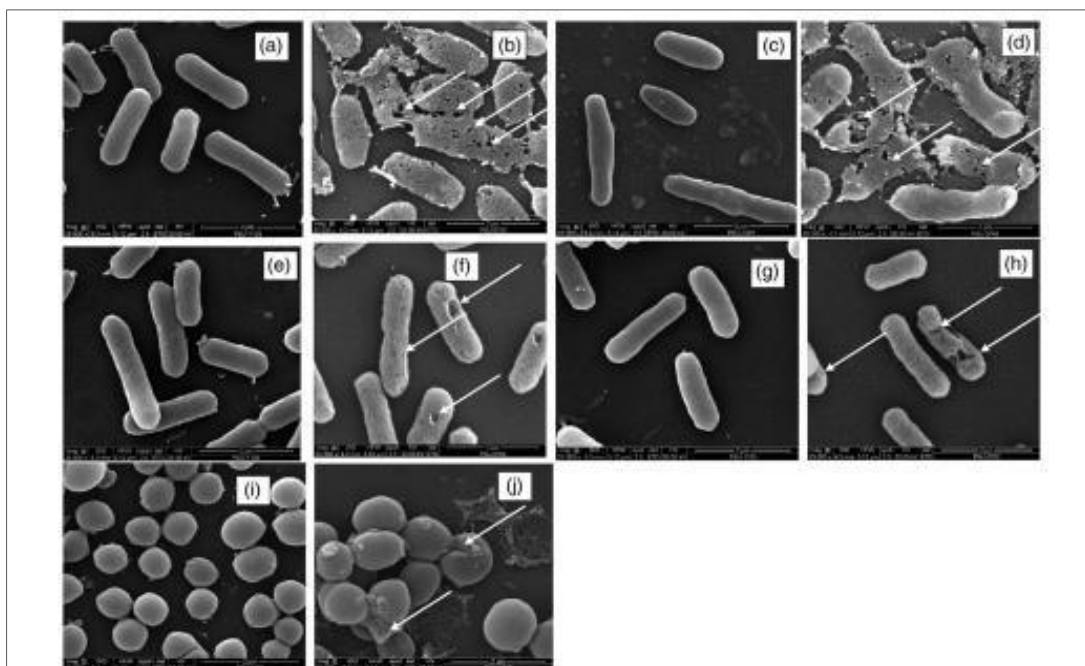


Εικόνα 2.11: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της βακτηριακής απενεργοποίησης που συμβαίνει λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα (Πηγή: Zhao et al., 2022a)

Η επίδραση που φέρεται να έχει το πλάσμα την εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων που εκτίθενται στην ακτινοβολία του και περιγράφεται παραπάνω, έχει παρατηρηθεί και με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στις φωτογραφίες που ακολουθούν (Εικόνα 2.12) φαίνεται πως έχει επηρεαστεί η μορφολογία των κυττάρων διάφορων μικροοργανισμών μετά από 5 λεπτά έκθεσης σε πλάσμα με σύσταση αερίου αργό/οξυγόνο με αναλογία 90:10. Συγκεκριμένα οι φωτογραφίες αφορούν κύτταρα από *Pseudomonas aeruginosa* (a, b), *Vibrio parahaemolyticus* (c, d), *Escherichia coli* (e, f), *Listeria monocytogenes* (g, h), και *Staphylococcus aureus* (i, j) πριν και μετά την επεξεργασία τους με πλάσμα αντίστοιχα.

Στις φωτογραφίες που απεικονίζουν το πριν, φαίνεται το σχήμα των κυττάρων (ραβδόμορφο για τους πέντε πρώτους μικροοργανισμούς και σφαιρικό για τον *S. aureus*), όπως επίσης είναι εμφανές και το πόσο λεία είναι η εξωτερική τους επιφάνεια. Μετά την

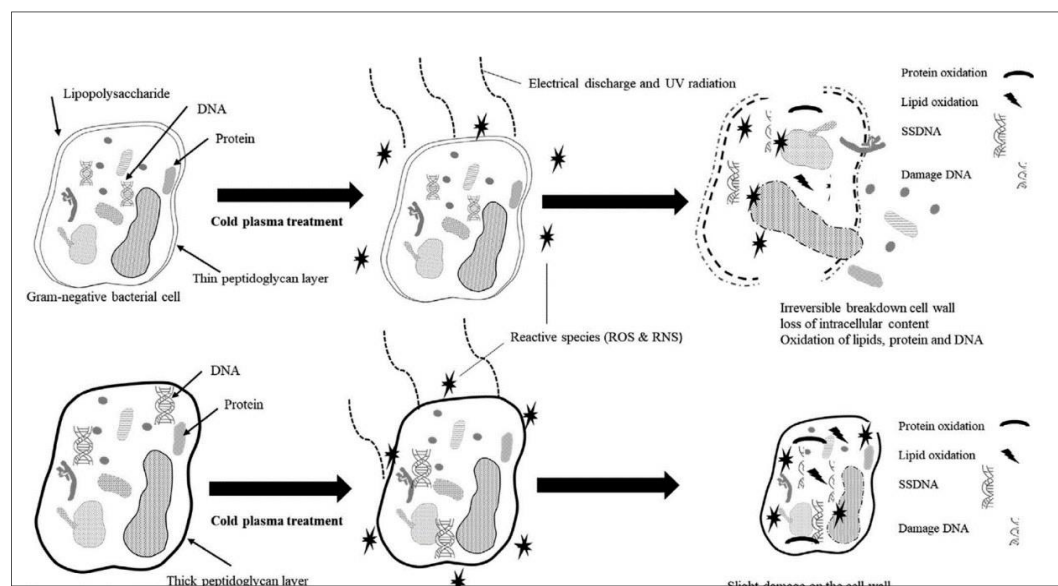
έκθεση τους στο πλάσμα τα κύτταρα όλων των μικροοργανισμών ανεξαιρέτως εμφανίζουν αλλαγές στην μορφολογία της επιφάνειάς τους, οι οποίες υποδεικνύονται με λευκά βέλη, με κάποια να έχουν υποστεί σοβαρότερες βλάβες από άλλα. Πιο συγκεκριμένα, η επιφάνεια των κυττάρων των *P. aeruginosa* και *V. paraheamyticus* έχει υποστεί πολύ μεγάλη διάσπαση, με μεγάλους και πολλούς σε αριθμό πόρους να διακρίνονται και τα κύτταρα έχουν χάσει το ομοιόμορφο ραβδοειδές σχήμα τους. Αντίστοιχα αποτελέσματα φαίνεται να υπάρχουν και στα κύτταρα των *E. coli* και *L. monocytogenes*, ωστόσο η έκταση των καταστροφών της πλασματικής μεμβράνης φαίνεται να είναι σαφώς πιο περιορισμένη στην περίπτωση αυτή, με την επιφάνεια των κυττάρων να φαίνεται σαφώς πιο τραχιά με βαθουλώματα και κενά. Στα κύτταρα του *S. aureus*, παρατηρείται και εκεί μια παραμόρφωση του σχήματός τους, όπως επίσης και ορισμένα εξογκώματα στην επιφάνειά τους, ενώ δεν παρατηρούνται κενά στην συνοχή της εξωτερικής μεμβράνης. Συνεπώς, σε αντίθεση με όλους τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που εκτέθηκαν στο πλάσμα, δεν φαίνεται να παρουσιάζει διαρροή του ενδοκυτταρικού του υλικού στο εξωτερικό περιβάλλον.



Εικόνα 2.12: Φωτογραφίες βακτηριακών κυττάρων πριν και μετά την έκθεση τους για 5 min σε πλάσμα. Οι φωτογραφίες έχουν τραβηχτεί από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης και αφορούν τους μικροοργανισμούς: *Pseudomonas aeruginosa* (a, b), *Vibrio paraheamyticus* (c, d), *Escherichia coli* (e, f), *Listeria monocytogenes* (g, h), και *Staphylococcus aureus* (i, j) (Πηγή: Olatunde et al., 2019a).

Οι μικροοργανισμοί που απεικονίζονται στην Εικόνα 2.12 κατηγοριοποιούνται με βάση την κατασκευή του εξωτερικού τους περιβλήματος σε δύο κατηγορίες. Στους θετικούς κατά Gram ανήκουν οι *L. monocytogenes* και *S. aureus*, ενώ στους αρνητικούς κατά Gram υπάγονται οι *P. aeruginosa*, *E. coli* και *V. paraheamyticus*. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα δραστικά συστατικά του πλάσματος. Οι δραστικές μορφές του οξυγόνου και οι ρίζες που προέρχονται από αυτό είναι από τα πιο αποτελεσματικά «όπλα» της ακτινοβολίας του πλάσματος καθώς θεωρούνται υπεύθυνα για τις φθορές στην πλασματική μεμβράνη (Olatunde et al., 2019a). Οι βλάβες αυτές συμπεριλαμβάνουν μεταξύ άλλων την δημιουργία πόρων στην επιφάνεια των κυττάρων και κατ' επέκταση την διαρροή ενδοκυτταρικού υλικού, την συρρίκνωση των κυττάρων και την αλλαγή της υφής και της όψης του κυτταρικού τοιχώματος σε σχέση με την λεία επιφάνεια που υπάρχει πριν (etching). Αυτή η αύξηση της τραχύτητας προκύπτει λόγω διάσπασης των δεσμών C-H από ορισμένες δραστικές μορφές του οξυγόνου και πιο συγκεκριμένα από το μονοατομικό οξυγόνο (O) και το όζον (O₃). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Olatunde et al. (2019a) όλη αυτή η συσσώρευση φορτίου στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, επηρεάζει την κυτταρική μεμβράνη προκαλώντας της ηλεκτροστατικό στρες με το

αποτέλεσμα να εμφανίζεται ως παραμορφώσεις της επιφάνειας. Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται ο τρόπος δράσης με τον οποίο πιθανολογείται ότι συμβαίνουν οι παραπάνω φθορές στο εξωτερικό περίβλημα των κυττάρων, για θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια.



Εικόνα 2:19: Πιθανός μηχανισμός δράσης του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων (Πηγή: Olatunde et al., 2019a)

2.4.1 Επίδραση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε βιοϋμένια και σπόρια

Τα βακτήρια εκτός από το εξωτερικό τους περίβλημα, το οποίο είναι επιλεκτικά διαπερατό και είναι η πρώτη τους άμυνα απέναντι σε κάθε παράγοντα καταπόνησης (stress), διαθέτουν και άλλους τρόπους για να προστατευθούν και να επιβιώσουν. Ένας από αυτούς είναι ο σχηματισμός κοινοτήτων που προσκολλώνται πάνω στις επιφάνειες, τα βιοϋμένια (biofilms). Αυτές οι ομάδες βακτηρίων εφόσον προσκολληθούν σε μια επιφάνεια δημιουργούν ένα προστατευτικό στρώμα, τη λεγόμενη μήτρα εξωκυττάρων πολυμερών (EPS), που τους επιτρέπει να προσκολλώνται στις επιφάνειες και να αντιστέκονται αποτελεσματικότερα στις διάφορες απόπειρες εξυγίανσης. Η EPS αποτελείται από ένα μίγμα πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών, λιπιδίων και νουκλεϊκών οξέων και στο εσωτερικό της διαχέονται με ευκολία το νερό και τα θρεπτικά υλικά μέσω διόδων (καναλιών) που υπάρχουν ανάμεσα στις κυτταρικές συστάδες. Αυτή η καλή κυκλοφορία επιτρέπει στα βακτηριακά κύτταρα να αναπτύσσονται διαρκώς, δημιουργώντας πολλαπλά στρώματα. Επιπλέον σύμφωνα με μελέτες τα κύτταρα μέσα στα βιοϋμένια μπορούν και επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω του «quorum sensing». Ο μηχανισμός αυτός τους δίνει το πλεονέκτημα της ενημέρωσης της κοινότητας για έναν επερχόμενο κίνδυνο, συντελώντας στην έγκαιρη και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση του. Είναι λοιπόν προφανές ότι η παρουσία βιοϋμενίων σε εργοστασιακές εγκαταστάσεις σε σημεία που δεν είναι εύκολο να καθαριστούν είναι ένα τεράστιο πρόβλημα που οδηγεί σε μολύνσεις τροφίμων και θέτει σε κίνδυνο την ασφάλεια των καταναλωτών (Khosravi et al., 2021).

Η εφαρμογή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε βιοϋμένια διαφορετικών παθογόνων βακτηρίων είχε αρκετά ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι Khosravi et al παρατήρησαν ότι η έκθεση σε ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα βιοϋμενίων των μικροοργανισμών *S. aureus* και *E. coli* οδήγησε σε ρήξη της εξωκυττάριας μήτρας και γενικότερα επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την βιωσιμότητά τους. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι το πλάσμα προκάλεσε βλάβες και στα βακτήρια που απαρτίζουν το βιοϋμένιο και στην δομή του συνολικά με τις δραστικές ενώσεις του να είναι αυτές που μέσω των διόδων νερού

μεταφέρθηκαν στα κύτταρα, προκαλώντας τα αναμενόμενα αποτελέσματα, δηλαδή φθορές στο εξωτερικό των κυττάρων.

Το ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα έχει επίσης χρησιμοποιηθεί και σε σπόρια, προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του σε αυτά. Τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και σε αυτή την περίπτωση, ωστόσο ο ακριβής τρόπος δράσης του πλάσματος δεν έχει αποσαφηνιστεί. Ο μηχανισμός που προτείνεται θέλει τις δραστικές ενώσεις που συσσωρεύονται στο εξωτερικό των σπορίων να επιτίθενται στο πολύπλοκο εξωτερικό περίβλημα τους (inner membrane, cortex, outer membrane and coat) και μόλις διεισδύσουν στο εσωτερικό αυτών των ανθεκτικών δομών οι ρίζες καταφέρνουν βλάβες σε κρίσιμες πρωτεΐνες, που σχετίζονται με τα μεταβολικά μονοπάτια του σπορίου, σε υποδοχείς και σε ένζυμα, ενώ στο DNA υποστηρίζεται ότι επιτίθενται τα φωτόνια της UV ακτινοβολίας (Nwabor et al., 2022).

2.5 Νομοθεσία σχετικά με τις τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων με χρήση ακτινοβολίας

Η προστασία του καταναλωτικού κοινού βρίσκεται διαρκώς στην επικαιρότητα και αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά προβλήματα τόσο για τις βιομηχανίες τροφίμων όσο και για την ίδια την κοινωνία. Η ανάγκη για νέους τρόπους επεξεργασίας των προϊόντων, πιο ήπιους που οφείλουν να είναι φιλικό προς το περιβάλλον αλλά να μην υπολείπονται σε τίποτα από τις κλασσικές μεθόδους όσον αφορά το κομμάτι της ασφάλειας των καταναλωτών οδηγεί στην ανακάλυψη και χρήση νέων τεχνολογιών. Η ανάπτυξη της επιστήμης έχει βοηθήσει σε μεγάλο βαθμό, ωστόσο οι προτεινόμενες τεχνολογίες πρέπει να περάσουν από πολύ διεξοδικό έλεγχο για να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητά τους πριν ξεκινήσουν να χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικό επίπεδο. Ταυτόχρονα, είναι απαραίτητοι οι έλεγχοι που αφορούν τυχόν μη επιθυμητά αποτελέσματα ή παρενέργειες που μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Η νομοθεσία γύρω από τις νέες τεχνολογίες επεξεργασίας τροφίμων και της ένταξής τους στη βιομηχανία είναι ένα πολύ λεπτό και αμφιλεγόμενο θέμα που συχνά εγείρει προβληματισμούς και αποτελεί αντικείμενο διαφωνίας. Η ένταξη μιας νέας τεχνολογίας για την επεξεργασία των τροφίμων απαιτεί πληθώρα επιστημονικών δεδομένων και μελετών που θα επιβεβαιώνουν την ασφάλεια της μεθόδου πέραν αμφιβολίας και θα πείσουν την κοινή γνώμη να την αποδεχτεί.

Ο Codex Alimentarius σε σχετικό κώδικα αναφέρει τα πρότυπα και τις πρακτικές που προτείνει για την αποτελεσματική εφαρμογή τεχνολογιών ακτινοβολίας τροφίμων με σκοπό την ασφάλεια τους. Βέβαια, η τελική απόφαση όσον αφορά τη χρήση τέτοιων μεθόδων ή μη έγκειται στις αποφάσεις των κυβερνητικών οργάνων της κάθε χώρας. Η νομοθεσία γύρω από την εφαρμογή ψυχρού πλάσματος απευθείας σε τρόφιμα δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως από το ευρωπαϊκό νομοθετικό πλαίσιο. Οι ευρωπαϊκές οδηγίες 1999/2/EK και 1999/3/EK, οι οποίες συντάχθηκαν πάνω από 20 χρόνια πριν είναι αυτές που ισχύουν ακόμα όσον αφορά τη χρήση τεχνολογιών που σχετίζονται με την ακτινοβολία τροφίμων με σκοπό τον έλεγχο του μικροβιακού φορτίου. Η πρώτη οδηγία αφορά “την προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα τρόφιμα και συστατικά τροφίμων που έχουν υποστεί επεξεργασία με ιοντίζουσα ακτινοβολία” ενώ η δεύτερη “την κατάρτιση κοινοτικού καταλόγου των τροφίμων και συστατικών τροφίμων που έχουν υποστεί επεξεργασία με ιοντίζουσα ακτινοβολία”.

Στις τεχνολογίες που σχετίζονται με την επεξεργασία τροφίμων με χρήση ακτινοβολίας (“food irradiation”) συμπεριλαμβάνονται σύμφωνα με την οδηγία 1999/2/EK:

- οι ακτίνες X που παράγονται από μηχανήματα, τα οποία λειτουργούν σε ονομαστική ενεργειακή στάθμη (ανώτατη κβαντική ενέργεια) το πολύ 5 MeV·
- οι ακτίνες γ από ραδιονουκλεΐδια ^{60}Co ή ^{137}Cs ·
- ηλεκτρόνια που παράγονται από μηχανήματα, τα οποία λειτουργούν σε ονομαστική ενεργειακή στάθμη (ανώτατη κβαντική ενέργεια) το πολύ 10 MeV.

Επιπλέον, η ευρωπαϊκή νομοθεσία στην οδηγία 1999/3/EK εμπεριέχει έναν πίνακα, όπου συγκαταλέγονται όλα τα τρόφιμα στα οποία επιτρέπεται η χρήση των παραπάνω μεθόδων για τον έλεγχο του μικροβιακού τους φορτίου και η μέγιστη δόση απορροφούμενης ακτινοβολίας από το τρόφιμο. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος πίνακας έχει μόνο μία καταχώρηση που περιλαμβάνει μπαχαρικά, αποξηραμένα αρωματικά βότανα και καρκεύματα λαχανικών, καθώς τα υπόλοιπα οκτώ τρόφιμα που είχαν προταθεί αρχικά, απορρίφθηκαν. Όσον αφορά την τεχνολογία του ψυχρού πλάσματος, δεν υπάρχει κάποια σχετική αναφορά στις δύο προαναφερθείσες οδηγίες.

Δεδομένου ότι οι δύο οδηγίες που σχετίζονται με την επεξεργασία τροφίμων με ακτινοβολία δεν έχουν εξεταστεί ξανά από την στιγμή της δημιουργίας τους, ούτε όταν έλαβε χώρα η τροποποίηση του γενικού νόμου των τροφίμων (Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 178/2002), οδηγείται κανείς στο συμπέρασμα ότι η επανεξέτασή τους είναι απαραίτητη, προκειμένου να συμβαδίζουν με της τεχνολογικές και επιστημονικές εξελίξεις. Το 2021 συντάχθηκε μια επιτροπή αξιολόγησης των οδηγιών 1999/2/EK και 1999/3/EK με σκοπό να αποφασιστεί εάν είναι ακόμα κατάλληλες και κατά πόσο καλύπτουν τους στόχους για τους οποίους δημιουργήθηκαν.

Ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα που εντοπίστηκε αφορά τον ορισμό του όρου ιοντίζουσα ακτινοβολία (“ionizing radiation”) καθώς με βάση αυτόν θα καθοριστεί και ποιες τεχνολογίες εμπίπτουν στις συγκεκριμένες οδηγίες. Εάν χρησιμοποιηθεί ο ορισμός που δόθηκε στην οδηγία 2013/59/EΥΡΑΤΟΜ του συμβουλίου, τότε: «ως ιοντίζουσα ακτινοβολία νοείται ενέργεια μεταφερόμενη υπό μορφή σωματιδίων ή ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων μήκους κύματος έως και 100 νανομέτρων (συχνότητας τουλάχιστον 3×10^{15} Hertz), μέσω των οποίων παράγονται ιόντα αμέσως ή εμμέσως». Με βάση αυτόν τον ορισμό η τεχνολογία του ψυχρού πλάσματος, όπως και της UV ακτινοβολίας για μήκη κύματος μεγαλύτερα των 100 νανομέτρων δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής.

Επιπλέον, αυτή η σύγχυση απέτρεψε τις βιομηχανίες να αναπτύξουν προϊόντα και διεργασίες με βάση τη συγκεκριμένη τεχνολογία και λειτούργησε αρνητικά όσον αφορά την παροχή ενός ενιαίου νομικού καθεστώτος γύρω από τα τρόφιμα που έχουν επεξεργαστεί με διάφορες μεθόδους ακτινοβολίας. Ορισμένα κράτη μέλη θεώρησαν ως απαγορευμένες τις τεχνολογίες που δεν συμπεριλαμβάνονταν στην οδηγία ενώ άλλα κατέληξαν στο αντίθετο συμπέρασμα ότι δηλαδή είναι εγκεκριμένες αλλά δεν αναφέρονται ακριβώς επειδή δεν εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής του συγκεκριμένου ορισμού. Συνεπώς, οι αποκλίσεις κατά την εφαρμογή της οδηγίας 1999/2/EK προήλθαν από τη διεξαγωγή διφορούμενων ερμηνειών του ελλιπούς ορισμού για την ιοντίζουσα ακτινοβολία.

Είναι λογικό να μην υπάρχουν σε αυτή την οδηγία τεχνολογίες όπως αυτή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος, καθώς η χρήση της έχει διαδοθεί κυρίως την τελευταία δεκαετία πάνω στον τομέα των τροφίμων. Οι μελέτες που έχουν γίνει γύρω από την τεχνολογία του ψυχρού πλάσματος δίνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα όσον αφορά την μείωση του μικροβιακού φορτίου και την επίδραση που έχει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων και τη διατήρηση της θρεπτικής τους αξίας. Ωστόσο, μόνο αυτά δεν είναι αρκετά για να ενταχθεί μια τόσο πρωτοποριακή τεχνολογία σε βιομηχανικό επίπεδο. Απαιτούνται περισσότερα δεδομένα ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα κάτι που σημαίνει χρόνια πειραματικών ερευνών πάνω σε κάθε πτυχή της συγκεκριμένης τεχνολογίας. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και η γνώμη των ευρωπαίων πολιτών, οι οποίοι στην πλειοψηφία τους δεν είναι θετικοί στο ενδεχόμενο της ένταξης τεχνολογιών ακτινοβολίας στην βιομηχανία τροφίμων κυρίως λόγω της ημιμάθειας γύρω από τις συγκεκριμένες μεθόδους.

3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

3.1 Εισαγωγή

Η μικροβιολογία τροφίμων είναι η επιστήμη που ασχολείται με την αλληλεπίδραση που έχουν οι μικροοργανισμοί με τα τρόφιμα αλλά και με το πως το περιβάλλον των τροφίμων επηρεάζει με τη σειρά του την ανάπτυξη τους. Αν και αποτελεί ένα σχετικά νέο πεδίο μελέτης πρέπει να σημειωθεί ότι δεν είναι απλά ένα παρακλάδι της μικροβιολογίας που ασχολείται μόνο με τη μελέτη της ανάπτυξης των μικροβίων σε τρόφιμα και έχει εξελιχθεί ραγδαία ειδικά τα τελευταία 20 χρόνια συντελώντας στην επεξεργασία, συντήρηση και διακίνηση ασφαλέστερων τροφίμων.

Με βάση τη σχέση που έχουν με τα τρόφιμα, το σύνολο των μικροοργανισμών μπορεί να χωριστεί σε τρεις βασικές κατηγορίες. Η πρώτη αφορά τους αλλοιογόνους (spoilage microorganisms), που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα, η δεύτερη περιλαμβάνει τους παθογόνους (pathogens), οι οποίοι σχετίζονται με τροφιμογενείς ασθένειες και τροφικές δηλητηριάσεις. Η παρουσία τους στα τρόφιμα δεν είναι επιθυμητή καθώς εκτός από το κομμάτι της σπατάλης τροφίμων (food waste) λόγω της αλλοίωσης υπάρχουν και θέματα ασφάλειας τροφίμων (food safety) λόγω έκθεσης των καταναλωτών σε κίνδυνο που μπορεί να βλάψει την υγεία τους. Ωστόσο υπάρχει και η τρίτη κατηγορία των μικροοργανισμών που βρίσκουν χρήσιμο ρόλο στα τρόφιμα και αποτελούν την τεχνική χλωρίδα. Σε ορισμένες περιπτώσεις όπως στα ζυμούμενα τρόφιμα (κρασί, μύρα, αλλαντικά, τυριά κ.λπ.) οι μικροοργανισμοί δρουν προς όφελος του τροφίμου, προσδίδοντας του νέα επιθυμητά χαρακτηριστικά και προστασία έναντι άλλων μικροοργανισμών (Georgalaki et al., 2000). Ανάμεσα στις διαφορετικές κατηγορίες μικροοργανισμών που απαντώνται στα τρόφιμα, τα βακτήρια είναι εκείνα που έχουν το μεγαλύτερο μερίδιο ευθύνης όσον αφορά την αλλοίωση τους, έναντι των μυκήτων και των ζυμών. Αυτό οφείλεται κυρίως στην πολύ καλή προσαρμοστικότητα των βακτηρίων που τους επιτρέπει να επιβιώνουν σε ένα πολύ ευρύ φάσμα συνθηκών, οι οποίες πολλές φορές είναι ακραίες και δεν επιτρέπουν εύκολα τον πολλαπλασιασμό πολλών μικροοργανισμών.

Η ανάπτυξη ή μη ενός μικροβιακού πληθυσμού σε ένα τρόφιμο εξαρτάται από δύο κατηγορίες παραγόντων: τους ενδογενείς και τους εξωγενείς. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι συνθήκες που παρέχει το τρόφιμο δηλαδή η ενεργότητα ύδατος (a_w), η οξύτητα, τα θρεπτικά στοιχεία, η συγκέντρωση οξυγόνου, η παρουσία/απουσία αντιμικροβιακών ουσιών και η δομή και το σχήμα του τροφίμου (matrix) κ.α. Όλα αυτά συνδυαστικά μπορεί να συντελούν στην δημιουργία ενός ευνοϊκού περιβάλλοντος που να επιτρέπει την αύξηση του μικροβιακού φορτίου. Ωστόσο, σε αυτό το σημείο πρέπει να συνυπολογιστούν οι συνθήκες στις οποίες θα συντηρηθεί, δηλαδή οι εξωγενείς παράγοντες. Σε αυτή την κατηγορία εντάσσονται: η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία, η σύνθεση των αερίων (εφόσον το τρόφιμο βρίσκεται σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, MAP ή κενού) και η προσθήκη συντηρητικών. Η δράση ενδογενών και εξωγενών παραγόντων είναι ταυτόχρονη και η συμπεριφορά που θα αναπτύξουν οι μικροοργανισμοί εξαρτάται από το συνδυασμό τους. Απόρροια των παραπάνω είναι η θεωρία των πολλαπλών εμποδίων (multiple-hurdle effect), η οποία συνδυάζει τους διάφορους παράγοντες (ενδογενείς και εξωγενείς) με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί έλεγχος του μικροβιακού φορτίου και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής του εκάστοτε προϊόντος.

Επιπλέον, η μικροβιολογία τροφίμων έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο στην ασφάλεια των προϊόντων μέσω της πρόβλεψης και πρόληψης ενός μικροβιακού κινδύνου, έναντι της ασφάλειας μέσω ελέγχου του τελικού προϊόντος. Με άλλα λόγια έχει συντελέσει στην ανάπτυξη ενός συστήματος πρόληψης (HACCP, Hazard Analysis Critical Control Point), που συντελεί στην διασφάλιση της υγιεινής και ασφάλειας. Το HACCP αναγνωρίζει τους πιθανούς μικροβιολογικούς κινδύνους που μπορεί να εμφανιστούν σε μια διεργασία, τις

πηγές από τις οποίες μπορεί να προέλθουν και το εκτιμώμενο αποτέλεσμα της εμφάνισης τους. Έπειτα εφαρμόζει ένα σχέδιο δράσης που έχει σαν κύριο άξονα την πρόληψη του κινδύνου και της επέκτασης του, μέσω μιας σειράς ενεργειών και μέτρων ασφαλείας που αποσκοπούν στην ασφάλεια του καταναλωτή.

Τέλος, η μικροβιολογία τροφίμων εκτός από το ότι είναι σε θέση να δίνει τις απαντήσεις που χρειάζονται σχετικά με τις συνθήκες που απαιτεί ο κάθε μικροοργανισμός για να πολλαπλασιαστεί ή να ανασταλεί, μπορεί μέσω της ανάπτυξης της ποσοτικής μικροβιολογίας να προβλέψει και τον ρυθμό αύξησης ή μείωσης των μικροοργανισμών χωρίς τη διεξαγωγή του αντίστοιχου πειράματος.

3.2 Ποσοτική μικροβιολογία

Η ποσοτική ή προβλεπτική μικροβιολογία είναι ένας τρόπος έκφρασης της επίδρασης που έχουν οι συνθήκες του περιβάλλοντος (θερμοκρασία, pH, ενεργότητα ύδατος κ.α.) στην συμπεριφορά των μικροοργανισμών. Αυτό γίνεται με την βοήθεια μαθηματικών μοντέλων που αναπτύσσονται συνδυαστικά με την κλασική μικροβιολογία με σκοπό την πρόβλεψη της ανάπτυξης ή του θανάτου σε συνθήκες που δεν έχουν εξεταστεί πειραματικά.

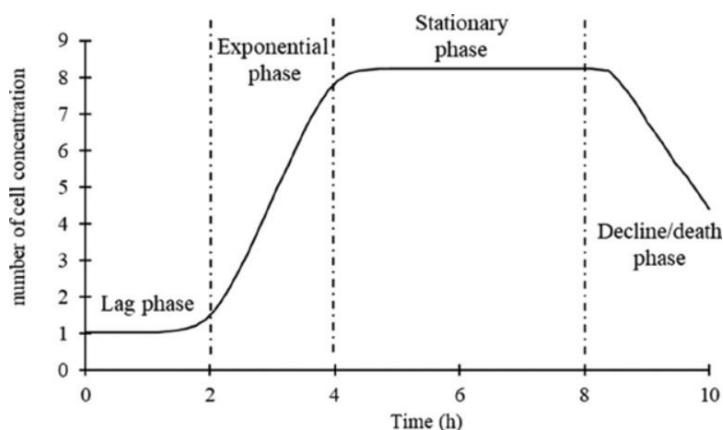
Βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς όπως η πρόβλεψη της επίδρασης που θα έχουν στο μικροβιακό φορτίο ενός τροφίμου τα ενδογενή χαρακτηριστικά του και οι συνθήκες αποθήκευσης του. Κατ' επέκταση βοηθάει στο να προσδιοριστούν οι ενδεχόμενες αλλαγές στη συμπεριφορά του φορτίου εφόσον αλλάξουν οι παράμετροι. Επιπλέον χρησιμοποιείται στο HACCP και συγκεκριμένα στην ανάλυση επικινδυνότητας, στον καθορισμό των ορίων των κρίσιμων σημείων ελέγχου (Critical Control Points, CCP) και στην επιλογή των κατάλληλων διορθωτικών ενεργειών. Είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς μπορεί να συνεισφέρει εκτός από την ασφάλεια των τροφίμων και στον υπολογισμό της διάρκειας ζωής (shelf-life) ενός προϊόντος. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην έρευνα για την ανάπτυξη νέων προϊόντων, προσδιορίζοντας τους πιθανούς κινδύνους που ενδέχεται να υπάρχουν σε κάθε στάδιο από τις πρώτες ύλες έως και την διανομή και κατανάλωση του.

Τα μικροβιακά μοντέλα εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου, καθώς νέες πληροφορίες προστίθενται στη βάση δεδομένων τους και τους παρέχουν τη δυνατότητα να εξειδικεύονται σε συγκεκριμένο τρόφιμο κάθε φορά αναλόγως τους ενδογενείς παράγοντες που εισάγονται σε αυτά. Επιπλέον τα μοντέλα συνυπολογίζουν τους εξωτερικούς (εξωγενείς) παράγοντες του περιβάλλοντος, δίνοντας αρκετά καλές προβλέψεις σχετικά με την πορεία του μικροβιακού φορτίου (αύξηση, επιβίωση ή θανάτωση) χωρίς να χρειάζονται χρονοβόρα και δαπανηρά πειράματα (Jagannath και Tsuchido, 2002; Bevilacqua et al., 2015).

3.2.1 Στάδια μικροβιακής αύξησης

Η μικροβιακή αύξηση έχει παρατηρηθεί ότι χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις (Εικόνα 3.1) από τις οποίες οι τρεις μελετώνται συνήθως και σχετίζονται άμεσα με την καταλληλότητα ενός τροφίμου. Πιο αναλυτικά, ένας μικροβιακός πληθυσμός δεδομένου ότι βρίσκεται σε ένα περιβάλλον, ξεκινάει από ένα αρχικό μικροβιακό φορτίο, το οποίο χρειάζεται συνήθως ένα χρονικό διάστημα να αναγνωρίσει τις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες βρίσκεται. Η φάση αυτή ονομάζεται φάση προσαρμογής ή επιβίωσης (Lag phase) και σε αυτό το σημείο ο μικροβιακός πληθυσμός δεν παρουσιάζει κάποια αύξηση. Η χρονική διάρκεια της φάσης αυτής δεν είναι σταθερή και μπορεί να επιμηκυνθεί εφόσον οι συνθήκες που επικρατούν δεν ευνοούν το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Στο επόμενο στάδιο, στη λεγόμενη εκθετική ή λογαριθμική φάση (Log phase) παρατηρείται σταδιακή αύξηση του ρυθμού αύξησης του

πληθυσμού (μ), έως ότου φτάσει τον μέγιστο ρυθμό (μ_{\max}). Σε αυτό το σημείο λόγω του ότι δεν αναφερόμαστε σε μια συνεχή καλλιέργεια, οι μικροοργανισμοί περνούν στη στατικήφάση ανάπτυξης (Stationary phase). Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της έλλειψης κάποιου θρεπτικού υλικού ή/και επειδή τα μεταβολικά προϊόντα των κυττάρων έχουν φτάσει σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις που είναι τοξικά για τα ίδια τα βακτηριακά κύτταρα. Η τέταρτη και τελευταία είναι η φάση θανάτου, όπου εμφανίζεται σταδιακά μια μείωση του συνολικού πληθυσμού λόγω ελάττωσης της βιωσιμότητας. Η συγκεκριμένη φάση προφανώς δεν παρουσιάζει κάποιο ενδιαφέρον όσον αφορά στη συντήρηση τροφίμων.



Εικόνα 3.1: Τυπική καμπύλη της μικροβιακής αύξησης σαν συνάρτηση του χρόνου, όπου διακρίνονται οι τέσσερις φάσεις (προσαρμογής, εκθετική, στατική και θανάτου).

3.2.2 Μαθηματικά μοντέλα περιγραφής της αύξησης των βακτηρίων

Υπάρχει ένας πολύ μεγάλος αριθμός μαθηματικών μοντέλων που χρησιμοποιείται στο πεδίο της ποσοτικής μικροβιολογίας και η κατηγοριοποίηση τους εξαρτάται από το κριτήριο με βάση το οποίο αυτή πραγματοποιείται. Για παράδειγμα, ταξινομούνται με βάση την συμπεριφορά των μικροοργανισμών, οπότε και υπάρχουν μοντέλα ανάπτυξης, θανάτωσης και επιβίωσης. Ακόμη μπορούν να χωριστούν σε εμπειρικά και μηχανιστικά (ή θεωρητικά) μοντέλα ή με βάση την χρήση τους δηλαδή σε κινητικά μοντέλα και μοντέλα πιθανοτήτων. Συνήθως χωρίζονται σε πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή μοντέλα.

Τα πρωτογενή είναι εκείνα που συσχετίζουν τη μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού με το χρόνο σε συγκεκριμένες συνθήκες περιβάλλοντος. Η μεταβολή αυτή μπορεί να αναφέρεται και σε ανάπτυξη αλλά και σε θανάτωση του εν λόγω μικροοργανισμού. Συνεπώς τα πρωτογενή μοντέλα έχουν ως ανεξάρτητη μεταβλητή τον χρόνο (t) και ως εξαρτημένη την αλλαγή του μικροβιακού πληθυσμού ($y(t)$). Επιπλέον από τις καμπύλες που προκύπτουν από τα πρωτογενή μοντέλα προσδιορίζονται οι διάφορες κινητικές παράμετροι (λ , μ_{\max} , N_{\max} , κ.α.). Ένα από τα πιο γνωστά μοντέλα και συγκεκριμένα αυτό των Baranyi & Roberts (1995) ανήκει στην συγκεκριμένη κατηγορία.

Τα δευτερογενή μοντέλα είναι αυτά που συνδέουν την μεταβολή των κινητικών παραμέτρων που αναφέρθηκαν παραπάνω, με εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες όπως είναι οι συνθήκες συντήρησης και τα χαρακτηριστικά του τροφίμου αντίστοιχα. Τα μοντέλα αυτά έχουν ως ανεξάρτητες μεταβλητές μεγέθη όπως η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα ύδατος και γενικά παράγοντες που μπορούν να δράσουν ανασταλτικά ή βοηθητικά ως προς τους μικροοργανισμούς, αναλόγως τι μελετάται κάθε φορά, ενώ εξαρτημένη μεταβλητή συνήθως είναι ο ειδικός ρυθμός αύξησης (μ_{\max}). Παραδείγματα αποτελούν τα Gamma Concept και Cardinal Parameter Model (CPM).

Στην κατηγορία των τριτογενών μοντέλων εμπίπτουν διάφορα πακέτα λογισμικών από τα οποία ο καθένας έχει πρόσβαση σε βάσεις δεδομένων στις οποίες μπορεί χωρίς απαραίτητα να έχει πειραματικά δεδομένα, δίνοντας κάποιες συνθήκες θερμοκρασίας, pH κ.α. να προβλέψει την μικροβιακή συμπεριφορά για το χρονικό διάστημα ενδιαφέροντος για τις δεδομένες συνθήκες που επιθυμεί. Ουσιαστικά αποτελούν το αποτέλεσμα της συνένωσης πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων. Τέτοιες βάσεις μπορεί να είναι on-line όπως η Combase, ή να εγκαθίστανται στον υπολογιστή όπως το PMP (Pathogens Modelling Program).

Στην περίπτωση της μελέτης κινητικής απενεργοποίησης, που εξετάζεται στη συγκεκριμένη εργασία, είναι εμφανές ότι χρειάζεται ένα πρωτογενές μοντέλο που να συσχετίζει την μείωση του φορτίου λόγω της επίδρασης του πλάσματος συναρτήσει του χρόνου έκθεσης σε αυτό.

3.3 Μοντέλα κινητικής απενεργοποίησης

Για την συγκεκριμένη μελέτη, η οποία εξετάζει τη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού λόγω της έκθεσης στην ακτινοβολία του πλάσματος, χρησιμοποιήθηκαν για την μαθηματική περιγραφή της συγκεκριμένης συμπεριφοράς τα ακόλουθα μικροβιολογικά μοντέλα απενεργοποίησης:

- Το μοντέλο «Geeraerd»,
- Το μοντέλο «Weibull»,
- Το μοντέλο «Bigelow»,
- Το διφασικό μοντέλο

3.3.1 Μοντέλο Bigelow

Η χρήση κινητικής πρώτης τάξεως για την περιγραφή της μείωσης του μικροβιακού πληθυσμού είναι η παλαιότερη και συνηθέστερη μέθοδος. Συναντάται κυρίως κατά την έντονη θερμική απενεργοποίηση των μικροοργανισμών και εξαρτάται από δύο βασικές παραμέτρους: τον χρόνο δεκαδικής μείωσης (D), δηλαδή το χρονικό διάστημα που χρειάζεται για να μειωθεί η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου κατά έναν λογάριθμο (ή 90%) και από την σταθερά θερμικής αντίστασης (z), η οποία αντιστοιχεί στους βαθμούς που πρέπει να αυξηθεί ή να μειωθεί η θερμοκρασία της θερμικής επεξεργασίας για να επιτευχθεί μεταβολή του D κατά έναν λογάριθμο. Η κινητική πάνω στην οποία βασίζονται όλα τα γραμμικά μοντέλα είναι η εξής:

$$N = N_0 \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \quad \text{ή} \quad \log_{10} N = \log_{10} N_0 - k_{max} \cdot t \quad \text{Εξίσωση (3.1)}$$

όπου τα N και N_0 αντιστοιχούν στην τελική και αρχική τιμή του μικροβιακού φορτίου σε CFU/mL αντίστοιχα, το k_{max} είναι ο ρυθμός μείωσης της βακτηριακού πληθυσμού με μονάδες 1/μονάδα χρόνου και t είναι ο χρόνος.

Προϋπόθεση για να ισχύει η γραμμικότητα είναι η ομοιομορφία των κυττάρων, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν μπορεί να ισχύει αφού υπάρχουν πολλοί παράγοντες που αποκλείουν ένα τέτοιο ενδεχόμενο, όπως για παράδειγμα η διαφορετική ηλικία των κυττάρων. Επιπλέον, αυτή την παραλλακτικότητα κάθε κυττάρου ενός μικροοργανισμού επιβεβαιώνουν ορισμένες συμπεριφορές που παρατηρούνται σε ηπιότερες μορφές επεξεργασίας όπως η υψηλή υδροστατική πίεση, παλμοί ηλεκτρικών πεδίων, ωμική θέρμανση κ.α. (Geeraerd et al., 2005). Σε τέτοιου είδους διεργασίες η θανάτωση των μικροοργανισμών δεν ακολουθεί την ίδια πορεία όπως με την επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες, άρα δημιουργήθηκαν νέα μοντέλα

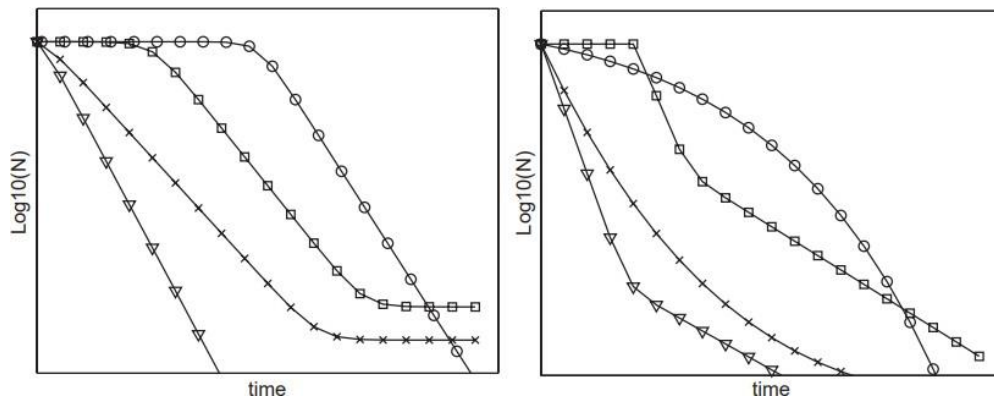
που θα προσαρμόζονταν καλύτερα και με περισσότερη ακρίβεια στις διαφορετικές αυτές συμπεριφορές που προέκυπταν από τα πειραματικά δεδομένα.

Μία από αυτές τις συμπεριφορές που παρατηρήθηκαν είναι το φαινόμενο “shoulder”, δηλαδή ενός πλατό πριν την έναρξη της μείωσης του βακτηριακού πληθυσμού, που μεταφράζεται κυρίως ως αντίσταση των κυττάρων στην επίδραση των παραγόντων που χρησιμοποιούνται για τη θανάτωσή τους. Με άλλα λόγια δε ξεκινάει απευθείας η μείωση του μικροβιακού φορτίου αλλά υπάρχει μια καθυστέρηση. Επιπλέον, μια άλλη συνήθης παρατήρηση είναι το φαινόμενο “tailing”, δηλαδή η παρουσία μιας “ουράς” στο τέλος της καμπύλης του μικροβιακού φορτίου ή διαφορετικά μιας ασυμπτωτικής ευθείας, που υποδεικνύει ότι δεν έχει εξαλειφθεί το σύνολο των μικροοργανισμών αλλά παραμένει ένα ποσοστό αυτών ζωντανό μετά το πέρας της επεξεργασίας. Αυτές οι συμπεριφορές αποδίδονται στο γεγονός ότι ο μικροβιακός πληθυσμός σε ένα δείγμα δεν είναι ομοιόμορφος, αντίθετα υπάρχουν υποομάδες, οι οποίες λόγω των διαφορετικών τους χαρακτηριστικών παρουσιάζουν και διαφορετική αντοχή.

Οι Mossel et al. (1995) πρότειναν ορισμένους λόγους, οι οποίοι εξηγούν το φαινόμενο shoulder και μπορεί να δρουν ανεξάρτητα ή και συνεργιστικά μεταξύ τους. Όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε στερεό υπόστρωμα, η κάθε αποικία αντιπροσωπεύει μια υποομάδα. Συνεπώς, η διάρκεια της φάσης αντίστασης συνδέεται με τον χρόνο που χρειάζεται για να θανατωθούν όλοι εκτός από έναν μικροοργανισμό στην κάθε υποομάδα. Επιπλέον η αντοχή των κυττάρων σχετίζεται με την ικανότητα τους να συνθέτουν ουσίες που τους επιτρέπουν να επιβιώνουν των αντιξοων συνθηκών μέχρι ενός σημείου, όπως επίσης και ότι οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην αντίσταση που προβάλλουν τα κύτταρα. Τέλος, μια ακόμα πιθανή εξήγηση για την εμφάνιση του φαινομένου της καθυστερημένης έναρξης της μικροβιακής μείωσης δόθηκε από τους Moatset al. (1971) και Adams and Moss (1995). Αυτή υποστηρίζει ότι τα κύτταρα τραυματίζονται κατά την έκθεση τους στην όποια επεξεργασία, όχι όμως σε τέτοιο βαθμό που να προκληθεί άμεσα ο θάνατος τους και για αυτό ο μικροβιακός πληθυσμός φαίνεται να παραμένει αμείωτος.

Όσον αφορά το φαινόμενο tailing στο τέλος της καμπύλης, αυτό αποδίδεται επίσης σε ένα εύρος διαφορετικών παραγόντων, οι οποίοι βασίζονται στην ανομοιομορφία του βακτηριακού πληθυσμού. Αναλυτικότερα, υπάρχουν δύο βασικές θεωρίες γύρω από την ερμηνεία αυτού του φαινομένου, η πρώτη υποστηρίζει ότι τα κύτταρα που παραμένουν ζωντανά μετά από την επεξεργασία είναι πολύ ανθεκτικά και για αυτό επιβιώνουν έναντι των υπολοίπων, άρα η εμφάνιση της «ουράς» στο τέλος της καμπύλης είναι ένα φυσιολογικό χαρακτηριστικό. Η δεύτερη θεωρία σχετίζει το φαινόμενο με μηχανιστικούς παράγοντες που σχετίζονται με την διεξαγωγή του πειράματος και τη μη ομοιόμορφη έκθεση όλων των κυττάρων στην εκάστοτε διεργασία. Με βάση αυτή τη θεωρία τα βακτήρια που επιβιώνουν είναι εκείνα τα οποία: ήταν λιγότερο προσβάσιμα στους δραστικούς παράγοντες λόγω της θέσης τους, υπέστησαν τραυματισμούς αλλά κατάφεραν να επιβιώσουν, δεν εκτέθηκαν αρκετό χρονικό διάστημα για να θανατωθούν, κατάφεραν να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες ή είναι γενετικά πιο ανθεκτικά στην συγκεκριμένη διεργασία (Cerf, 1997; Geeraerd et al., 2000). Ωστόσο δεν μπορεί απόλυτα να εξακριβωθεί σε ποια/ποιες από τις παραπάνω κατηγορίες ανήκει κάθε φορά το βακτηριακός πληθυσμός που παραμένει ζωντανός.

Εξαιτίας των παραπάνω φαινομένων είναι απόλυτα λογικό να εμφανίζονται διαφορετικοί τύποι καμπυλών απενεργοποίησης (Εικόνα 3.2) με αποτέλεσμα να μην επαρκεί το μοντέλο της γραμμικής μείωσης για να τα περιγράψει. Για αυτό και προτάθηκαν νέα μοντέλα που να προσαρμόζονται στα δεδομένα και να περιγράφουν με μεγαλύτερη ακρίβεια αυτές τις συμπεριφορές. Για την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα μοντέλα Weibull και Geeraerd με ουρά (tailed), για να περιγράψουν μαθηματικά τα φαινόμενα που αναλύθηκαν παραπάνω.



Εικόνα 3.2: Τύποι καμπυλών απενεργοποίησης. Αριστερή γραφική παράσταση: γραμμικό (Δ), γραμμικό με tailing (×), σιγμοειδές (◻), γραμμικό με shoulder (○). Δεξιά γραφική παράσταση: διφασικό (Δ), κοίλο (×), διφασικό με shoulder (◻), και κυρτό (◊) (Πηγή: Geeraerd et al., 2005).

3.3.2 Μοντέλο Geeraerd

Διάφορα μοντέλα προτάθηκαν από τους Geeraerd et al. (2000) για να περιγράψουν την μικροβιακή απενεργοποίηση μέσω ήπιας θερμικής επεξεργασίας, η οποία όμως διαφοροποιείται από το απλό μοντέλο γραμμικής μείωσης. Συγκεκριμένα, έχουν προτείνει ένα μοντέλο στο οποίο μαζί με το γραμμικό του τμήμα, το οποίο ακολουθεί κινητική πρώτης τάξεως (k_{max}), έχουν προστεθεί ακόμη παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση των διαμορφώσεων shoulder και tailing και αφορούν την καθυστέρηση στην εμφάνιση μείωσης του φορτίου και στο σχηματισμό της λεγόμενης ουράς στο τέλος της μείωσης αντίστοιχα. Η γενική εξίσωση που περιγράφει αυτό το φαινόμενο με τις τρεις διαφορετικές φάσεις που διαδέχεται η μια την άλλη, δηλαδή την αρχικά αμετάβλητη τιμή του μικροβιακού φορτίου (shoulder) της οποίας έπεται η γραμμική μείωση του έως ενός σημείου και ακολουθεί η εμφάνιση μιας ασυμπτωτικής ευθείας (tail) περιγράφεται από την εξής σχέση:

$$N = (N_0 - N_{res}) \cdot e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \frac{(e^{k_{max} \cdot S_l})}{1 + ((e^{(k_{max} \cdot S_l)} - 1) \cdot e^{-k_{max} \cdot t})} + N_{res} \quad \text{Εξίσωση (3.2)}$$

όπου, το N αντιστοιχεί στον βακτηριακό πληθυσμό σε χρόνο t , N_0 είναι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός, k_{max} είναι ο σταθερός ρυθμός πρώτης τάξεως, S_l είναι η διάρκειας φάσης shoulder και το N_{res} αντιστοιχεί στον βακτηριακό πληθυσμό που παραμένει μετάτο πέρας της επεξεργασίας και ευθύνεται για το φαινόμενο του tailing.

3.3.3 Μοντέλο Weibull

Το μοντέλο Weibull είναι κατά βάση ένα στατιστικό μοντέλο κατανομής των χρόνων απενεργοποίησης. Αν και εμπειρικό, οι παράμετροι του λαμβάνουν υπόψιν τους τις διάφορες βιολογικές διαφοροποιήσεις που υφίστανται και επιτρέπουν μια σύνδεση με τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών. Και το συγκεκριμένο μοντέλο έχει εξεταστεί κυρίως σε αδρανολογία μικροοργανισμών λόγω θερμικής επεξεργασίας και η σχέση που περιγράφει την μείωση του μικροβιακού φορτίου σε σχέση με τον χρόνο επεξεργασίας φαίνεται παρακάτω.

$$\frac{N}{N_0} = 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p} \quad \text{Εξίσωση (3.3)}$$

όπου, N_0 είναι το αρχικό βακτηριακό φορτίο, N είναι το βακτηριακό φορτίο σε χρόνο t , ενώ τα δ και p αποτελούν άγνωστες παραμέτρους. Η παράμετρος δ αφορά τον χρόνο που χρειάζεται για να πραγματοποιηθεί η πρώτη δεκαδική μείωση του βακτηριακού πληθυσμού. Στην περίπτωση του μοντέλου Weibull με ουρά, η παραπάνω εξίσωση τροποποιείται ως εξής:

$$N = (N_0 - N_{res}) \cdot 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p} + N_{res} \quad \text{Εξίσωση (3.4)}$$

Η παράμετρος p σχετίζεται με την συμπεριφορά της καμπύλης και συγκεκριμένα με την κυρτότητα της. Αναλόγως την τιμή της παραμέτρου p μπορούν να εξαχθούν τρεις διαφορετικές περιπτώσεις:

1. για τιμές $p < 1$, τότε η καμπύλη απενεργοποίησης έχει τα κοίλα προς τα πάνω,
2. για τιμές $p = 1$, τότε η καμπύλη απενεργοποίησης είναι γραμμική και
3. για τιμές $p > 1$, τότε η καμπύλη απενεργοποίησης έχει τα κοίλα προς τα κάτω.

Εάν εξεταστεί η συγκεκριμένη παράμετρος όχι από μαθηματική αλλά από μικροβιολογική σκοπιά προκύπτουν ορισμένες παρατηρήσεις. Συγκεκριμένα εάν ισχύει η πρώτη συνθήκη, δηλαδή εάν $p < 1$, τότε ο μικροοργανισμός είναι ευαίσθητος στο συγκεκριμένο εμπόδιο ενώ τα κύτταρα που παραμένουν ζωντανά φαίνεται να εμφανίζουν μια καλύτερη προσαρμοστικότητα στις συνθήκες καταπόνησης (stress) που έχουν υποβληθεί. Στην περίπτωση που ισχύει η δεύτερη συνθήκη, δηλαδή $p = 1$ θεωρείται ότι σε ίσα χρονικά διαστήματα θανατώνονται ίσα ποσά κυττάρων και άρα ισχύει η κινητική 1^{ης} τάξης. Εάν ισχύει η τρίτη συνθήκη δηλαδή εάν $p > 1$, ο μικροοργανισμός αποκτά μια ανθεκτικότητα στην αρχή της επεξεργασίας πριν αρχίσει να θανατώνεται και ο ρυθμός με τον οποίο επηρεάζονται τα εναπομείναντα κύτταρα φαίνεται να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου.

3.3.4 Διφασικό μοντέλο

Το συγκεκριμένο μοντέλο χωρίζει την μικροβιακή μείωση σε δύο φάσεις, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικό ρυθμό μείωσης μεταξύ τους. Συνήθως το πρώτο τμήμα της καμπύλης είναι αυτό με τον πιο μεγάλο ρυθμό απενεργοποίησης, καθώς τα πιο ευαίσθητα κύτταρα σαφώς επηρεάζονται και θανατώνονται πιο εύκολα και ακολουθεί το δεύτερο τμήμα, όπου τα κύτταρα είναι λιγότερο ευαίσθητα και η μείωση συμβαίνει με πιο αργό ρυθμό. Και πάλι η ανομοιογένεια του μικροβιακού πληθυσμού εξηγεί αυτό το φαινόμενο της εμφάνισης μιας αργής και μιας πιο γρήγορης μείωσης. Ακόμη μπορεί να υποδεικνύει και μια ενδεχόμενη προσαρμογή των κυττάρων στις νέες συνθήκες, κάτι που τους επιτρέπει να προβάλουν μεγαλύτερη αντίσταση στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η εξίσωση που περιγράφει την κινητική αυτού του μοντέλου είναι:

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N_0) + \log_{10}(f \cdot e^{-k_{max1} \cdot t} + (1 - f) \cdot e^{-k_{max2} \cdot t}) \quad \text{Εξίσωση (3.5)}$$

όπου, N και N_0 είναι ο τελικός και αρχικός βακτηριακός πληθυσμός, k_{max1} και k_{max2} είναι οι σταθεροί ρυθμοί πρώτης τάξης για την πρώτη και δεύτερη περιοχή αντίστοιχα, f το ποσοστό που αντιστοιχεί στην κάθε περιοχή και t ο χρόνος.

3.4 Φασματοσκοπία Υπέρυθρου (Infra-Red Spectroscopy, FTIR)

Η περιοχή του υπέρυθρου σε ένα ηλεκτρομαγνητικό φάσμα εκτείνεται σε μια αρκετά μεγάλη περιοχή με κυματαριθμούς που κυμαίνονται από $\approx 12,800 - 10 \text{ cm}^{-1}$. Η περιοχή αυτή χωρίζεται σε τρία τμήματα, το εγγύς υπέρυθρο (NearIR), το μέσο υπέρυθρο (MidIR) και το άπω υπέρυθρο (FarIR), με την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη να είναι η περιοχή του μέσου υπέρυθρου. Ο διαχωρισμός αυτός προέκυψε λόγω των εφαρμογών που υπάρχουν και των οργάνων που χρησιμοποιούνται, τα οποία διαφέρουν για κάθε τμήμα του (Kansiz et al., 1999)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου βασίζεται στο αποτέλεσμα που προκύπτει όταν μια δέσμη υπέρυθρης ακτινοβολίας αλληλεπιδράσει με την ύλη. Η ακτινοβολία προσφέρει ενέργεια στα μόρια πάνω στα οποία προσπίπτει και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των δονήσεων των δεσμών του μορίου σε υψηλότερης ενέργειας (κβαντισμένες) στάθμες. Ωστόσο υπάρχουν

δύο βασικές προϋποθέσεις για να μπορεί να απορροφηθεί η συγκεκριμένη έντασης ακτινοβολία. Η πρώτη είναι ότι η ενέργεια της πρέπει να αντιστοιχεί στις συχνότητες που συμπίπτουν με την φυσική συχνότητα δόνησης, τάσης και κάμψης των δεσμών του μορίου. Με άλλα λόγια η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας πρέπει να «ταιριάζει» ακριβώς στη διαφορά ενέργειας μεταξύ της θεμελιώδους και μιας διεγερμένης κατάστασης. Όμως ακόμα και εάν ισχύει ο παραπάνω περιορισμός υπάρχουν περιπτώσεις ενώσεων που και πάλι δεν την απορροφούν και ο λόγος σχετίζεται με την δομή της ένωσης και κατ' επέκταση των

δεσμών της. Η δεύτερη λοιπόν προϋπόθεση είναι οι ενώσεις να έχουν μεταβαλλόμενη διπολική ροπή ούτως ώστε να υπάρχει απορρόφηση στο υπέρυθρο (Filip και Hermann, 2001; Al-Qadiri et al., 2008).

Η ερμηνεία των φασμάτων απορρόφησης υπέρυθρου βασίζεται στις ενεργειακές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με το εκάστοτε δείγμα. Το ίδιο ισχύει και για τα φάσματα εκπομπής και ανάκλασης. Οι εν λόγω μεταβολές αποτελούν συνέπεια των μεταπτώσεων των μορίων από μια αρχική δονητική ή περιστροφική ενεργειακή κατάσταση σε μια νέα. Οι κύριες απορροφήσεις στο υπέρυθρο οφείλονται σε δύο βασικές μορφές δονήσεων. Η πρώτη αφορά τις δονήσεις τάσεως ή εκτατικές (stretching), όπου πραγματοποιείται μια συνεχής μεταβολή της απόστασης μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους. Μπορεί να είναι είτε συμμετρικές είτε ασύμμετρες και συμβολίζονται με το γράμμα ν . Η δεύτερη αφορά τις δονήσεις κάμψης (bending), όπου υπάρχει αλλαγή της γωνίας μεταξύ δύο δεσμών. Οι μοριακές αυτές δονήσεις που συμβολίζονται με το γράμμα δ , κατηγοριοποιούνται σε τέσσερα είδη: ψαλιδειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), παλλόμενη (wagging) και συστρεφόμενη (twisting), με τις πρώτες δύο να πραγματοποιούνται εντός του πεδίου κάμψεως και τις δύο επόμενες εκτός αυτού (Kim et al., 2005; Al-Qadiri et al., 2008).

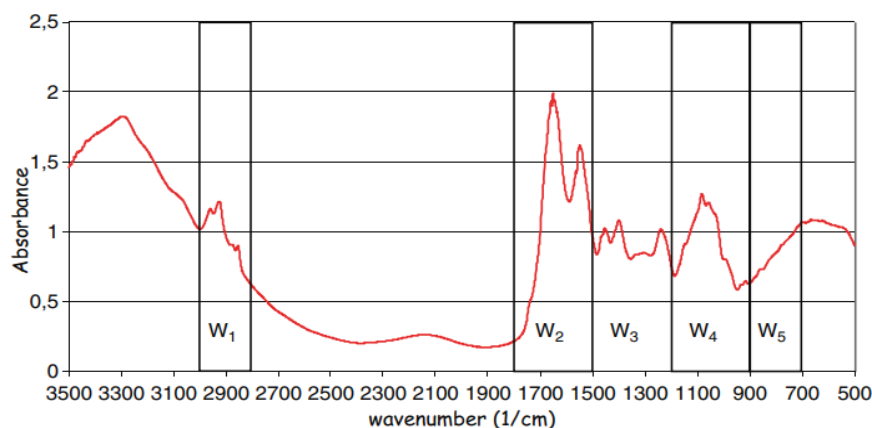
Επιπλέον οι διαφορετικές χαρακτηριστικές ομάδες απορροφούν συγκεκριμένες συχνότητες της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Κάθε δεσμός είναι διαφορετικός όσον αφορά τη διαφορά ενέργειας ανάμεσα στις δονητικές καταστάσεις κάτι που αποδίδεται στη φύση του δεσμού. Συνεπώς κάθε ένωση μπορεί να δώσει ένα πολύ συγκεκριμένο φάσμα, αναλόγως με τις χαρακτηριστικές ομάδες που περιέχονται στο μόριο της, το οποίο λειτουργεί ως «αποτύπωμα» καθώς είναι μοναδικό για κάθε μία. Συνεπώς η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση και τον χαρακτηρισμό ενώσεων και πιο συγκεκριμένα η περιοχή του μέσου υπέρυθρου είναι η συνήθως εκείνη που χρησιμοποιείται έναντι του εγγύς και άπω υπέρυθρου.

Ο κυματαριθμός (ν) είναι το μέγεθος που χρησιμοποιείται για λόγους ευκολίας έναντι της συχνότητας (f) ή του μήκους κύματος (λ) κατά την περιγραφή ενός φάσματος. Το μήκος κύματος του συγκεκριμένου τμήματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας βρίσκεται μεταξύ $2.5 - 50 \mu\text{m}$ ή συχνότητες από $1.2 \cdot 10^{14}$ έως $6.0 \cdot 10^{11} \text{ Hz}$ και αντιστοιχεί σε κυματαριθμούς από $4,000$ έως 200 cm^{-1} . Η σχέση που συνδέει αυτά τα μεγέθη είναι η εξής:

$$\tilde{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\mu\text{m})} \cdot 10^4 = \frac{f(\text{Hz})}{c(\text{cm/s})} \quad (3.5)$$

όπου c είναι η ταχύτητα του φωτός σε cm/s .

Τα φάσματα στο μέσο υπέρυθρο (IR) δίνουν πληροφορίες για την χημική δομή των μορίων του προς εξέταση δείγματος αλλά και του προσανατολισμού τους στο χώρο. Για ένα φάσμα που προέρχεται από ένα δείγμα με βακτηριακά κύτταρα όπως αυτό που φαίνεται στην Εικόνα 3.3 μπορούν να εντοπιστούν πέντε βασικές περιοχές, οι οποίες αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες δονήσεις χημικών δεσμών, κάτι που έχει ως συνέπεια αλλαγές που εντοπίζονται σε τέτοια φάσματα να μπορούν να μεταφραστούν σε τραυματισμούς που έχουν επέλθει στα κύτταρα (Ruthner et al., 1998)



Εικόνα 3.3: Αντιπροσωπευτικό φάσμα μέσου υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) από τα 3,500 έως τα 500 cm^{-1} (Πηγή: Alvarez-Ordóñez, και Prieto, 2012).

Η πρώτη περιοχή (w_1) τοποθετείται από τα 3,000 – 2,800 cm^{-1} και οι κορυφές που εμφανίζονται σε αυτό το εύρος αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης (ν_{as} , ν_{s}) μεταξύ C-H δηλαδή στα CH_3 και CH_2 που έχουν συνδεθεί κυρίως με τα λιπαρά οξέα που απαρτίζουν το κυτταρικό τοίχωμα (Alvarez-Ordóñez, και Prieto, 2012). Η δεύτερη περιοχή (w_2) εκτείνεται από τα 1,800 – 1,500 cm^{-1} και μέσα σε αυτήν εμφανίζονται δύο αρκετά έντονες κορυφές, που με βάση τη βιβλιογραφία οφείλονται σε πεπτίδια και πρωτεΐνες και δίνουν πληροφορίες σχετικά με τη δομή τους. Η πρώτη και υψηλότερη κορυφή (Amide I) συναντάται στα $\approx 1,650 \text{ cm}^{-1}$ και αφορά τις δονήσεις τάσεως C=O των αμινοξέων των πρωτεϊνών. Η δεύτερη (Amide II) βρίσκεται στα $\approx 1,540 \text{ cm}^{-1}$ αποδίδεται στις δονήσεις κάμψης (δ_{s}) του δεσμού N-H, σε εκτατικές δονήσεις των δεσμών C-N καθώς και σε δονήσεις κάμψης των λειτουργικών ομάδων CH_3 και CH_2 . Επιπλέον συναντάται και μια ακόμη αρκετά μικρότερη κορυφή στα $\approx 1,740 \text{ cm}^{-1}$, η οποία αντιστοιχεί σε δονήσεις τάσης των δεσμών C=O που βρίσκονται στους εστέρες των λιπαρών οξέων. Στην ίδια περιοχή απορροφούν και οι δονήσεις τάσεων των δεσμών C=O, C=N και C=C που υπάρχουν στα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) και πιο συγκεκριμένα στις αζωτούχες βάσεις. Από τα 1,500 – 1,200 cm^{-1} εκτείνεται η τρίτη περιοχή (w_3) στην οποία αποτυπώνονται κυρίως δονήσεις κάμψης των λειτουργικών ομάδων CH_3 και CH_2 , οι οποίες μπορεί να ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες όπως λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες και ενώσεις που έχουν φώσφορο στο μόριο τους. Η ζώνη κοντά στα 1,455 cm^{-1} αφορά συμμετρικές και αντισυμμετρικές δονήσεις των ομάδων CH_2 και CH_3 αντίστοιχα ενώ στα 1,310 – 1,240 cm^{-1} βρίσκεται η ζώνη του Αμιδίου III που σχετίζεται όπως και οι προαναφερθείσες με τις κυτταρικές πρωτεΐνες. Η περιοχή μεταξύ 1,200 – 900 cm^{-1} (w_4) αποκαλύπτει σύμφωνα με τη βιβλιογραφία την παρουσία άλλων ενώσεων εκτός των νουκλεϊκών οξέων. Αυτές περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες, οι οποίοι βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης και λιποσακχαρίτες, οι οποίοι εντοπίζονται στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων (εφόσον έχουν). Το φάσμα φαίνεται να περιλαμβάνει τις συμμετρικές δονήσεις τάσεως που προέρχονται από τη χαρακτηριστική ομάδα PO^- ($\approx 1,080 \text{ cm}^{-1}$) της «ραχοκοκκλιάς» (backbone) των νουκλεϊκών οξέων και από τριεκατατικές δονήσεις μεταξύ των δεσμών C-O-C και C-O-P. Στο τελευταίο τμήμα του φάσματος (w_5) που έχει εύρος από 900 έως 500 cm^{-1} είναι μια περιοχή με χαρακτηριστικό φάσμα, το οποίο εξαρτάται από διάφορες δονήσεις νουκλεοτιδίων και αμινοξέων που περιέχουν αρωματικό δακτύλιο στην πλευρική τους ομάδα (φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη &

τυροσίνη). Λόγω της μικρής έντασης που δίνουν αυτές οι δονήσεις και του γεγονότος ότι είναι πολύ συγκεκριμένο το μοτίβο που δίνει ο κάθε συνδυασμός η περιοχή αυτή αποκαλείται «αποτύπωμα» (true fingerprint region) και μπορεί να δώσει πληροφορίες για την ταυτότητα ενός μικροοργανισμού. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται μια προσπάθεια αντιστοίχισης των διάφορων κορυφών και περιοχών που εμφανίζονται στα φάσματα υπέρυθρου μικροοργανισμών με τους δεσμούς που προκαλούν αυτές τις δονήσεις και τις ενώσεις με τις οποίες έχουν συσχετιστεί. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την ευκολότερη επεξεργασία και επεξήγηση των φασμάτων που συλλέχθηκαν κατά το πείραμα (Alvarez-Ordóñez, και Prieto, 2012).

Πίνακας 3.1: Αντιστοίχιση ορισμένων περιοχών και κορυφών που εμφανίζονται σε ένα φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας από βακτηριακό δείγμα (Πηγή: Alvarez-Ordóñez, και Prieto, 2012).

Περιοχή φάσματος	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Πιθανό είδος δόνησης
w ₁	3,500	Δόνηση τάσεως του δεσμού O-H του υδροξυλίου
	3,200	Δόνηση τάσεως του δεσμού N-H των πρωτεϊνών (AmideA)
	2,955	Δόνηση τάσεως (ασύμμετρη) του δεσμού C-H του CH ₃ των λιπαρών οξέων.
	2,959-2,852	CH, CH ₂ , CH ₃ των λιπαρών οξέων
	2,930	Δόνηση τάσεως (ασύμμετρη) του δεσμού C-H του CH ₂
	2,918	Δόνηση τάσεως (ασύμμετρη) του δεσμού C-H του CH ₃ των λιπαρών οξέων.
	2,989	Δόνηση τάσεως του δεσμού C-H των ομάδων μεθίνης
	2,870	Δόνηση τάσεως (συμμετρική) του δεσμού C-H του CH ₃ .
	2,850	Δόνηση τάσεως (συμμετρική) του δεσμού C-H του CH ₂ των λιπαρών οξέων.
w ₂	1,740	Δόνηση τάσεως του δεσμού C=O των εστέρων των λιπαρών οξέων.
	1,715	Δόνηση τάσεως του δεσμού C=O των καρβοξυλικών οξέων
	1,680 – 1,715	Δόνηση τάσεως του δεσμού C=O των νουκλεϊκών οξέων
	1,695, 1,685, 1,675	Αμίδιο I (λόγω των β-στροφών των πρωτεϊνών)
	1,655 – 1,637	Ζώνη Αμιδίου I, (λόγω της διάταξης της α-έλικας και της β-πτυχωτής δομής των πρωτεϊνών)
	1,548	Ζώνη Αμιδίου II
	1,550 – 1,520	Ζώνη Αμιδίου II
	1,515	Ζώνη «Τυροσίνης»
w ₃	1,468	Δόνηση κάμψης του δεσμού C-H του CH ₂
	1,400	Δόνηση τάσεως (συμμετρική) του δεσμού C=O του COO ⁻
	1,310 – 1,240	Ζώνη Αμιδίου III
w ₄	1,250 – 1,220, 1,084 – 1,088	Δόνηση τάσεως (ασύμμετρη) της χαρακτηριστικής ομάδας PO ₂ ⁻ των φωσφοδιεστέρων.
	1,200 - 900	Δόνηση δακτυλίου των χαρακτηριστικών ομάδων C-O-C και C-O των υδατανθράκων
	1,090 – 1,085	Δόνηση τάσεως (συμμετρική) του δεσμού P=O της χαρακτηριστικής ομάδας PO ₂
w ₅	720	Δόνηση κάμψης (λικνιζόμενη) του δεσμού C-H του CH ₂
	900 – 600	Περιοχή του «αποτυπώματος»

3.5 Στόχος Διπλωματικής Εργασίας

Στόχος της συγκεκριμένης μεταπτυχιακής μελέτης είναι η αξιολόγηση της επίδρασης *in vitro* που έχει η ακτινοβολία του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος (CAPP) σε επιλεγμένα βακτήρια, τόσο αλλοιογόνα όσο και παθογόνα καθώς επίσης και η ανάπτυξη μοντέλων κινητικής απενεργοποίησης που θα περιγράφουν τη μείωση του μικροβιακού φορτίου. Σε δεύτερο χρόνο πραγματοποιήθηκε καταγραφή φασμάτων FTIR ορισμένων μικροοργανισμών μετά την έκθεσή τους σε ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα, με σκοπό την ανίχνευση της δράσης του πλάσματος σε κυτταρικό επίπεδο μέσω των φασματικών δεδομένων.

4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

4.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε εφαρμογή ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος τύπου jet (kINPen®IND, neoplas GmbH, Germany) για τον έλεγχο *in vitro* της αύξησης επιλεγμένων αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζεται αναλυτικά το σύνολο των προς μελέτη μικροοργανισμών. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή πλάσματος λειτουργεί με χρήση ευγενούς αερίου και συγκεκριμένα Αργού (Ar) ως φέρον αέριο, με ηλεκτρική τάση 2-6 kV και συχνότητα 1 MHz.

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η προσαρμογή κατάλληλων μαθηματικών μοντέλων στα μικροβιολογικά αποτελέσματα με στόχο τον προσδιορισμό των παραμέτρων που χαρακτηρίζουν την κινητική απενεργοποίησης που παρουσιάζει ο κάθε μικροοργανισμός. Επιπλέον, μελετήθηκε και η επίδραση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος στα βακτηριακά κύτταρα μέσω της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Πιο συγκεκριμένα ελήφθησαν τα φάσματα των βακτηρίων *Salmonella Typhimurium* (Gram -) και *Bacillus cereus* (Gram +) πριν και μετά την έκθεσή τους στο πλάσμα και αναζητήθηκαν διαφοροποιήσεις μεταξύ των φασμάτων που να υποδεικνύουν βλάβες στα κύτταρα. Χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο IROS-05 FTIR (Ostec corporation group, Russia) εξοπλισμένο με ανιχνευτή Τελλουριδίου των Υδραργύρου-Καδμίου (Mercury-Cadmium-Telluride -MCT) και κρύσταλλο διαμαντιού. Οι μικροβιολογικές πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, η εφαρμογή του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων και η καταγραφή των φασμάτων έγινε στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας. Και τα τρία εργαστήρια ανήκουν στο Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 4.1: Μικροοργανισμοί που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Αλλοιογόνοι	Παθογόνοι
<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	

4.2 Μικροβιολογικές Μέθοδοι

Προετοιμασία βακτηριακού εναιωρήματος

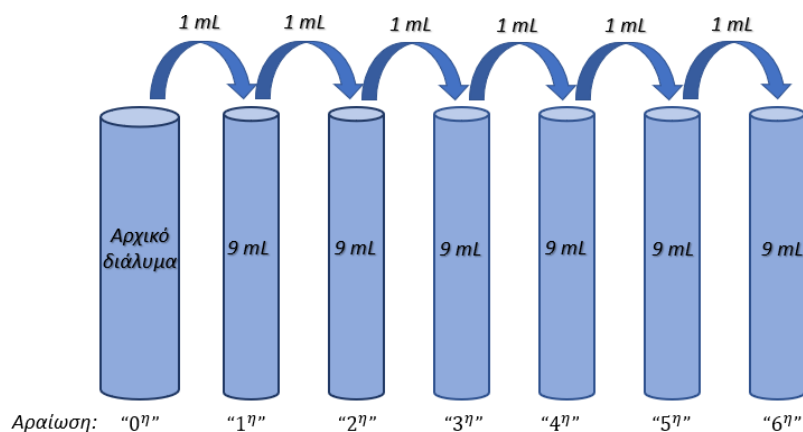
Για κάθε στέλεχος που μελετήθηκε, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, οι μικροοργανισμοί αποψύχθηκαν από την θερμοκρασία των -80°C , όπου και βρίσκονταν αποθηκευμένοι, σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν το κατάλληλο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (broth) ώστε να μπορέσουν να αναπτυχθούν. Συγκεκριμένα το υπόστρωμα TSB (Tryptic Soy Broth) χρησιμοποιήθηκε για την ανανέωση όλων των μικροοργανισμών εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactic Acid Bacteria, LAB*), για τα οποία χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα MRS Broth (1^η ανανέωση).

Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανακαλλιέργεια 100 μL , από την 1^η ανανέωση στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα, η οποία επώασθη για 18 ώρες στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κάθε στελέχους (2^η ανανέωση). Στο επόμενο στάδιο μεταφέρθηκαν 8 mL της 2^{ης} ανανέωσης σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon και εν συνεχεία φυγοκεντρήθηκαν (4 °C, 10 min, 7.000 \times g). Έπειτα πραγματοποιείται απόχυση του υπερκείμενου υγρού, επαναπροσθήκη αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (9 mL) και φυγοκέντρωση υπό τις ίδιες συνθήκες (“πλύσιμο κυττάρων”). Στο τέλος, πραγματοποιείται ξανά απόχυση του υπερκείμενου υγρού και επανεώρηση της βιομάζας σε 10 mL Ringer.

Η επιβεβαίωση της καθαρότητας του εναιωρήματος των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) σε στερεό θρεπτικό υλικό TSA και επώαση στην άριστη θερμοκρασία για κάθε μικροοργανισμό για χρονικό διάστημα 24-48 ώρες. Επιπλέον, ο ακριβής μικροβιακός πληθυσμός κάθε βακτηρίου προσδιορίστηκε μέσω της επιφανειακής επίστρωσης ποσότητας 100 μL κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία με υπόστρωμα MRS και TSA για τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, αντίστοιχα και επώαση σε θερμοκρασία 25, 30 και 37 °C για 24 ή 48 ώρες.

Διαδικασία Διαδοχικών Αραιώσεων

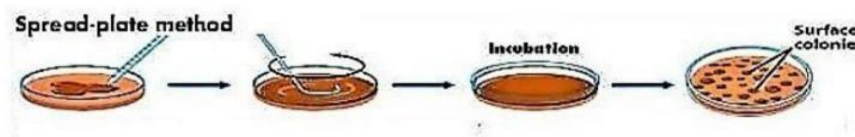
Για την παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων (Εικόνα 4.1) ποσότητα 1 mL βακτηριακού εναιωρήματος μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (1^η αραιώση). Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα Ringer μέχρι την 6^η αραιώση, με βάση την εκτίμηση του αρχικού φορτίου των υπό μελέτη βακτηρίων (10^8 - 10^9 CFU/mL).



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παρασκευής των διαδοχικών αραιώσεων.

Εμβολιασμός τρυβλίων

Ο εμβολιασμός των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη επιλεκτικού υποστρώματος TSA (Tryptic Soy Agar) για όλους τους μικροοργανισμούς, εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια στα οποία έγινε χρήση του υποστρώματος MRS. Ο εμβολιασμός όλων των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (Εικόνα 4.2), εξαπλώνοντας ομοιόμορφα στην επιφάνεια των τρυβλίων ποσότητα 100 μL βακτηριακού εναιωρήματος από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασίες και χρόνους που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.3 και απαρίθμηση των τρυβλίων εκείνων που περιείχαν από 30 έως 300 αποικίες.



Εικόνα 4.2: Τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) (Πηγή: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plating_methods.svg).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η επιλογή των τρυβλίων για την απαρίθμηση των μικροοργανισμών είναι συνάρτηση της δεκαδικής αραιώσης αλλά και του χρόνου έκθεσης στο πλάσμα. Με το σκεπτικό αυτό, οι δεκαδικές αραιώσεις που επιλέχθηκαν για τους διαφορετικούς χρόνους έκθεσης στο πλάσμα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2. Κάθε δοκιμή πραγματοποιήθηκε εις διπλούν (διπλά τρυβλία) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με τον μέσο όρο των μετρήσεων \pm την τυπική απόκλιση.

Πίνακας 4.2: Οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με το χρόνο έκθεσης των μικροοργανισμών στο πλάσμα.

Χρόνος Έκθεσης (min)	Αραιώσεις
0	5 ^η , 6 ^η
3	5 ^η , 6 ^η
6	4 ^η , 5 ^η
9	4 ^η , 5 ^η
12	3 ^η , 4 ^η
15	3 ^η , 4 ^η

Καταμέτρηση αποικιών

Για την έκφραση των αποτελεσμάτων σε μονάδες CFU/mL, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σχέση:

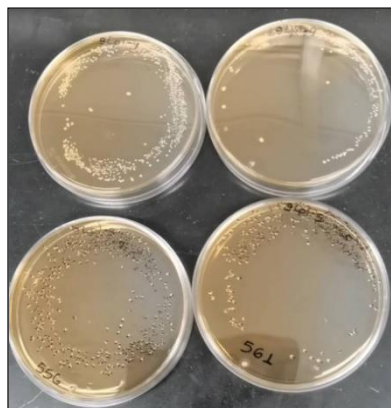
$$N = \frac{C_1 + C_2}{n_1 + \left(\frac{n_2}{10}\right)} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{1}{d_1} \quad \text{Εξίσωση (4.1)}$$

όπου:

C_1 είναι το συνολικό άθροισμα των αποικιών (CFU) στα n_1 τρυβλία της αραιώσης d_1

C_2 είναι το συνολικό άθροισμα των αποικιών στα n_2 τρυβλία της επόμενης αραιώσης

V ο όγκος του εμβολίου (mL)



Τα μοντέλα απενεργοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των αποτελεσμάτων είναι τα:

- Το μοντέλο «Geeraerd»,
- Το μοντέλο «Weibull»,
- Το μοντέλο «Bigelow»,
- Το διφασικό μοντέλο

Εικόνα 4.3: Αποτελέσματα από την καταμέτρηση των αποικιών για τον μικροοργανισμό *L. plantarum* από την 4^η και 5^η αραιώση για χρόνο έκθεσης στο πλάσμα ίσο με 9 λεπτά.

4.3 Εφαρμογή ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος

Κατά την χρήση της συσκευής παραγωγής του ψυχρού πλάσματος η παροχή αερίου είναι ίση με 4.0 L/min (slm) και για την καλύτερη κατανομή του πλάσματος σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου χρησιμοποιείται μια απόληξη κωνικού σχήματος, η οποία τοποθετήθηκε στο ακροφύσιο του jet, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 4.4. Το τρυβλίο τοποθετείται στο κέντρο της απόληξης προκειμένου η διασπορά του πλάσματος στο τρυβλίο να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να εκτεθούν όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφα οι μικροοργανισμοί του τρυβλίου στο πλάσμα. Αφότου ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα εμβολιασμένα τρυβλία, ακολουθεί η επώαση των μικροοργανισμών στην κατάλληλη κάθε φορά θερμοκρασία και χρονική διάρκεια και έπειτα γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών. Οι χρόνοι και οι θερμοκρασίες επώασης αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.3.



Εικόνα 4.4: Η συσκευή παραγωγής ψυχρού πλάσματος (kINPen IND model). Αριστερά το εξάρτημα τύπου στυλό με το χαρακτηριστικό «λοφίο» και δεξιά η συσκευή σε λειτουργία με χρήση κωνικής απόληξης.

Πίνακας 4.3: Χρόνοι και θερμοκρασίες επώασης των μικροοργανισμών μετά την έκθεσή τους στο πλάσμα.

Μικροοργανισμός	Χρόνος επώασης (ώρες)	Θερμοκρασία επώασης (° C)
<i>Pseudomonas fragi</i>	48	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	48	25
<i>Cronobacter sakazakii</i>	48	25
<i>Bacillus subtilis</i>	48	30
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	48	25
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	48	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	48	30
<i>Salmonella Typhimurium</i>	24	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	37
<i>Escherichia coli</i>	24	37
<i>Bacillus cereus</i>	24	37
<i>Listeria monocytogenes</i>	24	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	37

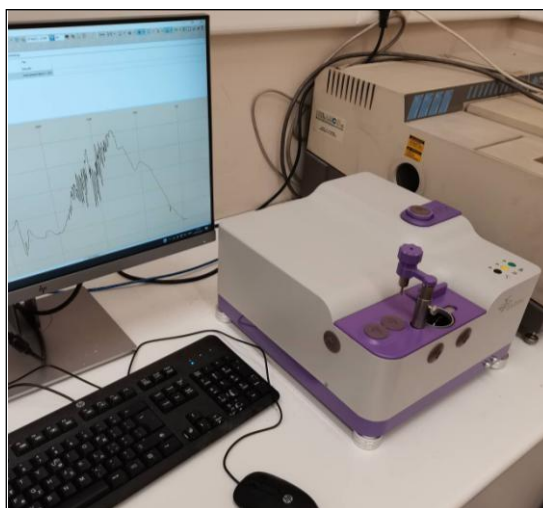
4.4 Φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR)

Προετοιμασία δείγματος

Για την παρασκευή των δειγμάτων που θα χρησιμοποιούνταν για τη φασματοσκοπία ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Σε θάλαμο νηματώδους ροής (laminar) με έναν κρίκο εμβολιασμού, ο οποίος είχε πρώτα περαστεί από τη φλόγα λύχνου Bunsen ώστε να αποστειρωθεί επιλέχθηκε η μισή από την αποικία του εκάστοτε μικροοργανισμού. Τα κύτταρα στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίον είχαν προστεθεί προηγουμένως 100 μL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και για το υπόλοιπο μισό κομμάτι της αποικίας. Οι δύο δοκιμαστικοί σωλήνες αναδεύτηκαν πολύ καλά σε vortex, ώστε να ομογενοποιηθεί όσο το δυνατόν καλύτερα το δείγμα. Στη συνέχεια έγινε καταγραφή του φάσματος αναφοράς από το φασματοφωτόμετρο. Έπειτα με μια πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου λήφθηκαν από τον δοκιμαστικό σωλήνα 10 μL , τα οποία τοποθετήθηκαν πάνω στο διαμάντι του υποδοχέα με τέτοιο τρόπο ώστε να μην εξέλχει η σταγόνα από τα όρια του κρυστάλλου. Στη συνέχεια ο υποδοχέας με το δείγμα τοποθετήθηκαν σε ξηραντήρα στους 40 $^{\circ}\text{C}$ και παρέμειναν εκεί για χρονικό διάστημα 10 – 15 min μέχρι να στεγνώσει η σταγόνα πάνω στο διαμάντι. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες τέσσερις φορές και συνολικά να έχουν τοποθετηθεί 50 μL πάνω στον κρύσταλλο. Το τελικό βήμα είναι η καταγραφή του φάσματος του μικροοργανισμού.

Καταγραφή και Επεξεργασία των φασμάτων

Για την καταγραφή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο IROS-05 FTIR (Ostec corporation group, Russia), (Εικόνα 4.5) εξοπλισμένο με ανιχνευτή Τελλουριδίου των Υδραργύρου-Καδμίου (Mercury-Cadmium-Telluride -MCT) και κρύσταλλο διαμαντιού. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή της εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR). Η διαχωριστική ικανότητα (resolution) ήταν 4 cm^{-1} , η ταχύτητα του κινούμενου κατόπτρου 0,3164 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ και κάθε δείγμα σαρώθηκε 64 φορές. Πριν τη καταγραφή των φασμάτων καταγράφηκε φάσμα υποβάθρου (background), το οποίο περιλάμβανε τις απορροφήσεις συστατικών της ατμόσφαιρας (κυρίως H_2O και CO_2). Ελήφθησαν τα φάσματα κάθε υπο-δείγματος κάθε δείγματος.



Εικόνα 4.7: Το φασματοφωτόμετρο IROS-05 FTIR (Ostec corporation group, Russia), που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των φασμάτων των μικροοργανισμών.

Μετά την καταγραφή των φασμάτων είναι απαραίτητο να ακολουθηθεί μια σειρά από ενέργειες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για την επεξεργασία όλων των φασμάτων που συλλέχθηκαν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο και την ίδια σειρά με την οποία αναφέρονται παρακάτω. Όλες οι επεξεργασίες των φασμάτων πραγματοποιήθηκαν με χρήση του λογισμικού OMNIC (ver. 8.2.0.387, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Καταρχάς, αφαιρείται μια μικρή περιοχή από το τέλος του φάσματος, επειδή για τιμές του κυματαριθμού χαμηλότερες των 500 cm^{-1} εμφανίζεται μόνο θόρυβος, λόγω του οργάνου και της τεχνικής που χρησιμοποιείται. Το επόμενο βήμα είναι αφαίρεση της κορυφής του CO_2 (φασματική περιοχή 2,400-2,250 cm^{-1}) και η αντικατάστασή της από μια ευθεία γραμμή. Η συγκεκριμένη ενέργεια δεν επηρεάζει σε κανένα βαθμό τα αποτελέσματα καθώς δεν υπάρχει

κάποια άλλη κορυφή κοντά σε αυτή του διοξειδίου του άνθρακα στο συγκεκριμένο τμήμα του φάσματος που θα μπορούσε να αλλοιωθεί κατά την επεξεργασία. Στη συνέχεια ακολουθεί μια διαδικασία που ουσιαστικά επιχειρεί να μειώσει όσο το δυνατόν περισσότερο τον θόρυβο που υπάρχει στο φάσμα. Με την έννοια «θόρυβος» εννοούνται τα σήματα που αν και καταγράφονται δεν αντιστοιχούν σε πραγματικές απορροφήσεις του δείγματος. Αντίθετα αποδίδονται σε διάφορους άλλους παράγοντες, ενδεικτικά αναφέρονται: η ανομοιογένεια του δείγματος, η πηγή, η ψηφιοποίηση του αναλογικού σήματος κ.α. Η εξομάλυνση του σήματος (smoothing) καταφέρει να ομαλοποιήσει τον θόρυβο σε κάποιο βαθμό δίνοντας ένα καλύτερο φάσμα. Στα φάσματα που παρατίθενται παρακάτω έχει γίνει μόνο μία φορά εξομάλυνση σήματος, με χρήση της λειτουργίας «automatic smoothing» και αυτό για να μη χαθούν τυχόν κορυφές και αλλοιωθεί το φάσμα. Έπειτα γίνεται η διόρθωση της βασικής γραμμής (baseline correction) με χρήση της λειτουργίας «automatic baseline correct», η οποία αποτελείται από τα κατώτερα σημεία του φάσματος, που έχουν σχεδόν μηδενική απορρόφηση.

Τέλος, υπολογίστηκε το μέσο φάσμα των δύο επαναλήψεων κάθε δείγματος, το οποίο κανονικοποιήθηκε, δηλαδή έγινε αναγωγή όλων των απορροφήσεων μεταξύ των τιμών 0 και 1, με τη μέγιστη απορρόφηση να αντιστοιχεί στην τιμή 1. Συνεπώς καθίσταται ευκολότερη η σύγκριση των φασμάτων μεταξύ τους.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την έκθεση των διάφορων μικροοργανισμών στο πλάσμα συγκεντρώθηκαν και παρουσιάζονται παρακάτω, για κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά. Εκτός από τη μείωση του μικροβιακού φορτίου, παρουσιάζονται και τα πρωτογενή μοντέλα απενεργοποίησης που προσαρμόστηκαν στα πειραματικά δεδομένα με σκοπό να περιγράψουν την κινητική απενεργοποίησης του κάθε μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, τα πρωτογενή μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι αυτά των: Geeraerd (Geeraerd et al., 2005), Weibull (Mafart et al., 2002), το γραμμικό (Bigelow and Esty, 1920) και το διφασικό μοντέλο (Cerf, 1977). Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι δεν προσαρμόστηκαν ικανοποιητικά όλα τα μοντέλα στα πειραματικά δεδομένα όλων των μικροοργανισμών. Η προσαρμογή των μοντέλων και η εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού GinaFit version 1.6 software (KULeuven, Belgium) του Excel (Geeraerd et al., 2005).

Στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου παρατίθενται τα αποτελέσματα για τους επτά αλλοιογόνους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν και έπειτα ακολουθεί το δεύτερο μέρος με τα αποτελέσματα των παθογόνων. Το τρίτο μέρος του κεφαλαίου αφορά τα αποτελέσματα από τη φασματοσκοπία υπέρυθρου. Σε γενικές γραμμές η πλειοψηφία των μοντέλων προσαρμόστηκε ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα, όπως προκύπτει από τις τιμές του συντελεστή προσδιορισμού R^2 και του προσαρμοσμένου συντελεστή $R^2_{adjusted}$, καθώς επίσης και από τα στατιστικά κριτήρια MSE (Mean Squared Error) και RMSE (Root Mean Squared Error). Το R^2 δείχνει το ποσοστό της παραλλακτικότητας που εξηγείται από το μοντέλο και το $R^2_{adjusted}$ λαμβάνει υπόψη του επιπλέον τον αριθμό των παραμέτρων του μοντέλου. Για τον υπολογισμό του προσαρμοσμένου R^2 χρησιμοποιείται η εξής σχέση:

$$R^2_{adjusted} = 1 - \left(\frac{(n - i) \cdot (1 - R^2)}{n - p} \right) \quad \text{Εξίσωση (5.1)}$$

όπου, n είναι ο αριθμός παρατηρήσεων και p ο αριθμός παραμέτρων, ενώ το i παίρνει τις τιμές 1 και 0 όταν το μοντέλο περιλαμβάνει ή όχι intercept, αντίστοιχα.

Το μέσο τετράγωνο του σφάλματος (MSE) και η ρίζα του μέσου τετραγώνου του σφάλματος (RMSE) παρουσιάζουν τη μέση απόκλιση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων, συνεπώς όσο μικρότερη η τιμή τους τόσο καλύτερη προσαρμογή εμφανίζει το εξεταζόμενο μοντέλο. Ο υπολογισμός τους πραγματοποιείται σύμφωνα με τις ακόλουθες σχέσεις:

$$MSE = \frac{\sum(\mu_{observed} - \mu_{predicted})}{df} \quad \text{Εξίσωση (5.2)}$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{df}} = \sqrt{\frac{\sum(\mu_{observed} - \mu_{predicted})}{df}} \quad \text{Εξίσωση (5.3)}$$

όπου, $\mu_{observed}$ και $\mu_{predicted}$ είναι οι παρατηρήσεις και οι προβλέψεις αντίστοιχα ενώ το df αντιστοιχεί στους βαθμούς ελευθερίας του μοντέλου και προκύπτει από την αφαίρεση μεταξύ του αριθμού παρατηρήσεων (n) και του αριθμού παραμέτρων (p).

Μέρος 1^ο: Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί

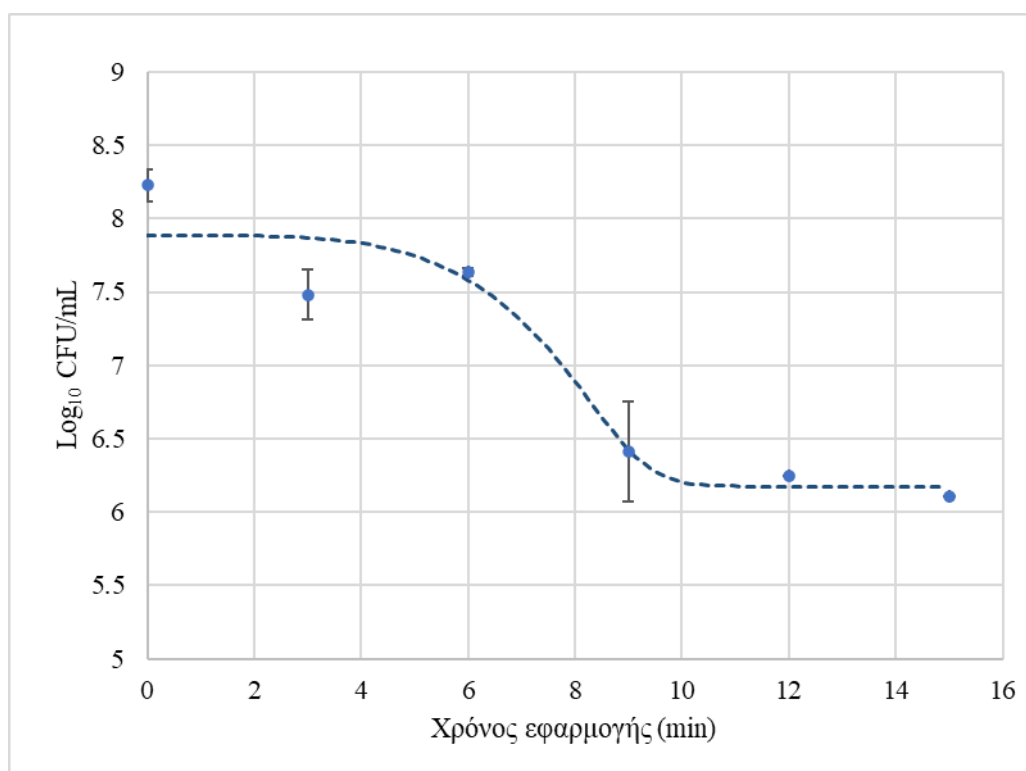
1. *Pseudomonas fragi*

Το βακτήριο *P. fragi* παρουσίασε ελάττωση του φορτίου κατά 2,12 log₁₀ CFU/mL μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα και η σχέση της μείωσης αυτής με το χρόνο έκθεσης στο πλάσμα έχει μια σχετικά ομαλή και ομοιόμορφη πορεία. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν την κινητική απενεργοποίησης είναι τα: Weibull, Weibull με ουρά (tailing), το γραμμικό και το διφασικό.

Πίνακας 5.1: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου της *P. fragi* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (log ₁₀ CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,23	0,11
3	7,48	0,17
6	7,64	0,02
9	6,42	0,34
12	6,25	N/D
15	6,11	N/D

Στο Διάγραμμα 5.1 παρατηρείται ότι η κινητική απενεργοποίησης του βακτηρίου ακολουθεί σιγμοειδή καμπύλη, η οποία ξεκινάει από 7,88 log₁₀ CFU/mL, εμφανίζει μια σχετικά μικρής διάρκειας φάση shoulder, ενώ στο τέλος της φαίνεται σχηματίζεται ένα πλατό (tailing) κοντά στην τιμή των 6 log₁₀ CFU/mL. Το μοντέλο Weibull με ουρά που χρησιμοποιήθηκε έχει μια σχετικά καλή προσαρμογή με βάση τις τιμές που αναγράφονται στον Πίνακα 5.2 για την αξιολόγηση του συγκεκριμένου μοντέλου.

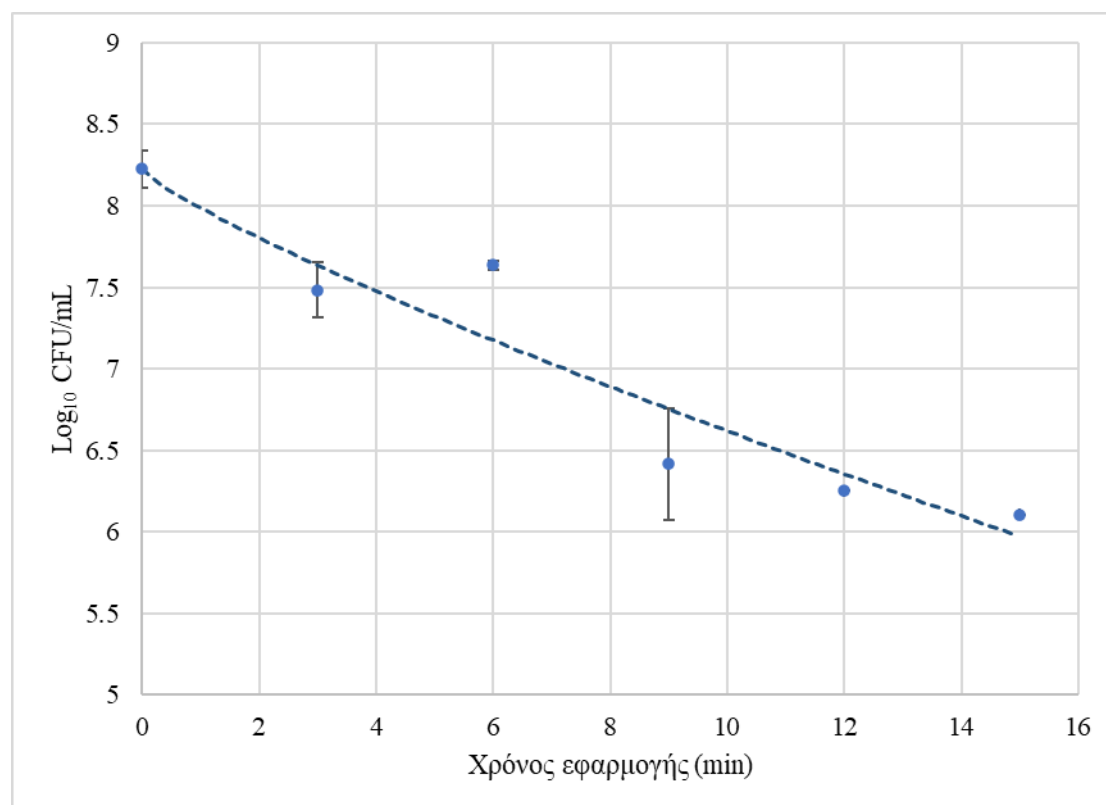


Διάγραμμα 5.1: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull με ουρά στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fragi*.

Πίνακας 5.2: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull με ουρά.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	7,86		1,27	
p	4,33		3,95	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	7,88		0,28	
N (\log_{10} CFU/mL)	6,18		0,26	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,93	0,82	0,14	0,37

Στο Διάγραμμα 5.2 το αρχικό φορτίο (N_0) εκτιμάται 8,22 \log_{10} CFU/mL και η τιμή του φαίνεται να φθίνει με σχεδόν γραμμική πορεία, ωστόσο εμφανίζει μια ελαφρά καμπυλότητα με τα κοίλα να βρίσκονται προς τα πάνω, όπως αναμένεται και από την τιμή της παραμέτρου p . Σε αντίθεση με το προηγούμενο διάγραμμα εδώ δεν φαίνεται η τάση να σχηματιστεί κάποιο πλατό, αλλά να συνεχίζεται η μείωση του μικροβιακού φορτίου. Η προσαρμογή αυτού του μοντέλου δεν είναι τόσο καλή σύμφωνα με τις τιμές του Πίνακα 5.3.

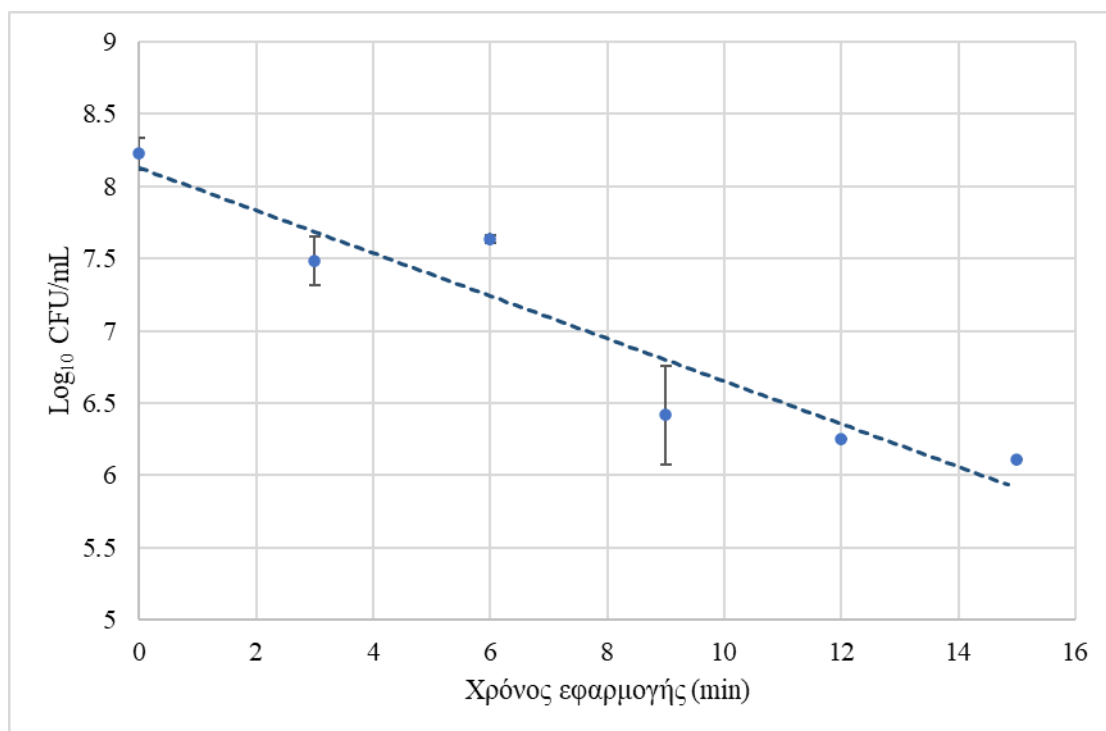


Διάγραμμα 5.2: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fragi*.

Πίνακας 5.3: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	5,67		2,88	
p	0,83		0,36	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,22		0,35	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,90	0,84	0,13	0,35

Το γραμμικό μοντέλο, εκτιμά το αρχικό φορτίο (N_0) σε $8,13 \log_{10}$ CFU/mL και ο ρυθμός απενεργοποίησης υπολογίζεται σε $0,34 \text{ min}^{-1}$, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.4. Οι τιμές των δεικτών αξιολόγησης του μοντέλου δείχνουν ότι το συγκεκριμένο δεν έχει καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fragi*.

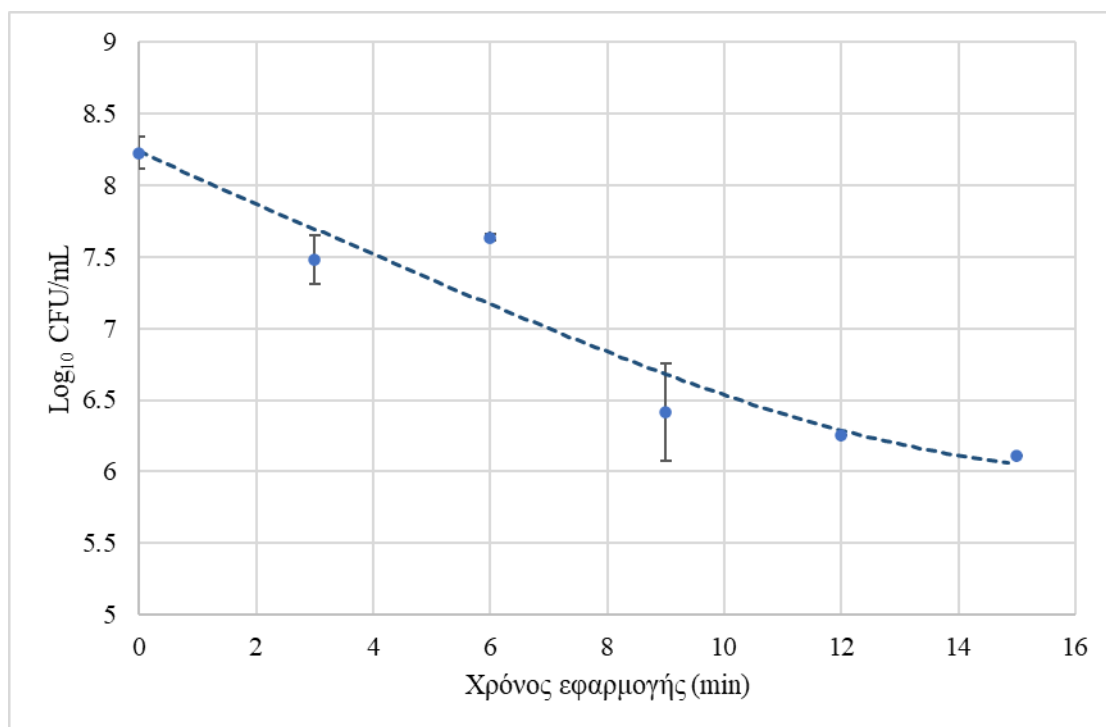


Διάγραμμα 5.3: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fragi*.

Πίνακας 5.4: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,34		0,06	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,13		0,23	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,90	0,87	0,10	0,32

Το διφασικό μοντέλο εκτιμά ότι ο αρχικός πληθυσμός ξεκινά από 8,23 log₁₀ CFU/mL και μειώνεται με ένα ρυθμό 0.42 min⁻¹ σχεδόν σε όλη τη διάρκεια των 15 λεπτών. Σύμφωνα με τα κριτήρια αξιολόγησης που αναγράφονται στον Πίνακα 5.5, το διφασικό μοντέλο έχει μια όχι τόσο καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά σημεία.



Διάγραμμα 5.4: Προσαρμογή του διφασικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fragi*

Πίνακας 5.5: Οι κινητικές παράμετροι του διφασικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
f	0.99		0.11	
k _{max1} (min ⁻¹)	0.42		0.30	
k _{max2} (min ⁻¹)	0.00		1.56	
N ₀ (log ₁₀ CFU/mL)	8.23		0.38	
Αξιολόγηση μοντέλου	R ²	R ² adjusted	MSE	RMSE
	0.91	0.78	0.17	0.41

Συγκρίνοντας τα παραπάνω μοντέλα φαίνεται ότι για το μικροοργανισμό *P. fragi* αυτό που περιγράφει καλύτερα την κινητική απενεργοποίησης του λόγω της έκθεσης του σε πλάσμα με βάση και τα κριτήρια αξιολόγησης είναι αυτό του “Weibull με ουρά” καθώς φαίνεται να έχει την καλύτερη προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα.

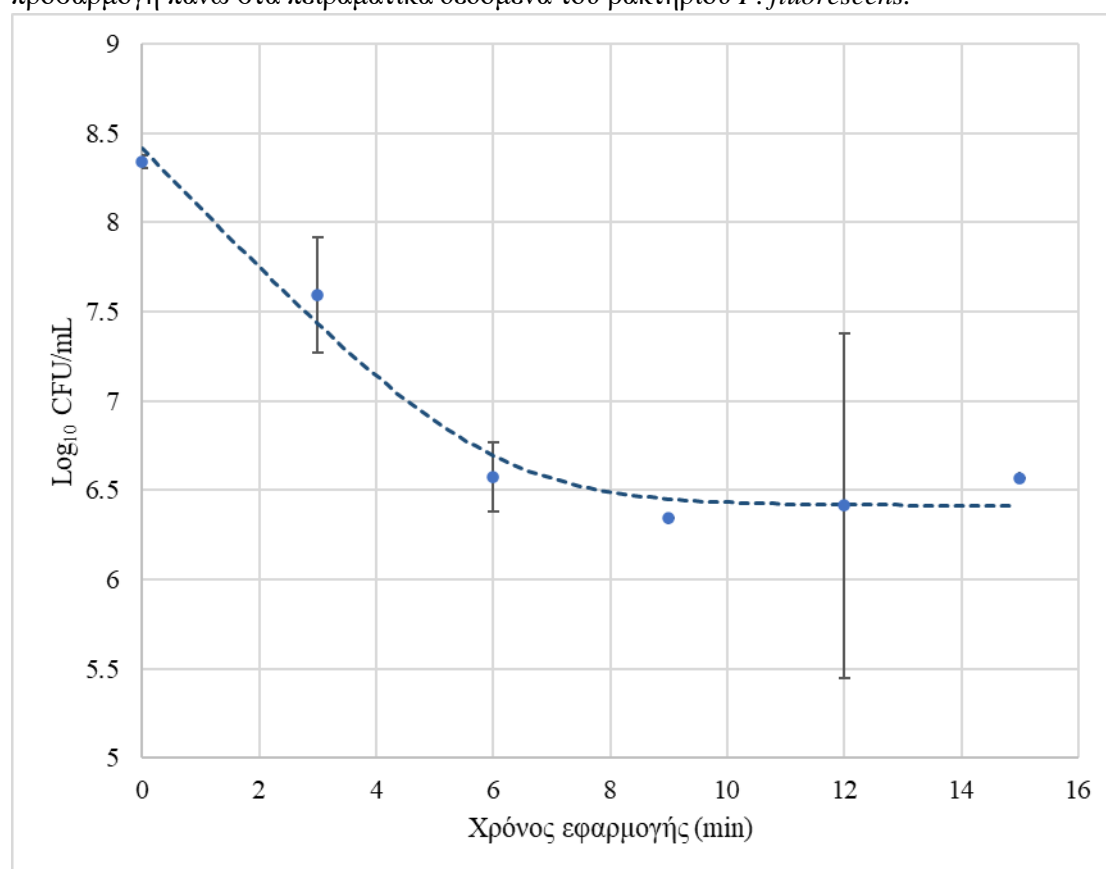
2. *Pseudomonas fluorescens*

Το φορτίο του μικροοργανισμού *P. fluorescens* ελαττώθηκε κατά $1,77 \log_{10}$ CFU/mL μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα και η μείωση πραγματοποιήθηκε κατά κύριο λόγο μέσα στα πρώτα 6 λεπτά της έκθεσης του στο πλάσμα. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν την κινητική απενεργοποίησης της είναι τα: Geeraerd, Weibull με ουρά, το γραμμικό και το διφασικό μοντέλο.

Πίνακας 5.6: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου της *P. fluorescens* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,34	0,04
3	7,59	0,33
6	6,57	0,19
9	6,34	N/D
12	6,41	0,96
15	6,57	N/D

Το μοντέλο Geeraerd με ουρά με εκτιμά τον αρχικό πληθυσμό (N_0) σε $8,41 \log_{10}$ CFU/mL και εμφανίζει απευθείας μείωση φορτίου, η οποία μετά τα 7 λεπτά φαίνεται να σταματάει και να σταθεροποιείται γύρω από την τιμή των $6,41 \log_{10}$ CFU/mL. Αυτή η τιμή αντιστοιχεί στον εναπομείναντα πληθυσμό που δεν θανατώνεται και σε αυτόν οφείλεται και το φαινόμενο του σχηματισμού “ουράς” (tail) στο τέλος της καμπύλης. Το συγκεκριμένο μοντέλο έχει πολύ καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα του βακτηρίου *P. fluorescens*.

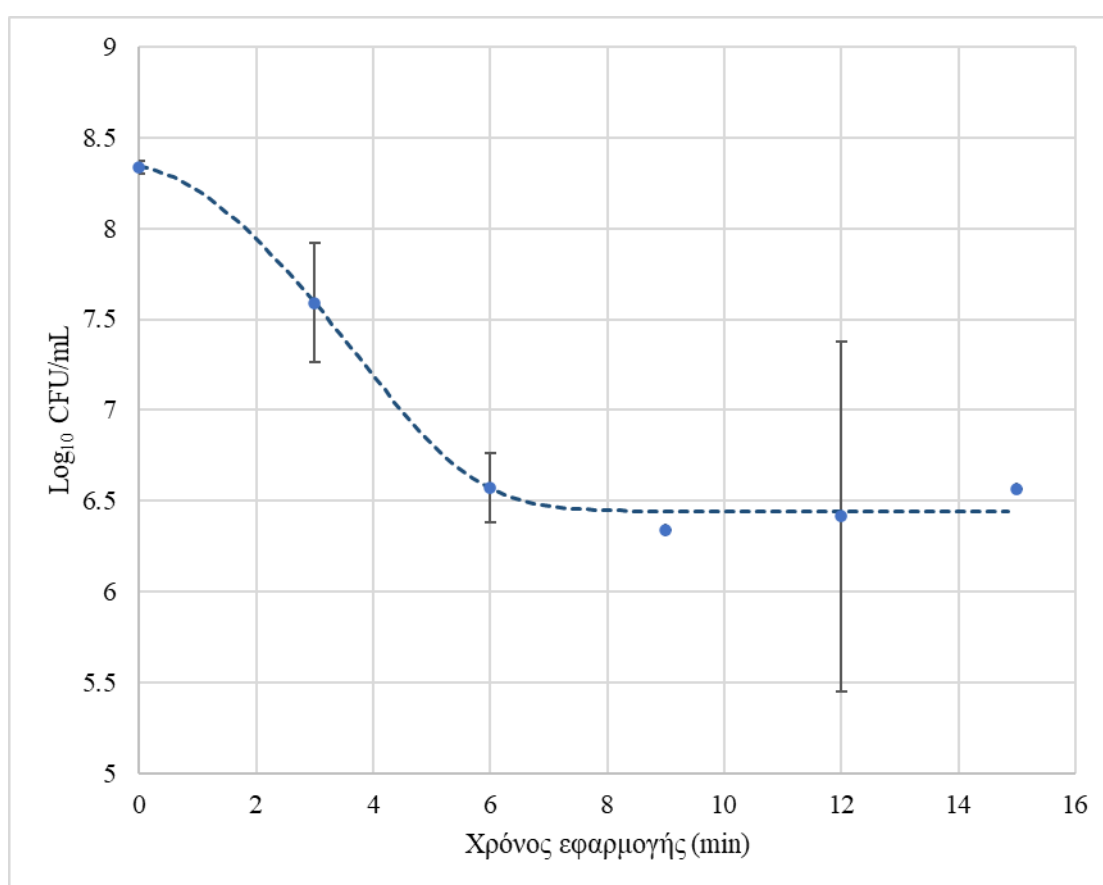


Διάγραμμα 5.5 : Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd με ουρά στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fluorescens*.

Πίνακας 5.7: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd με ουρά.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,78		0,14	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,41		0,16	
N (\log_{10} CFU/mL)	6,41		0,10	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,97	0,96	0,03	0,16

Η καμπύλη του Διαγράμματος 5.6 εκτιμά το αρχικό φορτίο (N_0) σε $8,34 \log_{10}$ CFU/mL και έχει παρόμοια μορφή με την προηγούμενη με τη μόνη διαφορά να εντοπίζεται στην αρχή της καμπύλης. Το μοντέλο Weibull με ουρά εκτιμά ότι η αρχική πτώση του φορτίου δεν είναι τόσο απότομη και η καμπύλη έχει μια ελαφρώς σιγμοειδή μορφή. Ωστόσο και σε αυτήν την περίπτωση παρουσιάζει μια σταθεροποίηση στην τιμή του φορτίου μετά τα 8 λεπτά έκθεσης.

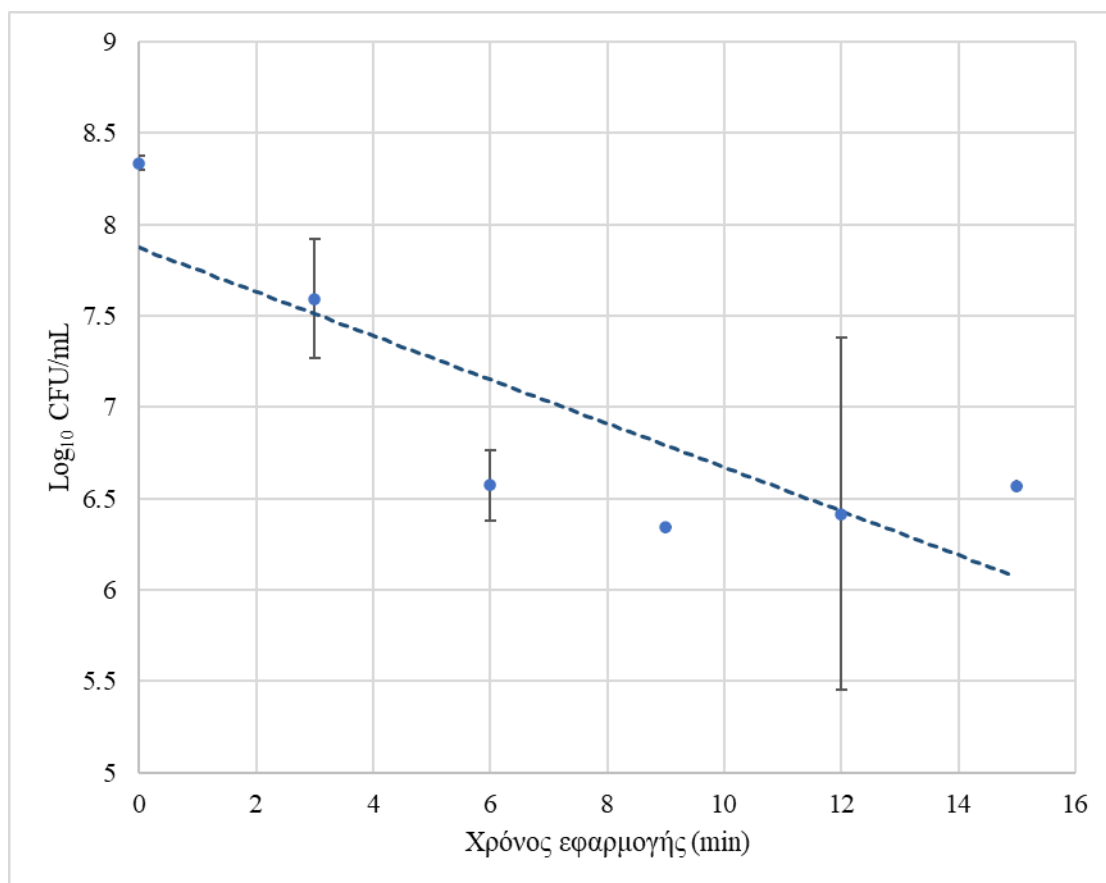


Διάγραμμα 5.6: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull με ουρά στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fluorescens*.

Πίνακας 5.8: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull με ουρά.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	3,53		0,41	
ρ	1,61		0,41	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,34		0,12	
N (\log_{10} CFU/mL)	6,44		0,07	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,99	0,98	0,01	0,12

Το γραμμικό μοντέλο, το οποίο και πάλι δεν έχει καλή προσαρμογή στον συγκεκριμένο μικροοργανισμό όπως φαίνεται από όλους τους δείκτες αξιολόγησης του Πίνακα 5.9, υπολογίζει τον αρχικό πληθυσμό (N_0) σε $7,87 \log_{10}$ CFU/mL και προβλέπει μείωση πληθυσμού κατά $1 \log_{10}$ CFU/mL μετά από περίπου 8 λεπτά με τον ρυθμό απενεργοποίησης να εκτιμάται ίσος με $0,28 \text{ min}^{-1}$.

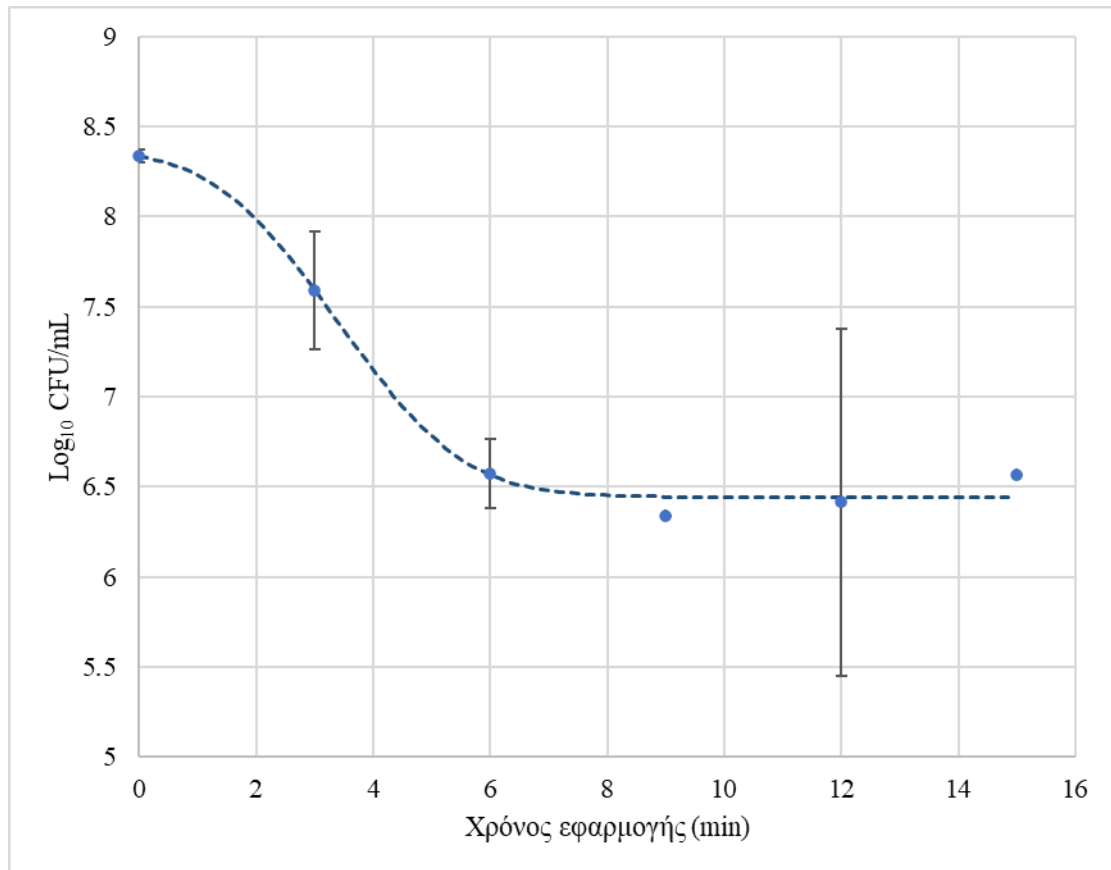


Διάγραμμα 5.7: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fluorescens*

Πίνακας 5.9: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,28		0,09	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	7,87		0,36	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,69	0,61	0,25	0,50

Το διφασικό μοντέλο εκτιμά εκτός από τις φάσεις μείωσης του πληθυσμού και του φαινομένου tailing και μια φάση “shoulder” διάρκειας 1,74 λεπτά, προτού ξεκινήσει η φάση της μικροβιακής μείωσης, η οποία έχει μέγιστο ρυθμό $1,28 \text{ min}^{-1}$. Στη συνέχεια εκτιμάται ότι ο πληθυσμός θα σταθεροποιηθεί σχηματίζοντας ένα πλατό (tailing) γύρω από την τιμή των $6,5 \log_{10}$ CFU/mL.



Διάγραμμα 5.8: Προσαρμογή του διφασικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. fluorescens*

Πίνακας 5.10: Οι κινητικές παράμετροι του διφασικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
f	0,99		0,01	
$k_{\max 1}$ (min^{-1})	1,28		0,85	
$k_{\max 2}$ (min^{-1})	0,00		0,09	
Shoulder length (min)	1,74		1,07	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,34		0,17	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,99	0,96	0,03	0,17

Από τα μοντέλα που αναφέρονται για την περιγραφή της κινητικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *P. fluorescens*, αυτό του “Weibull με ουρά” προσαρμόζεται στα πειραματικά δεδομένα καλύτερα από όλα, με το μοντέλο “Geeraerd με ουρά” να ακολουθεί. Οι δείκτες αξιολόγησης είναι σχεδόν ίδιοι για τα δύο αυτά μοντέλα, ωστόσο και το διφασικό έχει αρκετά ικανοποιητική προσαρμογή. Αντίθετα, το γραμμικό μοντέλο δεν μπορεί να περιγράψει την κινητική απενεργοποίησης του βακτηρίου.

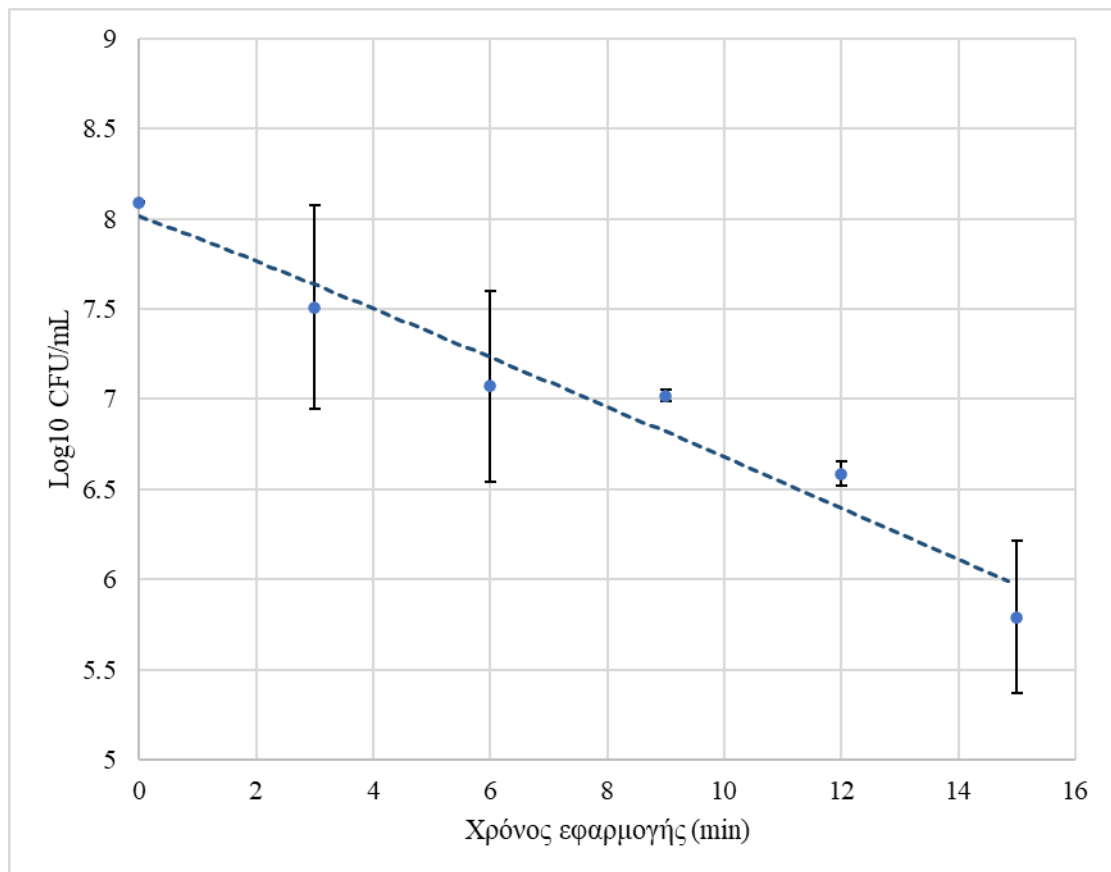
3. *Brochothrix thermosphacta*

Ο μικροοργανισμός *B. thermosphacta* παρουσιάζει μια άμεση μείωση του πληθυσμού του με το συνολικό μικροβιακό φορτίο να μειώνεται μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα κατά $2,3 \log_{10}$ CFU/mL, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.11. Το Weibull και το γραμμικό μοντέλο χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν την κινητική απενεργοποίησης του συγκεκριμένου βακτηρίου.

Πίνακας 5.11: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου της *B. thermosphacta* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,09	0,002
3	7,51	0,56
6	7,07	0,53
9	7,02	0,03
12	6,59	0,06
15	5,79	0,42

Η προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα έδειξε ότι απαιτείται χρόνος 7,6 λεπτών προκειμένου να μειωθεί ο πληθυσμός κατά ένα λογάριθμο, σύμφωνα με την τιμή της παραμέτρου δ . Η συγκεκριμένη καμπύλη είναι σχεδόν γραμμική κάτι που φαίνεται και από την τιμή της παραμέτρου p , η οποία είναι σχεδόν ίση με 1. Το μοντέλο αυτό εμφανίζει καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα με βάση τις τιμές των συντελεστών αξιολόγησης του Πίνακα 5.12.

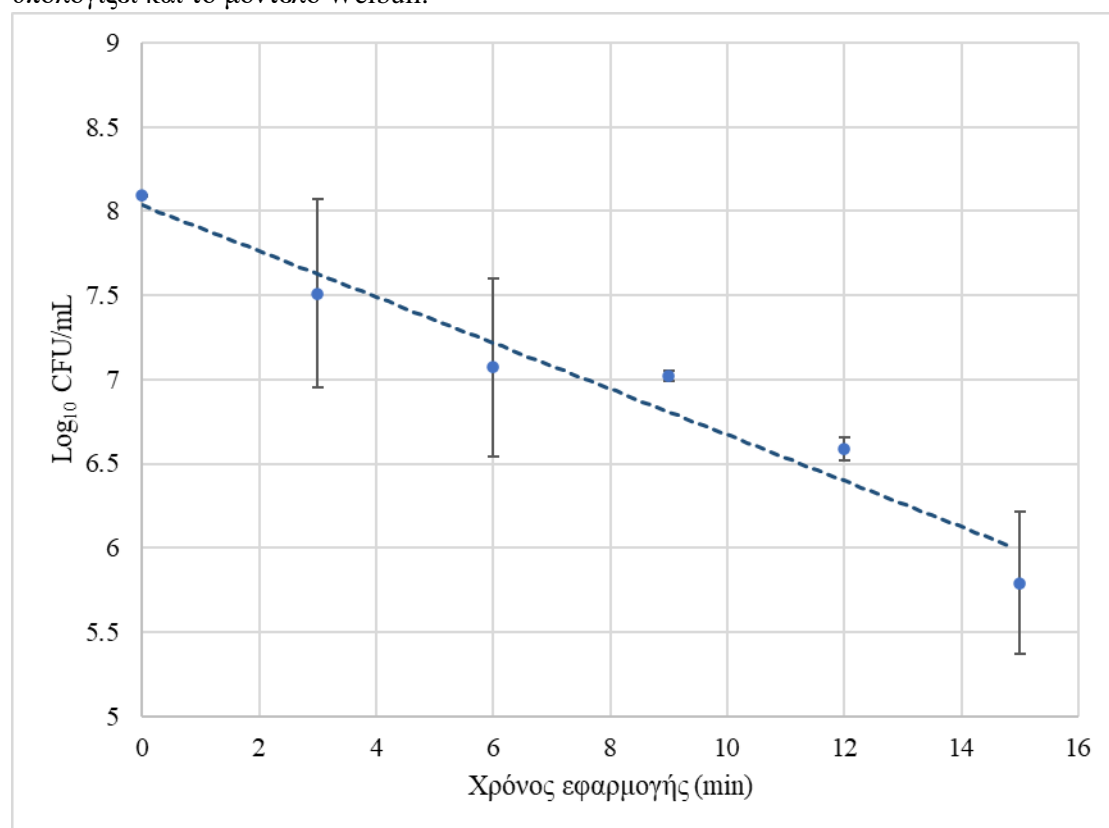


Διάγραμμα 5.9: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. thermosphacta*.

Πίνακας 5.12: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	7,60		2,01	
ρ	1,05		0,33	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,01		0,22	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,95	0,92	0,05	0,23

Το γραμμικό μοντέλο επίσης προσαρμόζεται αρκετά καλά στα πειραματικά δεδομένα, ο αρχικός πληθυσμός (N_0) εκτιμάται ίσος με 8,04 \log_{10} CFU/mL και ο ρυθμός απενεργοποίησης υπολογίζεται σε 0.31 min^{-1} . Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) του πληθυσμού παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 5.10 και είναι περίπου 7,50 λεπτά, δηλαδή πολύ κοντά με την τιμή που υπολογίζει και το μοντέλο Weibull.



Διάγραμμα 5.10: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. thermosphacta*.

Πίνακας 5.13: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,31		0,04	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,04		0,14	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,95	0,94	0,04	0,20

Και τα δύο μοντέλα που εξετάστηκαν έχουν αρκετά καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού με τις τιμές του R^2 να είναι ίσες με 0.95 και για τα δύο μοντέλα. Ωστόσο, το γραμμικό μοντέλο είναι εκείνο που παρουσιάζει την καλύτερη προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα του βακτηρίου *B. thermosphacta*, με βάση τις τιμές των υπόλοιπων συντελεστών αξιολόγησης.

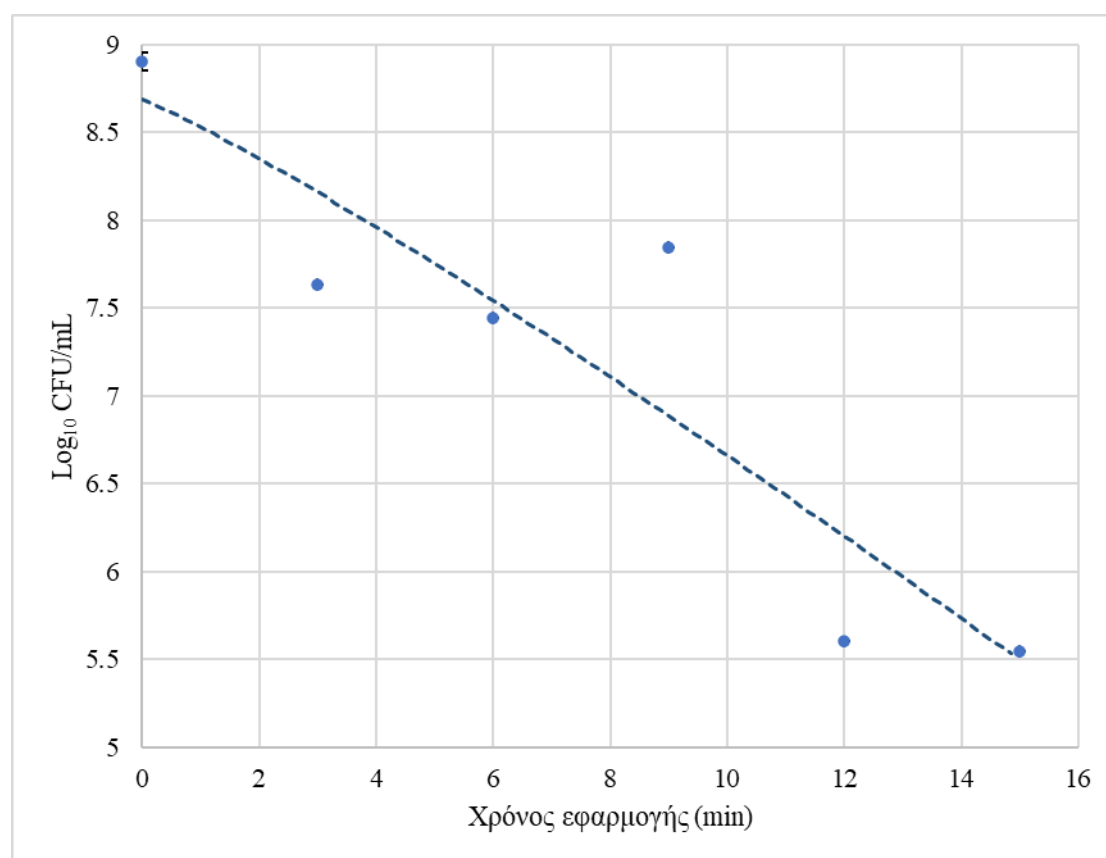
4. *Cronobacter sakazakii*

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρουσίασε τη δεύτερη μεγαλύτερη μείωση πληθυσμού ανάμεσα σε όλους τους μικροοργανισμούς που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη. Η μείωση αυτή είναι της τάξης των 3.36 \log_{10} CFU/mL μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο ψυχρό πλάσμα και τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Weibull και το γραμμικό.

Πίνακας 5.14: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου της *C. sakazakii* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,90	0,05
3	7,63	N/D
6	7,44	N/D
9	7,85	N/D
12	5,60	N/D
15	5,54	N/D

Το μοντέλο Weibull είναι το πρώτο από τα δύο μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν την κινητική του βακτηρίου *C. sakazakii*. Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός εκτιμάται σε 8,69 \log_{10} CFU/mL και η καμπύλη φαίνεται να στρέφει ελαφρώς τα κοίλα προς τα κάτω, ενώ ο χρόνος που θεωρητικά χρειάζεται για να μειωθεί κατά 1 λογάριθμο το μικροβιακό φορτίο είναι 5,32 λεπτά με βάση την παράμετρο δ .

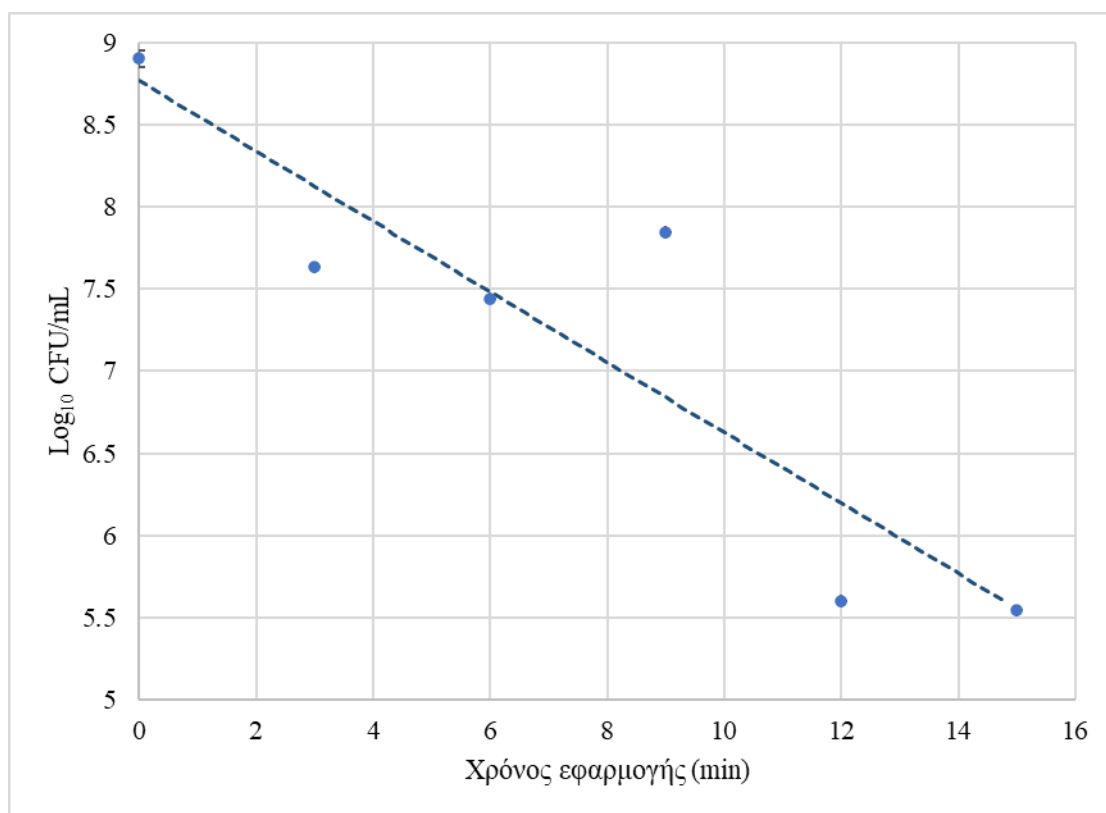


Διάγραμμα 5.11: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *C. sakazakii*.

Πίνακας 5.15: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	5,32		3,97	
p	1,12		0,72	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,65		0,70	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,82	0,70	0,54	0,73

Παρακάτω, απεικονίζεται το γραμμικό μοντέλο, το οποίο ξεκινάει με αρχική εκτίμηση του πληθυσμού σε 8,77 \log_{10} CFU/mL και ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) εκτιμάται σε 5 λεπτά περίπου με βάση το Διάγραμμα 5.12. Η τιμή του ρυθμού απενεργοποίησης υπολογίζεται σε 0.49 min^{-1} .



Διάγραμμα 5.12 Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *C. sakazakii*.

Πίνακας 5.16: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,49		0,12	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,77		0,46	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,82	0,77	0,41	0,64

Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν δεν περιγράφουν ικανοποιητικά την απενεργοποίηση του βακτηρίου *C. sakazakii*. Ωστόσο, η εικόνα που εμφανίζει το γραμμικό μοντέλο είναι ελαφρώς καλύτερη με βάση τους δείκτες αξιολόγησης των μοντέλων.

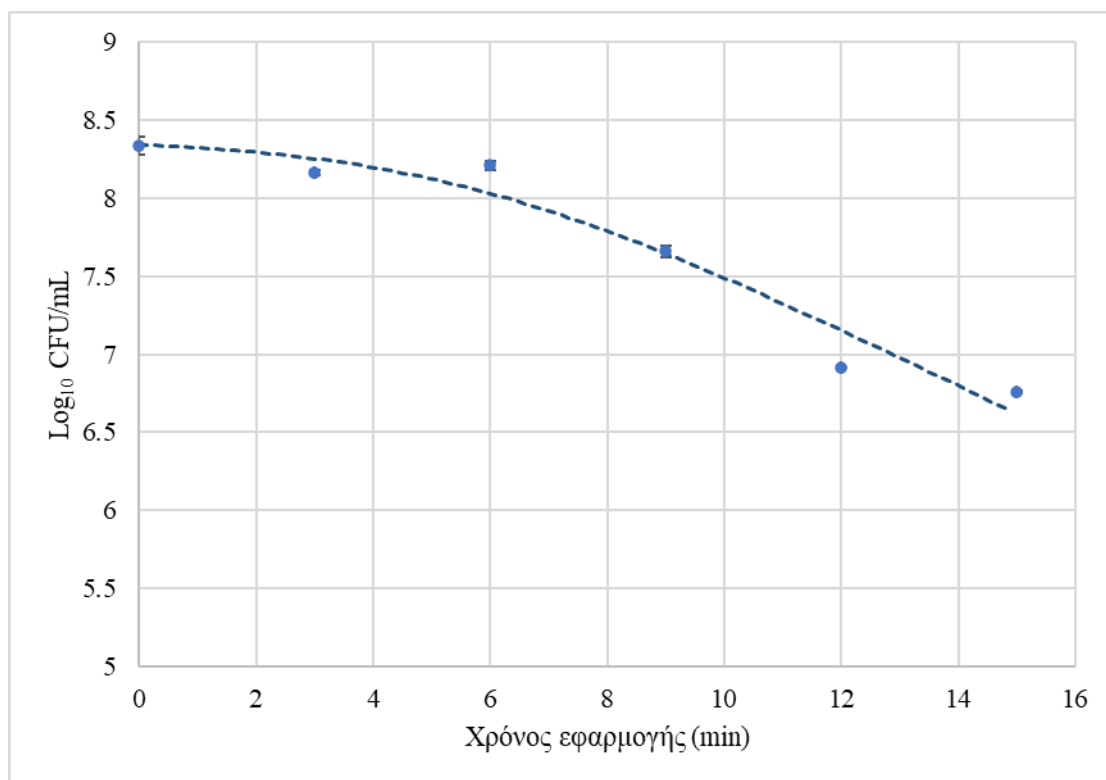
5. *Bacillus subtilis*

Το βακτήριο *B. subtilis* εμφάνισε μείωση κατά $1.58 \log_{10}$ CFU/mL μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός εμφάνισε αρχικά σχετική ανθεκτικότητα στην εφαρμογή του πλάσματος χωρίς να παρουσιάζει αξιοσημείωτη μείωση του πληθυσμού του, τουλάχιστο μέχρι τα πρώτα 8 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν τη συμπεριφορά του ήταν τα: Geeraerd, Weibull με ουρά και το γραμμικό.

Πίνακας 5.17: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *B. subtilis* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,34	0,06
3	8,16	0,02
6	8,21	0,03
9	7,66	0,03
12	6,91	N/D
15	6,76	0,01

Στο Διάγραμμα 5.13 απεικονίζεται μια καμπύλη, η οποία εκτιμά τον αρχικό πληθυσμό του βακτηρίου (N_0) σε $8,34 \log_{10}$ CFU/mL και η διάρκεια του shoulder υπολογίζεται σε 5,70 λεπτά. Ο μικροβιακός πληθυσμός φαίνεται να εμφανίζει μια μείωση με ολόενα και αυξανόμενο ρυθμό, με τη μέγιστη τιμή του να εκτιμάται σε $0,42 \text{ min}^{-1}$. Το συγκεκριμένο μοντέλο φαίνεται ότι έχει αρκετά καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα.

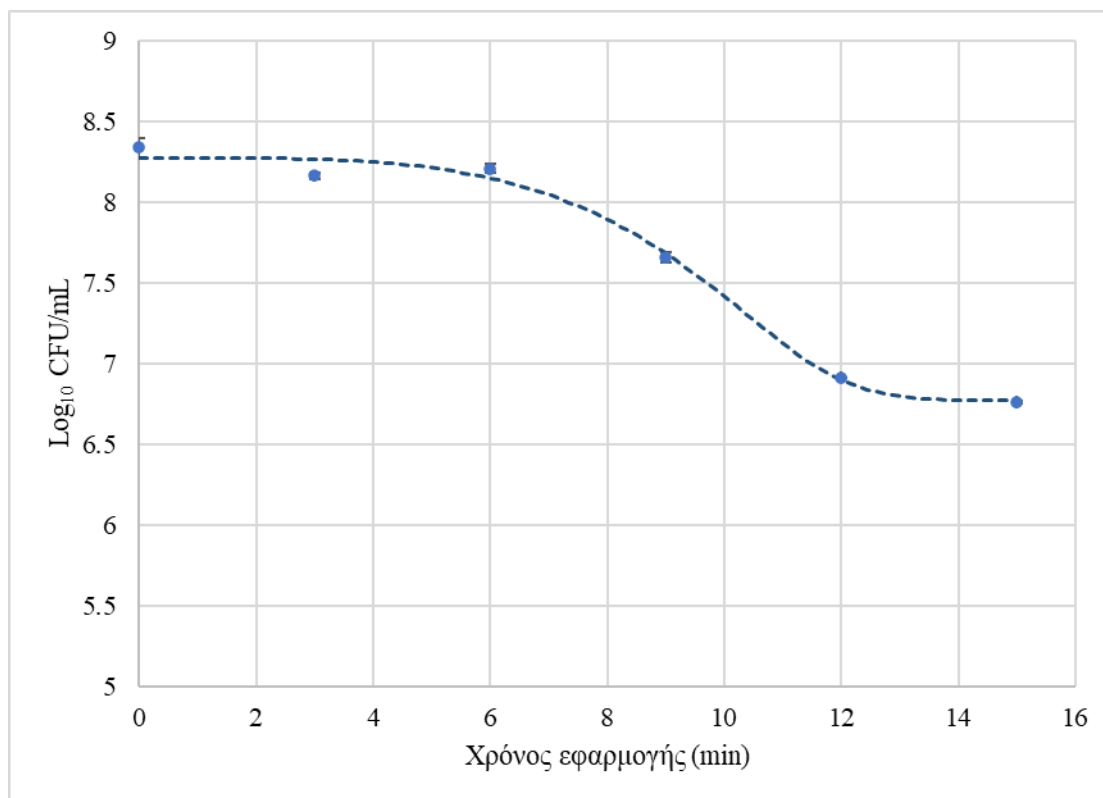


Διάγραμμα 5.13: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. subtilis*.

Πίνακας 5.18: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	5,70		2,29	
k_{max} (min^{-1})	0,42		0,10	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	8,34		0,16	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,95	0,92	0,04	0,20

Το μοντέλο Weibull με ουρά εκτιμά τον αρχικό πληθυσμό (N_0) στα 8,27 log_{10} CFU/mL και η καμπύλη που απεικονίζεται στο Διάγραμμα 5.14 έχει σιγμοειδή μορφή. Η ανθεκτικότητα του συγκεκριμένου βακτηρίου στην ακτινοβολία του πλάσματος αντικατοπτρίζεται στην τιμή της παραμέτρου δ που είναι ίση με 10,12 λεπτά, ενώ στο τέλος της καμπύλης η τιμή του φορτίου φαίνεται να τείνει προς ένα πλατό (tailing). Το συγκεκριμένο μοντέλο έχει πολύ καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα.

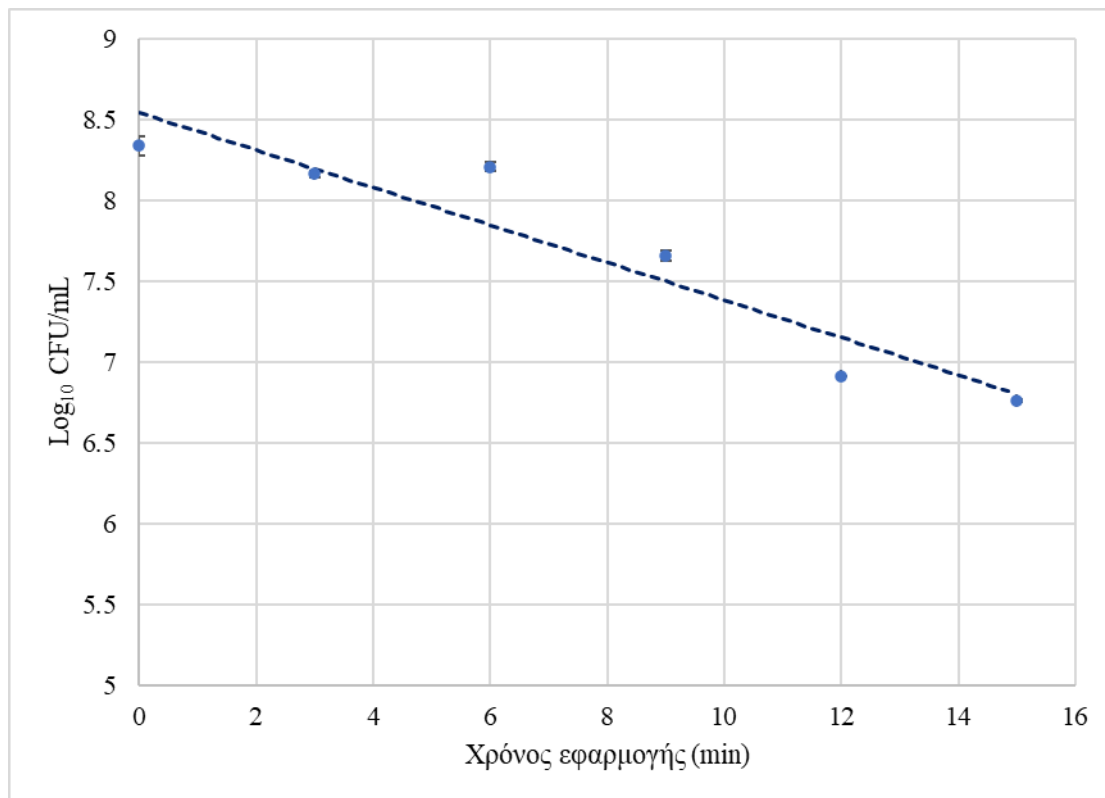


Διάγραμμα 5.14: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull με ουρά στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. subtilis*.

Πίνακας 5.19: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibul με ουρά.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	10,12		0,44	
p	3,90		0,98	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	8,27		0,07	
N (log_{10} CFU/mL)	6,77		0,10	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,99	0,98	0,01	0,10

Η προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου, δίνει ως εκτίμηση του αρχικού πληθυσμού του βακτηρίου *B. subtilis* 8,54 log₁₀ CFU/mL και τον ρυθμό απενεργοποίησης του ίσο με 0,27 min⁻¹. Η προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου δεν είναι αρκετά καλή κάτι που αποτυπώνεται και στους δείκτες αξιολόγησης του, που αναγράφονται στον Πίνακα 5.20.



Διάγραμμα 5.15: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. subtilis*.

Πίνακας 5.20: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min ⁻¹)	0,27		0,05	
N_0 (log ₁₀ CFU/mL)	8,54		0,18	
Αξιολόγηση μοντέλου	R ²	R ² adjusted	MSE	RMSE
	0,89	0,86	0,06	0,25

Εκτός από το γραμμικό μοντέλο, τα υπόλοιπα έχουν μια αρκετά καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα της μείωσης του πληθυσμού του βακτηρίου *B. subtilis* παρόλο που το καθένα προτείνει και μια διαφορετική μορφή της καμπύλης απενεργοποίησης. Βέβαια την καλύτερη προσαρμογή είχε το μοντέλο “Weibull με ουρά”, με τους δείκτες αξιολόγησης του να έχουν τιμές 0.01 (MSE) και 0.98 (R² adjusted).

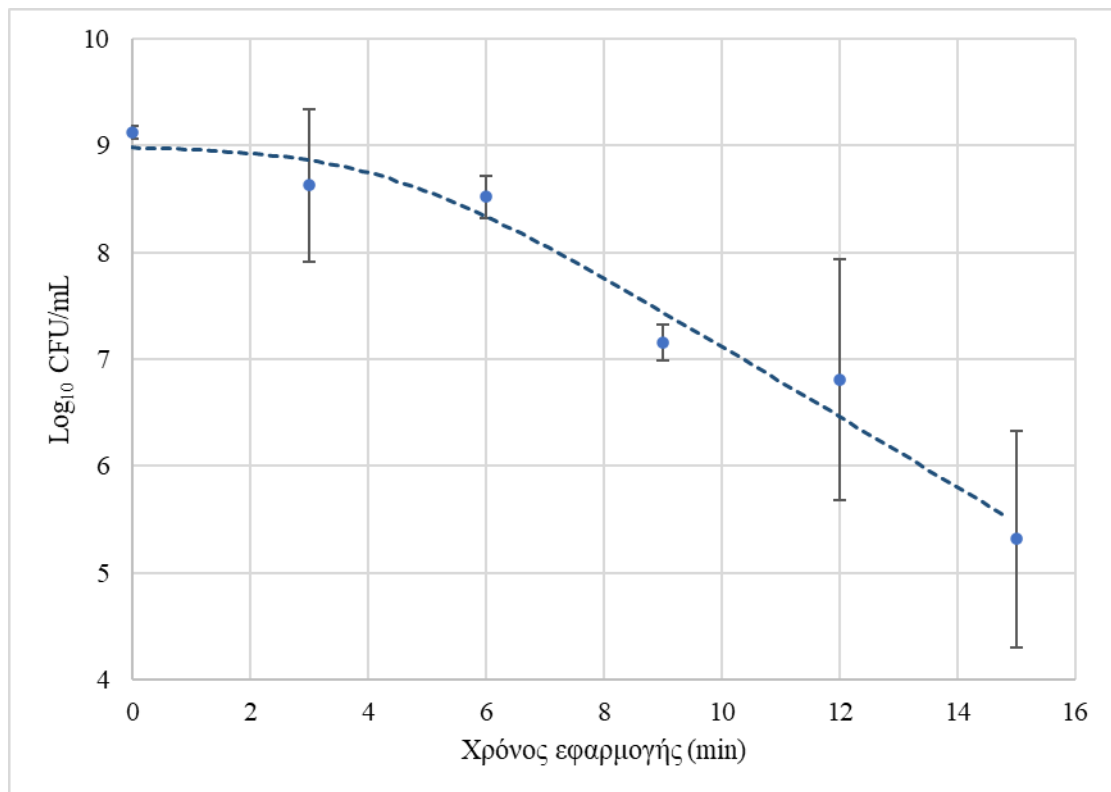
6. *Leuconostoc mesenteroides*

Το οξυγαλακτικό βακτήριο *L. mesenteroides* είναι εκείνο που εμφανίζει τη μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που εξετάζονται. Η αρχική τιμή του πληθυσμού του βακτηριακού εναιωρήματος ήταν ίση με $9,12 \log_{10}$ CFU/mL και μετά από 15 λεπτά μειώθηκε κατά $3,80 \log_{10}$ CFU/mL, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.21.

Πίνακας 5.21: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *L. mesenteroides* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	9,12	0,06
3	8,63	0,71
6	8,52	0,20
9	7,16	0,17
12	6,81	1,13
15	5,32	1,01

Στο Διάγραμμα 5.16 απεικονίζεται η καμπύλη του μοντέλου Geeraerd, η οποία εκτιμά το αρχικό φορτίο (N_0) σε $8,98 \log_{10}$ CFU/mL και αρχικά εμφανίζει ένα shoulder διάρκειας 4,39 λεπτών. Στη συνέχεια ο πληθυσμός μειώνεται με τον μέγιστο ρυθμό απενεργοποίησης να εκτιμάται σε $0,76 \text{ min}^{-1}$. Το μοντέλο έχει μια αρκετά καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τις τιμές των δεικτών αξιολόγησης.

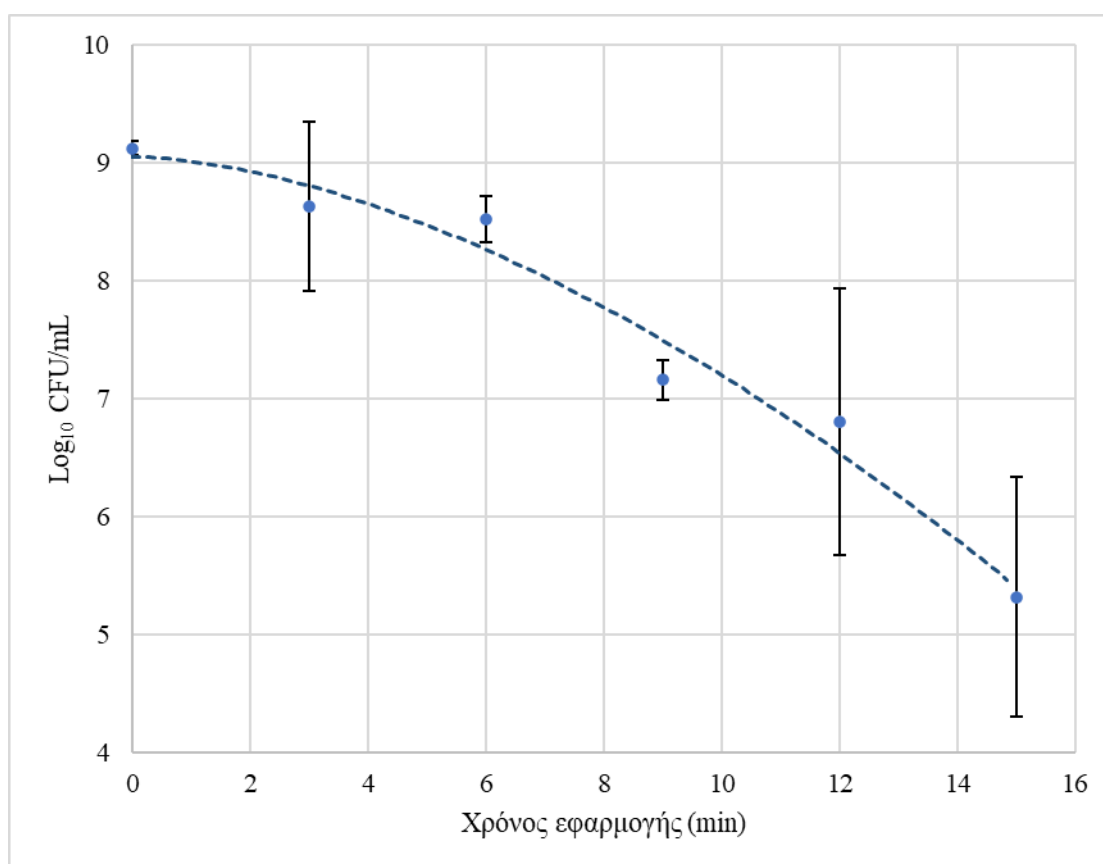


Διάγραμμα 5.16: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. mesenteroides*.

Πίνακας 5.22: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	4,39		1,72	
k_{max} (min^{-1})	0,76		0,13	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	8,98		0,27	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,97	0,95	0,11	0,33

Παρόμοια εικόνα εμφανίζει και το Διάγραμμα 5.17, όμως η καμπύλη διαφέρει ως προς την καμπυλότητά της, σε σχέση με την καμπύλη του προηγούμενου διαγράμματος. Εδώ στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω ($p > 1$) χωρίς να είναι τόσο εμφανής ο σχηματισμός shoulder, αντίθετα η μείωση φαίνεται να είναι πιο άμεση. Και εδώ υπάρχει αρκετά καλή προσαρμογή του μοντέλου Weibull με τις τιμές των δεικτών αξιολόγησης να είναι σχεδόν ίδιες με αυτές του μοντέλου Geeraerd.

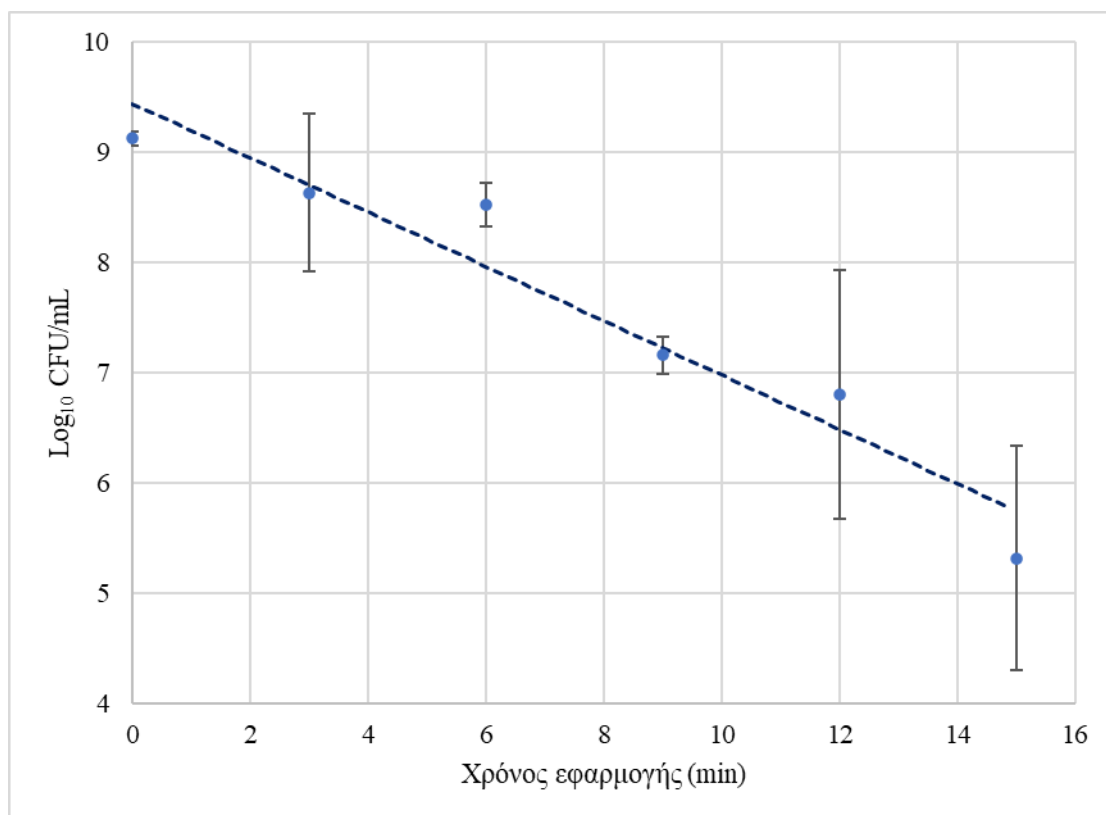


Διάγραμμα 5.17: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. mesenteroides*.

Πίνακας 5.23: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	6,91		1,42	
p	1,67		0,41	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	9,05		0,27	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,97	0,95	0,10	0,31

Στην περίπτωση του γραμμικού μοντέλου, ο αρχικός πληθυσμός εκτιμάται σε 9,44 \log_{10} CFU/mL, ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) περίπου σε 4 λεπτά και ο ρυθμός απενεργοποίησης υπολογίζεται ίσος με $0,57 \text{ min}^{-1}$. Το μοντέλο αυτό δεν έχει τόσο καλή προσαρμογή όσο τα δύο προηγούμενα κάτι που αντικατοπτρίζεται στις τιμές των δεικτών αξιολόγησης του Πίνακα 5.24.



Διάγραμμα 5.18: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. mesenteroides*.

Πίνακας 5.24: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,57		0,08	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	9,44		0,30	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,93	0,91	0,18	0,42

Για την καμπύλη απενεργοποίησης του βακτηρίου *L. mesenteroides* εκτός από το γραμμικό, τα υπόλοιπα μοντέλα που εξετάστηκαν έχουν εξίσου καλή προσαρμογή με το μοντέλο Weibull να είναι οριακά εκείνο που έχει την καλύτερη δυνατή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα.

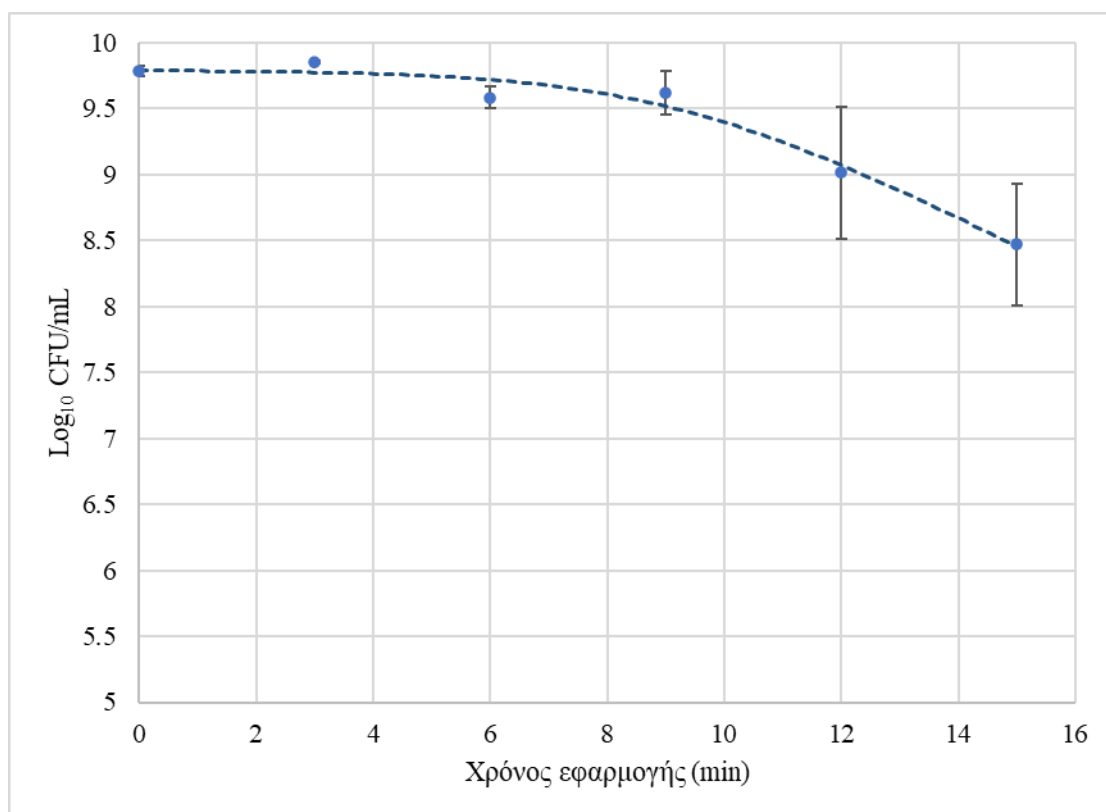
7. *Lactiplantibacillus plantarum*

Το δεύτερο από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που μελετήθηκαν, το βακτήριο *L. plantarum* εμφάνισε τη μικρότερη μείωση φορτίου ανάμεσα στους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς κατά $1,31 \log_{10}$ CFU/mL και τη μεγαλύτερη φάση προσαρμογής σε σχέση με όλους τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν, η οποία διήρκησε σχεδόν 10 λεπτά. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Geeraerd, Weibull και το γραμμικό.

Πίνακας 5.25: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *L. plantarum* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	9,78	0,04
3	9,85	0,01
6	9,58	0,08
9	9,62	0,16
12	9,01	0,50
15	8,47	0,46

Η καμπύλη απενεργοποίησης του μοντέλου Geeraerd, η οποία απεικονίζεται στο Διάγραμμα 5.19 εκτιμά το αρχικό φορτίο (N_0) σε $9,79 \log_{10}$ CFU/mL και υπολογίζει τη διάρκεια της φάσης shoulder σε 9,27 λεπτά. Έπειτα κατά τη μείωση του φορτίου ο ρυθμός απενεργοποίησης υπολογίζεται σε $0,53 \text{ min}^{-1}$. Τέλος, η προσαρμογή του συγκεκριμένου μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα είναι αρκετά καλή.

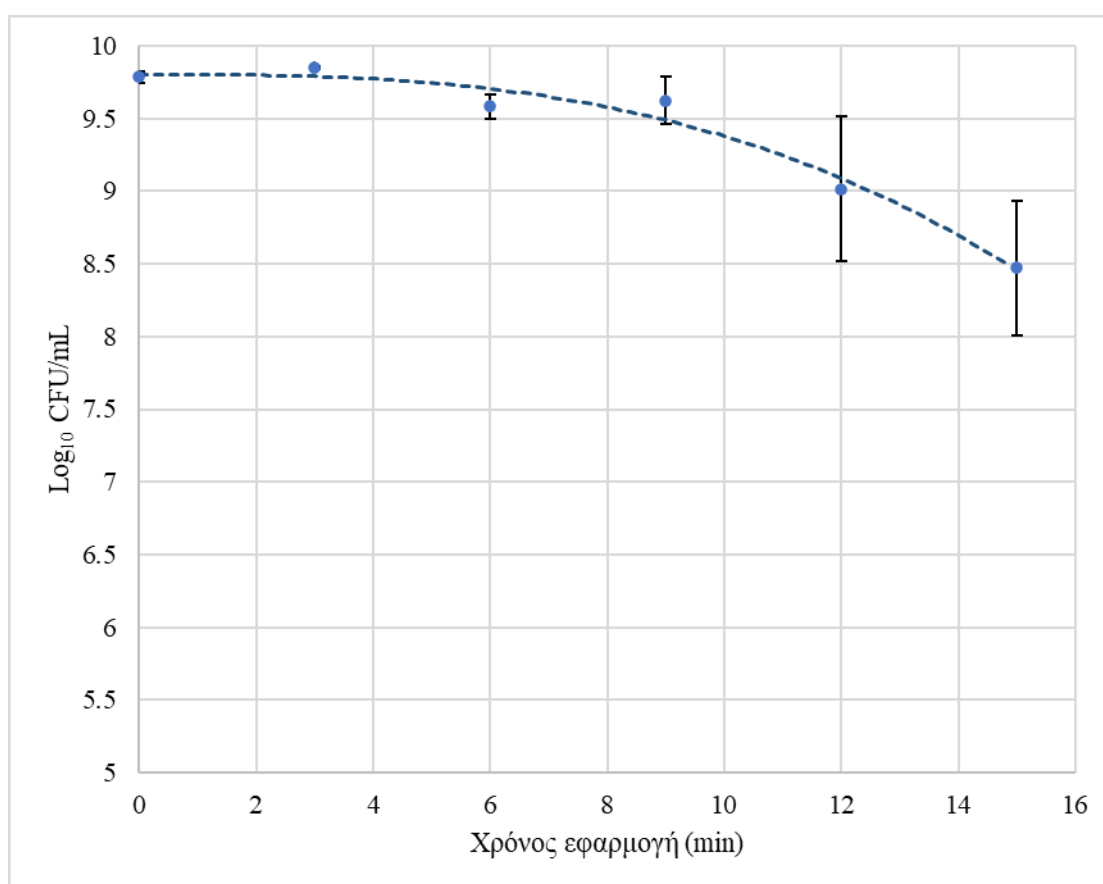


Διάγραμμα 5.19: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. plantarum*.

Πίνακας 5.26: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	9,27		1,07	
k_{\max} (min^{-1})	0,53		0,10	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	9,79		0,08	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,97	0,95	0,01	0,11

Το μοντέλο Weibull επίσης παρουσιάζει μια περιοχή όπου το μικροβιακό φορτίο διατηρείται σταθερό, ωστόσο αυτή διαρκεί μικρότερο χρονικό διάστημα. Η καμπύλη του Διαγράμματος 5.20 εμφανίζει μια έντονη καμπυλότητα με τα κοίλα προς τα κάτω ($p > 1$) ενώ μετά το πέρας των 15 λεπτών, η καμπύλη δείχνει μια ξεκάθαρη τάση προς περαιτέρω μείωση του μικροβιακού πληθυσμού. Και εδώ οι τιμές των δεικτών αξιολόγησης είναι πολύ καλές και το μοντέλο προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα.

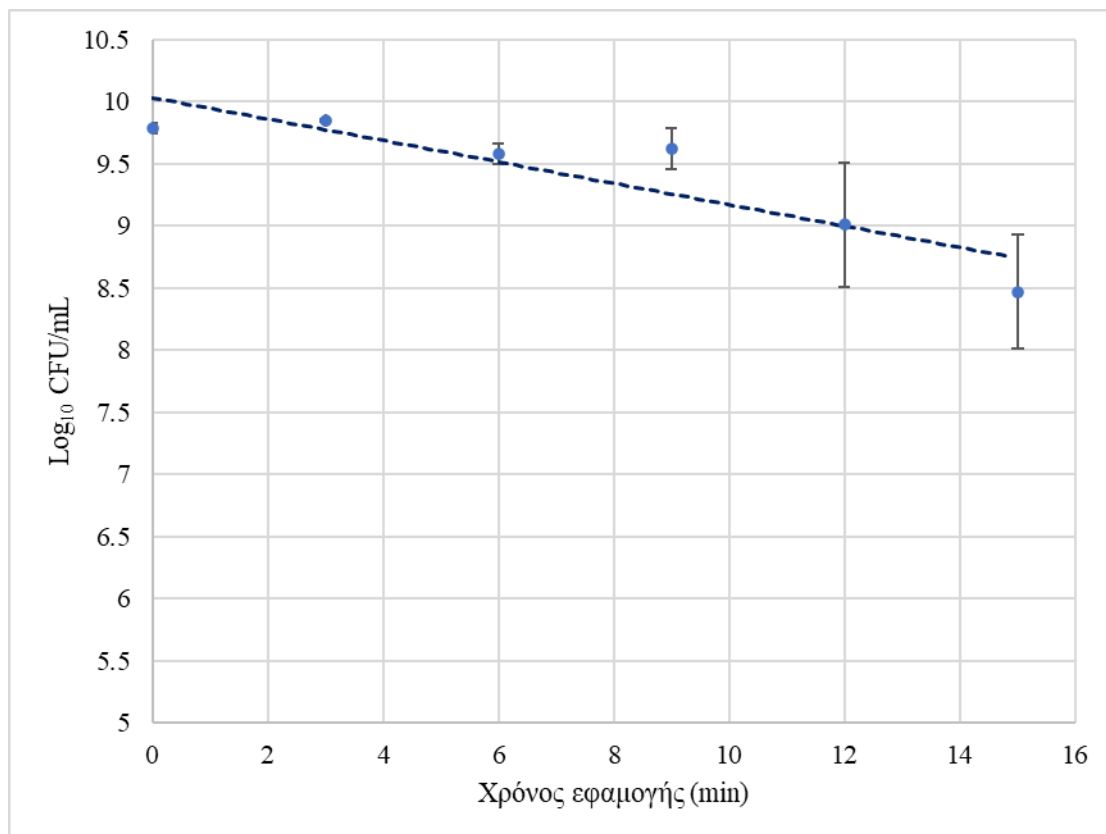


Διάγραμμα 5.20: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. plantarum*.

Πίνακας 5.27: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	13,51		0,60	
p	2,85		0,71	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	9,80		0,08	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,97	0,95	0,01	0,12

Το γραμμικό μοντέλο δεν έχει τόσο καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα του βακτηρίου *L. plantarum* και αυτό γιατί δεν μπορεί περιγράψει ικανοποιητικά την καθυστέρηση που υπάρχει στη μείωση του μικροβιακού φορτίου τα πρώτα 10 λεπτά της έκθεσης του μικροοργανισμού στο πλάσμα. Οι τιμές των δεικτών αξιολόγησης που φαίνονται και στον Πίνακα 5.28 δείχνουν ότι το γραμμικό μοντέλο είναι ακατάλληλο για τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα.



Διάγραμμα 5.21: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. plantarum*.

Πίνακας 5.28: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{max} (min^{-1})	0,20		0,05	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	10,03		0,19	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,81	0,76	0,07	0,26

Από τα τρία μοντέλα που εξετάστηκαν τα Geeraerd και Weibull ήταν τα καλύτερα όσον αφορά την προσαρμογή τους πάνω στα πειραματικά δεδομένα του βακτηρίου *L. plantarum* με τις τιμές των MSE και RMSE να είναι σχεδόν ίδιες. Το γραμμικό μοντέλο κρίνεται ακατάλληλο για τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα, αφού δεν μπορεί να περιγράψει ικανοποιητικά την κινητική απενεργοποίησης του συγκεκριμένου οξυγαλακτικού βακτηρίου.

Μέρος 2^ο: Παθογόνοι μικροοργανισμοί

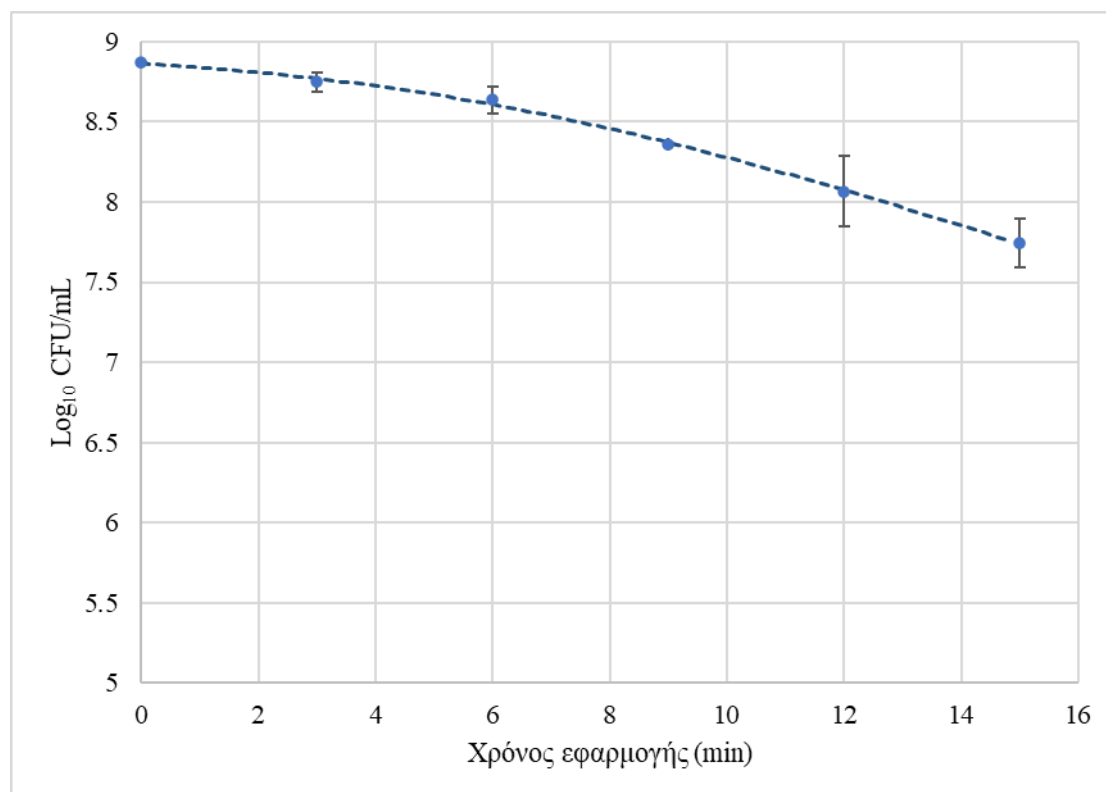
8. *Salmonella Typhimurium*

Το βακτήριο *S. Typhimurium* παρουσίασε μια μείωση φορτίου κατά 1,12 log₁₀ CFU/mL μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα. Ο συγκεκριμένος παθογόνος εμφανίζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τους μικροοργανισμούς που έχουν εξεταστεί ως τώρα. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να αποδώσουν την κινητική του βακτηρίου *S. Typhimurium* ήταν τα Geeraerd, Weibull και το γραμμικό.

Πίνακας 5.29: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *S. Typhimurium* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (log ₁₀ CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,87	0,00
3	8,75	0,06
6	8,64	0,08
9	8,36	0,00
12	8,07	0,22
15	7,75	0,15

Το μοντέλο του Geeraerd, έχει μια πολύ καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα του παθογόνου *S. Typhimurium*. Η καμπύλη υπολογίζει τον αρχικό πληθυσμό (N_0) σε 8,86 log₁₀ CFU/mL. Η τιμή του ρυθμού απενεργοποίησης εκτιμάται σε 0,28 min⁻¹, η διάρκεια της φάσης shoulder σε 6,07 λεπτά, ενώ η καμπύλη φαίνεται να συνεχίζει με καθοδική πορεία μετά τα 15 λεπτά.

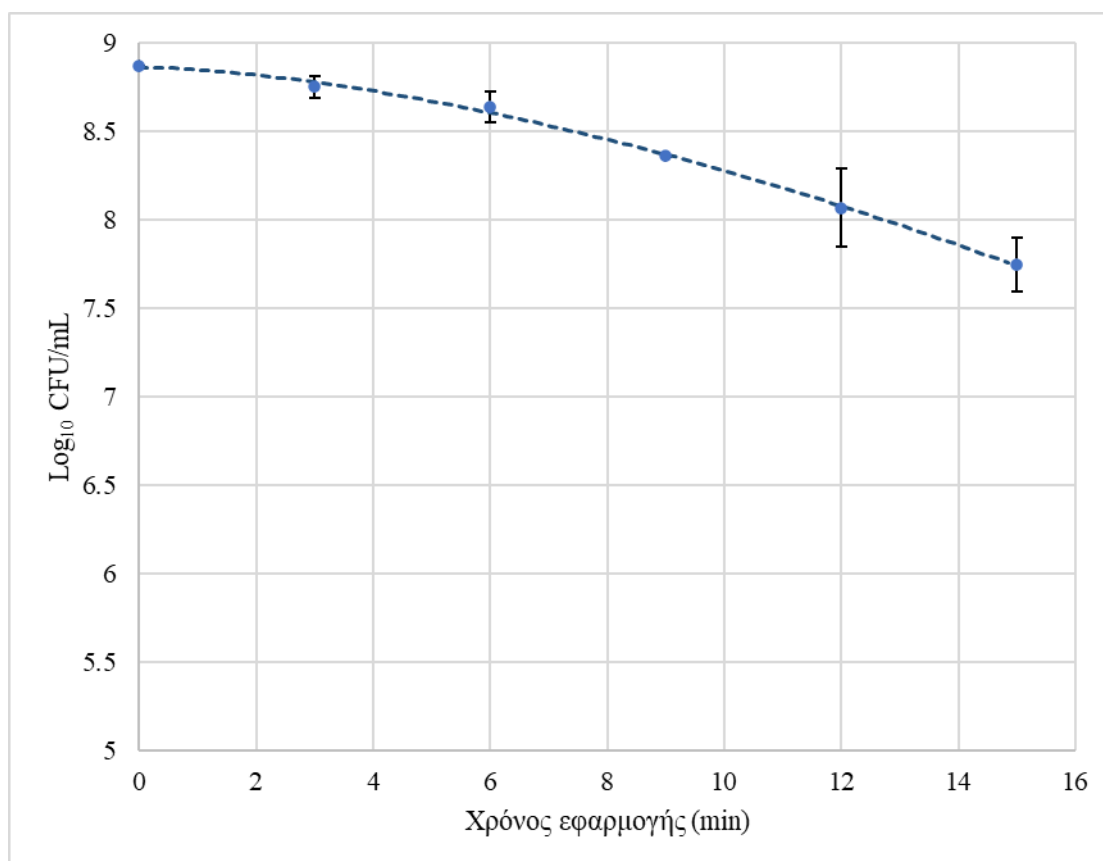


Διάγραμμα 5.22: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *S. Typhimurium*.

Πίνακας 5.30: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	6,07		0,48	
k_{max} (min^{-1})	0,28		0,01	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	8,86		0,02	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,99	0,99	0	0,02

Και το μοντέλο Weibull περιγράφει ικανοποιητικά την κινητική απενεργοποίησης του βακτηρίου *S. Typhimurium*, με την καμπύλη απενεργοποίησης να παρουσιάζει την ίδια μορφή με αυτή του προηγούμενου μοντέλου. Ο αργός ρυθμός απενεργοποίησης επιβεβαιώνεται από την τιμή της παραμέτρου δ , η οποία εκτιμά ότι ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά ένα λογάριθμο είναι 13,96 λεπτά. Επιπλέον, η καμπύλη στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω ($p > 1$) συνεπώς ο ρυθμός απενεργοποίησης αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου εφαρμογής στο πλάσμα.

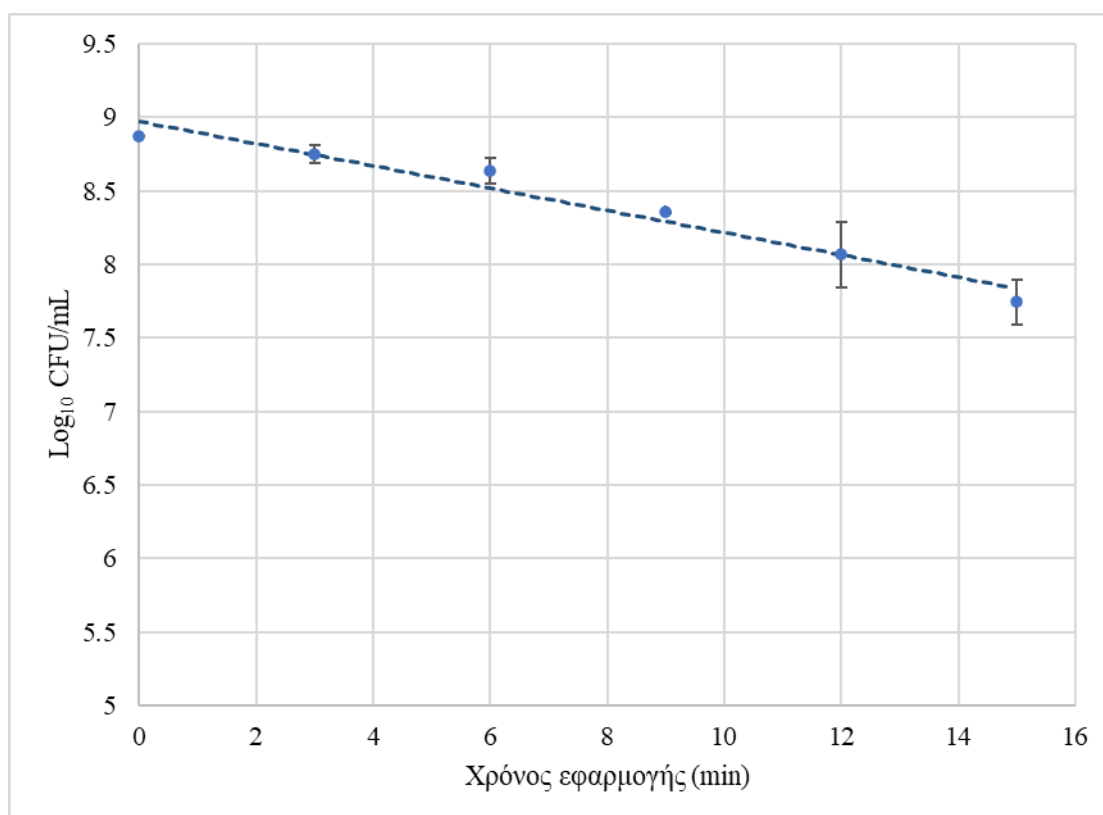


Διάγραμμα 5.23: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *S. Typhimurium*.

Πίνακας 5.31: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	13,96		0,26	
p	1,61		0,11	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	8,86		0,02	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,99	0,99	0	0,03

Στην περίπτωση του γραμμικού μοντέλου η εκτίμηση του αρχικού πληθυσμού (N_0) είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από τις δύο προηγούμενες και ο ρυθμός απενεργοποίησης υπολογίζεται σε $0,17 \text{ min}^{-1}$, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.32. Και σε αυτή την περίπτωση η προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα είναι πολύ καλή.



Διάγραμμα 5.24: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *S. Typhimurium*.

Πίνακας 5.32: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
$k_{\max} (\text{min}^{-1})$	0,17		0,02	
$N_0 (\log_{10} \text{CFU/mL})$	8,97		0,07	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	$R^2 \text{ adjusted}$	MSE	RMSE
	0,96	0,95	0,01	0,10

Στην περίπτωση του βακτηρίου *S. Typhimurium*, όλα τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν πολύ καλή προσαρμογή κάτι που επιβεβαιώνεται από τις τιμές των δεικτών αξιολόγησής τους. Τα καλύτερα μοντέλα ήταν τα Geeraerd και Weibull, τα οποία ουσιαστικά πρότειναν την ίδια καμπύλη, η μορφή της οποίας δείχνει μια αύξηση του ρυθμού μείωσης όσο αυξάνεται ο χρόνος έκθεσης στο πλάσμα. Αυτό όσον αφορά την συμπεριφορά των κυττάρων δείχνει μια αρχική αντίσταση των κυττάρων, η οποία σιγά σιγά κάμπτεται, οδηγώντας στη θανάτωση περισσότερων κυττάρων.

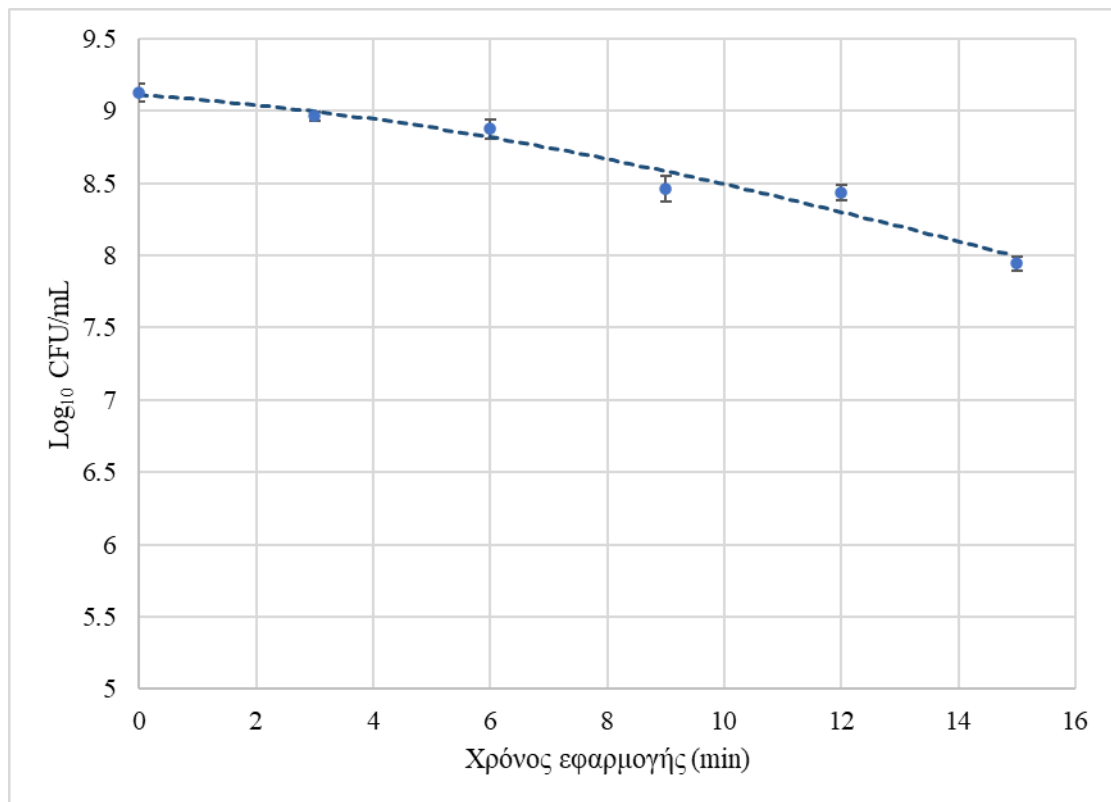
9. *Escherichia coli*

Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει η ο μικροοργανισμός *E. coli*, με τον πληθυσμό του να μειώνεται από τα 9,13 στα 7,94 \log_{10} CFU/mL, δηλαδή κατά 1,18 \log_{10} CFU/mL. Και πάλι ο ρυθμός απενεργοποίησης της καμπύλης αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου έκθεσης. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Geeraerd, Weibull και το γραμμικό, όπως και πριν.

Πίνακας 5.33: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *E. coli* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	9,13	0,06
3	8,96	0,03
6	8,85	0,07
9	8,47	0,09
12	8,43	0,05
15	7,94	0,05

Στο Διάγραμμα 5.25 απεικονίζεται η καμπύλη απενεργοποίησης του βακτηρίου *E. coli*, που προέκυψε από το μοντέλο Geeraerd. Η εκτίμηση του αρχικού φορτίου (N_0) είναι 9,11 \log_{10} CFU/mL, ο ρυθμός απενεργοποίησης υπολογίστηκε σε 0,26 min^{-1} , ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις σταθεροποίησης του πληθυσμού μετά τα 15 λεπτά. Επιπλέον, το μοντέλο εκτιμά τη διάρκεια της φάσης shoulder σε 5,22 λεπτά και έχει μια καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα.

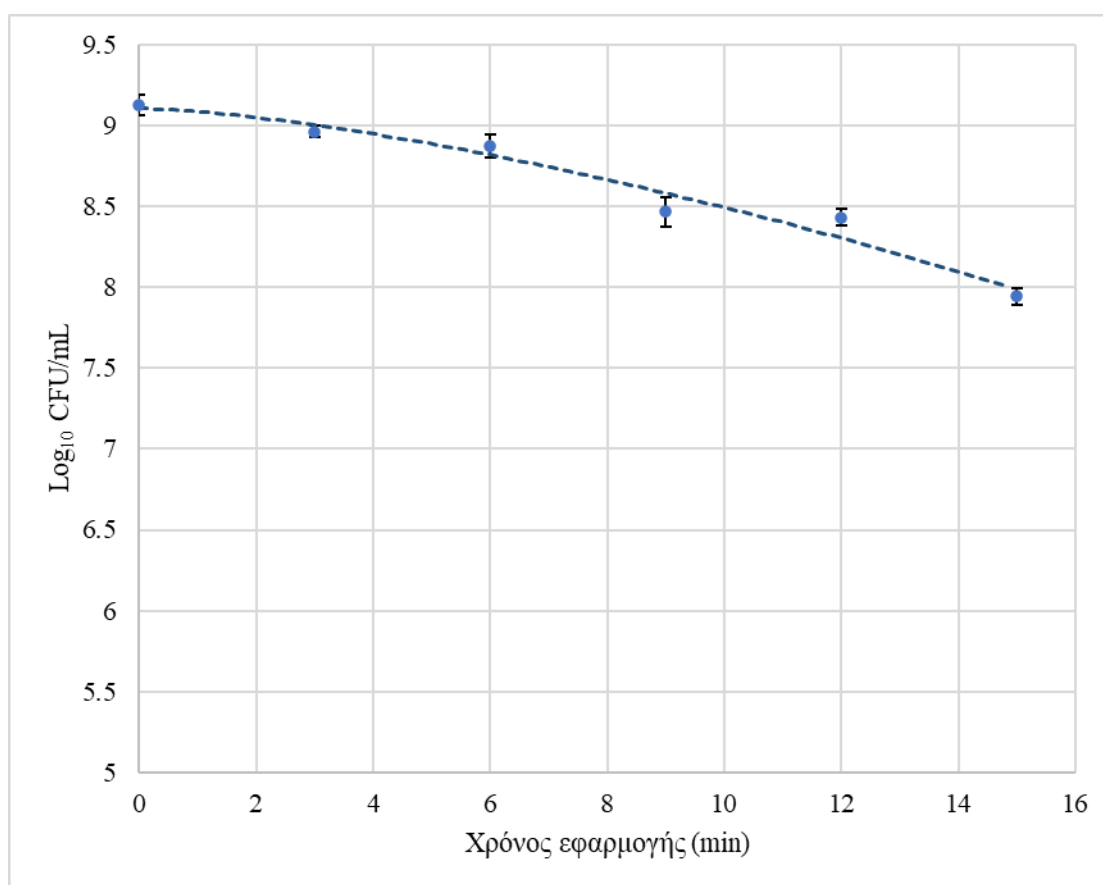


Διάγραμμα 5.25: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *E. coli*.

Πίνακας 5.34: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	5,22		2,80	
k_{\max} (min^{-1})	0,26		0,07	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	9,11		0,10	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,96	0,93	0,01	0,11

Παρόμοια είναι η καμπύλη που προκύπτει από την εφαρμογή του μοντέλου Weibull. Η μορφή της, δηλαδή ότι στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω ($p > 1$) συμφωνεί με το προηγούμενο μοντέλο. Ο αργός ρυθμός μείωσης του συγκεκριμένου παθογόνου αντικατοπτρίζεται στο χρόνο που χρειάζεται το βακτηριακό φορτίο για να μειωθεί κατά έναν λογάριθμο, ο οποίος υπολογίστηκε σε 13,93 λεπτά.

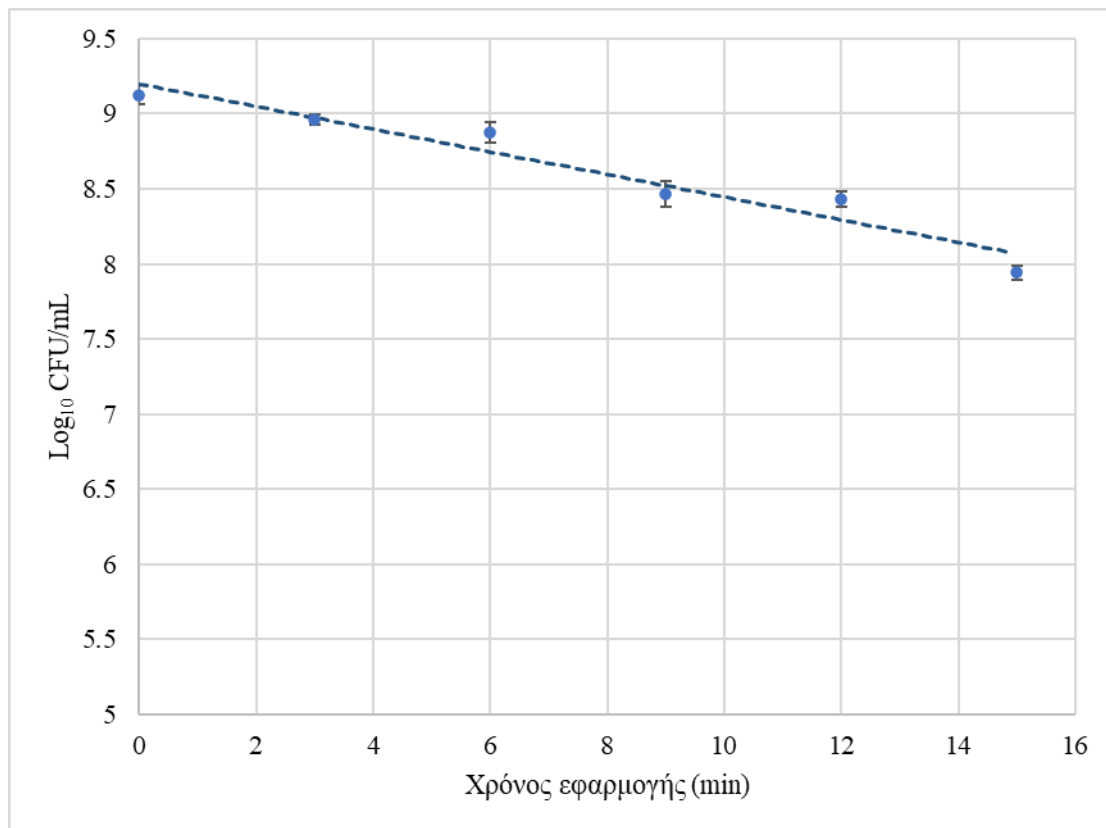


Διάγραμμα 5.26: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *E. coli*.

Πίνακας 5.35: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	13,93		1,19	
p	1,48		0,42	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	9,11		0,10	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,96	0,93	0,01	0,11

Το γραμμικό μοντέλο επίσης περιγράφει ικανοποιητικά την μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *E. coli*, υπολογίζοντας μικρότερο χρόνο δεκαδικής μείωσης από το προηγούμενο μοντέλο στα περίπου 13 λεπτά με βάση το Διάγραμμα 5.27, ενώ το αρχικό φορτίο (N_0) εκτιμάται σε 9,20 \log_{10} CFU/mL. Και αυτό το μοντέλο έχει καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα, όπως φαίνεται από τους δείκτες αξιολόγησης που αναγράφονται στον Πίνακα 5.36.



Διάγραμμα 5.27: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *E. coli*.

Πίνακας 5.36: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση	Τυπικό σφάλμα		
k_{\max} (min^{-1})	0,17	0,02		
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	9,20	0,09		
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,94	0,92	0,02	0,12

Όλα τα μοντέλα περιέγραψαν αρκετά ικανοποιητικά την κινητική απενεργοποίησης του βακτηρίου *E. coli*. Τα MSE και RMSE δεν ξεπέρασαν τις τιμές 0,02 και 0,12 στις περιπτώσεις που εξετάζονται και τα R^2 και R^2 adjusted έχουν επίσης ικανοποιητικές τιμές. Συνεπώς, τα μοντέλα Geeraerd και Weibull έχουν την καλύτερη προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

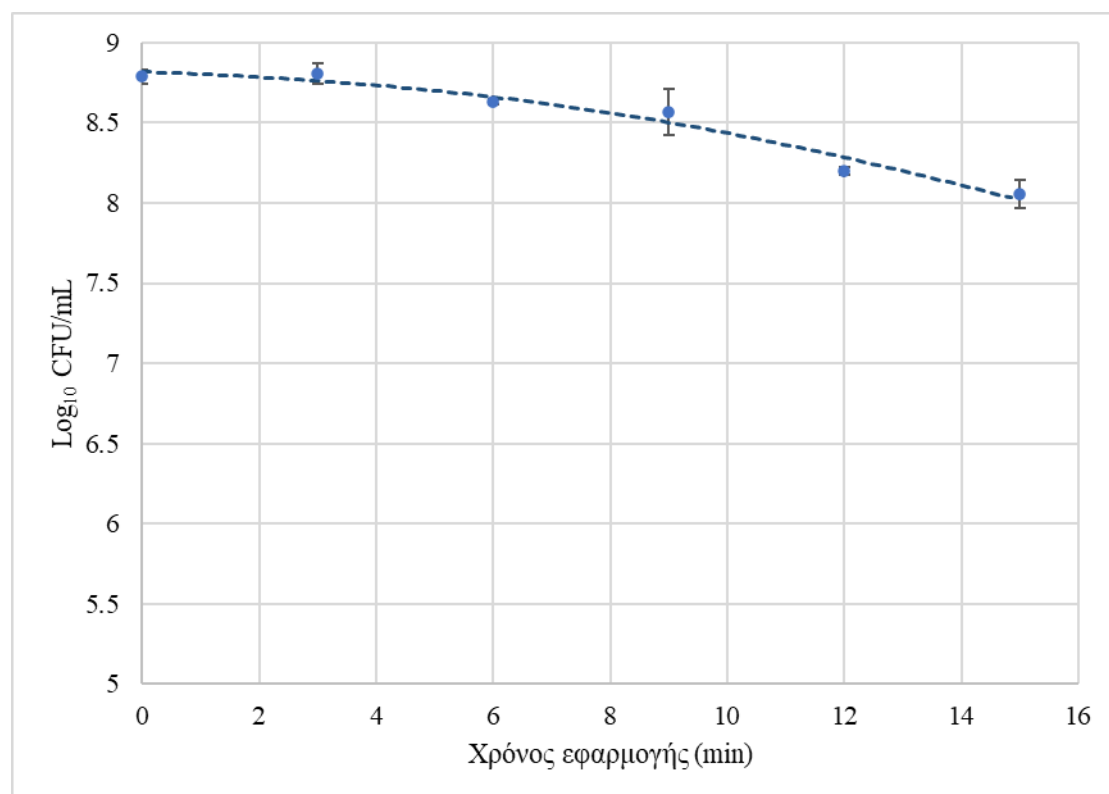
10. *Pseudomonas aeruginosa*

Η τρίτη κατά σειρά ψευδομονάδα που μελετήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία παρουσίασε και τη μικρότερη πτώση φορτίου ανάμεσα σε όλους τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν. Το φορτίο του βακτηρίου *P. aeruginosa* μειώθηκε μόλις κατά 0,73 \log_{10} CFU/mL και όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.37 παρουσίασε μια αρκετά μεγάλη αντίσταση, η οποία κάμφθηκε ελαφρώς μετά τα 12 λεπτά έκθεσης του στο πλάσμα. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Geeraerd, Weibull και το γραμμικό.

Πίνακας 5.37: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *P. aeruginosa* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού αιμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,79	0,05
3	8,81	0,06
6	8,63	0,01
9	8,57	0,01
12	8,20	0,02
15	8,05	0,09

Το μοντέλο Geeraerd, το οποίο προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα προτείνει μια ελαφρώς κοίλη καμπύλη, η οποία εκτιμά το αρχικό φορτίο (N_0) σε 8,82 \log_{10} CFU/mL. Η διάρκεια της φάσης shoulder υπολογίζεται σε 8,30 λεπτά και ο μέγιστος ρυθμός απενεργοποίησης στη διάρκεια των 15 λεπτών εκτιμάται σε 0,25 min^{-1} .

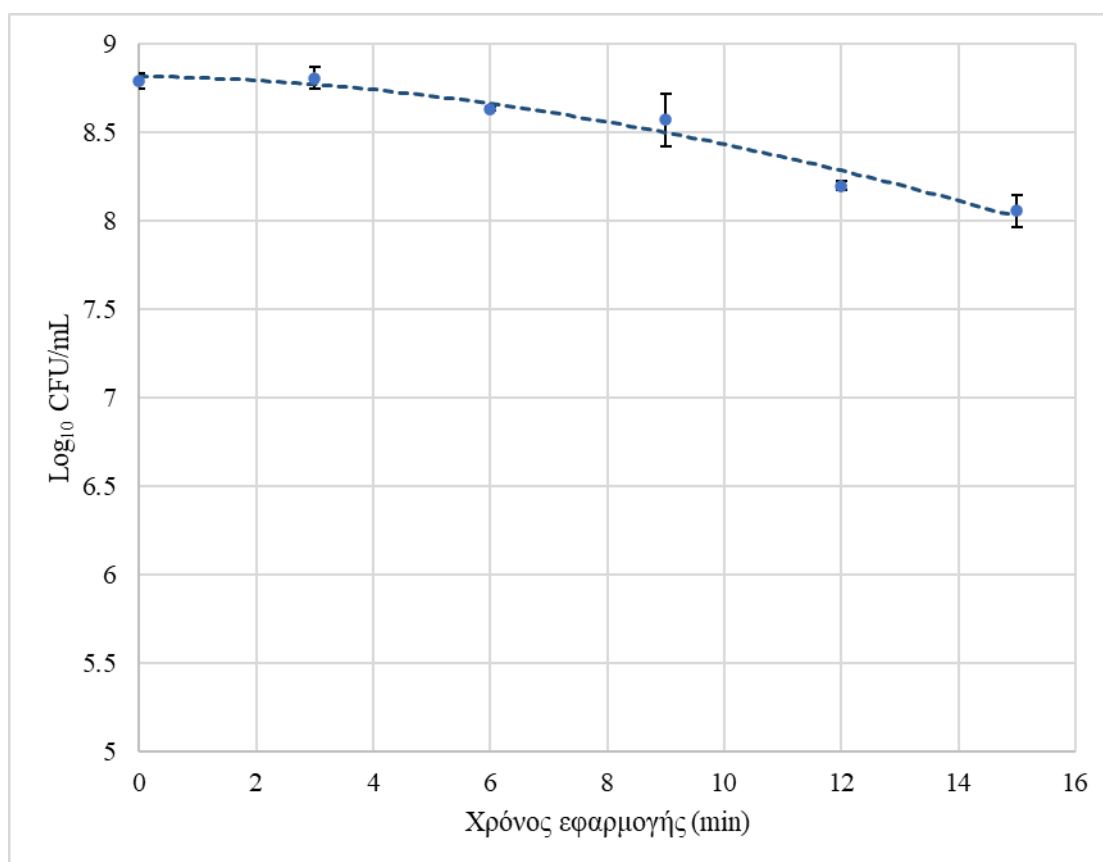


Διάγραμμα 5.28: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. aeruginosa*.

Πίνακας 5.38: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	8,30		1,95	
k_{\max} (min^{-1})	0,25		0,07	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,82		0,06	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,97	0,94	0,01	0,07

Η καμπύλη του μοντέλου Weibull είναι παρόμοια καθώς όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 5.29 προτείνεται μια κοίλη καμπύλη ($p > 1$), η οποία αυξάνει το ρυθμό μείωσης με την πάροδο του χρόνου έκθεσης. Ο αρχικός πληθυσμός (N_0) υπολογίζεται σε $8,81 \log_{10}$ CFU/mL και ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) εκτιμάται σε 17,02 λεπτά με βάση την παράμετρο δ .

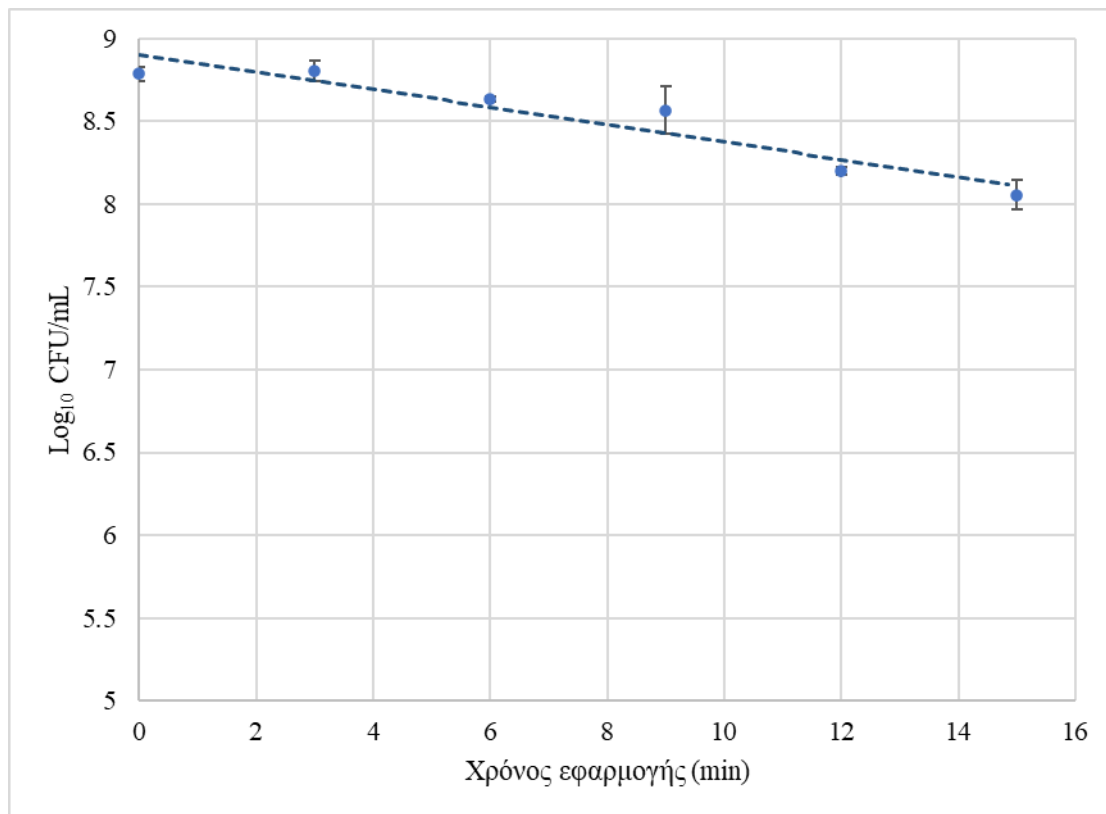


Διάγραμμα 5.29: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. aeruginosa*.

Πίνακας 5.39: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	17,02		1,12	
p	1,80		0,47	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,81		0,06	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,97	0,94	0,01	0,07

Το γραμμικό μοντέλο εκτιμά τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό (N_0) σε $8,91 \log_{10}$ CFU/mL και το ρυθμό απενεργοποίησης σε $0,12 \text{ min}^{-1}$. Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) εκτιμάται μεγαλύτερος των 15 λεπτών. Το συγκεκριμένο μοντέλο δεν έχει τόσο καλή προσαρμογή όσο τα προηγούμενα δύο πάνω στα πειραματικά δεδομένα, σύμφωνα με τους δείκτες αξιολόγησης που αναγράφονται στον Πίνακα 5.40.



Διάγραμμα 5.30: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *P. aeruginosa*.

Πίνακας 5.40: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση	Τυπικό σφάλμα		
k_{\max} (min^{-1})	0,12	0,02		
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,91	0,08		
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,90	0,88	0,01	0,11

Τα μοντέλα Geeraerd και Weibull είχαν αμφότερα το ίδιο καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα του συγκεκριμένου παθογόνου και προτείνουν την ίδια μορφή καμπύλης, γεγονός που τα καθιστά πιο κατάλληλα έναντι του γραμμικού για την περιγραφή της κινητικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *P. aeruginosa*.

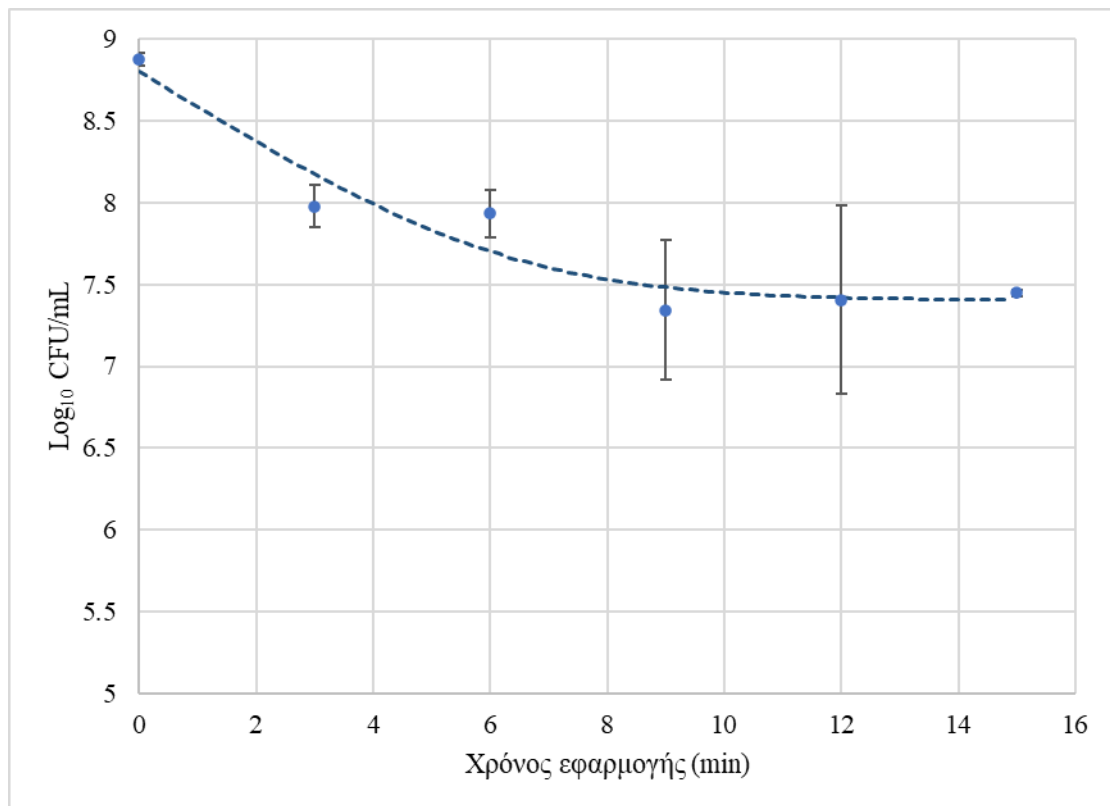
11. *Listeria monocytogenes*

Το βακτήριο *L. monocytogenes* εμφάνισε τη μεγαλύτερη μείωση στον πληθυσμό της ανάμεσα στους παθογόνους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα το φορτίο του μειώθηκε από την αρχική τιμή των 8,87 log₁₀ CFU/mL κατά 1,43 log₁₀ CFU/mL μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα, όπως φαίνεται και από τα δεδομένα του Πίνακα 5.41. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Geeraerd, Weibull, το διφασικό και το γραμμικό.

Πίνακας 5.41: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *L. monocytogenes* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (log ₁₀ CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,87	0,04
3	7,98	0,13
6	7,93	0,15
9	7,34	0,42
12	7,41	0,57
15	7,45	0,02

Ανάμεσα στους παθογόνους μικροοργανισμούς, ο συγκεκριμένος είναι ο μοναδικός που εμφανίζει αυτή τη μορφή καμπύλης. Το μοντέλο Geeraerd εκτιμά τον αρχικό πληθυσμό (N_0) σε 8,80 log₁₀ CFU/mL και το ρυθμό απενεργοποίησης σε 0,53 min⁻¹ από. Ωστόσο με την πάροδο του χρόνου εμφανίζεται ένα πλατό και η τιμή του φορτίου σταθεροποιείται κοντά στα 7,40 log₁₀ CFU/mL.

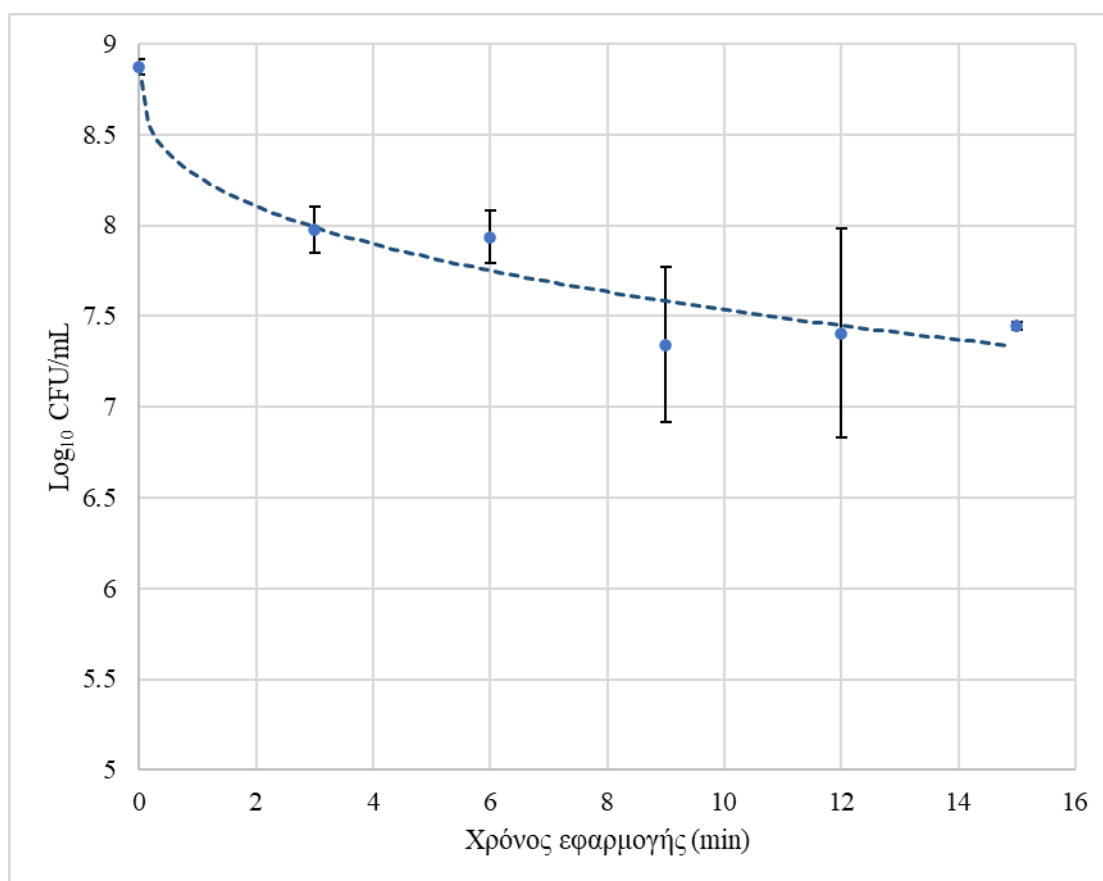


Διάγραμμα 5.31: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*.

Πίνακας 5.42: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,53		0,17	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,80		0,19	
N (\log_{10} CFU/mL)	7,40		0,14	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,93	0,88	0,04	0,20

Το μοντέλο Weibull εκτιμά ότι η καμπύλη απενεργοποίησης του βακτηρίου *L. monocytogenes* είναι μια κυρτή καμπύλη, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 5.32, με το αρχικό φορτίο (N_0) να εκτιμάται σε 8,88 \log_{10} CFU/mL. Η τιμή της παραμέτρου p φανερώνει ότι η καμπύλη στρέφει τα κοίλα προς τα πάνω ($p < 1$) και αυτό ουσιαστικά σημαίνει ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός αν και επηρεάστηκε αρκετά στην αρχή, στη συνέχεια ο ρυθμός απενεργοποίησης του ελαττώνεται.

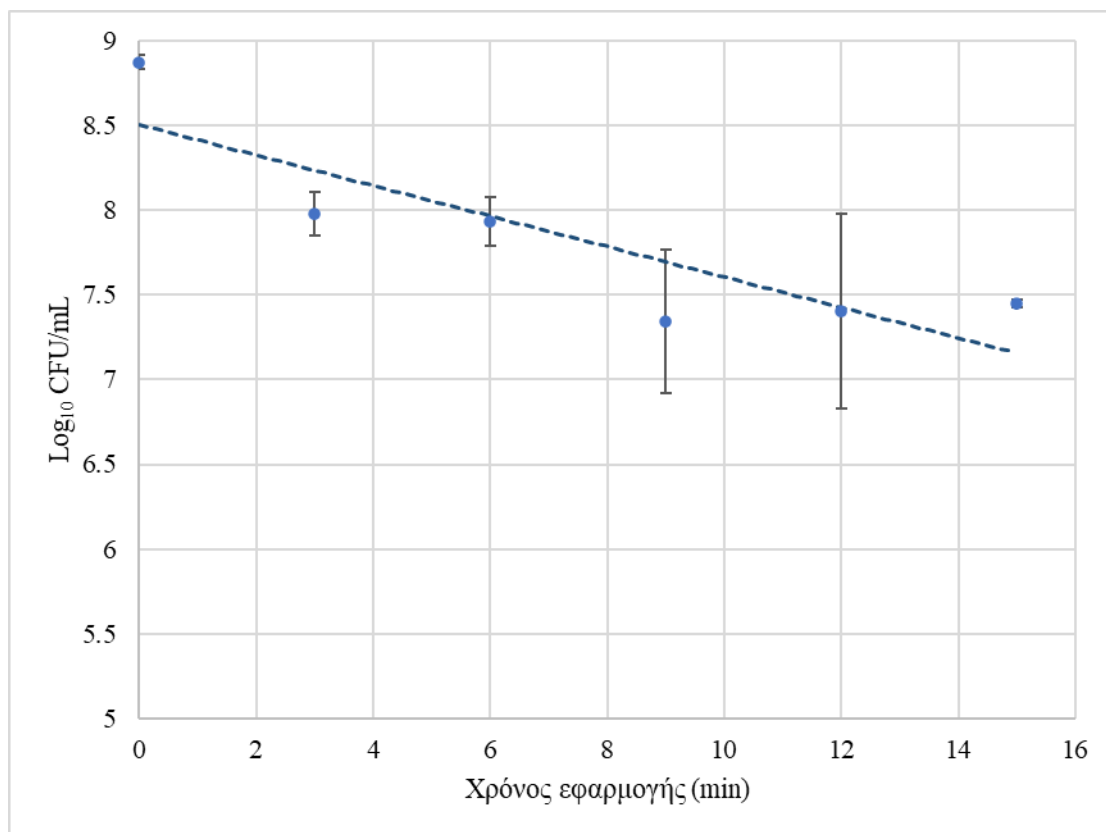


Διάγραμμα 5.32: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*.

Πίνακας 5.43: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	4,25		2,81	
p	0,34		0,15	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,88		0,19	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,94	0,89	0,03	0,19

Το γραμμικό μοντέλο δεν μπορεί να αποδώσει την συμπεριφορά αυτού του παθογόνου. Η κινητική απενεργοποίησης του, όπως έχει ήδη αναλυθεί παραπάνω, δεν εμφανίζει κάποια γραμμικότητα. Συνεπώς, είναι αναμενόμενο το συγκεκριμένο μοντέλο να μην προσαρμόζεται στα πειραματικά δεδομένα κάτι που επιβεβαιώνεται και από τις τιμές των δεικτών αξιολόγησης που αναγράφονται στον Πίνακα 5.44.

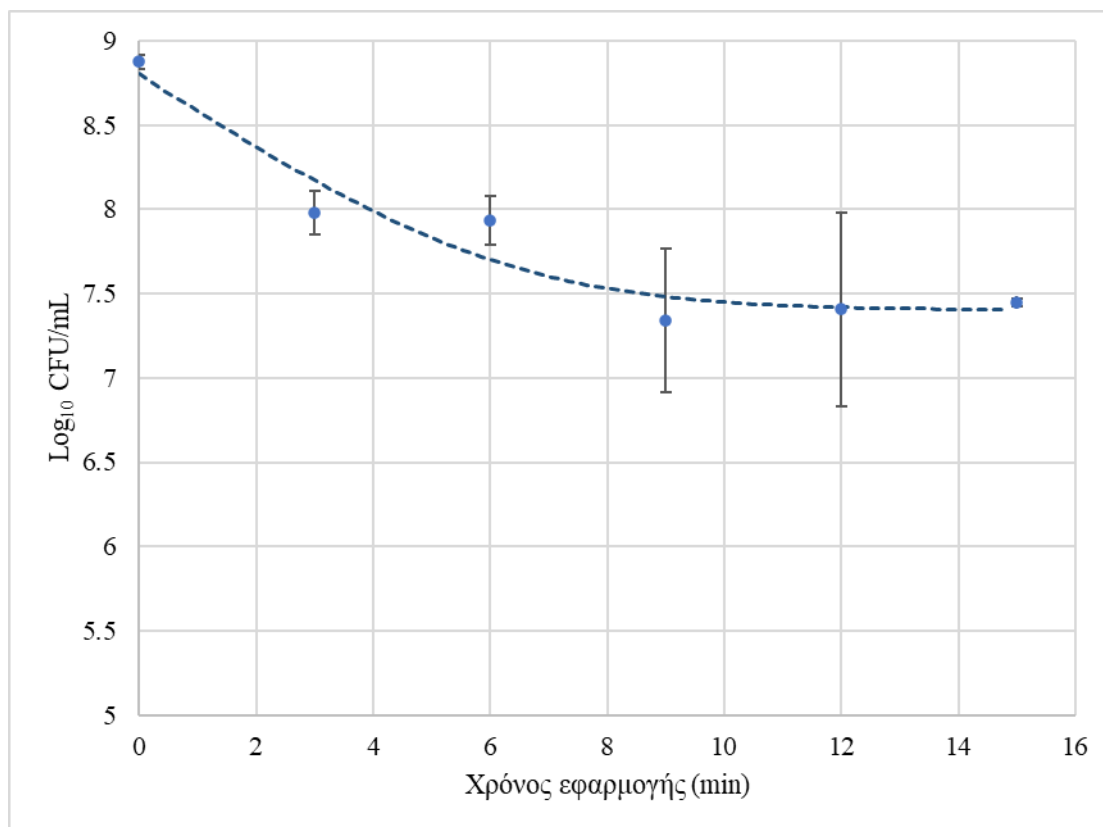


Διάγραμμα 5.33: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*.

Πίνακας 5.44: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,21		0,06	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,50		0,23	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,75	0,69	0,10	0,32

Στην περίπτωση του βακτηρίου *L. monocytogenes* εξετάστηκε και το διφασικό μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο στην πρώτη φάση της καμπύλης, που καταλαμβάνει και το μεγαλύτερο ποσοστό της ($f=0.96$), μειώνεται το φορτίο με το ρυθμό απενεργοποίησης να εκτιμάται σε $0,53 \text{ min}^{-1}$, ενώ στη δεύτερη φάση το φορτίο σταθεροποιείται κοντά στην τιμή των $7,5 \log_{10} \text{ CFU/mL}$.



Εικόνα 5.34: Προσαρμογή του διφασικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*.

Πίνακας 5.45: Κινητικές παράμετροι του διφασικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση	Τυπικό σφάλμα		
f	0.96	0.10		
$k_{\max 1} (\text{min}^{-1})$	0.53	0.31		
$k_{\max 2} (\text{min}^{-1})$	0.00	0.19		
$N_0 (\log_{10} \text{ CFU/mL})$	8.80	0.24		
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0.93	0.82	0.06	0.24

Συνοψίζοντας, για τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, η πλειοψηφία των μοντέλων που χρησιμοποιήθηκαν έχουν αρκετά καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα του βακτηρίου, εκτός από το γραμμικό μοντέλο που δεν είχε καθόλου καλή προσαρμογή. Ωστόσο το μοντέλο Weibull είναι εκείνο που με βάση τους δείκτες αξιολόγησης είναι το καταλληλότερο για τον συγκεκριμένο παθογόνο.

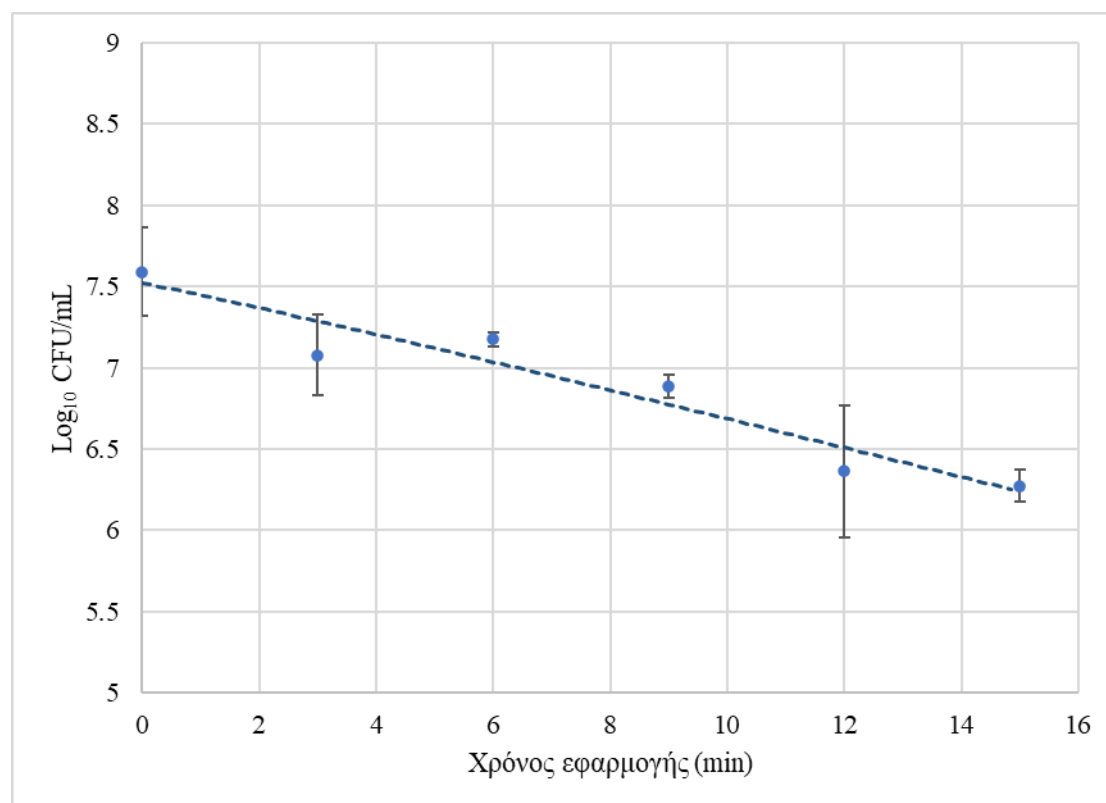
12. *Bacillus cereus*

Τη δεύτερη μεγαλύτερη μείωση φορτίου ανάμεσα στους παθογόνους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν, εμφάνισε ο μικροοργανισμός *B. cereus* με τον πληθυσμό του να μειώνεται κατά $1,32 \log_{10}$ CFU/mL, σύμφωνα με τον Πίνακα 5.46. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Geeraerd, Weibull και το γραμμικό.

Πίνακας 5.46: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *B. cereus* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	7,59	0,27
3	7,08	0,25
6	7,18	0,04
9	6,89	0,07
12	6,37	0,41
15	6,27	0,10

Από την προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα προέκυψε ότι η εκτίμηση του αρχικού φορτίου (N_0) ανέρχεται σε $7,52 \log_{10}$ CFU/mL και ο ρυθμός απενεργοποίησης υπολογίζεται σε $0,21 \text{ min}^{-1}$. Η μείωση ξεκινάει σχεδόν άμεσα με το μοντέλο να προτείνει μια μικρή φάση shoulder διάρκειας 0,92 λεπτών, ενώ δεν υπάρχει κάποιο φαινόμενο tailing στο μελετώμενο χρονικό διάστημα.

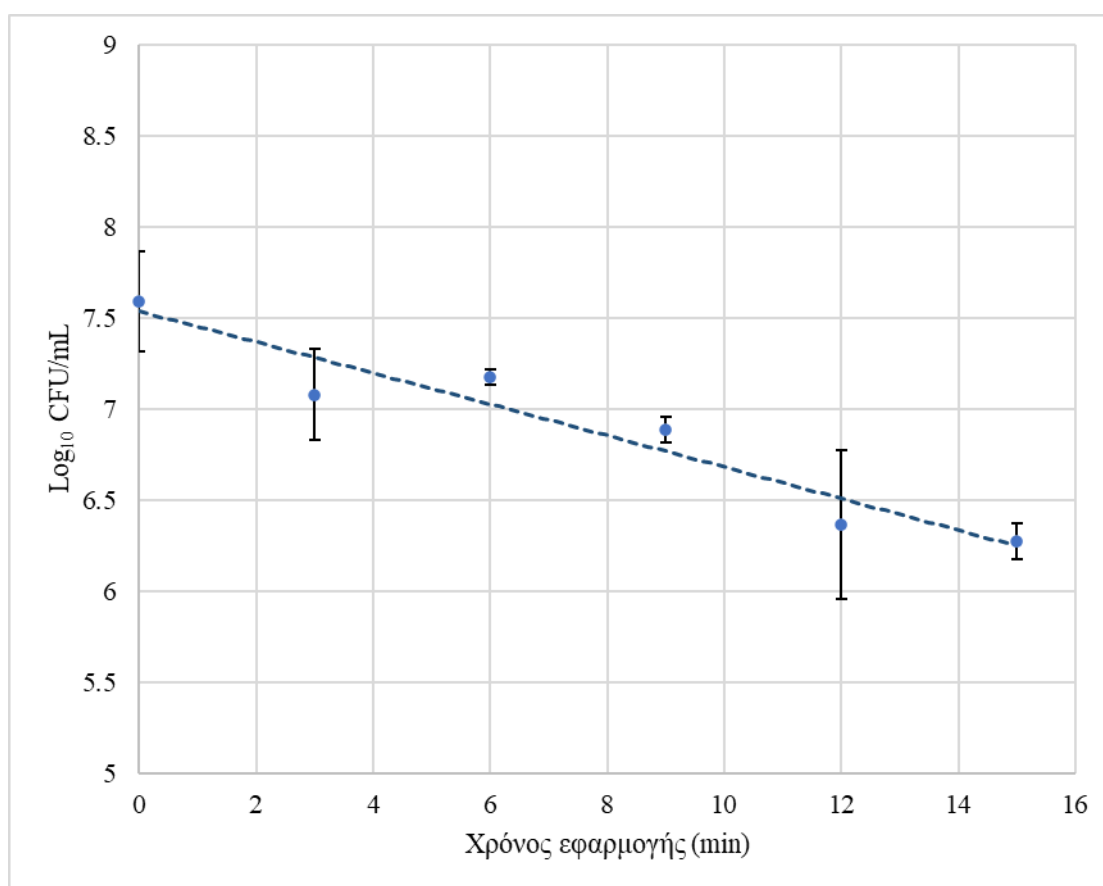


Διάγραμμα 5.35: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. cereus*.

Πίνακας 5.47: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	0,92		6,33	
k_{max} (min^{-1})	0,21		0,09	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	7,52		0,17	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,92	0,87	0,03	0,18

Στο Διάγραμμα 5.36 η κινητική απενεργοποίησης του βακτηρίου ακολουθεί μια γραμμική πορεία, η οποία επιβεβαιώνεται από την τιμή της παραμέτρου p , που είναι σχεδόν ίση με 1. Ο αρχικός πληθυσμός (N_0) εκτιμάται σε 7,54 log_{10} CFU/mL και ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) του πληθυσμού του παθογόνου *B. cereus* υπολογίζεται σε 11,68 λεπτά.

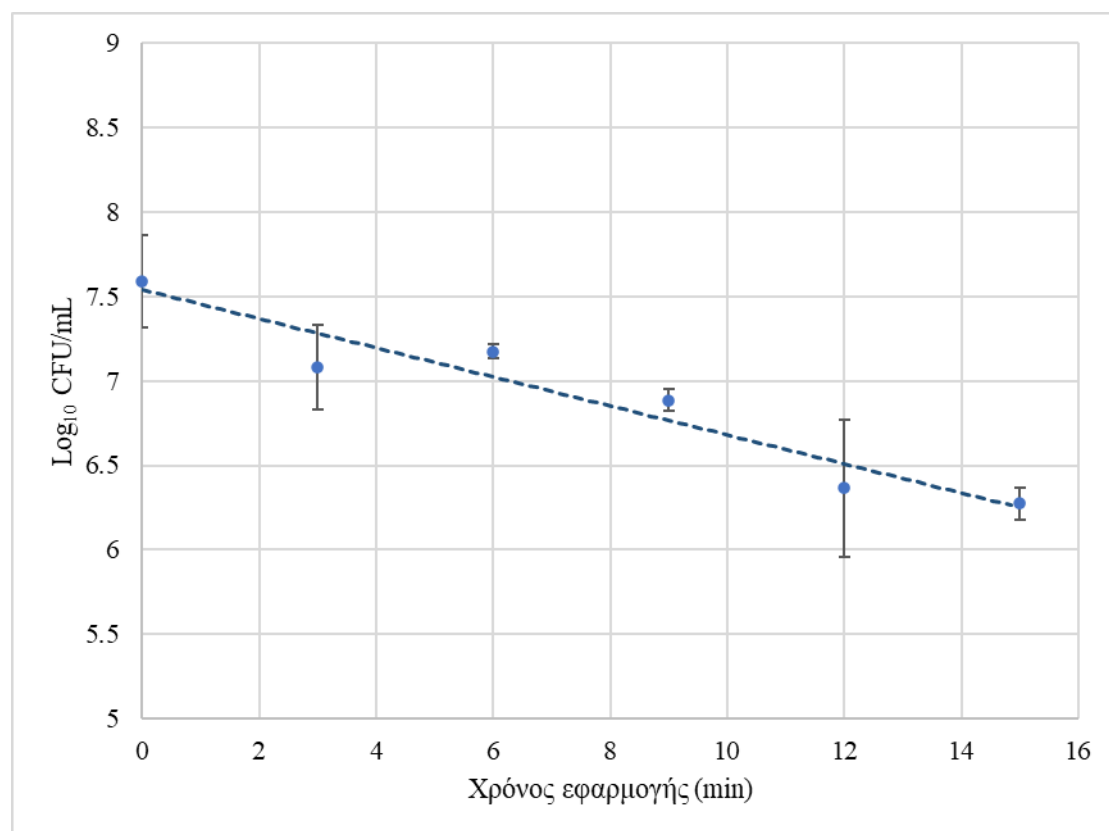


Διάγραμμα 5.36: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. cereus*.

Πίνακας 5.48: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	11,68		2,47	
p	1,01		0,41	
N_0 (log_{10} CFU/mL)	7,54		0,18	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,92	0,87	0,03	0,18

Το γραμμικό μοντέλο εκτιμά το αρχικό μικροβιακό φορτίου (N_0) σε $7,54 \log_{10}$ CFU/mL και τον ρυθμό απενεργοποίησης σε $0,20 \text{ min}^{-1}$. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 5.37, ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) του πληθυσμού υπολογίζεται περίπου σε 12 λεπτά.



Διάγραμμα 5.37: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *B. cereus*.

Πίνακας 5.49: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,20		0,03	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	7,54		0,12	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,92	0,90	0,03	0,16

Το γραμμικό μοντέλο είναι εκείνο που περιγράφει καλύτερα την μικροβιακή μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *B. cereus*, χωρίς να υπάρχουν βέβαια μεγάλες διαφορές από τα υπόλοιπα δύο μοντέλα που εξετάστηκαν, καθώς όλα πρότειναν μια γραμμική συμπεριφορά όσον αφορά την κινητική απενεργοποίησης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

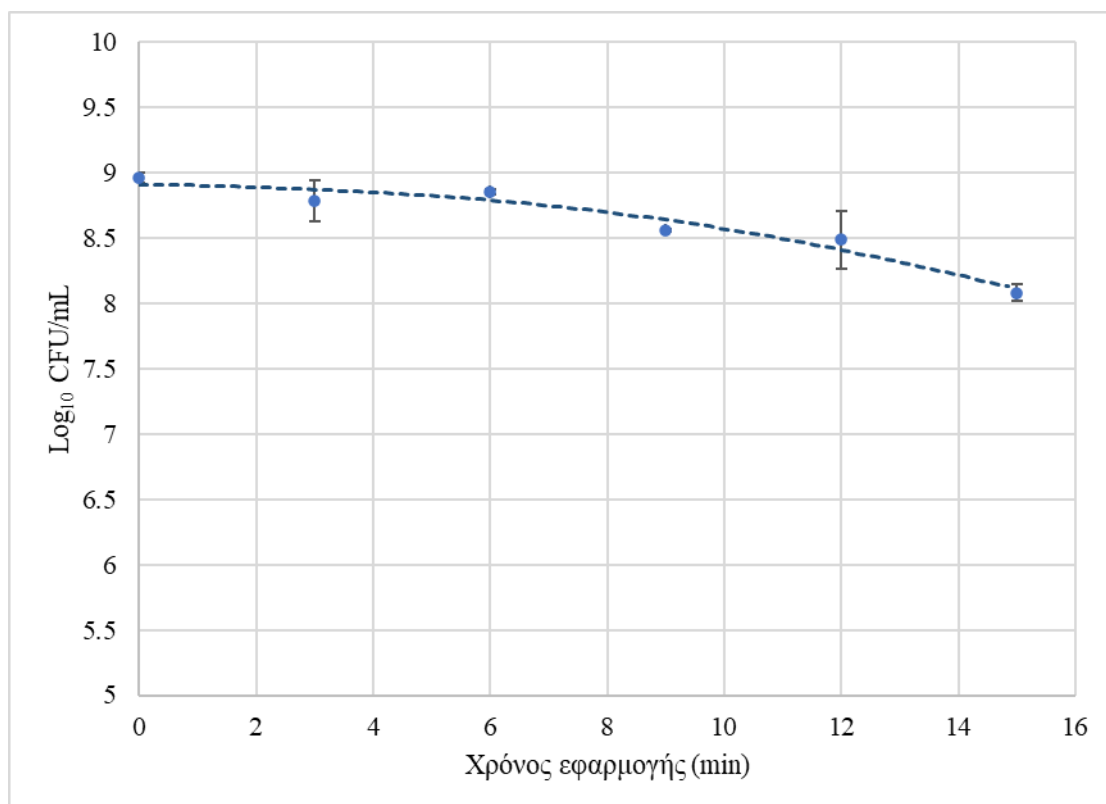
13. *Staphylococcus aureus*

Αρκετά μικρή ήταν και η μείωση του πληθυσμού του παθογόνου *S. aureus*, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.50. Η τιμή του φορτίου του μειώθηκε μόλις κατά 0,88 \log_{10} CFU/mL κατατάσσοντας τον ως τον μικροοργανισμό με τη δεύτερη μικρότερη μείωση του πληθυσμού από την εφαρμογή του πλάσματος ανάμεσα σε όσους εξετάστηκαν. Τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα Geeraerd, Weibull και το γραμμικό.

Πίνακας 5.50: Η μείωση του μικροβιακού φορτίου του *S. aureus* συναρτήσει του χρόνου εφαρμογής του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος.

Χρόνος εφαρμογής (min)	Μικροβιακό φορτίο (\log_{10} CFU/mL)	Τυπική απόκλιση
0	8,96	0,04
3	8,78	0,16
6	8,85	0,02
9	8,56	0,008
12	8,48	0,22
15	8,08	0,06

Το μοντέλο Geeraerd εκτιμά τη διάρκεια της φάσης shoulder που εμφανίζεται σε 9,19 λεπτά και τον μέγιστο ρυθμός απενεργοποίησης σε $0,29 \text{ min}^{-1}$. Η καμπύλη φαίνεται να ξεκινάμε αρχικό πληθυσμό (N_0) $8,91 \log_{10}$ CFU/mL και να φθίνει με ολοένα και αυξανόμενο ρυθμό, άρα αναμένεται συνέχεια στην μείωση του φορτίου μετά το πέρας των 15 λεπτών έκθεσης στο πλάσμα με βάση το συγκεκριμένο μοντέλο, το οποίο έχει αρκετά καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα.

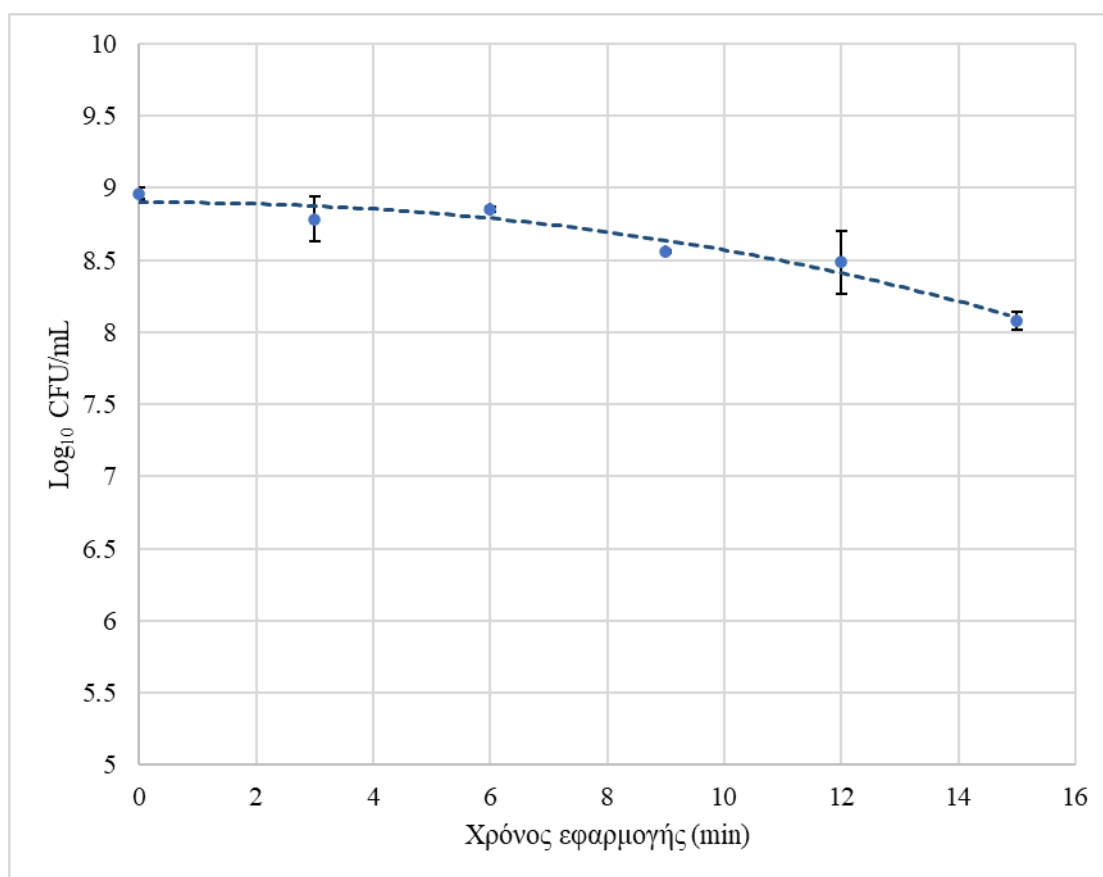


Διάγραμμα 5.38: Προσαρμογή του μοντέλου Geeraerd στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *S. aureus*.

Πίνακας 5.51: Οι κινητικές παράμετροι του μοντέλου Geeraerd.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
Shoulder length (min)	9,19		2,03	
k_{\max} (min^{-1})	0,29		0,09	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,91		0,08	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,95	0,91	0,01	0,09

Η εκτίμηση του αρχικού φορτίου (N_0) του βακτηρίου *S. aureus* ήταν 8,90 \log_{10} CFU/mL. Η καμπύλη στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω ($p > 1$) συνεπώς η μείωση του πληθυσμού γίνεται με ολοένα και αυξανόμενο ρυθμό. Ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) του πληθυσμού εκτιμάται μετά τα 16 λεπτά εφόσον συνεχιστεί με τον προβλεπόμενο ρυθμό η μικροβιακή απενεργοποίηση.

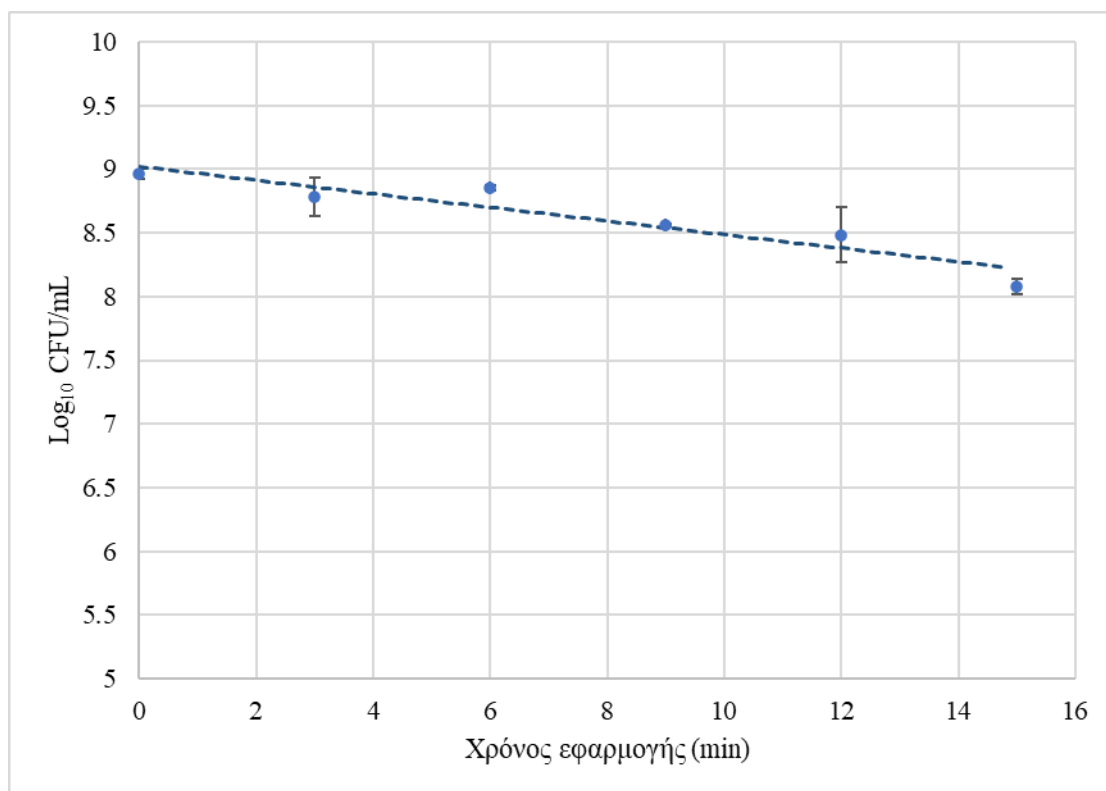


Διάγραμμα 5.39: Προσαρμογή του μοντέλου Weibull στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *S. aureus*.

Πίνακας 5.52: Κινητικές παράμετροι του μοντέλου Weibull.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
δ	16,68		1,20	
p	2,16		0,75	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	8,90		0,08	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,94	0,91	0,01	0,10

Σε αντίθεση με τα παραπάνω το γραμμικό μοντέλο υπολογίζει το αρχικό φορτίο (N_0) σε $9,02 \log_{10}$ CFU/mL και τον ρυθμό απενεργοποίησης σε $0,12 \text{ min}^{-1}$ ενώ εκτιμά ότι ο χρόνος δεκαδικής μείωσης (D) του φορτίου του βακτηρίου *S. aureus* θα ξεπεράσει τα 15 λεπτά. Το συγκεκριμένο μοντέλο δεν έχει καλή προσαρμογή πάνω στα πειραματικά δεδομένα όπως φαίνεται και από τους δείκτες αξιολόγησης του Πίνακα 5.53.



Διάγραμμα 5.40: Προσαρμογή του γραμμικού μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *S. aureus*.

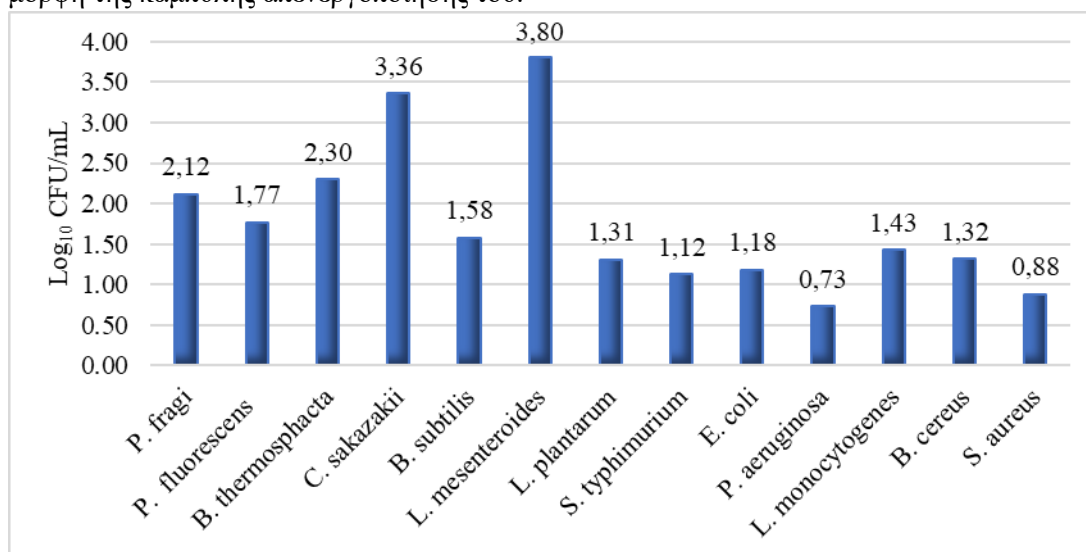
Πίνακας 5.53: Οι κινητικές παράμετροι του γραμμικού μοντέλου.

Παράμετροι	Εκτίμηση		Τυπικό σφάλμα	
k_{\max} (min^{-1})	0,12		0,02	
N_0 (\log_{10} CFU/mL)	9,02		0,09	
Αξιολόγηση μοντέλου	R^2	R^2 adjusted	MSE	RMSE
	0,88	0,85	0,02	0,12

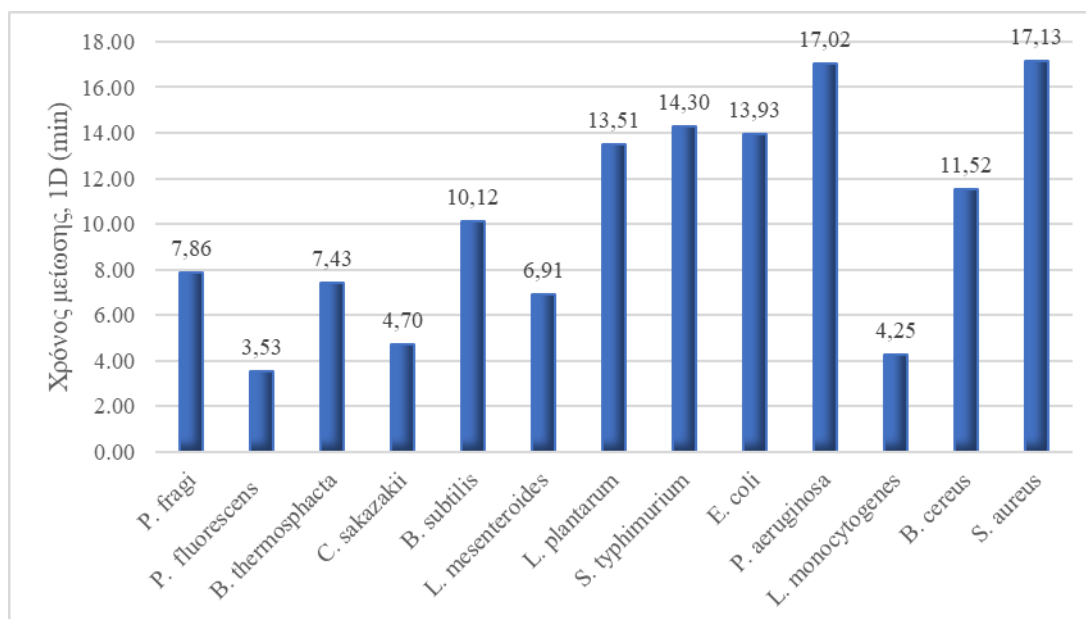
Το πιο καλά προσαρμοζόμενο μοντέλο πάνω στα πειραματικά δεδομένα του μικροοργανισμού *S. aureus* είναι το Geeraerd με τις τιμές των MSE και RMSE να υπολογίζονται 0,01 και 0,09 αντίστοιχα. Αντίθετα, το γραμμικό μοντέλο δεν μπορεί να εκφράσει ικανοποιητικά την κινητική απενεργοποίησης του συγκεκριμένου παθογόνου.

Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα της ακτινοβολίας του πλάσματος στη μείωση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων μετά τα 15 λεπτά έκθεσης αλλά και στο χρόνο που απαιτείται για να επέλθει μείωση κατά ένα λογάριθμο αποτυπώνονται και στα παρακάτω διαγράμματα. Η μείωση του πληθυσμού που εμφάνισε ο κάθε μικροοργανισμός κυμαίνεται από 0,73 έως και 3,80 \log_{10} CFU/mL. Σε γενικές γραμμές οι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στο ψυχρό πλάσμα από τους παθογόνους. Ωστόσο, οι μειώσεις που καταγράφηκαν είναι κατά πολύ μικρότερες σε σχέση με τις μειώσεις που καταγράφονται στη βιβλιογραφία.

Συγκρίνοντας τα δύο διαγράμματα, φαίνεται ότι στην πλειοψηφία τους τα παθογόνα βακτήρια είναι εκείνα που εμφανίζουν τους μεγαλύτερους χρόνους δεκαδικής μείωσης, D, και παράλληλα τις μικρότερες μειώσεις στον πληθυσμό τους. Εξαιρέση αποτελεί το βακτήριο *L. monocytogenes*, το οποίο έχει το δεύτερο μικρότερο χρόνο δεκαδικής μείωσης, χωρίς να παρουσιάζει τόσο μεγάλη μείωση στο συνολικό του φορτίο, γεγονός που εξηγείται από τη μορφή της καμπύλης απενεργοποίησης του.



Διάγραμμα 5.41: Συνολική μείωση του μικροβιακού πληθυσμού μετά από 15 λεπτά έκθεσης στο ψυχρό πλάσμα για κάθε αλλοιογόνο και παθογόνο μικροοργανισμό που εξετάστηκε.



Διάγραμμα 5.42 : Ο χρόνος (min) που απαιτείται σύμφωνα με τα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για να μειωθεί ο πληθυσμός κάθε μικροοργανισμού κατά έναν λογάριθμο.

Υπάρχουν αρκετές μελέτες, οι οποίες ασχολούνται με την επίδραση του ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος σε βακτήρια αλλά και σε μύκητες, σπόρια και βιοϋμένια. Πολλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μείωση που θα σημειώσει κάθε φορά ο προς μελέτη μικροοργανισμός και το γεγονός ότι η κάθε μελέτη ακολουθεί έναν διαφορετικό τρόπο προσέγγισης δεν καθιστά εύκολη τη σύγκριση των τελικών αποτελεσμάτων. Σύμφωνα με τους Sun et al. (2007), η μείωση του φορτίου των βακτηρίων *S. aureus* και *E. coli* κατά $5\log_{10}$ CFU/mL πραγματοποιήθηκε σε λιγότερο από 2 λεπτά. Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε με χρήση αέρα και σε συνθήκες αυξημένης υγρασίας (60%) ενώ χρησιμοποιήθηκε η διάταξη dielectric barrier discharge (DBD). Οι Lee et al. (2006) μελέτησαν την επίδραση ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος στα βακτήρια *S. cerevisiae*, *S. aureus* και *E. coli*, χρησιμοποιώντας ένα μίγμα αερίων (He/O_2) και συγκέντρωση αρχικού εναιωρήματος 10^5 CFU/mL. Τα αποτελέσματα έδειξαν πλήρη θανάτωση του πληθυσμού του *S. aureus* σε διάστημα 90 s, για το βακτήριο *E. coli* χρειάστηκαν περισσότερα από 120 s, ενώ ο *S. cerevisiae* αποδείχθηκε ανθεκτικότερος καθώς χρειάστηκαν 5 λεπτά για να θανατωθεί. Η μελέτη των Theinkom et al. (2019) αφορά στον παθογόνο μικροοργανισμό *E. faecalis*, ο οποίος παρουσίασε μείωση στο αρχικό φορτίο ($7,3 \cdot 10^{10}$ CFU/mL) μεγαλύτερη των 7 λογαρίθμων από το πρώτο λεπτό έκθεσης. Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια πρωτότυπη πηγή παραγωγής πλάσματος με τεχνολογία μικρο-εκκένωσης επιφάνειας (surface micro-discharge-technology SMD) και το φέρον αέριο ήταν ο ατμοσφαιρικός αέρας. Υπάρχουν ακόμη μελέτες, όπως αυτή των Zhao et al. (2022a), η οποία μελετά την κινητική απενεργοποίησης του βακτηρίου *P. aeruginosa* σε εμβολιασμένα φιλέτα κοτόπουλου. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πλάσματος διάταξη τύπου jet και το αρχικό φορτίο κυμαινόταν μεταξύ $10^8 - 10^9$ CFU/mL. Η μικροβιακή θανάτωση επήλθε μετά από 5 λεπτά (με χρήση αέρα ως φέρον αέριο) και μετά από 9 λεπτά (με χρήση N_2). Στη μελέτη των Zhang et al., 2019, απομονώθηκαν από προϊόν ψαριού τα βακτήρια *P. glacincola*, *B. thermosphacta* και *P. fragi* και εκτέθηκαν σε πλάσμα παραγόμενο από αποστειρωμένο αέρα με διάταξη DBD. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από 5 λεπτά, οι πληθυσμοί είχαν σημειώσει μείωση κατά 6,87, 4,81 και 3,32 \log_{10} CFU/mL, αντίστοιχα.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η μείωση του βακτηριακού πληθυσμού είναι αρκετά πιο γρήγορη και μεγάλη σε σχέση με τις μειώσεις που υπολογίστηκαν στη συγκεκριμένη εργασία. Ενώ όλες οι μελέτες που αναφέρονται παραπάνω παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη μείωση φορτίου σε σχετικά μικρούς χρόνους, αυτό δεν συνέβη στην παρούσα μελέτη. Η μεγαλύτερη διαφοροποίηση εντοπίζεται στην επιλογή του αερίου. Ενώ στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε το αργό (Ar), σε όλες τις προαναφερθείσες μελέτες το φέρον αέριο είναι είτε ο αέρας είτε κάποιο από τα αέρια O_2 και N_2 . Υπάρχουν βέβαια και περιπτώσεις που συναντώνται ευγενή αέρια, ωστόσο δεν χρησιμοποιούνται μόνο τους αλλά ως συστατικό σε κάποιο μίγμα αερίων. Ο λόγος που επιλέγονται τα συγκεκριμένα αέρια είναι η ενίσχυση της παραγωγής των λεγόμενων δραστικών ενώσεων του οξυγόνου και του αζώτου (RONS), που διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στον μηχανισμό της μικροβιακής απενεργοποίησης. Η χρήση αργού, όπως και των υπόλοιπων ευγενών αερίων δεν βοηθάει στην παραγωγή RONS και κατ' επέκταση στη μεγαλύτερη αποδοτικότητα της ακτινοβολίας του πλάσματος ενάντια στα βακτηριακά κύτταρα. Συνεπώς, επηρεάζεται η μείωση του βακτηριακού φορτίου κάτι που επιβεβαιώνεται από τα πειραματικά δεδομένα των μικροοργανισμών.

Επιπλέον, στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που συσχετίζουν και τη δομή του κυτταρικού τοιχώματος με την ανθεκτικότητα που εμφανίζει ένας μικροοργανισμός στο πλάσμα. Πιο συγκεκριμένα οι Das et al. (2022) αναφέρουν ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι λιγότερο επιρρεπή στην ακτινοβολία του πλάσματος έναντι των αρνητικών κατά Gram, εξαιτίας της πιο παχιάς δομής της πεπτιδογλυκάνης στο κυτταρικό τους τοίχωμα, η οποία τα προστατεύει. Συγκεκριμένα η μελέτη των Lee et al. (2006), σύγκρινε τους χρόνους δεκαδικής μείωσης των βακτηρίων *S. aureus* και *E. coli*, οι οποίοι ήταν 19 και 18 s αντίστοιχα αποτέλεσμα που δείχνει να επιβεβαιώνει αυτή την υπόθεση. Και στην παρούσα μελέτη για τα ίδια βακτήρια οι χρόνοι δεκαδικής μείωσης τους ήταν 17,13 s για το βακτήριο *S. aureus* και 13,93 s για το βακτήριο *E. coli*. Ωστόσο, εάν συγκριθούν οι μικροοργανισμοί *S. Typhimurium* (Gram-) και *B. cereus* (Gram+) από τη συγκεκριμένη μελέτη, τα αποτελέσματα διαφέρουν. Οι

χρόνοι δεκαδικής μείωσης του πληθυσμού τους είναι 14,30 και 11,52 λεπτά αντίστοιχα, με το θετικό κατά Gram βακτήριο να επηρεάζεται περισσότερο.

Μέρος 3^ο: Αποτελέσματα από την φασματοσκοπία υπέρυθρου (FTIR)

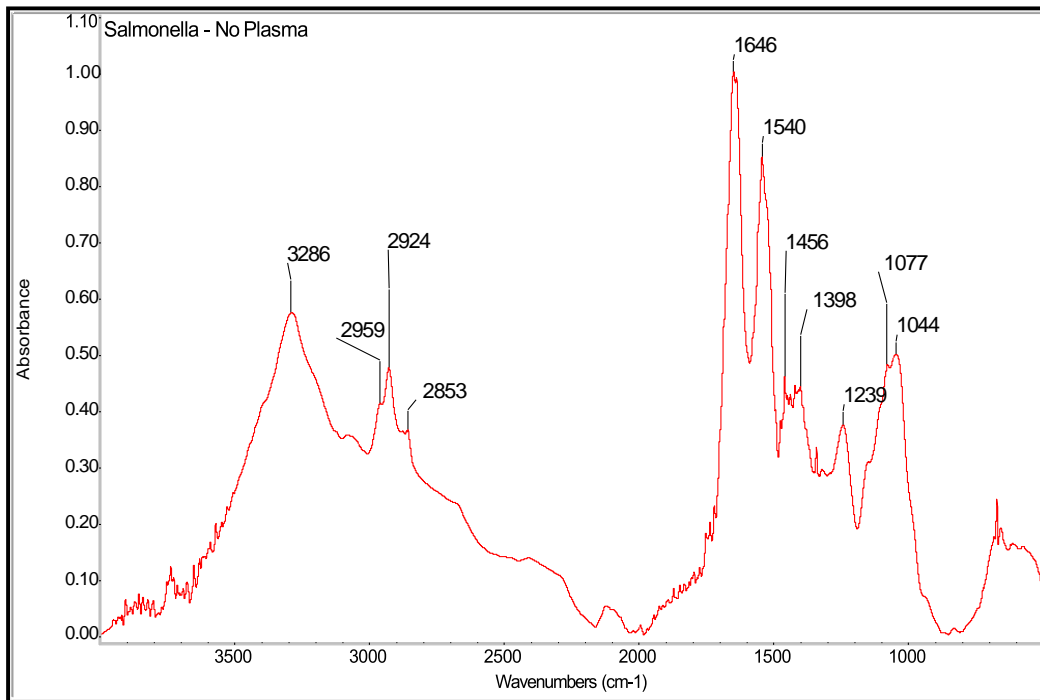
Υπάρχουν ερευνητικά άρθρα που εξετάζουν την επίδραση θερμικών και όχι μόνο μεθόδων σε παθογόνους μικροοργανισμούς και έπειτα εφαρμόζουν φασματοσκοπία υπέρυθρου (ATR) για να προσδιορίσουν την επίδρασή τους και τον βαθμό αποτελεσματικότητάς τους (Al-Qadiri et al., 2008a και 2008b). Επομένως, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη τεχνική ώστε να εντοπιστούν στα βακτηριακά κύτταρα τυχόν βλάβες που να οφείλονται στο πλάσμα. Αυτό που αναζητείται είναι διαφορές στα φάσματα με και χωρίς έκθεση στην ακτινοβολία, που να υποδεικνύουν ότι αυτή έχει κάποια επίδραση και που ακριβώς εντοπίζεται. Παρακάτω παρατίθενται τα φάσματα για δύο παθογόνους μικροοργανισμούς και συγκεκριμένα για το βακτήριο *Salmonella Typhimurium* και το βακτήριο *Bacillus cereus* για να εξεταστεί κατά πόσο θα μπορούσαν να προκύψουν αντίστοιχες διαφοροποιήσεις στα φάσματά τους με την απευθείας έκθεσή τους στην ακτινοβολία του ψυχρού πλάσματος.

Salmonella Typhimurium

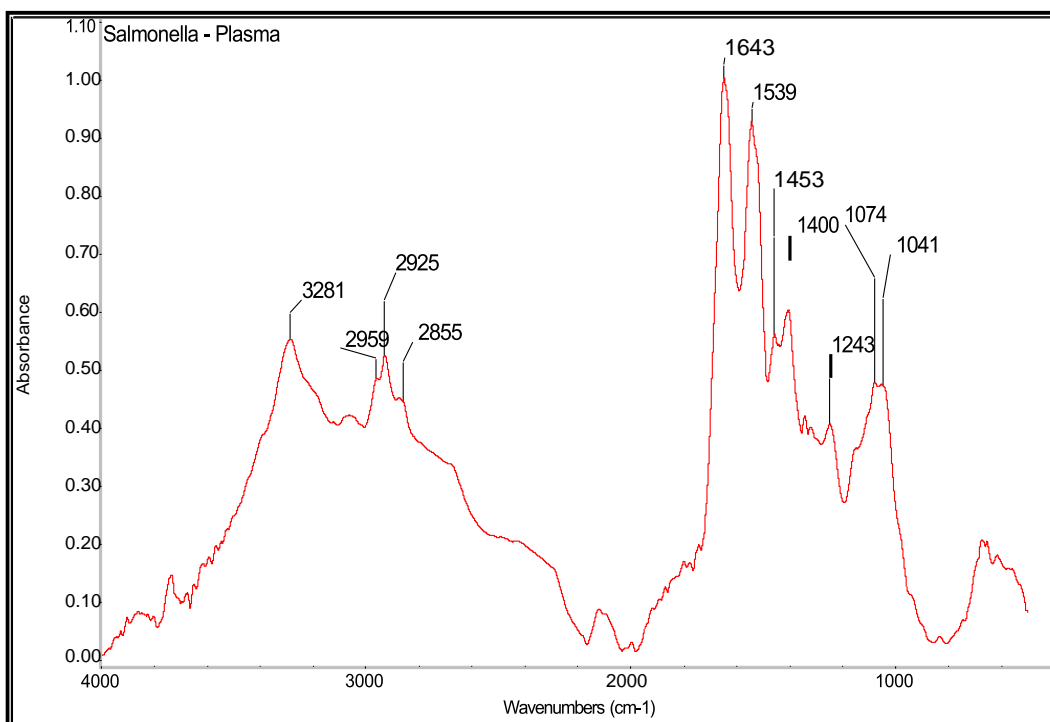
Στις Εικόνες 5.1 και 5.2 απεικονίζονται τα φάσματα για το βακτήριο *Salmonella Typhimurium*, το οποίο ανήκει στην κατηγορία των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, που όπως έχει ήδη αναφερθεί έχουν μια αρκετά πιο σύνθετη δομή στο κυτταρικό περίβλημα που τα προστατεύει. Με την πρώτη ματιά δε φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φασμάτων πέραν της περιοχής $1.500 - 1.400 \text{ cm}^{-1}$. Οι πολύ μικρές μεταβολές του κυματαριθμού των κορυφών (κάτω από 4 cm^{-1}) είναι αναμενόμενο αποτέλεσμα και δε θεωρούνται μετακινήσεις καθώς βρίσκονται πολύ κοντά στη διακριτική ικανότητα (resolution) του οργάνου, η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι 4 cm^{-1} .

Αναλυτικότερα δεν εντοπίζεται κάποια μετατόπιση κορυφής σε αυτό το διάστημα. ωστόσο φαίνεται να υπάρχει μια αλλαγή όσον αφορά στο εμβαδόν της κορυφής στα 1.400 cm^{-1} . Συγκεκριμένα το εμβαδόν μετά την επίδραση του πλάσματος φαίνεται να αυξάνεται συγκριτικά με αυτό που καταγράφηκε πριν την έκθεση στο πλάσμα. Αυτή η περιοχή ($1.500 - 1.400 \text{ cm}^{-1}$) αφορά κυρίως τα λιπαρά οξέα, τα οποία υπάρχουν στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων. Επιπλέον η κορυφή στα 1.044 cm^{-1} φαίνεται να εμφανίζει μια ελαφριά μεταβολή στο εμβαδόν της. Αυτή η κορυφή αφορά στους πολυσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούν δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος. Συνεπώς η αλλαγή που αποτυπώνεται στο φάσμα στις συγκεκριμένες περιοχές θεωρείται ως το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της ακτινοβολίας του πλάσματος με το εξωτερικό περίβλημα των κυττάρων.

Στην περιοχή γύρω στα 1.200 cm^{-1} που αντιστοιχεί στις δονήσεις του δεσμού P=O, ο οποίος συναντάται στα φωσφολιπίδια και στα νουκλεϊκά οξέα, όπως και στις δύο ζώνες των πρωτεϊνών (Amide I και Amide II) δηλαδή από τα 1.700 έως τα 1.500 cm^{-1} , δεν παρατηρούνται μεταβολές. Άρα, η έκθεση των κυττάρων του μικροοργανισμού *S. Typhimurium* για 20 λεπτά σε πλάσμα δεν ήταν αρκετή ώστε να διεισδύσουν τα δραστικά του συστατικά πέραν του εξωτερικού τους περιβλήματος και να προκαλέσουν βλάβες στο εσωτερικό των κυττάρων.



Εικόνα 5.1: Το φάσμα του μικροοργανισμού *Salmonella* Typhimurium χωρίς έκθεση στην ακτινοβολία του ψυχρού πλάσματος.



Εικόνα 5.2: Το φάσμα του μικροοργανισμού *Salmonella* Typhimurium με έκθεση στην ακτινοβολία του ψυχρού πλάσματος.

Bacillus cereus

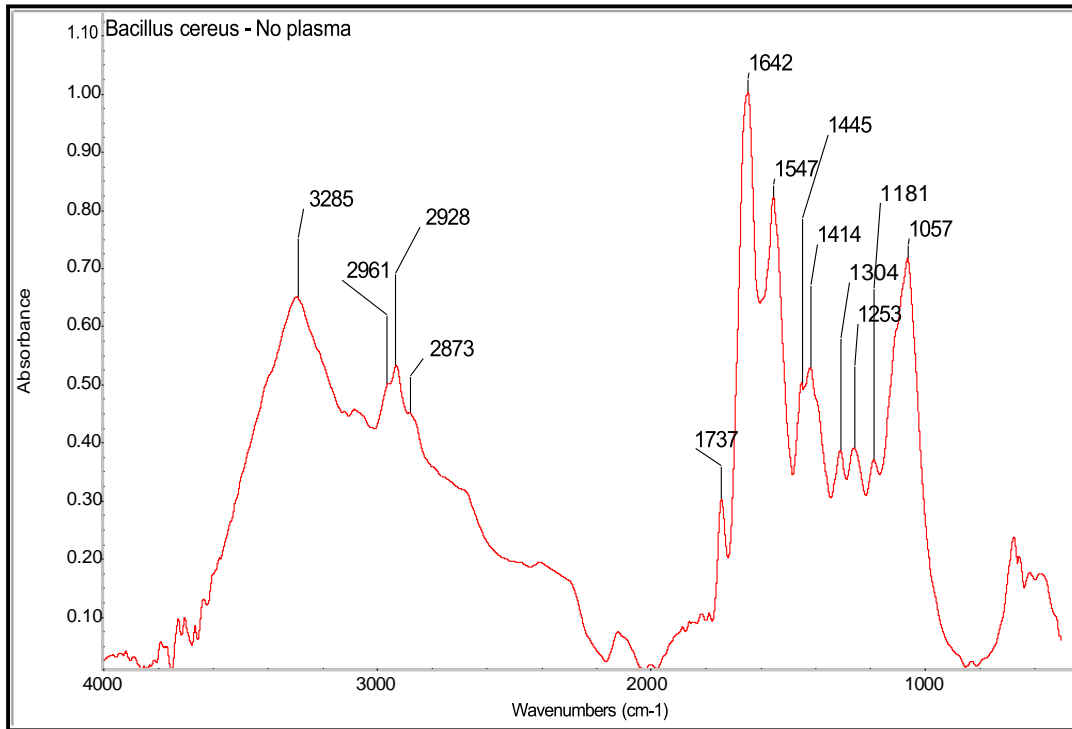
Ο δεύτερος μικροοργανισμός που επιλέχθηκε ήταν το βακτήριο *Bacillus cereus*, ο οποίος είναι θετικός κατά Gram. Αναλύοντας το φάσμα του συγκεκριμένου βακτηρίου πριν και μετά την έκθεσή του στο πλάσμα (Εικόνες 5.3 και 5.4) παρατηρούνται διαφορές σε περισσότερες κορυφές.

Η περιοχή των δονήσεων που αφορά τις ομάδες CH, CH₂ και CH₃ και εκτείνεται περίπου από τα 3.000 – 2.800 cm⁻¹ δεν παρουσιάζει κάποια αξιοσημείωτη αλλαγή όσον αφορά στην μετατόπιση των κορυφών εκτός από μια αύξηση στην απορρόφηση του φάσματος μετά την επίδραση του πλάσματος. Ομοίως και η κορυφή που εντοπίζεται στα 1.737 cm⁻¹ και αποδίδεται στην δόνηση του δεσμού C=O των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων δεν παρουσιάζει κάποια αλλαγή. Το ίδιο ισχύει και για τις κορυφές στα 1.642 cm⁻¹ και 1.547 cm⁻¹ που αφορούν τις πρωτεΐνες. Ωστόσο αξιοσημείωτη είναι η αλλαγή που δημιουργείται στην μεταξύ τους σχέση καθώς στην Εικόνα 3 η κορυφή του Αμιδίου I έχει σαφώς μεγαλύτερη απορρόφηση από την κορυφή του Αμιδίου II, ενώ στην Εικόνα 4 οι δύο κορυφές φαίνεται να έχουν σχεδόν παρόμοιο ύψος. Εάν ληφθούν υπόψιν οι δεσμοί που απορροφούν σε αυτό το εύρος του φάσματος τότε προκύπτει ότι η αύξηση της απορρόφησης στη ζώνη του Αμιδίου II συνδέεται με κάποια μεταβολή στους δεσμούς που εντοπίζονται στα αμινοξέα και σταθεροποιούν την πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών (πεπτιδικός δεσμός). Αυτό πιθανώς να σημαίνει ότι επηρεάζεται η αλληλουχία των κυτταρικών πρωτεϊνών υπό την ακτινοβολία του πλάσματος.

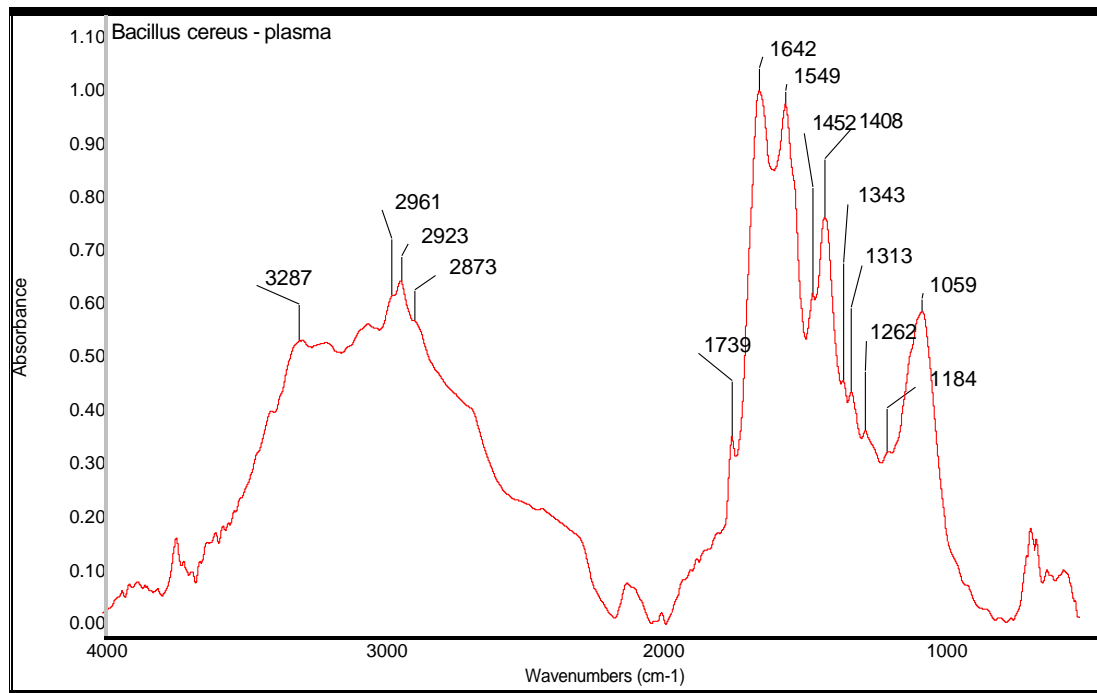
Αντίθετα στην περιοχή μεταξύ 1.500 – 1.400 cm⁻¹ παρατηρούνται μετατοπίσεις των κορυφών που αποδίδονται στις συμμετρικές δονήσεις κάμψης (δ_s) των CH₂ και CH₃. Συγκεκριμένα παρατηρείται ελαφρά μετατόπιση των κορυφών στα 1.445 cm⁻¹ και 1.414 cm⁻¹ στα 1.452 cm⁻¹ και 1.408 cm⁻¹ αντίστοιχα. Επιπλέον φαίνεται ότι μετά την έκθεση στην ακτινοβολία υπάρχει και μια αύξηση στην απορρόφηση της κορυφής που εντοπίζεται στα 1.408 cm⁻¹.

Αλλαγές υπάρχουν και στο τμήμα του φάσματος από τα 1.300 cm⁻¹ έως και τα 900 cm⁻¹. το οποίο χαρακτηρίζεται από δονήσεις πολλών διαφορετικών δεσμών. Στην συγκεκριμένη περιοχή φαίνεται να απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα, κυτταρικές πρωτεΐνες και διάφορα δομικά συστατικά που απαντώνται στην πλασματική μεμβράνη και στο κυτταρικό τοίχωμα. Συγκεκριμένα φαίνεται να «εμφανίζεται» μια κορυφή στα 1.343 cm⁻¹, η οποία δεν υπήρχε στο αρχικό φάσμα του *B. cereus* και επίσης σημειώνεται μετατόπιση της κορυφής από τα 1.304 cm⁻¹ που εντοπίζεται αρχικά στα 1.313 cm⁻¹. Οι κορυφές αυτές φαίνεται να αποδίδονται σε διάφορα συστατικά των πρωτεϊνών (περιοχή Αμιδίου III) ωστόσο δεν είναι δυνατόν να προσδιοριστεί ακριβώς τι έχει επηρεαστεί και με ποιο τρόπο. Ακόμα μετατόπιση φαίνεται να υφίσταται και η κορυφή που αντιστοιχεί στις ασύμμετρες δονήσεις (ν_{as}) του δεσμού P=O της χαρακτηριστικής ομάδας PO⁻ των νουκλεϊκών οξέων. Όπως φαίνεται και στις Εικόνες 3 και 4, η συγκεκριμένη κορυφή έχει μετατοπιστεί από τα 1.253 cm⁻¹ στα 1.262 cm⁻¹. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι αντισυμμετρικές δονήσεις του δεσμού P=O που απορροφούν σε αυτή την περιοχή υποδεικνύουν μετουσίωση των νουκλεϊκών οξέων και πιο συγκεκριμένα αφορούν αλλαγές στις δονήσεις των φωσφοδιεστερικών δεσμών της ραχοκοκαλιάς τους. Η περιοχή απορρόφησης 1.084 – 1.088 cm⁻¹ αντιστοιχίζεται σε συμμετρικές δονήσεις του δεσμού P=O και αφορά αλλαγές στη δομή της πεντόζης (δεοξυριβόζης/ριβόζης) του DNA/RNA που δε φαίνεται να υπάρχουν στο συγκεκριμένο φάσμα.

Εξαιρέση δεν αποτελεί ούτε η κορυφή που εντοπίζεται στα 1.057 cm⁻¹, η οποία αποδίδεται στους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Δεν εμφανίζεται κάποια μετατόπιση στη συγκεκριμένη περίπτωση, ωστόσο η κορυφή φαίνεται ελαφρώς πιο πλατιά μετά την έκθεση των κυττάρων στο πλάσμα και παρουσιάζει μείωση στην τιμή της απορρόφησης κάτι που μπορεί να σημαίνει επίδραση στις δονήσεις των δεσμών C-O-C που απαντώνται στα δυο αμινοσάκχαρα (NAM, NAG) και αποτελούν το δομικό συστατικό της πεπτιδογλυκάνης.



Εικόνα 5.3: Το φάσμα του μικροοργανισμού *Bacillus cereus* χωρίς έκθεση στην ακτινοβολία του ψυχρού πλάσματος.



Εικόνα 5.4: Το φάσμα του μικροοργανισμού *Bacillus cereus* με έκθεση στην ακτινοβολία του ψυχρού πλάσματος.

Τα φάσματα των δύο μικροοργανισμών μοιάζουν αρκετά μεταξύ τους, όμως η επίδραση της ακτινοβολίας του πλάσματος είναι εμφανέστερη στο βακτήριο *B. cereus*. Αυτή η διαφοροποίηση ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι το βακτήριο *S. Typhimurium* ως αρνητικό κατά Gram βακτήριο διαθέτει μια επιπλέον εξωτερική μεμβράνη σε σχέση με το βακτήριο *B. cereus*.

Συνεπώς, η επιπλέον μεμβράνη προσφέρει προστασία στα κύτταρα του βακτηρίου *S. Typhimurium*, με αποτέλεσμα να μην επαρκούν τα 20 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα προκειμένου να διεισδύσουν οι ελεύθερες ρίζες στο εσωτερικό του κυττάρου και να προκαλέσουν εκτενείς βλάβες σε βιομόρια. Για αυτό και οι μοναδικές διαφοροποιήσεις που εντοπίστηκαν αφορούν κορυφές που σχετίζονται είτε με την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη είτε με το κυτταρικό τοίχωμα. Θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι οι επίδραση του πλάσματος περιορίστηκε σε μεγάλο βαθμό στο εξωτερικό περίβλημα του βακτηρίου *S. Typhimurium*.

Αντίθετα στο βακτήριο *B. cereus* η επίδραση του πλάσματος με βάση τα φάσματα εντοπίστηκε σε διάφορες περιοχές, γεγονός που αποδεικνύει ότι επηρεάστηκαν εκτός από το κυτταρικό τοίχωμα, η κυτταροπλασματική μεμβράνη και βιομόρια στο εσωτερικό του. Οι αλλαγές στις απορροφήσεις των κορυφών που αφορούν τις κυτταρικές πρωτεΐνες (περιοχή Αμιδίου I & II) συνεπάγονται επίδραση του πλάσματος σε αυτές, χωρίς να μπορεί να προσδιοριστεί ποια είναι ακριβώς αυτή η αλλαγή. Τα νουκλεϊκά οξέα επίσης επηρεάστηκαν και σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπέστησαν μετουσίωση, όπως αποτυπώνεται στις ζώνες που απορροφά ο δεσμός P=O.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

6.1 Κινητική απενεργοποίησης μικροοργανισμών και μείωση μικροβιακού φορτίου μέσω της απευθείας εφαρμογής ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος

Η μελέτη της κινητικής απενεργοποίησης επιλεγμένων μικροοργανισμών λόγω της έκθεσης τους στο ψυχρό ατμοσφαιρικό πλάσμα παρουσιάζει θετικά αποτελέσματα, όσον αφορά τη μείωση του πληθυσμού τους. Η διαδικασία συμπεριλαμβάνει την έκθεση τρυβλίων εμβολιασμένων με ένα αρχικό εναιώρημα της τάξης των 10^8 - 10^9 CFU/mL σε πλάσμα για χρόνους 3, 6, 9, 12 και 15 λεπτών και στη συνέχεια τα αποτελέσματα που προκύπτουν επεξεργάζονται με σκοπό τον υπολογισμό της μείωσης του βακτηριακού φορτίου αλλά και τον προσδιορισμό της κινητικής απενεργοποίησης του καθενός.

Από την κατηγορία των αλλοιογόνων μικροοργανισμών που μελετώνται τη μεγαλύτερη μείωση μετά από τα 15 λεπτά έκθεσης στο πλάσμα παρουσιάζει το *L. mesenteroides*, το φορτίο του οποίου μειώνεται κατά $3,80 \log_{10}$ CFU/mL και την αμέσως επόμενη θέση κατέχει το *C. sakazakii*, με τον πληθυσμό του να βρίσκεται κατά $3,36 \log_{10}$ CFU/mL κάτω από τον αρχικό. Το δεύτερο οξυγαλακτικό βακτήριο που μελετάται στη συγκεκριμένη εργασία, το *L. plantarum* εμφανίζει τη μικρότερη μείωση στην κατηγορία των αλλοιογόνων, η οποία είναι ίση με $1,31 \log_{10}$ CFU/mL και παράλληλα το συγκεκριμένο βακτήριο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη φάση “shoulder” από όλους τους μικροοργανισμούς, η οποία διαρκεί σχεδόν 10 λεπτά. Σχετικά με τους υπόλοιπους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, οι μειώσεις που παρατηρούνται είναι με φθίνουσα σειρά: *B. thermosphacta* $2,30 \log_{10}$ CFU/mL, *P. fragi* $2,12 \log_{10}$ CFU/mL, *P. fluorescens* $1,77 \log_{10}$ CFU/mL και *B. subtilis* $1,58 \log_{10}$ CFU/mL. Στην κατηγορία των παθογόνων μικροοργανισμών παρατηρείται μικρότερη επίδραση στη μείωση του πληθυσμού σε σχέση με αυτή των αλλοιογόνων. Τη μικρότερη πληθυσμιακή μεταβολή παρουσιάζει το βακτήριο *P. aeruginosa* και ακολουθεί αρκετά κοντά το βακτήριο *S. aureus* με τα φορτία τους να μειώνονται κατά $0,73$ και $0,88 \log_{10}$ CFU/mL αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη ελάττωση εμφανίζεται στο φορτίο του βακτηρίου *L. monocytogenes* και είναι ίση με $1,43 \log_{10}$ CFU/mL. Για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη οι μειώσεις που σημειώνονται είναι με φθίνουσα σειρά: *B. cereus* $1,32 \log_{10}$ CFU/mL, *E. coli* $1,18 \log_{10}$ CFU/mL και *S. Typhimurium* $1,12 \log_{10}$ CFU/mL.

Όσον αφορά στα μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν για την μαθηματική έκφραση των κινητικών απενεργοποίησης των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, σχεδόν σε κάθε περίπτωση υπάρχει τουλάχιστον ένα μοντέλο που προσαρμόζεται ικανοποιητικά στα πειραματικά δεδομένα. Στην περίπτωση των βακτηρίων *B. cereus*, *B. thermosphacta* και *C. sakazakii* το γραμμικό μοντέλο (Bigelow) είναι εκείνο που περιγράφει καλύτερα την απενεργοποίησή τους, καθώς η μείωση φορτίου που παρατηρείται ξεκινάει από τα πρώτα κίχλας λεπτά έκθεσης στο πλάσμα και συνεχίζεται με σταθερό ρυθμό σε όλη τη διάρκεια των 15 λεπτών. Η καμπύλη απενεργοποίησης του βακτηρίου *L. monocytogenes* έχει μια χαρακτηριστική καμπυλότητα στρέφοντας τα κοίλα προς τα πάνω, κάτι που αποτυπώνει τη μείωση του ρυθμού απενεργοποίησης με την πάροδο του χρόνου έκθεσης στο πλάσμα και περιγράφεται εξαιρετικά από το μοντέλο Weibull. Οι *P. fragi* και *B. subtilis* εμφανίζουν μια σιγμοειδή καμπύλη μείωσης, η οποία εμπεριέχει μια αρχική φάση στην οποία το φορτίο παραμένει θεωρητικά αμετάβλητο, έπειτα ακολουθεί μείωση του πληθυσμού και μετά το πέρας αυτής το φορτίο φαινομενικά σταθεροποιείται και πάλι. Τα μικροβιακά κύτταρα εμφανίζουν αρχικά μια αντίσταση στην ακτινοβολία και αφότου αυτή καμφθεί, ξεκινάει να θανατώνεται ένα μέρος του πληθυσμού τους. Στην ίδια κατηγορία εντάσσεται και η *P. fluorescens* με τη διαφορά ότι η αρχική φάση του shoulder δεν είναι τόσο εμφανής και μεγάλη σε διάρκεια. Το βακτήριο *P. fluorescens* αρχίζει να μειώνεται σχεδόν άμεσα και με μεγαλύτερο ρυθμό και φτάνει σε πλατό γρηγορότερα σε σχέση με το βακτήριο *B. subtilis*, το

οποίο καθυστερεί να εμφανίσει πτώση στον πληθυσμό του και η μείωση είναι πιο ομαλή ενώ το πλατό αρχίζει να σχηματίζεται σε αρκετά μεγαλύτερο χρόνο. Το μοντέλο “Weibull με ουρά” είναι εκείνο που περιγράφει καλύτερα τη συμπεριφορά και των τριών αυτών αλλοιογόνων βακτηρίων. Ορισμένοι από τους μικροοργανισμούς που μελετώνται δεν παρουσίασαν κάποια σταθεροποίηση στο φορτίο τους και οι καμπύλες τους εμφανίζουν μόνο τις δύο πρώτες φάσεις της σιγμοειδούς καμπύλης. Τα μοντέλα Weibull και Geeraerd περιγράφουν αρκετά ικανοποιητικά τις καμπύλες αυτής της μορφής. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι μικροοργανισμοί: *S. Typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* και τα δύο οξυγαλακτικά βακτήρια *L. mesenteroides* και *L. plantarum*. Στην περίπτωση των παθογόνων, οι καμπύλες τους δεν εμφανίζουν ξεκάθαρα το φαινόμενο “shoulder” αλλά αυτό που παρατηρείται είναι μια μείωση του φορτίου τους με αυξανόμενο με την πάροδο του χρόνου έκθεσης ρυθμό. Στρέφουν δηλαδή τα κοίλα προς τα κάτω κάτι που περιγράφεται καλύτερα από τα μοντέλα Geeraerd και Weibull. Παρόλο που φαίνεται να έχουν μια ανθεκτικότητα στο πλάσμα, αυτή αναμένεται να μειωθεί σε μεγαλύτερους χρόνους με βάση τα μοντέλα απενεργοποίησης. Τέλος, συγκρίνοντας τα δύο οξυγαλακτικά βακτήρια *L. mesenteroides* και *L. plantarum*, οι καμπύλες απενεργοποίησης τους είναι αρκετά διαφορετικές. Για το βακτήριο *L. mesenteroides*, η μείωση είναι αρκετά μεγάλη και ξεκινάει σχεδόν άμεσα. Αντίθετα, στο βακτήριο *L. plantarum* παρατηρήθηκε μια αρκετά επιμήκης φάση “shoulder”, προτού αρχίσει η μείωση του φορτίου του.

6.2 Επίδραση της εφαρμογής ψυχρού ατμοσφαιρικού πλάσματος στα βακτηριακά κύτταρα σύμφωνα με τα φάσματα FTIR

Τα φάσματα υπέρυθρου που καταγράφηκαν για τους δύο επιλεγμένους μικροοργανισμούς εμφανίζουν αρκετές διαφορές μεταξύ τους. Στην περίπτωση του βακτηρίου *S. Typhimurium* η απευθείας έκθεση στο πλάσμα για 20 λεπτά, δεν φαίνεται να την επηρέασε σε μεγάλο βαθμό, καθώς τα φάσματα χωρίς και με έκθεση στο πλάσμα είχαν πολύ μικρές διαφορές. Οι διαφορές αυτές εντοπίζονται σε δύο κορυφές, στα 1.400 cm^{-1} και 1.044 cm^{-1} που σχετίζονται με τα λιπαρά οξέα και τους πολυσακχαρίτες αντίστοιχα, που αποτελούν δομικά συστατικά του εξωτερικού περιβλήματος του κυττάρου. Δεδομένου ότι οι μεταβολές στο φάσμα περιορίζονται μόνο σε αυτές τις δύο κορυφές, εξάγεται το συμπέρασμα ότι δραστικά συστατικά του πλάσματος δεν κατάφεραν να εισέλθουν στο εσωτερικό των κυττάρων και οι βλάβες που εντοπίζονται αφορούν μόνο το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταρική τους μεμβράνη. Δεν ισχύει το ίδιο για το βακτήριο *B. cereus*, τα φάσματα του οποίου εμφάνισαν αρκετές διαφορές πριν και μετά την έκθεση στο πλάσμα. Εκτός από τις διαφορές που εντοπίζονται και στα φάσματα του βακτηρίου *S. Typhimurium*, παρατηρούνται επιπλέον μεγάλες διαφορές σε περιοχές που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, που αποτελούν το γενετικό υλικό των κυττάρων. Οι μεταβολές στα εμβαδά ορισμένων κορυφών, οι μετατοπίσεις άλλων και η εμφάνιση ή εξαφάνιση από το φάσμα κορυφών δείχνουν ότι η επίδραση των δραστικών ενώσεων του πλάσματος επηρέασε σε μεγάλο βαθμό το συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Συγκεκριμένα, υποδεικνύεται η μετουσίωση των βιομορίων των κυττάρων και παράλληλα έχει επέλθει ρήξη του εξωτερικού περιβλήματος του κυττάρου, γεγονός που συμβάλει στη διάχυση των μακρομορίων στο εξωτερικό περιβάλλον. Η διαφορά των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να αποδοθεί στην διαφοροποίηση των δύο μικροοργανισμών σύμφωνα με τη χρώση Gram. Το βακτήριο *S. Typhimurium*, ως ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο που διαθέτει την επιπλέον προστασία που προσφέρει η δεύτερη εξωτερική μεμβράνη, εμφάνισε λιγότερες φθορές κατά την έκθεση στο πλάσμα, οι οποίες περιορίζονται στο εξωτερικό του κυττάρου. Αντίθετα το βακτήριο *B. cereus*, που είναι θετικός κατά Gram μικροοργανισμός, δεν παρουσίασε ανθεκτικότητα στην επίδραση του πλάσματος και το εξωτερικό του περίβλημα εν τέλει διαπεράστηκε από τις ελεύθερες ρίζες της ακτινοβολίας του πλάσματος, επιφέροντας

γενικευμένες βλάβες τόσο στο εξωτερικό του όσο και στα βιομόρια που βρίσκονται στο εσωτερικό του. Σε κάθε περίπτωση τα συγκεκριμένα πειράματα πρέπει να επαναληφθούν και να εξεταστούν περαιτέρω μικροοργανισμοί προκειμένου να εξακριβωθεί κατά πόσο ισχύει ότι η διαφοροποίηση της ανθεκτικότητάς τους κατά την έκθεση στο πλάσμα οφείλεται στην διαμόρφωση του εξωτερικού τους περιβλήματος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, M.R., Moss, M.O. (1995) Food Microbiology. Royal Society of Chemistry. Cambridge
- Ahmad, S.M., Siddiqui, M.W., Da., B.N., Shah, M.A., Wani, M.H., Roohinejad, S., Ali, A. (2019) Promising applications of cold plasma for microbial safety. chemical decontamination and quality enhancement in fruits. Journal of Applied Microbiology. doi:10.1111/jam.14541.
- Albertos, I., Martín-Diana, A.B., Cullen, P.J., Tiwari, B.K., Ojha, S.K., Bourke, P., Rico, D. (2017) Effects of dielectric barrier discharge (DBD) generated plasma on microbial reduction and quality parameters of fresh mackerel (*Scomber scombrus*) fillets. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 44: 117–122. doi:10.1016/j.ifset.2017.07.006.
- Al-Qadiri, H.M., Al-Alami, N.I., Al-Holy, M.A., Rasco, B.A. (2008a) Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) absorbance spectroscopy and multivariate analysis to study the effect of chlorine-induced bacterial injury in water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 8992–8997. doi:10.1021/jf801604p.
- Al-Qadiri, H.M., Lin, M., Al-Holy, M.A., Cavinato, A.G., Rasco, B.A. (2008b) Detection of sublethal thermal injury in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy (4000 to 600 cm⁻¹). Journal of Food Science, 73: M54–M61. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00640.x.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D.G., Lightfoot, D.A. (2017) Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. Plants, 6, 42: doi: 10.3390/plants6040042.
- Alvarez-Ordóñez, A., Prieto, M. (2012) Fourier transform infrared spectroscopy in food microbiology. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition. doi:10.1007/978-1-4614-3813-7, p. 1-12.
- Bevilacqua, A., Speranza, B., Sinigaglia, M., Corbo, M. (2015) A focus on the death kinetics in predictive microbiology: Benefits and limits of the most important models and some tools dealing with their application in foods. Foods, 4: 565–580. doi:10.3390/foods4040565.
- Bigelow, W.D., Esty, J.R. (1920) The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. Journal of Infectious Diseases, 27: 602–617. doi:10.1093/infdis/27.6.602.
- Bora, J., Khan, T., Mahnot, N.K. (2022) Cold plasma treatment concerning quality and safety of food: A Review. Curr. Res. Nutr Food Sci Jour., 10: 427-446. doi: 10.12944/CRNFSJ.10.2.3.
- Brandenburg, R., Basner, R., Weltmann, K.D. (2010) Nicht-thermische plasmen zum emissionsschutz. Vakuum in Forschung Und Praxis. 22. doi:10.1002/vipr.201000414.
- Brouwer, A.F., Eisenberg, M.C., Remais, J.V., Collender, P.A., Meza, R., Eisenberg, J.N.S. (2017) Modeling biphasic environmental decay of pathogens and implications for risk analysis. Environ. Sci. Technol., 51: 2186–2196. doi:10.1021/acs.est.6b04030.
- Bruggeman, P.J., Iza, F., Brandenburg, R. (2017) Foundations of atmospheric pressure non-equilibrium plasmas. Plasma Sources Sci. Technol., 26: 123002. doi:10.1088/1361-6595/aa97af.
- CAC/RCP 19-1979. Code of practice for radiation processing of food.
- Cerf, O. (1977) A review. Tailing of survival curves of bacterial spores. Journal of Applied Bacteriology, 42: 1 – 19. doi: 10.1111/j.1365-2672.1977.tb00665.x.

- Choi, M., Jeon, E.B., Kim, J.Y., Choi, E.H., Lim, J.S., Choi, J., Park, S.Y. (2022) Application of dielectric barrier discharge plasma for the reduction of non-pathogenic *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 and the quality stability of fresh oysters (*Crassostrea gigas*). *LWT - Food Science and Technology*, 154: 112698. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112698.
- Cooper, G.M., Hausman R.E. (2016) *The cell: A molecular edition* (7ⁿ edition). Washington. D.C.: Sunderland. Mass., ASM Press
- Directive 1999/2/EC of the European Parliament and of the Council of 22 February 1999 on the approximation of the laws of the Member States concerning foods and food ingredients treated with ionising radiation. OJ L 066 13.3.1999. p. 16.
- Directive 1999/3/EC of the European Parliament and of the Council of 22 February 1999 on the establishment of a Community list of foods and food ingredients treated with ionising radiation. OJ L 66. 13.3.1999. p. 24–25.
- Domonkos, M., Tichá, P., Trejbal, J., Demo, P. (2021) Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma technology in medicine, agriculture, and food industry. *Applied Sciences*, 11: 4809. doi:10.3390/app11114809.
- Filip, Z., Hermann, S. (2001) An attempt to differentiate *Pseudomonas spp.* and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *Eur. J. Soil Biol.*, 37: 137–143. doi: 10.1016/S1164-5563(01)01078-0.
- Gaunt, L.F., Beggs, C.B., Georghiou, G.E. (2006) Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A Review. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34: 1257–1269. doi: 10.1109/TPS.2006.878381.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F. (2005) GI_{na}FiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 95–105. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.038.
- Geeraerd A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F. (2000) Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of FoodMicrobiology*, 59: 185–209. doi: 10.1016/s0168-1605(00)00362-7.
- Georgalaki, M.D., Sarantinopoulos, P., Ferreira, E.S., De Vuyst, L., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2000) Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasserli cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 817–825. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01055.x.
- Giannoglou, M., Dimitrakellis, P., Efthimiadou, A., Gogolides, E., Katsaros, G. (2021) Comparative study on the effect of Cold Atmospheric Plasma. Ozonation. Pulsed electromagnetic fields and high-pressure technologies on Sea Bream fillet quality indices and shelf life. *FoodEngineering Reviews*, 3: 175–184. doi:10.1007/s12393-020-09248-7.
- Giannoglou, M., Stergiou, P., Dimitrakellis, P., Gogolides, E., Stoforos, N.G., Katsaros, G. (2020) Effect of Cold Atmospheric Plasma processing on quality and shelf-life of ready-to-eat rocket leafy salad. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 66: 102502. doi:10.1016/j.ifset.2020.102502.
- Gupta, T.T., Ayan, H. (2019) Application of non-thermal plasma on biofilm: A Review. *Applied Sciences*, 9: 3548. doi:10.3390/app9173548.
- Hou, Y., Wang, R., Gan, Z., Shao, T., Zhang, X., He, M., Sun, A. (2019) Effect of cold plasma on blueberry juice quality. *Food Chemistry*, 290: 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.123>.

- Hsu, Y.P., Meng, X., Van Nieuwenhze, M.S. (2016) Methods for visualization of peptidoglycan biosynthesis. *Imaging bacterial molecules. Structures and Cells*, 43: 3–48. doi:10.1016/bs.mim.2016.10.004.
- Isbell, H.S., Frush, H.L., Martin, E.T. (1973) Reactions of carbohydrates with hydroperoxides. *Carbohydrate Research*, 26: 287–295. doi: 10.1016/s0008-6215(00)84515-2.
- Jagannath, A., Tsuchido, T. (2003) Predictive Microbiology: A Review. *Biocontrol Science*, 8: 1-7. doi: 10.4265/BIO.8.1.
- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J., McNaughton, D. (1999) Fourier Transform Infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry*, 52: 407-417. doi: 10.1016/S0031-9422(99)00212-5.
- Khlyustova, A., Labay, C., Machala, Z., Ginebra, M., Canal, C. (2019) Important parameters in plasma jets for the production of RONS in liquids for plasma medicine: A brief review. *Front. Chem. Sci. Eng.*, 13: 238–252. doi:10.1007/s11705-019-1801-8.
- Khosravi, S., Jafari, S., Zamani, H., Nilkar, M. (2021) Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by air-based atmospheric-pressure DBD plasma. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 193: 3641–3650. doi: 10.1007/s12010-021-03636-3.
- Kim, S., Reuhs, B.L., Mauer, L.J. (2005) Use of Fourier transform infrared spectra of crude bacterial lipopolysaccharides and chemometrics for differentiation of *Salmonella enterica* serotypes. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 411–417. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02621.x.
- Kopuk, B., Gunes, R., Palabiyik, I. (2022) Cold plasma modification of food macromolecules and effects on related products. *Food Chemistry*, 382: 132356. doi:10.1016/j.foodchem.2022.132356.
- Laroque, D.A., Seo, S.T., Valencia, G.A., Laurindo, J.B., Carciofi, B.A.M. (2022) Cold plasma in food processing: Design, mechanisms, and application. *Journal of Food Engineering*, 312: 110748. doi:10.1016/j.jfoodeng.2021.110748.
- Lee, K., Paek, K., Ju, W., & Lee, Y. (2006). Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen. *J. Microbiol.* 44: 269–275. Ανακτήθηκε από: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16820756/>.
- Lee, J., Park, S., Korber, D., Baik, O. (2022) Optimization of atmospheric cold plasma treatment with different gases for reduction of *Escherichia coli* in wheat flour. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 768–775. doi :10.4014/jmb.2203.03056.
- Li, J., Xiang, Q., Liu, X., Ding, T., Zhang, X., Zhai, Y., Bai, Y. (2017) Inactivation of soybean trypsin inhibitor by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma. *Food Chemistry*, 232: 515–522. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.03.167.
- López, M., Calvo, T., Prieto, M., Múgica-Vidal, R., Muro-Fraguas, I., Alba-Elías, F., Alvarez-Ordóñez, A. (2019) A Review on non-thermal atmospheric plasma for food preservation: Mode of action, Determinants of effectiveness, and applications. *Front. Microbiol.* 10: 622. doi: 10.3389/fmicb.2019.00622.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. (2002) On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107 – 113. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00624-9.

- Van Boekel M. A. (2002) On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74: 139 – 159. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00742-5.
- Moats, W.A., Dabbah, R., Edwards, V.M. (1971) Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heated bacteria. *J. Food Sci.* 36: 523–526. doi: 10.1111/J.1365-2621.1971.TB06406.X.
- Morabit, Y., Hassan, M.I., Whalley, R.D., Robert, E., Modic, M., Walsh, J.L. (2021) A review of the gas and liquid phase interactions in low-temperature plasma jets used for biomedical applications. *European Physical Journal D*, 75: 32. doi: 10.1140/epjd/s10053-020-00004-4.
- Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., Baird, R.M. (1995) *Essentials of the microbiology of foods*. John Wiley & Sons. West Sussex.
- Niemira, B.A. (2012) Cold plasma decontamination of foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3: 125–142. doi:10.1146/annurev-food-022811-101132
- Niemira, B.A. (2012) Cold plasma reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Almonds Using Ambient Pressure Gases. *Journal of Food Science*, 77: M171– M175. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02594.x
- Nwabor, O.F., Onyeaka, H., Miri, T., Obileke, K., Anumudu, C., Hart, A. (2022) A cold plasma technology for ensuring the microbiological safety and quality of foods. *Food Engineering Reviews*, 14: 535–554. doi: 10.1007/s12393-022-09316-0
- Olatunde, O.O., Benjakul, S., Vongkamjan, K. (2019a) Dielectric barrier discharge cold atmospheric plasma: Bacterial inactivation mechanism. *Journal of Food Safety*, 84: 1871- 1880. doi:10.1111/jfs.12705.
- Olatunde, O.O., Benjakul, S., Vongkamjan, K. (2019b) High voltage cold atmospheric plasma: Antibacterial properties and its effect on quality of Asian sea bass slices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52: 305–312. doi:10.1016/j.ifset.2019.01.011.
- Paixao, L.M.N., Fonteles, T.V., Oliveira, V.S., Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S. (2019) Cold plasma effects on functional compounds of Siriguela juice. *Food and Bioprocess Technology*, 12: 110–121. doi: 10.1007/s11947-018-2197-z.
- Pankaj, S.K., Keener, K.M. (2017) Cold plasma: background. applications and current trends. *Current Opinion in Food Science*, 16: 49–52. doi:10.1016/j.cofs.2017.07.008
- Poetsch, A.R. (2020) The genomics of oxidative DNA damage. repair. and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18: 207-219. doi:10.1016/j.csbj.2019.12.013
- Qian, J., Ma, L., Yan, W., Zhuang, H., Huang, M., Zhang, J., Wang, J. (2022) Inactivation kinetics and cell envelope damages of foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* treated with cold plasma. *Food Microbiology*, 101: 103891. doi:10.1016/j.fm.2021.103891
- Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law. establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. OJ L 031 1.2.2002. p. 1.

- Reuter, S., Von Woedtke, T., Weltmann, K.D. (2018) The kINPen—a review on physics and chemistry of the atmospheric pressure plasma jet and its applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 51: 233001. doi: 10.1088/1361-6463/aab3ad.
- Lewis, R.N., McElhane, R. (1998) The structure and organization of phospholipid bilayers as revealed by infrared spectroscopy. *Chemistry and Physics of Lipids* 96: 9–21. doi: 10.1016/S0009-3084(98)00077-2.
- Sarangapani, C., Thirumdas, R., Devi, Y., Trimukhe, A., Deshmukh, R.R., Annapure, U.S. (2016) Effect of low-pressure plasma on physico-chemical and functional properties of parboiled rice flour. *LWT - Food Science and Technology*. 69: 482–489. doi: 10.1016/J.LWT.2016.02.003.
- Scholtz, V., Pazlarova, J., Souskova, H., Khun, J., Julak, J. (2015) Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances*, 33: 1108–1119. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.002.
- Sharma, A., Collins, G., Pruden, A. (2009) Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 1440–1449. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04323.x.
- Sirohi, R., Tarafdar, A., Kumar Gaur, V., Singh, S., Sindhu, R., Rajasekharan, R., Pandey, A. (2021) Technologies for disinfection of food grains: Advances and way forward. *Food Research International*. 145: 110396. doi:10.1016/j.foodres.2021.110396.
- Sonawane, S.K., Marat, T., Patil, S. (2020) Non-thermal plasma: An advanced technology for food industry. *Food Science and Technology International*. 26: 727-740. doi:10.1177/1082013220929474.
- Sruthi, N.U., Josna, K., Pandiselvam, R., Kothakota, A., Gavahian, M., Mousavi Khaneghah, A. (2022) Impacts of cold plasma treatment on physicochemical, functional, bioactive, textural, and sensory attributes of food: A comprehensive review. *Food Chemistry*, 368: 130809. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130809.
- Sun, Y., Qiu, Y., Nie, A., Wang, X. (2007) Experimental research on inactivation of bacteria by using dielectric barrier discharge. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 35: 1496–1500. doi:10.1109/tps.2007.905947.
- Tabares, F.L., Junkar, I. (2021) Cold plasma systems and their application in surface treatments for medicine. *Molecules*, 26: 1903. doi: 10.3390/molecules26071903.
- Theinkom, F., Singer, L., Cieplik, F., Cantzler, S., Weilemann, H., Cantzler, M., Weilemann, H., Cantzler, M., Hiller, K.A., Maisch, T., Zimmermann, J.L. (2019) Antibacterial efficacy of cold atmospheric plasma against *Enterococcus faecalis* planktonic cultures and biofilms in vitro. *PLoS ONE*, 14: e0223925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223925>.
- Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U.S. (2014) Cold Plasma: A novel non-thermal technology for food processing. *Food Biophysics*, 10: 1–11. doi:10.1007/s11483-014-9382-z.
- Tolouie, H., Mohammadifar, M.A., Ghomi, H., Hashemi, M. (2017) Cold atmospheric plasma manipulation of proteins in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58: 2583-2597. doi:10.1080/10408398.2017.1335689.
- Ucar, Y., Ceylan, Z., Durmus, M., Tomar, O., Cetinkaya, T. (2021) Application of cold plasma technology in the food industry and its combination with other emerging technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 114: 355–371. doi:10.1016/j.tifs.2021.06.004.

- Uscanga, B.R.A., Santoyo, M.C., Sánchez, J.A.R., Duarte, M.I.A., Montañó, J.A.P., Balcázar –López, E., Pacheco, J.R.S. (2022) Effect of the application of cold plasma energy on the inactivation of microorganisms. Proteins. and lipids deterioration in Adobera Cheese. *Journal of Food Quality*, 2022: 1-9. doi: 10.1155/2022/8230955.
- Von Woedtke, T., Reuter, S., Masur, K., Weltmann, K.D. (2013) Plasmas for medicine. *Physics Reports*, 530: 291–320. doi:10.1016/j.physrep.2013.05.005.
- Wan, S.Z., Keener, K. (2018) Effects of cold plasma on food quality: A Review. *Foods*. 7:4. doi:10.3390/foods7010004.
- Wang, J., Zhuang, H., Zhang, J. (2016) Inactivation of spoilage bacteria in package by dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma—treatment time effects. *Food and Bioprocess Technology*, 9: 1648–1652. doi:10.1007/s11947-016-1746-6.
- Wielogorska, E., Ahmed, Y., Meneely, J., Graham, W.G., Elliott, C.T., Gilmore, B.F. (2019) A holistic study to understand the detoxification of mycotoxins in maize and impact on its molecular integrity using cold atmospheric plasma treatment. *Food Chemistry*, 301: 125281. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125281.
- Xiao, D. (2016) Gas discharge and gas insulation. *Energy and environment research in China*. Springer. p. 47-49, 59-73. doi:10.1007/978-3-662-48041-0.
- Xu, H., Zhu, Y., Du, M., Wang, Y., Ju, S., Ma, R., Jiao, Z. (2020) Subcellular mechanism of microbial inactivation during water disinfection by cold atmospheric-pressure plasma. *Water Research*, 188:116513. doi:10.1016/j.watres.2020.116513.
- Yong, H.I., Kim, H.J., Park, S., Kim, K., Choe, W., Yoo, S.J., Jo, C. (2015) Pathogen inactivation and quality changes in sliced cheddar cheese treated using flexible thin-layer dielectric barrier discharge plasma. *Food Research International*, 69:57–63. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.008.
- Zhang, Y., Wei, J., Yuan, Y., Chen, H., Dai, L., Wang, X., & Yue, T. (2019). Bactericidal effect of cold plasma on microbiota of commercial fish balls. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52:394–405. doi:10.1016/j.ifset.2019.01.019.
- Zhao, Y., Shao, L., Jia, L., Meng, Z., Liu, Y., Wang, Y., Zou, B., Dai, R., Li, X., Jia, F. (2022a) Subcellular inactivation mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* treated by cold atmospheric plasma and application on chicken breasts. *Food Research International*, 160:111720. doi:10.1016/j.foodres.2022.111720
- Zhao, Y., Shao, L., Jia, L., Zou, B., Dai, R., Li, X., Jia, F. (2022b) Inactivation effects, kinetics and mechanisms of air- and nitrogen-based cold atmospheric plasma on *Pseudomonas aeruginosa*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 79:103051. doi: 10.1016/j.ifset.2022.103051.
- Zhou, R., Zhou, R., Yu, F., Xi, D., Wang, P., Li, J., Ostrikov, K. (2018) Removal of organophosphorus pesticide residues from *Lycium barbarum* by gas phase surface discharge plasma. *Chemical Engineering Journal*, 342: 401–409. doi:10.1016/j.cej.2018.02.107.
- Γιαβάσης. Ι. (2017) Γενική μικροβιολογία: Δομή και σύσταση μικροβιακού κυττάρου. Τμήμα Τεχνολογίας Τροφίμων. ΤΕΙ Θεσσαλίας.
- Φιλιούσης. Γ. (2017) Σημειώσεις: Δομή βακτηριακού κυττάρου. Τμήμα Κτηνιατρικής ΑΠΘ