



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Τροποποίηση στα λιπίδια του τροφογενούς βακτηρίου
Listeria monocytogenes σε απόκριση διαφόρων
πειραματικών συνθηκών**

**ΑΝΙΤΑ ΜΠΕΡΜΠΕΡΙ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

Φεβρουάριος 2016

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Τροποποίηση στα λιπίδια του τροφογενούς βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε απόκριση διαφόρων πειραματικών συνθηκών

ΑΝΙΤΑ ΜΠΕΡΜΠΕΡΙ

A.M.: 52712

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

Π. Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Π. Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Χ. Προεστός, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

N. Γαλανοπούλου, Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Π. Μαρκάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

Χ. Προεστός, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

A. Καλοκαιρινός, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Θ. Μαυρομούστακος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

M. Λιούνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ

B. Σινάνογλου, Επίκουρη Καθηγήτρια ΤΕΙ Αθήνας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 15/02/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* είναι διαδεδομένο σε μια ποικιλία τροφίμων και έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων δημιουργώντας ένα σοβαρό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Οι ικανότητες του *L. monocytogenes* να προσαρμόζεται σε χαμηλή θερμοκρασία, χαμηλό pH, υψηλή ωσμωτική πίεση, να αντέχει παράγοντες καθαρισμού και απολύμανσης και να εκτελεί διασταυρούμενη προστασία, σε συνδυασμό με την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ, του επιτρέπουν να επικρατήσει στην κοινές τεχνικές της ασφάλειας των τροφίμων.

Ο στόχος της διατριβής αυτής ήταν η αποσαφήνιση των τροποποιήσεων που επέρχονται στη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την προσαρμογή του στις συνθήκες παρασκευής και συντήρησης τροφίμων και συγκεκριμένα, ενός εργαστηριακά παρασκευασμένου μαλακού τυριού (τύπου φέτα). Η αποσαφήνιση αυτή θα έχει ως απόρροια τη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών προσαρμογής του παθογόνου στις δυσμενείς συνθήκες.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η *L. monocytogenes* όυσα παρούσα στο γάλα (5 log cfu/ml) μπορεί να επιβιώσει κατά την παρασκευή και την αποθήκευση του τυριού. Μολονότι το επίπεδο επιβίωσης των καταπονημένων κυττάρων (3 log cfu/g) του βακτηρίου διέφερε από αυτό των βέλτιστων (7 log cfu/g), συνεχίζει να είναι άνω του επιτρεπόμενου ορίου σε όλη την πειραματική διάρκεια αποθήκευσης. Επιπλέον, η προϊστορία των κυττάρων που επιμολύνουν το τρόφιμο έχει επίδραση στην συμπεριφορά τους κατά την αποθήκευση του τυριού.

Το βακτήριο για να διατηρήσει τη βέλτιστη ρευστότητα στις μεμβράνες, φαίνεται να ακολουθεί διάφορους τρόπους σε συνάρτηση του χρόνου και της προϊστορίας του. Τα κύτταρα, τα οποία πριν την επιμόλυνση είχαν αναπτυχθεί σε βέλτιστες συνθήκες, αυξάνουν τα λιπαρά οξέα ευθείας αλυσίδας (SCFA) εις βάρος των λιπαρών οξέων διακλαδιζόμενης αλυσίδας (BCFA), χωρίς να μεταβάλλουν τον λόγο των διακλαδιζόμενων br-C15:0 προς br-C17:0 λιπαρών οξέων και τον λόγο των iso προς anteiso λιπαρών οξέων διατηρώντας τις αλλαγές αυτές καθ' όλο το πειραματικό διάστημα. Διαφορετικό τρόπο ακολουθούν τα κύτταρα που είχαν αρχικά αναπτυχθεί σε συνθήκες καταπόνησης. Η ισορροπία μεταξύ ρευστής και συμπαγούς φάσης της μεμβράνης επιτυγχάνεται τώρα όχι μόνο με τη μεταβολή στα SCFA, αλλά και με τις μεταβολές στους λόγους br-C15:0 προς br-C17:0 και iso προς anteiso λιπαρών οξέων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Χημεία τροφίμων, Μικροβιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: *Listeria monocytogenes*, λιπίδια, λιπαρά οξέα, επιβίωση, τυρί, φέτα

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is present in a variety of foods and ready-to-eat products and it may generate a serious public health problem. The ability of *L. monocytogenes* to be adapted at low temperature, low pH, osmotic stress, to withstand cleaning and disinfection agents and to perform cross-protection, combined with its ability to form biofilms, allow it to prevail over commonly used techniques of food safety. Among the strategies undertaken by *L. monocytogenes* to adapt to environmental changes, modifications of membrane lipids are essential for keeping enough fluidity compatible with integrity and functionality of the membrane.

The objective of the present study was to determine the changes that occur in lipid composition of the membrane of *L. monocytogenes* during its adaptation to the manufacture and storage of a laboratory prepared soft cheese (feta type). This will result in a deeper understanding of bacterium's mechanisms to maintain the membrane fluidity in adverse conditions.

The results show that *L. monocytogenes* being present in milk (5 log cfu/ml) may survive the manufacture and storage of cheese. Although the surviving level of stressed cells (3 log cfu/g) differ from the level of cells grown in optimal conditions (7 log cfu/g), it is still above the regulatory levels throughout the experimental storage. Moreover, the history of inoculated cells has an effect on their behavior during storage of the cheese. The bacterium seems to follow different ways as a function of time and of the inocula history in order to maintain optimum membrane fluidity, and hence the possible operation of the membrane to the conditions of this experiment (preparation and storage of cheese). So, cells derived from inoculated cells grown in optimal conditions used the increase of straight chain fatty acids (SCFA) at the expense of branched chain fatty acids (BCFA), without altering the ratio of branched C15:0 to branched C17:0 fatty acids, and the ratio of iso to anteiso fatty acids. These changes were maintained during all experimental period. the cells derived from inoculated cells grown in stressed conditions follow a different way. The balance between fluid and solid phase membrane was achieved not only by changes in SCFA, but also by changes in the ratios of br-C15: 0 / br-C17: 0 and iso to anteiso fatty acids.

SUBJECT AREA: Food Chemistry, Microbiology

KEYWORDS: *Listeria monocytogenes*, lipids, fatty acids, survival, cheese, feta

Kushtuar nënës time Valentina, bashkëshortit tim Sokratit dhe të Ardhmes time

Στην μητέρα μου Βαλεντίνα, στο συζυγό μου Σωκράτη και στο Μέλλον μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ' όλα, είμαι βαθιά ευγνώμων προς την αείμνηστη καθηγήτρια Σοφία Μαστρονικολή, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα τόσο ενδιαφέρον και ευέλικτο θέμα. Η Σοφία ήταν η ενεργητική, οξυδερκής και αγαπητή σύμβουλος με την οποία ο καθένας θα' θέλε να εργαστεί. Με μια πραγματική και αναλλοίωτη προσέγγιση στην επιστήμη, και ένα γνήσιο ενδιαφέρον για την ευημερία των φοιτητών της, η Σοφία πίστευε ότι η σχέση σύμβουλος-φοιτητής πρέπει να πάει πέρα από την επιστήμη. Μου πρόσφερε πολύτιμες συμβουλές για την επαγγελματική ανάπτυξη, μου πρότεινε νέες προσεγγίσεις και εντόπισε διάφορες ευκαιρίες που προστέθηκαν στην ακαδημαϊκή, πνευματική και προσωπική μου ανάπτυξη. Πράγματι, ήταν ένα προνόμιο που συνεργάστηκα με μία τόσο καταξιωμένη καθηγήτρια και επιστήμονα.

Ευχαριστώ βαθύτατα την Επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παναγιώτα Μαρκάκη για την άρτια καθοδήγηση της κατά τη διεξαγωγή αυτής της διατριβής και για την υποστήριξη της καθόλη την διάρκεια των σπουδών μου. Ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Χαράλαμπο Προεστό και την Καθηγήτρια Κωνσταντίνα Γαλανοπούλου για τις συμβουλές, την καθοδήγηση, την υποστήριξη και τις χρήσιμες υποδείξεις τους κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαιτέρως την Ντία για την αγάπη που μου μετέδωσε για τη Βιοχημεία.

Πέρασα εξαιρετικά στην Ελλάδα, όχι μόνο λόγω της ομορφιάς της χώρας, αλλά και λόγω των υπέροχων ανθρώπων που εργάστηκαν και εργάζονται στα Εργαστήρια της Χημείας Τροφίμων και της Βιοχημείας. Τους ευχαριστώ όλους. Ευχαριστώ τον Γιάννη, που είναι ένας υπέροχος νέος επιστήμονας και εξαίρετος φίλος, για την υποστήριξη του από τότε που αρχίσαμε να δουλεύουμε μαζί. Ευχαριστώ την Βιβή, για τη συνεργασία της και που ήταν μαζί μου έως στις δύο μετά τα μεσάνυχτα, περιμένοντας την ανάπτυξη της "φίλης" μας *Listeria*.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τον άντρα μου Σωκράτη για την υποστήριξή του. Είμαι εξαιρετικά ευγνώμων στη μητέρα μου, Βαλεντίνα για την αμέριστη υποστήριξη και συμπαράσταση που μου προσέφερε σε όλη μου την ζωή.

Anita Berberi

Αθήνα, Μάιος 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	33
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>.....	35
1. 1. Εισαγωγή.....	35
1. 2. Βιολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	35
1. 3. Παθογένεια της <i>Listeria monocytogenes</i>	37
1.3.1 Η εισβολή της <i>Listeria monocytogenes</i> στα κύτταρα του ξενιστή	37
1.3.2 Άλλοι λοιμογόνιοι παράγοντες της <i>Listeria monocytogenes</i>	40
1. 4. Η νόσος και επιδημιολογία της λιστερίωσης	41
1.4.1 Προέλευση μολύνσεων	41
1.4.2 Συμπτώματα, διάγνωση και θεραπεία της ανθρώπινης λιστερίωσης ...	42
1.4.3 Επιδημιολογία της λιστερίωσης.....	45
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΤΗΣ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	48
2.1. Εισαγωγή στις βιολογικές μεμβράνες.	48
2.2. Λιπιδική σύσταση της μεμβράνης της <i>Listeria monocytogenes</i>	50
2.3. Προσαρμογή της μεμβράνης στις δυσμενείς συνθήκες.....	51
2.3.1. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε χαμηλή θερμοκρασία	52
2.3.2. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε χαμηλό pH	53
2.3.3. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε ασθενή οξέα που δρουν ως συντηρητικά	54
2.3.4. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε ωσμωτική πίεση (αλατότητα).....	55
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ	58
3.1. Εισαγωγή.....	58
3.2. Χαρακτηριστικά της <i>Listeria monocotogenes</i> που την καθιστούν επικίνδυνη για την ασφάλεια τροφίμων.....	59

3.2.1.	Η αντοχή της <i>Listeria monocytogenes</i> στα μέσα καθαρισμού και απολύμανσης	59
3.2.2.	Σχηματισμός βιοϋμενίων και η αίσθηση απαρτίας (quorum sensing) ..	61
3.3.	Στρατηγικές ενέργειες για τον έλεγχο της <i>Listeria monocytogenes</i> σε γαλακτοκομικά προϊόντα.....	64
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΦΕΤΑ	66
4. 1.	Φέτα και η ιστορία της.....	66
4.1.1	Διατροφική αξία της φέτας	67
4. 2.	Γάλα ως πρώτη ύλη	67
4.2.1	Χημική σύνθεση του γάλακτος.....	68
4.2.2	Τεχνολογία παραγωγής της φέτας.....	70
4. 3.	Παράγοντες ασφάλειας του τυριού.....	72
4.3.1.	Ανάπτυξη της <i>Listeria monocytogenes</i> σε τυρί και γαλακτοκομικά προϊόντα.....	73
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	76
5. 1.	Ασηπτική τεχνική.....	76
5. 2.	Ανακαλλιέργεια του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	76
5.2.1	Στερεή ανακαλλιέργεια του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	77
5.2.2	Ανακαλλιέργεια του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε γλυκερόλη.....	78
5. 3.	Υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	79
5. 4.	Έλεγχος της ανάπτυξης της υγρής καλλιέργειας.....	79
5.4.1	Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD).....	80
5. 5.	Καταμέτρηση αποικιών του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε εμπλουτισμένο υπόστρωμα BHI	80
5. 6.	Καταμέτρηση του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στα τρόφιμα	81
5. 7.	Παρατήρηση του βακτηρίου σε μικροσκόπιο	84
5.7.1	Χρώση Gram και παρατήρηση του βακτηρίου σε οπτικό μικροσκόπιο	84

5.7.2	Παρατήρηση του βακτηρίου σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	85
5. 8.	Συλλογή κυττάρων και εκχύλιση λιπιδίων κατά Folch	87
5. 9.	Προσδιορισμός Φωσφόρου σε εκχυλισμένα λιπίδια	89
5. 10.	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)	92
5. 11.	Οξυκαταλυόμενη Μεθανόλυση σε εκχυλισμένα λιπίδια	93
5. 12.	Ανάλυση των λιπαρών οξέων με αεριοχρωματογραφία GC	94
5. 13.	Αναλύσεις γάλακτος και τυριού	96
5.13.1	Προσδιορισμός ειδικού βάρους γάλακτος	96
5.13.2	Προσδιορισμός στερεού υπολήμματος άνευ λίπους στο γάλα	97
5.13.3	Προσδιορισμός λίπους στο γάλα, κατά Bozindsky	98
5.13.4	Προσδιορισμός λίπους στο τυρί, κατά Gerber-Van Gulik	98
5.13.5	Προσδιορισμός υγρασίας στο τυρί.	99
5. 14.	Μέτρηση pH στα στερεά τρόφιμα, (τυρί) και λειτουργία του πεχαμέτρου....	100
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΙΑΣ.	
	ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>LISTERIA</i>	
	<i>MONOCYTOGENES</i>.....	103
6. 1.	Μέτρηση μικροβιακού φορτίου καλλιεργειών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση του γάλακτος	103
6.1.1	Αποτελέσματα μέτρησης μικροβιακού φορτίου καλλιεργειών.....	103
6. 2.	Μικροσκοπική παρατήρηση του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	107
6.2.1	Παρατήρηση του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στο οπτικό μικροσκόπιο	107
6.2.2	Παρατήρηση του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	107
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> ΣΤΟ ΤΥΡΙ ΤΥΠΟΥ ΦΕΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	111
7. 1.	Εισαγωγή.....	111
7. 2.	Χημικές αναλύσεις του γάλακτος.	111
7. 3.	Παρασκευή λευκού τυριού τύπου φέτα μετά την επιμόλυνση του γάλακτος.....	112

7. 4.	Έλεγχος της συμπεριφοράς του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στο επιμολυσμένο τυρί τύπου φέτα κατά την ωρίμανση του.....	114
7.4.1	Αποτελέσματα του πρώτου ελέγχου του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στα δείγματα τυριού.....	114
7.4.2	Αποτελέσματα του δεύτερου ελέγχου του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στα δείγματα τυριού.....	117
7.4.3	Αποτελέσματα του τρίτου ελέγχου του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στα δείγματα τυριού.....	120
7. 5.	Συγκρίσεις των αποτελεσμάτων της επιμόλυνσης του τυριού.....	123
8.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΥΡΙΟΥ. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ	125
8. 1.	Σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας.	125
8. 1.	Εκχύλιση των ολικών λιπιδίων των καλλιέργειων με την μεθοδο Folch.	126
8. 2.	Προσδιορισμός φωσφόρου στα ολικά λιπίδια. Εκτίμηση αποτελεσμάτων ..	127
8. 3.	Ανάλυση λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)	130
9.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΚΤΗΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΥΡΙΟΥ.....	135
9. 1.	Εισαγωγή.....	135
9. 2.	Μελέτη λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων μεμβράνης από τα κύτταρα των καλλιιεργειών της σειράς CO.	135
9. 3.	Μελέτη λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων μεμβράνης από τα κύτταρα των καλλιιεργειών της σειράς BC.....	138
9. 4.	Μελέτη λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων μεμβράνης από τα κύτταρα των καλλιιεργειών της σειράς LA	140
9. 5.	Συμπεράσματα από την μελέτη των λιπαρων οξέων	142
10.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10. ΣΥΖΥΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	143
10.1.	Εισαγωγή.....	143
10.2.	Παρουσία του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> στο τυρί τύπου Φέτα....	143
10.3.	Μελέτη των μεμβρανικών λιπιδίων του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	145

10.4. Μελέτη των λιπαρών οξέων του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	147
10.5. Εισηγήσεις για μελλοντικές μελέτες	149
11. ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	153
12. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	155
13. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	157
14. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	159
15. ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	169

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1: Διάγραμμα ροής της μόλυνσης από το βακτήριο <i>L. monocytogenes</i> μέσω τροφίμων	59
Σχήμα 4.1: Παράσταση της κατανομής των συστατικών του γάλακτος στο τυρόπηγμα και στο τυρόγαλα κατά την πήξη του με πυτιά	69
Σχήμα 4.2: Διάγραμμα ροής παρασκευής φέτας όπου με έντονα γράμματα, επισημαίνονται τα κρίσιμα σημεία ελέγχου της παραγωγικής διαδικασίας (critical control points, CCP)	71
Σχήμα 6.1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας καταμέτρησης των αποικιών του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> , ανεπτυγμένο στους 30°C. Για κάθε αραιώση αντιστοιχούν 3 τρυβλία με θρεπτικό υλικό BHI ή OCLA ή PALCAM.	104
Σχήμα 6.2: Καμπύλες ανάπτυξης για τις καλλιέργειες α) pCo και β) pBc. Στον κάθετο άξονα δίνονται οι μετρούμενες τιμές της θολερότητας (OD) σε συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης (ώρες) (οριζώντιος άξονας)	104
Σχήμα 7.1: Πορεία παρασκευής τυριού τύπου φέτα από αιγοπρόβειο γάλα	113
Σχήμα 7.2: Σχηματική παράσταση της διαδικασίας των διαδοχικών αραιώσεων με διάλυμα Fraser Broth Base του ομογενοποιημένου μίγματος (τυριού+Fraser) και της μεταφοράς 0,1 mL από τις αραιώσεις σε τρυβλία OCLA, με σκοπό την καταμέτρηση των αποικιών της <i>L.monocytogenes</i>	115
Σχήμα 7.3: Μεταβολή των πληθυσμών των καλλιεργιών pCo και pBC κατά τη διάρκεια της παρασκευής από επιμολυσμένο γάλα και αποθήκευσης λευκού τυριού τύπου φέτα που συντηρήθηκε σε άλμη 6%. Οι στατιστικές μπάρες προέρχονται από την επεξεργασία των δύο πειραματικών σειρών.	124
Σχήμα 8.1: Διάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλυτικών προσδιορισμών που έγιναν στα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων της <i>L. monocytogenes</i> που αναπτύχθηκε σε καλλιέργειες του 1L BHI εμβολιασμένου με τα ανακτημένα από τα δείγματα τυριού κύτταρα, στους 30°C, έως την όψιμη λογαριθμική φάση.....	126
Σχήμα 8.2: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της <i>L. monocytogenes</i> από καλλιέργειες επωασμένες στους 30°C. Οι καλλιέργειες CO1, CO2, CO3 έχουν εμβολιαστεί με ανακτημένα απο τα	

δείγματα τυριού κύτταρα. Τα δείγματα τυριού είχαν αρχικά επιμολυνθεί με κύτταρα από καλλιέργεια pCO, ανεπτυγμένα σε βέλτιστες συνθήκες (30°C, 1L BHI).....	128
Σχήμα 8.3: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της <i>L. monocytogenes</i> από καλλιέργειες επωασμένες στους 30°C. Οι καλλιέργειες BC1, BC2, BC3 έχουν εμβολιαστεί με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα. Τα δείγματα τυριού είχαν αρχικά επιμολυνθεί με κύτταρα από καλλιέργεια pBC, ανεπτυγμένα σε καταπονικές συνθήκες, παρουσία χλωριδίου βενζαλκονίου 2.5mg/L.....	129
Σχήμα 8.4: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της <i>L. monocytogenes</i> από καλλιέργειες επωασμένες στους 30°C. Οι καλλιέργειες LA1, LA2, LA3 έχουν εμβολιαστεί με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα. Τα δείγματα τυριού είχαν αρχικά επιμολυνθεί με κύτταρα από καλλιέργεια pLA, ανεπτυγμένα σε καταπονικές συνθήκες (pH 5.5 λόγω παρουσίας γαλακτικού οξέος).....	129
Σχήμα 9.1: Διάγραμμα παρουσίασης των % περιεκτικότητων (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς CO και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pCO.	137
Σχήμα 9.2: Παρουσίαση σχηματική των αθροισμάτων των: διακλαδιζόμενης αλυσίδας (Σ branched), ευθύγραμμης αλυσίδας (Σ normal), ακόρεστων (Σ str unsat) και κορεσμένων (Σ str sat) λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες της σειράς CO και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pCO.....	137
Σχήμα 9.3: Διάγραμμα παρουσίασης των % περιεκτικότητων (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC.....	139
Σχήμα 9.4: Παρουσίαση σχηματική των αθροισμάτων των: διακλαδιζόμενης αλυσίδας (Σ branched), ευθύγραμμης αλυσίδας (Σ normal), ακόρεστων (Σ str unsat) και κορεσμένων (Σ str sat) λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC.	139
Σχήμα 9.5: Διάγραμμα παρουσίασης των % περιεκτικότητων (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς LA και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pLA.	141
Σχήμα 9.6: Παρουσίαση σχηματική των αθροισμάτων των: διακλαδιζόμενης αλυσίδας (Σ branched), ευθύγραμμης αλυσίδας (Σ normal), ακόρεστων (Σ str unsat) και	

κορεσμένων (Σstr sat) λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC.....	141
Σχήμα 10.1: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της <i>L. monocytogenes</i> που ανακτήθηκαν από το τυρί 24 ώρες μετά την παρασκευή του και επωάστηκαν στους 30°C.....	146
Σχήμα 10.2: Παρουσίαση των BCFA (Σbranched), SCFA (Σnormal), MUFA (Σunsat) και sSCFA (Σstr sat) του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> που ανακτήθηκε 24 ώρες μετά την παρασκευή του τυριού. Στο διάγραμμα δίνονται οι τιμές των αθροισμάτων της καθημίας ομάδας λιπαρών οξέων	150
Σχήμα 10.3: Παρουσίαση των BCFA (Σbranched), SCFA (Σnormal), MUFA (Σunsat) και sSCFA (Σstr sat) του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> που ανακτήθηκε 30 μέρες μετά την παρασκευή του τυριού. Στο διάγραμμα δίνονται οι τιμές των αθροισμάτων της καθημίας ομάδας λιπαρών οξέων	150
Σχήμα 10.4: Παρουσίαση των BCFA (Σbranched), SCFA (Σnormal), MUFA (Σunsat) και sSCFA (Σstr sat) του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> που ανακτήθηκε 60 ώρες μετά την παρασκευή του τυριού. Στο διάγραμμα δίνονται οι τιμές των αθροισμάτων της καθημίας ομάδας λιπαρών οξέων	150

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Εικόνες του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε α) οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση Gram β) από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο γ) ηλεκτρονική μικρογραφία ενός τεχνητά χρωματισμένου βακτηρίου σε ιστό	36
Εικόνα 1.2: Στάδια ενδοκυτταρικής ζωής του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> . Στο κέντρο: σχέδιο που απεικονίζει την εισβολή, την διαφυγή από το κενοτόπιο, τον σχηματισμό πυρήνων ακτίνης, την ακτίνοβασιζόμενη κινητικότητα και την εξάπλωση από το ένα κύτταρο στο άλλο. Περιφεριακά: Ηλεκτρονικές φωτογραφίες από τις οποίες προήλθε το κεντρικό σχέδιο. Τα InlA, InlB, LLO, PLC και ActA έχουν περιγραφεί στο κείμενο	39
Εικόνα 1.3: Διαδοχικά στάδια της ανθρώπινης λιστερίωσης.....	44
Εικόνα 2.1: Τρεις κυριότερες τάξεις φωσφολιπιδίων που έχουν βρεθεί στη μεμβράνη του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	51
Εικόνα 2.2: Δομές των κυριοτέρων λιπαρών οξέων της <i>Listeria monocytogenes</i>	52
Εικόνα 3.1: Χημικός τύπος για το χλωριούχο βενζαλκόνιο	61
Εικόνα 3.2: Η ανάπτυξη ενός βιοϋμενίου, απεικονιζόμενη ως μια διαδικασία πέντε σταδίων, στάδιο 1- αρχική προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια, στάδιο 2- παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας από εξωπολυσακχαρίτη, στάδιο 3- πρώιμη ανάπτυξη της αρχιτεκτονικής του βιοϋμενίου, στάδιο 4- ωρίμανση αρχιτεκτονικής του βιοϋμενίου, στάδιο 5- διασπορά των βακτηριακών κυττάρων από το βιοϋμένιο.....	63
Εικόνα 5.1: Πίνακας με τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων του βακτηριακού προτύπου Bacterial Acid Methyl Esters CP Mixture Matreya LLC, που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των λιπιδίων του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> , όπως δίνεται στα συνοδευτικά έγγραφα	95
Εικόνα 5.2: Χρωματογράφημα του προτύπου Marine oil FAME mix που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των λιπιδίων του βακτηρίου <i>L.monocytogenes</i> , όπως δίνεται στα συνοδευτικά έγγραφα του προτύπου.	96
Εικόνα 5.3: pH-μετρο ebro PHT 810.....	101
Εικόνα 6.1: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> ανεπτυγμένο σε βέλτιστες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI (καλλιέργεια pCo). Η δεξιά εικόνα είναι επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας.	108
Εικόνα 6.2: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου <i>L. monocytogenes</i> ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI παρουσία 2,5 µg/L χλωρίδιο βενζαλκονίου (καλλιέργεια pBc). Η δεξιά εικόνα είναι επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας.....	108

Εικόνα 6.3: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες 30 °C, 1 L BHI, pH 5,5 παρουσία του γαλακτικού οξέος (καλλιέργεια pLa). Η δεξιά εικόνα είναι επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας 108

Εικόνα 6.4: Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε βέλτιστες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI, (καλλιέργεια pCo). Οι δεξιές εικόνες είναι επεξεργασία των αντίστοιχων αριστερών πρωτότυπων φωτογραφιών. Με τα βέλη στην κάτω δεξιά εικόνα, δείχνονται κάποια τα κύτταρα. ... 109

Εικόνα 6.5: Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI παρουσία 2.5 μg/L χλωρίδιο βενζαλκονίου (καλλιέργεια pBc). Η δεξιά εικόνα είναι επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας 109

Εικόνα 6.6: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες 30 °C, 1 L BHI, pH 5.5 παρουσία του γαλακτικού οξέος (καλλιέργεια pLa). Οι δεξιές εικόνες είναι επεξεργασία των αντίστοιχων αριστερών πρωτότυπων φωτογραφιών και με τα βέλη δείχνονται κάποια από τα κύτταρα. 110

Εικόνα 8.1: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~150 μg, ~6 μg P) από καλλιέργειες της σειράς CO, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pCO (επισημασμένη ως TH). Πρότυπα λιπίδια: Τριπαλμιτίνη (TG), 1,2-διπαλμιτίνη (1,2-DG), 1,3-διπαλμιτίνη (1,3-DG), 1-μονοπαλμιτολεΐνη (MG), Παλμιτική αλκοόλη (FAIc), Ελαϊκό οξύ. Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ 98:2:1 v/v/v Εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I₂, (αριστερή εικόνα) b) Καύση κηλίδων μετά από ψεκασμό με θειικό χαλκό (δεξιά εικόνα). 131

Εικόνα 8.2: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~150 μg, ~6 μg P) από καλλιέργειες της σειράς CO, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pCO (επισημασμένη ως TH). Πρότυπα λιπίδια: καρδιολιπίνη CL, φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI), L-α-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (L-PE) Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ /Νερό 50:25:6:2 v/v/v/v. Η εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I₂, (αριστερή εικόνα) και β) Αντιδραστήριο Dittmer-Lester, (μεσαία εικόνα) γ) Αντιδραστήριο νινυδρίνης (δεξιά εικόνα)..... 131

Εικόνα 8.3: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~200 μg, ~6 μgP) από καλλιέργειες της σειράς BC, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pBC. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 μg) από την αρχική επιμολυντική καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Σύστημα ανάπτυξης:

Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ 98:2:1 v/v/v Εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I₂, (αριστερή εικόνα) β) Καύση μετά από ψεκασμό με θειικό χαλκό (δεξιά εικόνα).....132

Εικόνα 8.4: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~200 µg, ~6 µg P) από καλλιέργειες της σειράς BC, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pBC. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 µg) από την καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Πολικό Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ /Νερό 50:25:6:2 v/v/v/v. Η εμφάνιση έγινε με: α) Έκθεση σε ατμούς I₂, (αριστερή εικόνα) β) Αντιδραστήριο Dittmer-Lester, (μεσαία εικόνα) γ) Αντιδραστήριο νινυδρίνης (δεξιά εικόνα).....132

Εικόνα 8.5: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~250 µg, ~6 µg P) από καλλιέργειες της σειράς LA, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pLA. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 µg) από την καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ 98:2:1 v/v/v και η εμφάνιση έγινε με: α) Έκθεση σε ατμούς ιωδίου, (αριστερή εικόνα) και β) Καύση κηλίδων μετά από ψεκασμό με θειικό χαλκό (δεξιά εικόνα).133

Εικόνα 8.6: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~200 µg, ~6 µg P) από καλλιέργειες της σειράς LA, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pLA. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 µg) από την καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ /Νερό 50 :25: 6: 2 v/v/v/v. Η εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I₂, (αριστερή εικόνα) και β) Αντιδραστήριο Dittmer-Lester, (μεσαία εικόνα) γ) Αντιδραστήριο νινυδρίνης (δεξιά εικόνα).....133

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Μερικές επιδημίες λιστερίωσης των τελευταίων 2 δεκαετιών. Σε παρενθέσεις δίνεται ο αριθμός θανάτων.....	47
Πίνακας 4.1: Κύρια θρεπτικά συστατικά της φέτας και ποσοστά που καλύπτουν από τις ημερήσιες ανάγκες ενός ενήλικου άνδρα που εργάζεται μέτρια. Πηγή: Εθνική Επιτροπή Γάλακτος	67
Πίνακας 4.2: % Σύνθεση γάλακτος διαφόρων θηλαστικών [149.....	69
Πίνακας 4.3: Οι πιθανοί κίνδυνοι και τα ξένα σώματα στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.....	73
Πίνακας 5.1: Παρουσίαση των τύπων για το υπολογισμό του όγκου των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην τελευταία φάση της εκχύλισης λιπιδίων κατά Folch, πριν το διαχωρισμό.	89
Πίνακας 5.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στα δείγματα για τον προσδιορισμό φωσφόρου. Ο όγκος μετράται σε ml	90
Πίνακας 5.3: Ο όγκος (ml) αντιδραστηρίων για την προετοιμασία των τριών ομάδων προτύπων διαλυμάτων (Π) και των 2 τυφλών (Τ) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στον προσδιορισμό φωσφόρου.....	90
Πίνακας 6.1: Αποτελέσματα καταμέτρησης των αποικιών καλλιέργειας βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε βέλτιστες συνθήκες (pCo) σε τρυβλία με εμπλουτισμένο γενικό θρεπτικό υλικό BHI, καθώς και σε τρυβλία με εκλεκτικά θρεπτικά υλικά OCLA, PALCAM. Δίνονται και τα αποτελέσματα υπολογισμών για τον μικροβιακό φορτίο της καλλιέργειας.....	105
Πίνακας 6.2: Αποτελέσματα καταμέτρησης των αποικιών καλλιέργειας καταπονημένη με χλωρίδιο βενζαλκόνιο (pBc) του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε τρυβλία με εμπλουτισμένο γενικό θρεπτικό υλικό BHI. Δίνονται και τα αποτελέσματα υπολογισμών για τον μικροβιακό φορτίο της καλλιέργειας.	106
Πίνακας 6.3: Συνοπτική παρουσίαση των τιμών της θολερότητας OD, και του μικροβιακού φορτίου για τις τρεις καλλιέργειες του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> , την pCo, την pBc και για την υγρή οξυκαταπονημένη καλλιέργεια του βακτηρίου,	

ανεπτυγμένη στους 30°C, 1L BHI, με αρχικό pH 5.5 λόγω παρουσίας του γαλακτικού οξέος (lactic acid), (pLa) 106

Πίνακας 7.1: Πειραματικά αποτελέσματα χημικών αναλύσεων στα χρησιμοποιημένα γάλατα. Το αιγοπρόβειο είναι σε αναλογία 70% πρόβειο και 30% κατσικίσιο γάλα ... 112

Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα υπολογισμένα απο το τύπο του Fleischman με βάση την τιμή επί τοις εκατό του λίπους στα χρησιμοποιημένα γάλατα. Το αιγοπρόβειο είναι σε αναλογία 70% πρόβειο και 30% κατσικίσιο γάλα 112

Πίνακας 7.3: Δεδομένα για τις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των δειγμάτων αιγοπρόβειου γάλακτος στις δύο πειραματικές σειρές, και ο μικροβιακός αριθμός του επιμολυσμένου γάλακτος..... 114

Πίνακας 7.4: Δεδομένα από τον 1^ο έλεγχο (24 ώρες) στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα επαναληπτικά πειράματα A και B.... 115

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμών του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, για τον 1^ο έλεγχο (24 ώρες). 116

Πίνακας 7.6: Αποτελέσματα των υπολογισμών του μικροβιακού φορτίου τυριού ΜΦ σε cfu/gr και του λογαριθμού του, από τους αντίστοιχους μικροβιακούς αριθμούς MA εναιωρήματος τυρί+Fraser, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, κατά τον 1^ο έλεγχο (24 ώρες). 117

Πίνακας 7.7: Δεδομένα από τον 2^ο έλεγχο (30 μέρες) στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα επαναληπτικά πειράματα A και B.... 117

Πίνακας 7.8: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς CO, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, για τον 2^ο έλεγχο (30 μέρες). 118

Πίνακας 7.9: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, για τον 2^ο έλεγχο (30 μέρες). 119

Πίνακας 7.10: Αποτελέσματα των υπολογισμών του μικροβιακού φορτίου τυριού ΜΦ σε cfu/gr και του λογαριθμού του, από τους αντίστοιχους μικροφιακούς αριθμούς MA εναιωρήματος τυρί+Fraser, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, κατά τον 2 ^ο έλεγχο (30 μέρες).	120
Πίνακας 7.11: Δεδομένα από τον 3 ^ο έλεγχο (60 μέρες) στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα επαναληπτικά πειράματα A και B.....	120
Πίνακας 7.12: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς CO, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, για τον 3 ^ο έλεγχο (60 μέρες).	121
Πίνακας 7.13: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, για τον 3 ^ο έλεγχο (60 μέρες).	122
Πίνακας 7.14: Αποτελέσματα των υπολογισμών του μικροβιακού φορτίου τυριού ΜΦ σε cfu/gr και του λογαριθμού του, από τους αντίστοιχους μικροφιακούς αριθμούς MA εναιωρήματος τυρί+Fraser, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, κατά τον 3 ^ο έλεγχο (60 μέρες).	123
Πίνακας 7.15: Αποτελέσματα της μεταβολής των πληθυσμών σε log(cfu/g) του βακτηρίου <i>L.monocytogenes</i> σε δείγμα τυριού τύπου φέτα κατά την αποθήκευση του. Δίνονται οι μέσοι όροι των δύο πειραμάτων, μετά από στατιστική επεξεργασία. .	123
Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα της συγκομιδής κυττάρων από υγρές καλλιέργειες 1L της <i>L.monocytogenes</i> που επωάστηκαν στους 30 °C, έως την όψιμη λογαριθμική φάση και της εκχύλισης των μεμβρανικών λιπιδίων με την μέθοδο Folch. Δίνονται οι μέσοι όροι των δύο πειραμάτων.	127
Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα του προσδιορισμού της % περιεκτικότητας σε φώσφορο των ολικών λιπιδίων μεμβράνης των κυττάρων από υγρές καλλιέργειες 1L της <i>L.monocytogenes</i> που επωάστηκαν στους 30 °C, έως την όψιμη λογαριθμική φάση.	128

Πίνακας 9.1: Συγκεντρωτικός πίνακας για τις % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς CO και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pCO..... 136

Πίνακας 9.2: Συγκεντρωτικός πίνακας για τις % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC..... 138

Πίνακας 9.3: Συγκεντρωτικός πίνακας για τις % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς LA και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pLA..... 140

Πίνακας Π1.1: Αποτελέσματα των μετρήσεων της απορρόφησης για τον προσδιορισμό φωσφόρου σε δείγματα ολικών λιπιδίων κυτταρικών μεμβράνων του βακτηρίου *L.monocytogenes*, που αναπτύχθηκε στους 30°C, σε 1L BHI 157

Πίνακας Π2.1: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια CO1. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων 159

Πίνακας Π2.2: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια CO2. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων 160

Πίνακας Π2.3: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια CO3. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων 161

Πίνακας Π2.4: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια BC1. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας

κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων162

Πίνακας Π2.5: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια BC2. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων163

Πίνακας Π2.6: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια BC3. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων164

Πίνακας Π2.7: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια LA1. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων165

Πίνακας Π2.8: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια LA2. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων166

Πίνακας Π2.9: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια LA3. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων167

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της διατριβής έγινε στο Εργαστήριο της Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ υπό την καθοδήγηση της καθηγήτριας Σοφίας Μαστρονικολή. Μετά την απώλεια της, την επίβλεψη ανέλαβε η αν. καθηγήτρια Παναγιώτα Μαρκάκη. Το θέμα αναφέρεται στο τρόπο με το οποίο προσαρμόζεται το βακτήριο *Listeria monocytogenes* και την αποκρυπτογράφηση του μηχανισμού επιβίωσης του σε δυσμενείς συνθήκες, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων για την προστασία και την συντήρηση τροφίμων. Το κόστος των αιφνίδιων τροφολοιμώξεων από το παθογόνο φτάνει τα 2.3 εκατομμύρια \$ και 2500 άνθρωποι αρρωσταίνουν σοβαρά από λιστερίωση κάθε χρόνο. Το βακτήριο έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε δυσμενείς συνθήκες (stress) όπως χαμηλές θερμοκρασίες, όξινο περιβάλλον, αλλά και στα απολυμαντικά των χώρων της παραγωγικής διαδικασίας.

Η διατριβή αυτή μέλετησε:

την επιβίωση του βακτηρίου σε συνθήκες παραγωγικής διαδικασίας και συντήρησης τροφίμων και συγκεκριμένα λευκού τυριού τύπου φέτα και

την αποσαφήνιση των μεταβολών που επέρχονται στην λιπιδική σύσταση μεμβράνης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*, κατά την προσαρμογή του στις συνθήκες αυτές.

Η μελέτη έγινε δυνατή χάρη και στην Δρ. Χαρισμιάδου, Λέκτορα του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που μας προμήθευσε το γάλα από το οποίο παρασκευάστηκε το υπό μελέτη τρόφιμο, το τυρί. Επίσης πρέπει να ευχαριστήσω τον Δρ. Α. Βελέντζα από το Τμήμα της Βιολογίας και την καθηγήτρια Παπασιδέρη, Διευθύντρια του Τομέα της Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την βοήθεια στην παρατήρηση του βακτηρίου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σαρώσεως.

Η έρευνα έχει σημασία στην προσφορά θεμελιωδών πληροφοριών ώστε να κατανοήσουμε βαθύτερα τούς μηχανισμούς προσαρμογής του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στις δυσμενείς συνθήκες. Συνεπώς θα είναι δυνατόν να σχεδιαστούν νέες μέθοδοι συντήρησης, που θα έχουν ως στόχο την ανάπτυξη αποτελεσματικότερων τρόπων πρόληψης και ελέγχου του βακτηρίου στα τρόφιμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

LISTERIA MONOCYTOGENES

1. 1. Εισαγωγή

Η *Listeria monocytogenes* είναι ο παράγοντας της λιστερίωσης (listeriosis), μιας σοβαρής μόλυνσης που προκαλείται από την κατανάλωση μολυσμένων με το βακτήριο τροφίμων. Αναγνωρισμένη ως ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας η λιστερίωση πλήττει κυρίως έγκυες γυναίκες, τα νεογνά και ενήλικες με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα, με μία θνησιμότητα μεγαλύτερη του 25% [1]. Οι δύο κύριες κλινικές εκδηλώσεις είναι σηψαιμία και μηνιγγίτιδα. Η μηνιγγίτιδα συχνά περιπλέκεται από εγκεφαλίτιδα, μια παθολογία που είναι ασυνήθιστη για βακτηριακές λοιμώξεις [2, 3].

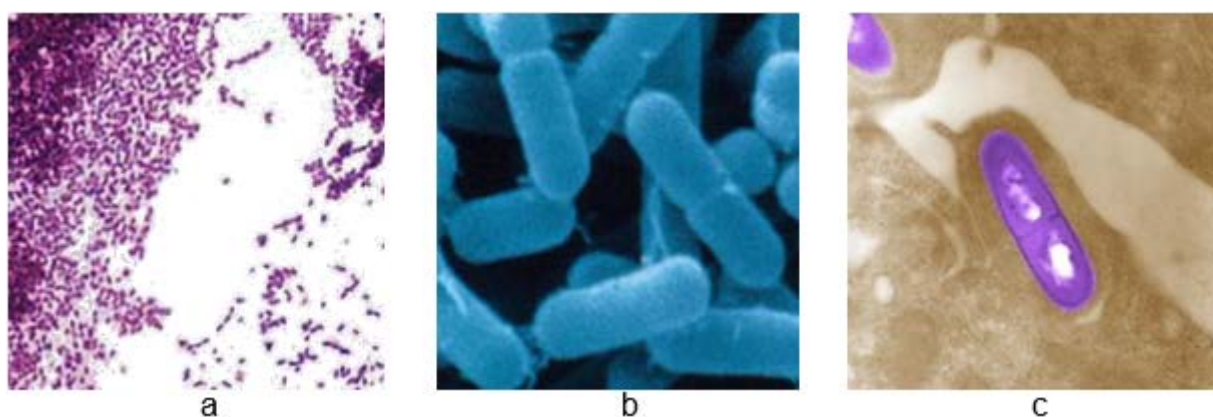
Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram θετικό βακτήριο, το οποίο μπορεί να απομονωθεί από το χώμα, το χορτάρι και άλλες περιβαλλοντικές πηγές. Επίσης έχει βρεθεί σε αρκετά ζώα και πουλιά [4, 5]. Άρχισε να μελετάται από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Μετά από διάφορα ονόματα που δόθηκαν για την περιγραφή του βακτηρίου από διάφορους επιστήμονες (όπως οι Paterson και Pirie), το 1940 προτάθηκε το όνομα *Listeria monocytogenes* το οποίο έγινε τελικά αποδεκτό [6]. Ο ιδιαίτερος ρόλος αυτού του βακτηρίου, ως παθογόνου, δεν είχε συνειδητοποιηθεί μέχρι το 1949 όταν μια επιδημία λιστερίωσης στα νεογνά εκδηλώθηκε στη Γερμανία. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η *L.monocytogenes* είναι παθογόνος για τον άνθρωπο αλλά επίσης και για τα ζώα [7].

Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να βρεθεί σε μια ευρεία ποικιλία από ακατέργαστα και επεξεργασμένα τρόφιμα. Το γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, τα διάφορα κρέατα και πουλερικά, τα αλλαντικά, τα φρέσκα ζαρζαβατικά, όπως ραδίκια και το λάχανο, τα θαλασσινά και τα προϊόντα αλιείας έχουν συσχετισθεί όλα με μόλυνση από την *L. monocytogenes*. Τρόφιμα, όπως τα μαλακά τυριά, τα χοτ ντογκ και θαλασσινά έχουν εμπλακεί σε αρκετές επιδημίες της ανθρώπινης λιστερίωσης. Το ιδιαίτερο με τη *L. monocytogenes* είναι ότι αναπτύσσεται ικανοποιητικά σε δυσμενείς συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία 0-5°C, χαμηλό pH και αλατότητα μέχρι 10%) και το ότι είναι ευαίσθητη σε βακτηριολυσίνες άλλων μικροοργανισμών που καταστρέφονται όμως σε τέτοιες συνθήκες [8].

1. 2. Βιολογικά χαρακτηριστικά του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram θετικό βακτήριο πλειομορφικό, ραβδοειδές με αποστρογγυλευμένα άκρα. Ανήκει στο γένους *Listeria* που περιλαμβάνει επίσης 6 άλλα είδη: *Listeria seligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria*

welshmeri, *Listeria grayi* και *Listeria murrayi* [9]. Στο μικροσκόπιο φαίνεται ως κύλινδρος μικρού μήκους διαστάσεων $1.0\text{-}2.0\mu\text{m}\times 0.5\mu\text{m}$ (Εικόνα 1.1) [10, 11]. Νεαρά κύτταρα *Listeria* εμφανίζονται είτε ως διπλόκοκκοι είτε ως κόκκοι. Το βακτήριο δεν παράγει σπόρια και δεν σχηματίζει κάψουλες. Όταν αναπτύσσεται στους $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ κινείται τρομωδώς με την βοήθεια των λίγων (1-5) βλεφαρίδων, ενώ παραμένει ακίνητο στους $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$. Η ιδιότητα αυτή ξεχωρίζει την *L. monocytogenes* από ένα άλλο στέλεχος του γένους, την *L. innocua*, η οποία σε θερμοκρασία 37°C παράγει φλαγελλίνη και κινείται [12]. Όταν καλλιεργηθεί σε στερεό θρεπτικό υλικό έχει μορφή περισσότερο κοκκοειδή και μοιάζει με στρεπτόκοκκο, ενώ όταν αναπτυχθεί σε ζωμό έχει μορφή βακτηριδίου και μοιάζει με κορυνοβακτηρίδιο [11].



Εικόνα 1.1: Εικόνες του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε a) οπτικό μικροσκόπιο μετά από χρώση Gram b) από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο c) ηλεκτρονική μικρογραφία ενός τεχνητά χρωματισμένου βακτηρίου σε ιστό [13, 14]

Η *Listeria monocytogenes* αντέχει στις κρίες θερμοκρασίες, σε αντίθεση με πολλά άλλα τροφογενή βακτήρια. Το βακτήριο αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, ξεκινώντας από -0.4°C έως 50°C [15, 16], γεγονός που την κατατάσσει στην κατηγορία των ψυχρότροφων και μεσόφιλων μικροοργανισμών. Η βέλτιστη όμως θερμοκρασία ανάπτυξης είναι $30\text{-}37^{\circ}\text{C}$ [17].

Είναι αξιοσημείωτα ανθεκτικό στο NaCl. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο με περιεκτικότητα σε NaCl μεγαλύτερη από 12% [18, 19].

Η *Listeria monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε περιοχή pH από 4,1 έως 9,6 αλλά καλύτερη ανάπτυξη εμφανίζεται μεταξύ pH 6 και 8. Γενικά, το ελάχιστο pH ανάπτυξης του βακτηρίου εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης, τη σύσταση του θρεπτικού υλικού, την ενεργότητα νερού, την οσμωτική πίεση και την παρουσία αναστολέων [3].

Για την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις βιταμίνες Β (βιοτίνη, ριβοφλαβίνη, θειαμίνη, λιποϊκό οξύ) και αμινοξέα (κυστεΐνη,

γλουταμίνη, ισολευκίνη, λευκίνη και βαλίνη). Γλυκόζη και γλουταμίνη είναι οι κύριες πηγές άνθρακα και αζώτου. Επίσης, απαραίτητα για την ανάπτυξη του *Listeria* είναι τα ιόντα: Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ και PO_4^{3-} [20, 21]. Η ανάπτυξη ευνοείται από την παρουσία ιόντων Fe^{3+} και φαινυλαλανίνη. Σε μερικά πειράματα, παρουσία ιόντων σιδήρου, τα παθογόνα στελέχη αναπτύσσονταν πιο γρήγορα από τα μη παθογόνα [6, 20].

Η *Listeria monocytogenes* είναι αερόβιο, μικροαεροφιλικό και εκλεκτικά αναερόβιο βακτήριο, παρουσιάζει θετική αντίδραση καταλάσης (έχουν παρατηρηθεί και σπάνια στελέχη με αρνητική αντίδραση καταλάσης [6]) και αρνητική αντίδραση οξειδάσης όπως όλα τα είδη του γένους *Listeria*. Ο καταβολισμός της γλυκόζης λαμβάνει χώρα μέσω της Embden – Meyerhof οδού, αερόβια και αναερόβια. Όλα τα είδη *Listeria* είναι ομοζυμωτικά (homofermentative) και οξειδώνουν τα ενδιάμεσα προϊόντα γλυκόλυσης. Η *L. monocytogenes* συσσωρεύει τη γλυκόζη μέσω δύο συστημάτων: αυτό της φωσφοενολο-πυροσταφυλικό-εξαρτώμενης φωσφομεταφοράς (PTS) και το σύστημα βαθμίδωσης πρωτονίων [22]. Άλλες βιοχημικές ιδιότητες για την ταυτοποίηση είναι οι εξής: αρνητική αντίδραση ουρεάσης, θετικό τέστ Methyl Red/Voges-Proskauer, θετικό τέστ CAMP (Christie–Atkins–Munch–Petersen). Το βακτήριο επίσης διασπά την τρεχαλόζη, την ραμνόζη, την λακτόζη, τη μαλτόζη, τη σακχαρόζη, τη σαλικίνη, την εσκουλίνη και τα ιππουρικά. Δεν διασπά τη μαννιτόλη, τη ξυλόζη, τη δουλσιτόλη, την ινδόλη και, επίσης, δεν μπορεί να υδρολύσει τη ζελατίνη, καζεΐνη ή γάλα [6, 23]

1. 3. Παθογένεια της *Listeria monocytogenes*

Οι παθογενικοί παράγοντες (ή παράγοντες μολυσματικότητας) περιλαμβάνουν όλες τις βακτηριακές ουσίες που επιτρέπουν σε έναν μικροοργανισμό να εισχωρεί στο ξενιστή, να επιβιώσει και να πολλαπλασιάζεται προκαλώντας ασθένεια ή μόλυνση. Όπως και άλλα παθογόνα, η *L. monocytogenes* διαθέτει μια ποικιλία παραγόντων μολυσματικότητας που συμβάλλουν στην παθογένειά της.

1.3.1 Η εισβολή της *Listeria monocytogenes* στα κύτταρα του ξενιστή

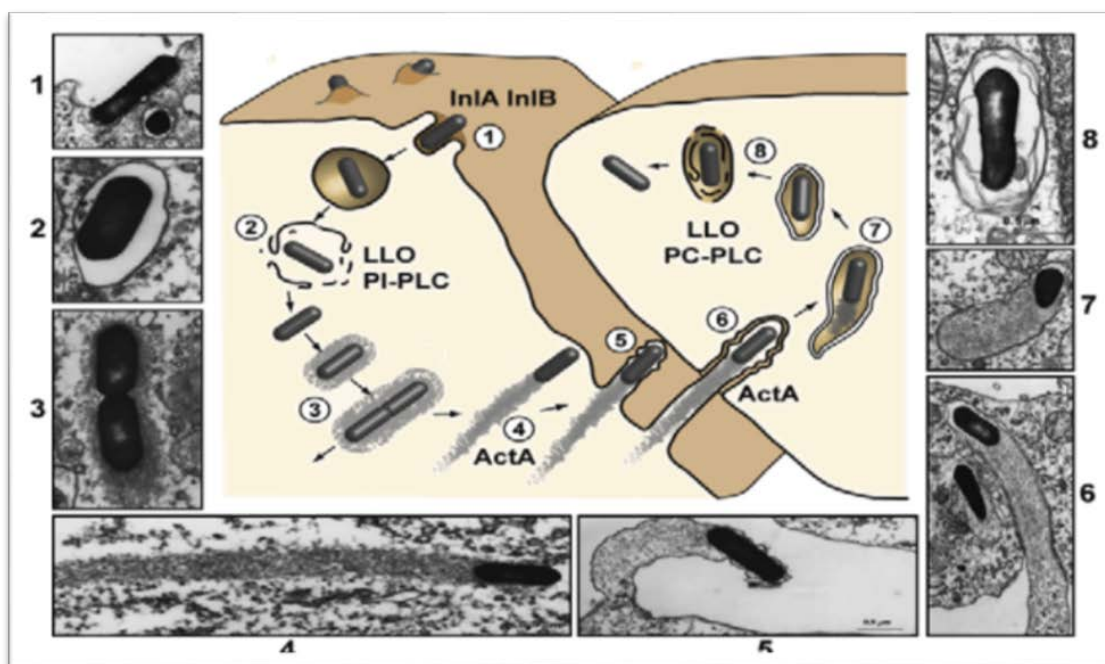
Η εισχώρηση στα κύτταρα ενός ξενιστή (Εικόνα 1.2) είναι μια στρατηγική που χρησιμοποιείται από ένα μεγάλο αριθμό παθογόνων για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Στην περίπτωση της *L. monocytogenes*, ο μηχανισμός, γνωστός και ως μηχανισμός φερμουάρ (the zipper mechanism), επάγεται απευθείας από την αλληλεπίδραση ανάμεσα σε πρωτεΐνες στην επιφάνεια του βακτηρίου και υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή [24, 25, 26]. Στην κατηγορία αυτών των

πρωτεϊνών ανήκουν η ιντερναλίνη Α (internalin, Inl A) και η ιντερναλίνη Β (Inl B) [24, 27, 28]. Η ιντερναλίνη Α προωθεί την είσοδο του βακτηρίου αντιδρώντας με τον κατάλληλο υποδοχέα στην επιφάνεια του επιθηλιακού κυττάρου που, σύμφωνα με μελέτες [29, 30] είναι το μόριο της Ε-καδερίνης. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι ειδική και βασίζεται στην φύση ενός μόνο αμινοξέος, του δεκατοεκτού, στο ώριμο πεπτίδιο της Ε-καδερίνης, που στον άνθρωπο είναι προλίνη ενώ στο ποντίκι είναι γλουταμινικό οξύ. Αυτή η διαφορά είναι αρκετή ώστε το βακτήριο να μην μπορεί να ξεπερνά το εντερικό φράγμα των ποντικών όταν μολύνονται μέσω τροφής [30]. Η ιντερναλίνη Β αλληλεπιδρά με τρεις υποδοχείς: την c-Met, ένα υποδοχέα κινάσης τυροσίνης του οποίου το μόνο γνωστό πρόσδεμα είναι ο Αυξητικός Παράγοντας Ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor, HGF) [31], την gC1q-R, μία ευρέως διαδεδομένη γλυκοπρωτεΐνη [32] και πρωτεογλυκάνες [33].

Μετά την εγκόλπωση, το βακτήριο διαφεύγει από το φαγόσωμα, πριν τη σύντηξη του φαγολυσσοσώματος. Η διαφυγή μεσολαβείται δια εκκρίσεως της λιστεριολυσίνης Ο (listeriolysin O, LLO) και δύο φωσφολιπασών C (phospholipase C, PLC) [34, 35, 36, 37]. Η λιστεριολυσίνη-Ο ανήκει στην οικογενεία των χοληστερολο-εξαρτωμένων κυτολυσίνων (cholesterol-dependent cytolysin, CDC), οι οποίες παράγονται και από άλλα Gram θετικά βακτήρια, όπως *Streptococcus pneumonia* και *Bacillus anthracis* [28, 38, 39, 40, 41, 42]. Η ικανότητα της LLO για σχηματισμό πόρων είναι βέλτιστη σε pH 5,9 (τιμή που θα μπορούσε να επιτυγχάνεται μόνο σε κενोटόπια) και η πρωτεΐνη έχει ενδοκυτταρικό χρόνο ημιζωής μικρότερο των 15min [43, 44, 45, 46]. Οι δύο PLC της *L. monocytogenes*, η φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, PI-PLC) και φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοχολίνης (Phosphatidylcholine-specific phospholipase C, PC-PLC) φαίνεται να έχουν επικαλυπτόμενες λειτουργίες στη διαφυγή από το κενोटόπιο και εξάπλωση από κύτταρο σε κύτταρο [47, 48, 49, 50, 51, 52, 53].

Κατά την αλληλεπίδραση με τα κύτταρα του ξενιστή το βακτήριο παρεμβαίνει, διαμορφώνει και ρυθμίζει τις λειτουργίες του κυττάρου-ξενιστή και αρχίζει να αναπτύσσεται και να πολλαπλασιάζεται, χρησιμοποιώντας τα θρεπτικά συστατικά του ξενιστή [54, 55]. Ταυτόχρονα ένα σύννεφο από νημάτια ακτίνης συναρμολογείται γύρω από το βακτήριο. Την έναρξη την κάνει η ActA, μία μεμβρανική πρωτεΐνη, αναγνωρισμένη ως αναγκαία για την κινητικότητα εντός ξενιστή του βακτηρίου [1, 28, 56]. Τα νημάτια ακτίνης, στη συνέχεια, αναδιοργανώνονται για να σχηματίσουν μια μακρά ουρά ακτίνης, που εκτείνεται από το ένα άκρο μόνο του βακτηρίου, μια “ουρά κομήτη”, η οποία μπορεί να είναι μέχρι 5 μm. Τα νημάτια ακτίνης στην ουρά

εμφανίζονται τυχαία προσανατολισμένα [57]. Με την μορφή αυτή, η *L. monocytogenes* μεταναστεύει προς την μεμβράνη του κυττάρου. Εκεί, πιέζοντας την μεμβράνη του πλάσματος από το εσωτερικό, επάγει τον σχηματισμό προεξοχών που κάνουν επαφή με γειτονικά κύτταρα και επιτρέπουν την εσωτερίκευση των βακτηρίων εντός του διπλανού κυττάρου. Η *Listeria monocytogenes* διαφεύγει προς το κυτταρόπλασμα μετά από διάλυση των δύο μεμβρανών, και ο κύκλος επαναλαμβάνεται [24, 57, 58].



Εικόνα 1.2: Στάδια ενδοκυτταρικής ζωής του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Στο κέντρο: σχέδιο που απεικονίζει την εισβολή, την διαφυγή από το κενोटόπιο, τον σχηματισμό πυρήνων ακτίνης, την ακτίνοβασισζόμενη κινητικότητα και την εξάπλωση από το ένα κύτταρο στο άλλο. Περιφεριακά: Ηλεκτρονικές φωτογραφίες από τις οποίες προήλθε το κεντρικό σχέδιο. Τα InlA, InlB, LLO, PLC και ActA έχουν περιγραφεί στο κείμενο [59]

Τα βακτηριακά γονίδια που κωδικοποιούν τις InlA, InlB, LLO, PLC, ActA και άλλες τρεις ακόμη πρωτεΐνες, σχηματίζουν ένα ρεγγουλόνιο υπό τον θετικό έλεγχο της πρωτεΐνης PrfA (positive regulatory factor A). Η PrfA ενσωματώνει μια σειρά από περιβαλλοντικά σήματα για να εξασφαλιστεί η σωστή χωροχρονικά και εξειδικευμένη έκφραση του ρεγγουλονίου. Η PrfA είναι μία 27 kDa πρωτεΐνη με τρισδιάστατη δομή παρόμοια με εκείνη της ρυθμιστικής Crp (cAMP receptor protein) της *Escherichia coli*, επίσης γνωστή ως Cap (catabolite gene activator protein). Η PrfA ενεργοποιεί τη μεταγραφή με σύνδεση ως διμερές σε ένα παλινδρομικό υποκινητή της κανονικής αλληλουχίας. Ενώ έχουν διευκρινιστεί αρκετά στοιχεία σχετικά με τον γενικό τρόπο δράσης της πρωτεΐνης αυτής, άλλα παραμένουν άλυτοι. Πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν πρόσθετους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην διαμόρφωση της

μολυσματικότητας της *L. monocytogenes*, συχνά μέσω διομιλίας (cross-talk) με την PrfA ή με τη ρύθμιση νέων γονιδίων [60, 61, 62].

1.3.2 Άλλοι λοιμογόνοι παράγοντες της *Listeria monocytogenes*

Η δημοσίευση της πλήρους αλληλουχίας του γονιδιώματος των τεσσάρων κλινικών στελεχών της *L. monocytogenes* και του ενός στελέχους του μη παθογόνου *L. innocua*, το 2001 και το 2003, άνοιξε τον δρόμο για σημαντικές ανακαλύψεις στην κατανόηση της βιολογίας της *L. monocytogenes*. Σύγκριση των γονιδιωμάτων αυτών οδήγησε στην ταυτοποίηση αρκετών λοιμογόνων παραγόντων της *L. monocytogenes* που δεν είναι παρόντες στο γονιδίωμα της *L. innocua* [63]. Μεταξύ των πιθανών βακτηριακών παραγόντων μολυσματικότητας, οι περιφεριακές πρωτεΐνες είναι προνομιούχοι υποψήφιοι.

Μία από αυτές, είναι η πρωτεΐνη Vip (από Virulence protein), μία περιφεριακή πρωτεΐνη αγκυροβολημένη στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω του μοτίβου LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) (όπως και η InlA) [64]. Μία σύνοδος πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ), η Grp96, που εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και την κυτταρική διακίνηση πολλών μορίων, είναι ο υποδοχέας της Vip. Η Vip εμφανίζεται έτσι ως ένας νέος παράγοντας μολυσματικότητας που εκμεταλλεύεται την Grp96 ως υποδοχέα για την κυτταρική εισβολή και/ή για τη σηματοδότηση γεγονότων που μπορούν να παρεμβαίνουν με την ανοσοαπόκριση του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης [65].

Αρκετές αυτολυσίνες της *L. monocytogenes*, όπως Ami και Auto, εμπλέκονται επίσης στην μολυσματικότητα. Οι βακτηριακές αυτολυσίνες διασπούν την πεπτιδογλυκάνη του κυτταρικού τοιχώματος και ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη, την κυτταρική διαίρεση, την ωρίμανση της πεπτιδογλυκάνης, την έκκριση πρωτεϊνών και την παθογένεια.

Η αυτολυσίνη Ami είναι μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 917 αμινοξέα, η οποία αγκυροβολεί στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα μέσω των οκτώ GW μονάδων της καρβοξυ-τελικής περιοχής της. Η Ami χωνεύει τα κυτταρικά τοιχώματα της *L. monocytogenes* και μεσολαβεί στην προσκόλληση στα κύτταρα θηλαστικών [66].

Η Auto είναι μία άλλη GW-αγκυρωμένη αυτολυσίνη που απουσιάζει από το γονιδίωμα της *L. innocua*. Αδρανοποίηση του γονιδίου auto που την εκφράζει, έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη είσχωρησή της *L. monocytogenes* στα κύτταρα-ξενιστές αλλά, η έκφραση της Auto σε *L. innocua* δεν της παρείχε αυτή την ικανότητα. Η Auto προωθεί την προσκόλληση αντί της διείσδυσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να

δραστηριοποιείται στη μεμβρανική αρχιτεκτονική που απαιτείται για τη προσκόλληση [67].

Η επιβίωση του βακτηρίου εντός του φαγολυσσοσώματος γίνεται επίσης και λόγω ικανότητάς του να παράγει καταλάση και δισμουτάση υπεροξειδίου που εξουδετερώνουν την επιδράση της φαγοκυτταρικής οξειδωτικής έκρηξης [68, 69, 70].

Ικανότητα δέσμευσης σιδήρου, απαραίτητου για την ζωή όλων των μικροοργανισμών, είναι ένας σημαντικός μολυσματικός παράγοντας της *L. monocytogenes* [17]. In vitro, ο σίδηρος ενισχύει την ανάπτυξη του οργανισμού και σε ζωικά μοντέλα λιστεριακής λοίμωξης, η υπερφόρτωση με σίδηρο σχετίζεται με αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις [71]. Οι κλινικές συσχετίσεις των σποραδικών περιπτώσεων λιστεριακής λοίμωξης με αιμοχρωμάτωση και των επιδημιών με την αιμοκάθαρση μαρτυρούν τη σπουδαιότητα της απόκτησης του σιδήρου ως μολυσματικού παράγοντα της *L. monocytogenes* σε ανθρώπους [1, 72].

1. 4. Η νόσος και επιδημιολογία της λιστερίωσης

Με τον όρο λιστερίωση αποδίδονται συνολικά οι μολύνσεις που προκαλούνται από τα είδη *Listeria*. Οι περισσότερες περιπτώσεις της ανθρώπινης λιστερίωσης είναι σποραδικές και, ενώ η πηγή και η οδός μόλυνσης στις περισσότερες περιπτώσεις παραμένουν άγνωστοι, η τροφιμογενής μετάδοση φαίνεται να είναι αρκετά κοινή. Η μολυσματική δόση της *L. monocytogenes* θεωρείται μεταξύ 10^6 και 10^9 cfu (από πειράματα σε ποντίκια) αλλά η ελάχιστη δόση που απαιτείται για να προκαλέσει κλινική μόλυνση στον άνθρωπο δεν έχει καθοριστεί. Οι μεγάλοι αριθμοί κυττάρων *L. monocytogenes* που βρέθηκαν στα τρόφιμα υπεύθυνα για την επιδημία και τις σποραδικές περιπτώσεις λιστερίωσης (συνήθως 10^6 cfu) υποδηλώνουν ότι είναι υψηλή, αλλά εξαρτάται πάρα πολύ από τη φύση του τροφίμου και την ευαισθησία των μολυσμένων ατόμων [73, 74, 75, 76]. Ορισμένες ομάδες ανθρώπων είναι πιο ευαίσθητες. Αυτές περιλαμβάνουν τα βρέφη, τους ηλικιωμένους, τα ανοσοκατασταλμένα άτομα από φάρμακα (π.χ. κορτικοστεροειδή, κυτταροτοξικά φάρμακα) ή ασθένεια (το AIDS, αιματολογικές κακοήθειες, όπως η λευχαιμία, το λέμφωμα και το μυέλωμα, καθώς και συμπαγείς κακοήθειες) και οι έγκυες γυναίκες [77].

1.4.1 Προέλευση μολύνσεων

Ευρέως διαδεδομένα στο φυσικό περιβάλλον, τα είδη *Listeria* μπορούν να βρεθούν στο έδαφος, στα φυτά, στις σε αποσύνθεση φυτικές ουσίες και στα νερά. Τα είδη *Listeria* είναι επίσης κοινά κτηνιατρικά παθογόνα, που συνδέονται με την άμβλωση

και την εγκεφαλίτιδα σε πρόβατα και βοοειδή [4]. Μέχρι περίπου το 1960, η *L. monocytogenes* θεωρήθηκε ότι σχετίζονται σχεδόν αποκλειστικά με λοιμώξεις σε ζώα, και λιγότερο συχνά σε ανθρώπους. Ωστόσο, κατά τα επόμενα έτη, τα είδη *Listeria*, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων ειδών *L. monocytogenes* και *L. ivanovii*, άρχισαν να απομονώνονται από μια ποικιλία πηγών. Εκτός από τον άνθρωπο, τουλάχιστον 42 είδη άγριων και κατοικίδιων θηλαστικών και 17 είδη πτηνών μπορεί να φιλοξενούν τα είδη *Listeria*. 5-10% του ανθρώπινου πληθυσμού μεταφέρει την *L. monocytogenes* στον εντερικό σωλήνα του, χωρίς εμφανή συμπτώματα της νόσου [13]. Άτομα ασχολούμενα με κτηνοτροφικές εργασίες και με παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων έχουν συνήθως αντισώματα στο αίμα τους για λιστέρειες. Τα είδη *Listeria* έχουν επίσης απομονωθεί από καρκινοειδή, ψάρια, τα στρείδια, τα τσιμπούρια και τις μύγες [4, 13].

Αρκετά δεδομένα υπάρχουν για την επικράτηση της *L. monocytogenes* σε διάφορα περιβάλλοντα, ωστόσο λείπει μια καλή κατανόηση της δυναμικής μετάδοσης της *L. monocytogenes*. Αν και η *L. monocytogenes* διανέμεται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον και οι άνθρωποι και τα ζώα έρχονται συχνά σε επαφή με το βακτήριο διαμέσου διαφόρων πηγών, τα τρόφιμα και οι ζωϊκές τροφές, αντίστοιχα, φαίνεται να είναι οι πιο κοινές πηγές μόλυνσης.

Τα τρόφιμα είναι η σημαντικότερη πηγή μόλυνσης για τον άνθρωπο. Το βακτήριο μολύνει μια ευρεία γκάμα τροφίμων όπως: ακατέργαστο γάλα, μαλακά τυριά, φρέσκο και κατεψυγμένο κρέας, πουλερικά, θαλασσινά, φρούτα, λαχανικά και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Ready To Eat foods, RTE) [17]. Από τις 28 μαζικές περιπτώσεις λιστερίωσης τα τελευταία 20 χρόνια, οι 15 συνδέονται με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (Υποκεφ. 1.4.3) [4].

1.4.2 Συμπτώματα, διάγνωση και θεραπεία της ανθρώπινης λιστερίωσης

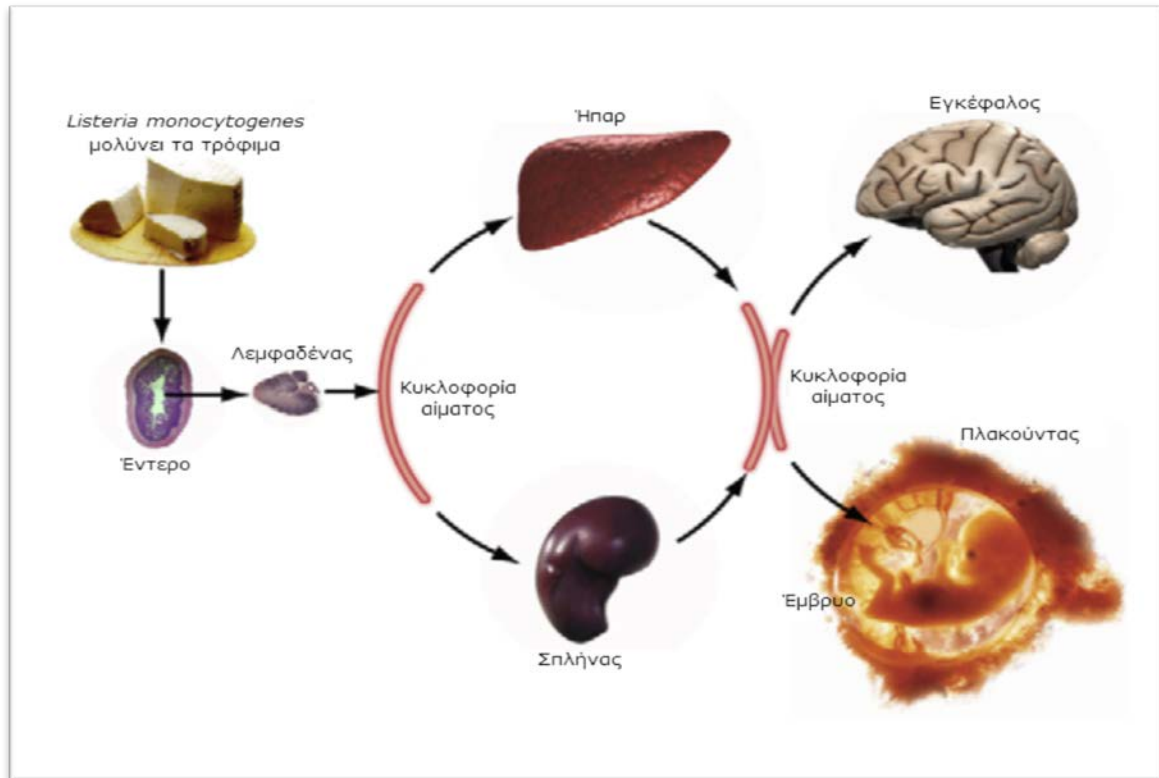
Τα κλινικά χαρακτηριστικά της λιστερίωσης ποικίλουν ευρέως και συχνά συγχέονται με εκείνες των άλλων ασθενειών. Οι διάφορες κλινικές εκδηλώσεις της λιστερίωσης μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: επιδρομική (invasive) λιστερίωση και μη επιδρομική λιστερίωση. Μη επιδρομική λιστερίωση (που αναφέρεται ως εμπύρετη λιστερική γαστρεντερίτιδα) έχει παρατηρηθεί κυρίως κατά τις επιδημίες (outbreaks), σε υγιή άτομα, όπου η πλειονότητα των περιπτώσεων ανέπτυξε συμπτώματα γαστρεντερίτιδας, όπως διάρροια, πυρετό, κεφαλαλγία και μυαλγία, μετά από μία σύντομη περίοδο επώασεως [1].

Επιδρομική λιστερίωση ή απλά λιστερίωση, είναι οι περιπτώσεις που αρχικές λοιμώξεις του εντερικού ιστού με *L. monocytogenes* οδηγούν στην εισβολή των κατά τα άλλα αποστειρωμένων περιοχών του σώματος όπως είναι το αίμα, το κεντρικό νευρικό σύστημα και η έγκυος μήτρα. Θεωρείται γενικά ότι τα βακτήρια μετά τη διέλευση του εντερικού φραγμού φθάνουν μέσω της λέμφου και του αίματος, στο ήπαρ (στο οποίο αναπαράγονται στα ηπατοκύτταρα) καθώς επίσης και στον σπλήνα. Στη συνέχεια, τα βακτήρια μέσω αιματογενούς διασποράς μπορεί να φτάσουν στον εγκέφαλο και τον πλακούντα (Εικόνα 1.3) [78, 79]. Η ασθένεια επομένως οφείλεται στην πρωτότυπη ιδιότητα της *L. monocytogenes* να διασχίζει τρία εμπόδια του ξενιστή: το εντερικό φραγμό, το αίματοεγκεφαλικό φραγμό και το φράγμα του πλακούντα. Επιδημιολογικά δεδομένα δείχνουν ότι η λιστερίωση μπορεί να έχει εξαιρετικά μεταβλητή περίοδο επώασης (από 1 έως και >90 ημερών).

Η επιδρομική λιστερίωση διακρίνεται σε [1]:

- Λιστερίωση νεογνών, που εκδηλώνεται κυρίως με μηνιγγίτιδα και σηψαιμία. Η μόλυνση του νεογνού μπορεί να είναι ενδομήτρια από κατάποση αμνιακού υγρού, αλλά μπορεί να έγινε και κατά τον τοκετό από τον κόλπο της μητέρας. Πάντως δεν πρόκειται για ενδονοσοκομειακή μόλυνση. Στη νεογνική λιστερίωση η *L. monocytogenes* συνήθως απομονώνεται από το αίμα.
- Λιστερίωση εγκύων γυναικών, που εμφανίζεται ως ελαφριά εμπύρετη νόσος με διάρροια στην έναρξή της, που μοιάζει με γρίπη. Το έμβρυο μολύνεται, νοσεί με αποτέλεσμα την αποβολή του κατά τους πρώτους μήνες της εγκυμοσύνης. Άλλη έκβαση είναι η γέννηση νεκρού παιδιού και η ελαφρότερη ο πρόωρος τοκετός.
- Βακτηραιμία χωρίς εμφανή εστίαση είναι η πιο κοινή εκδήλωση της λιστερίωσης μετά τη νεογνική περίοδο. Κλινικές εκδηλώσεις τυπικά περιλαμβάνουν πυρετό και μυαλγίες και μια πρόδρομη ασθένεια με ναυτία και διάρροια. Παροδική βακτηραιμία σε υγιή άτομα, μπορεί να παραμένει αδιάγνωστη. Η λιστεριακή βακτηραιμία μπορεί να οδηγήσει σε ηπατίτιδα και ηπατικό απόστημα, χολοκυστίτιδα, περιτονίτιδα, σπληνικό απόστημα, πνευμονική λοίμωξη, αρθρική λοίμωξη, οστεομυελίτιδα, περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, αρτηρίτιδα και ενδοφθαλμίτιδα .
- Λιστερίωση του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) που εμφανίζεται στους ενήλικες, κυρίως ως μηνιγγίτιδα, ρομβοεγκεφαλίτιδα και απόστημα του εγκεφάλου. Η *L. monocytogenes* έχει τροπισμό για τον ίδιο τον εγκέφαλο (ιδίως το εγκεφαλικό στέλεχος), καθώς και για τους μύηγγες.
- Ενδοκαρδίτιδα. Λιστεριακή ενδοκαρδίτιδα υπολογίζεται στο 7.5% των λιστεριακών λοιμώξεων σε ενήλικες και συνδέεται με ένα υψηλό ποσοστό των σηπτικών επιπλοκών

και έχει ένα ποσοστό θνησιμότητας 48%. Λιστεριακή ενδοκαρδίτιδα (αλλά όχι βακτηριαιμία καθαυτή) μπορεί να είναι ένας δείκτης της υποκείμενης παθολογίας γαστρεντερικού σωλήνα, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Περιπτώσεις παιδιών με λιστεριακή ενδοκαρδίτιδα δεν έχουν αναφερθεί.



Εικόνα 1.3: Διαδοχικά στάδια της ανθρώπινης λιστερίωσης [78]

Η διάγνωση της νόσου βασίζεται στην απομόνωση του μικροοργανισμού από το αίμα, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και το αμνιακό υγρό, τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν περιέχουν μικρόβια. Οι ορολογικές διαγνώσεις λιστερίωσης, μετρώντας επίπεδα αντισωμάτων της λιστεριολυσίνης O, μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες στον εντοπισμό μολυσμένων ατόμων με την μη επιδρομική νόσο (ασυμπτωματική μόλυνση, γαστρεντερίτιδα) κατά τη διάρκεια τροφιμογενών επιδημιών [1]

Αν και σε μερικές περιπτώσεις έχουμε ίαση χωρίς κάποια θεραπεία, η έγκαιρη αντιβιοτική θεραπεία κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να αποφευχθούν μόνιμες βλάβες ή ένας πιθανός θάνατος. Η *Listeria monocytogenes* σε καλλιέργειες *in vitro* είναι πολύ ευαίσθητη σε αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη, η αμπικιλίνη, η τετρακυκλίνη, η ερυθρομυκίνη και η χλωραμφαινικόλη [17]. Για τη θεραπεία των λιστερίσεων απαραίτητη είναι η διεισδυτικότητα του/των αντιβιοτικών μέσα στα κύτταρα όπου βρίσκεται η *L. monocytogenes* και η μικροβιοκτόνος δράση αυτών.

Αμπικικλλίνη θεωρείται γενικά ο προτιμώμενος παράγοντας για τη θεραπεία της λιστερίωσης. Βάσει της συνέργειας που παρατηρήθηκε *in vitro* και σε ζωικά μοντέλα, οι περισσότερες αρχές προτείνουν τον συνδυασμό αμπικικλλίνης και γενταμυκίνης για τη θεραπεία της λιστεριακής βακτηριαιμίας σε ασθενείς με σοβαρά εξασθενημένη λειτουργία των T-κυττάρων και σε όλες τις περιπτώσεις λιστεριακής μηνιγγίτιδας και ενδοκαρδίτιδας. Για τους ασθενείς με δυσανεξία των πενικιλλινών, η τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη (trimethoprim-sulfamethoxazole) πιστεύεται ότι είναι η καλύτερη εναλλακτική λύση. Σε μια προκαταρκτική μελέτη των ασθενών με σοβαρή λιστεριακή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, ο συνδυασμός της τριμεθοπρίμης-σουλφαμεθοξαζόλης με την αμπικικλλίνη συνδέθηκε με ένα πολύ χαμηλότερο ποσοστό αποτυχίας της θεραπείας και με λιγότερα νευρολογικά επακόλουθα από ό, τι ήταν ο συνδυασμός αμπικικλλίνης με ένα αμινογλυκοσίδη [1]

1.4.3 Επιδημιολογία της λιστερίωσης

Είναι κάτι περισσότερο από ιστορικό ενδιαφέρον ότι, σύμφωνα με μια σειρά από αναφορές περιστατικών από παθολόγους, που χρονολογούνται από τον Hayem το 1891, Kantschewa το 1923, Fraenkel το 1924 και άλλους στη Γερμανία, η λιστερίωση πρέπει να παρατηρήθηκε πριν με διαφορετικά ονόματα, όπως ψευδοφυματίωση (pseudotuberculosis) και νεογνική σηψαιμία (neonatal septicemia) [80]. Η πρώτη απομόνωση *L. monocytogenes* έγινε το 1924, ενώ το 1929 απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον άνθρωπο. Στη 25ετία που ακολούθησε την απομόνωση, αναφέρθηκε μικρός αριθμός περιπτώσεων λιστερίωσης. Έτσι ο αριθμός τους μέχρι το 1950 ήταν 70, ενώ το 1980 έφθανε τις 10.000 περιπτώσεις. Μεταγενέστερα (1987-1989) αναφέρθηκαν συχνότητες που κυμαίνονταν από 5 έως 70 περιπτώσεις ανά 100.000 και ανά έτος [81]. Στις ΗΠΑ αναφέρθηκαν 255 περιπτώσεις για ένα διάστημα τριών χρόνων, από το 1967 στο 1969, με ποσοστό θνησιμότητας γύρω στο 28,2% [82]. Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση από τα διαθέσιμα επιδημιολογικά δεδομένα είναι ότι η πλειοψηφία των ανθρώπινων κρουσμάτων σχετίζονται κυρίως με μόνο 3 ορότυπους (serotype) της *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b και 4b), μολονότι είναι γνωστό ότι υπάρχουν 13 ορότυποι ικανοί για ανθρώπινη μόλυνση [83, 84]. Επίσης τα επιδημιολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι ορισμένα τρόφιμα έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να σχετίζονται με την λιστερίωση (Πίνακας 1.1).

Το ενδιαφέρον πάνω στην εμφάνιση της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα κλιμακώθηκε πολύ κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 και συνεχίστηκε στη δεκαετία του 1990, όπου σημειώθηκε σημαντική αύξηση των περιπτώσεων λιστερίωσης

με την εκδήλωση τροφολοιμώξεων και σποραδικών κρουσμάτων [21]. Σύμφωνα με στατιστικές των Κέντρων Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Centers for Disease Control and Prevention, CDC), περίπου 1.600 ασθένειες και 260 θάνατοι που οφείλονται σε λιστερίωση, συμβαίνουν κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες [85]. Το CDC εκτίμησε επίσης ότι για το 2009-2011, η συχνότητα εμφάνισης λιστερίωσης στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν 0,29 λοιμώξεις ανά 100.000 πληθυσμού. Το 2011 υπήρχε η μεγαλύτερη επιδημία λιστερίωσης στις ΗΠΑ, που συνδέθηκε με ολόκληρα πεπόνια από ένα μοναδικό αγρόκτημα και είχε ως αποτέλεσμα 147 νόσους, 143 νοσηλείες, 33 θανάτους και μία αποβολή [86]. Ένα δεύτερο ξέσπασμα λιστερίωσης το 2011 συνδέθηκε με τυριά που παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα και από τον ίδιο τον κατασκευαστή. Επιπλέον, ερευνήθηκαν περιπτώσεις που σχετίζονται με την κατανάλωση του μπλε τυριού (από μη παστεριωμένο γάλα) [87].

Η λιστερίωση αναφέρεται κυρίως στις βιομηχανικές χώρες και τα δεδομένα από την Αφρική, την Ασία και τη Νότια Αμερική είναι λιγοστά. Η ελλιπής διάγνωση και επιτήρηση της λιστερίωσης, ή ο ελλιπής έλεγχος στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, η υψηλή συχνότητα εμφάνισης άλλων παθογόνων και παθολογιών, διαφορετικά πρότυπα κατανάλωσης και διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, ή και διαφορετικές ευαισθησίες προς το βακτήριο, είναι οι πιθανοί λόγοι για τα λιγοστά δεδομένα σε αυτές τις ηπείρους [88]. Στην Ευρώπη, η συχνότητα εμφάνισης της λιστερίωσης το 2008 ήταν τρεις περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκους. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η αύξηση του ποσοστού της λιστερίωσης έχει αναφερθεί σε χώρες όπως Εσθονία, Γερμανία, Ιρλανδία, Ιταλία, Λετονία, Λιθουανία, Κάτω Χώρες, Πολωνία, Ισπανία, Σουηδία και το Ηνωμένο Βασίλειο [88].

Στην Ελλάδα, μετά από τις πρώτες απομονώσεις της *L. monocytogenes* το 1967 και 1969 και κάποιες αναφορές από αιμοκαλλιέργειες το 1975, αναφέρθηκαν 5 περιπτώσεις λιστερίωσης στη δεκαετία του 1980 και 17 μέχρι το 1998. Η επιτήρηση της λιστερίωσης μέσω του συστήματος υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων ξεκίνησε το 2004. Συνολικά, το διάστημα 2004-2012 δηλώθηκαν στην Ελλάδα 64 κρούσματα λιστερίωσης από τα οποία 11 κατέληξαν σε θάνατο [81, 89]. Στο σύνολο των δηλωθέντων κρουσμάτων, τα 34 (53,1%) αφορούσαν ανοσοκατεσταλμένα άτομα, ενώ ένα αφορούσε πρόωρο νεογνό. Η αύξηση των περιπτώσεων λιστερίωσης που παρατηρήθηκε στην Ελλάδα οφείλεται αφενός στην αλλαγή των διατροφικών συνθηκών του πληθυσμού, που καταναλώνει μεγαλύτερες ποσότητες έτοιμων ή προπαρασκευασμένων τροφίμων τα οποία διατηρούνται στο ψυγείο για μεγάλο χρονικό

διάστημα, και αφετέρου στη μεγαλύτερη εμπειρία των κλινικών και εργαστηριακών γιατρών στη διάγνωση των λιστεριώσεων και στην απομόνωση του βακτηρίου [81].

Πίνακας 1.1: Μερικές επιδημίες λιστερίωσης των τελευταίων 2 δεκαετιών. Σε παρενθέσεις δίνεται ο αριθμός θανάτων.

Χρον ολογία	Τοποθεσία	Αριθμός Κρουσμάτων (Θάνατοι)	Εμπλεκόμενα τρόφιμα
2014	Ηνωμένες Πολιτείες	8 (1)	Φρέσκο τυρόπηγμα (Caujada en Terron): Roos Foods Dairy Products
2013	Ηνωμένες Πολιτείες	6 (1)	Τυρί: Crave Brothers Farmstead Cheese Company
2012	Ηνωμένες Πολιτείες	20 (4)	Τυρί: Εισαγόμενη Μάρκα Frescolina Marte Ricotta Salata
2011	Ηνωμένες Πολιτείες	147 (33)	Πεπόνια
2010	Ηνωμένες Πολιτείες	7 (4)	Σέλινο
2009 - 2010	Πορτογαλία	19 (6)	Άγνωστο
2009 - 2010	Γερμανία, Αυστρία	12 (7)	Τυρί Quargel' πηγμένο με οξίνιση (Acid curd cheese)
2009	Χηλή	3 (3)	Σκευάσματα κρέατος
2008	Καναδάς	57 (23)	Αλλαντικά: Maple Leaf Foods
2008	Καναδάς	23 (1)	Μαλακό τυρί
2008	Χηλή	119 (5)	Τυρί
2007	Μασαχουσέτη, ΗΠΑ	5 (3)	Γάλα
2006	Τσεχία	78 (13)	Μαλακό τυρί
2005	Ελβετία	10 (3)	Τυρί Tomme
2003	Τέξας, ΗΠΑ	12 (δ.α)	Τυρί μεξικάνικου τύπου
2003	Ηνωμένο Βασίλειο	14 (δ.α)	Σάντουιτς
2002	Κεμπέκ, Καναδάς	17 (0)	Τυρί από νωπό γάλα
2002	Ηνωμένες Πολιτείες	54 (8)	Ντελικατέσεν γαλοπούλας, τρόφιμα RTE
2000	Βόρεια Καρολίνα, ΗΠΑ	13 (5)	Σπιτικό (home-made) τυρί μεξικάνικου τύπου
2000	Ηνωμένες Πολιτείες	30 (7)	Ντελικατέσεν γαλοπούλας, τρόφιμα RTE
1999 - 2000	Γαλλία	32 (10)	Χοιρινές γλωσσες σε ζελατίνη (aspic)
1999 - 2000	Γαλλία	10	Rillettes (χοιρινό προϊόν)
1999	Φινλανδία	25 (6)	Βούτυρο
1998 - 1999	Ηνωμένες Πολιτείες	101 (21)	Χοτ-ντογκ, αλλαντικά
1997	Ιταλία	292	Καλαμπόκι (κονσερβοποιημένο)
1997	Σουηδία	9	Πέστροφα (Rainbow trout)
1995	Ελβετία	57	Μαλακό τυρί
1994	Ιλλινόις, ΗΠΑ	4	Σοκολατούχο γάλα

δ.α. – δεν αναφερθηκαν

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΤΗΣ *LISTERIA MONOCYTOGENES*. ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΔΥΣΜΕΝΕΙΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

2.1. Εισαγωγή στις βιολογικές μεμβράνες.

Με τον όρο βιολογικές μεμβράνες αναφερόμαστε σε όλες τις μεμβράνες των κυττάρων, προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών, ζωικών και φυτικών. Οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες διαχωρίζουν τα κύτταρα από το εξωτερικό περιβάλλον, εμπεριέχοντας το κυτταρόπλασμα και τα κυτταρικά οργάνδια. Οι δύο κύριες κατηγορίες των βακτηρίων, τα Gram θετικά και τα Gram αρνητικά διαφέρουν ως προς τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και τις μεμβράνες τους. Το κυτταρικό τοίχωμα ενός Gram αρνητικού βακτηρίου αποτελείται από μία εξωτερική και μια εσωτερική μεμβράνη, οι οποίες περικλείουν μια περιοχή γνωστή ως το περιπλασματικό χώρο και έχει πολύ σημαντικές λειτουργίες στην επιβίωση και τη λειτουργία του κυττάρου. Ενώ η οργάνωση κυτταρικού τοιχώματος των Gram θετικών βακτηρίων είναι πιο απλή και αποτελείται από ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης και μιας ενιαίας μεμβράνης.

Η κύρια λειτουργία των μεμβρανών είναι να ρυθμίζουν την μεταφορά των ουσιών που εισέρχονται ή εξέρχονται από τα κύτταρα και καταλύουν αντιδράσεις ανταλλαγής, διαδραματίζοντας το ρόλο της αντλίας. Επίσης παίζουν ρόλο στην μεταγωγή ενέργειας και στην διατήρηση βαθμίδωσης ιοντικών συγκεντρώσεων για να διατηρηθεί ένα σταθερό ενδοκυτταρικό περιβάλλον [90, 91].

Η λιπιδική διπλοστοιβάδα σχηματίζει το πλαίσιο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Τα κύρια λιπιδικά συστατικά αυτής της διπλοστοιβάδας είναι τα πολικά φωσφολιπίδια. Άλλα πολικά λιπίδια όπως σφιγγολιπίδια και γλυκολιπίδια καθώς και ουδέτερα λιπίδια όπως οι στερόλες μπορεί να συμβάλλουν στην δομή της βακτηριακής μεμβράνης. Ιόντα (π.χ. Na^+ , K^+), νερό, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες βρίσκονται, επίσης, στο πλαίσιο της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Η πιο ευρέως αποδεκτή δομή για την μεμβράνη είναι μια τροποποιημένη έκδοση του ρευστού μωσαϊκού μοντέλου των Singer & Nicolson. Το μοντέλο προβλέπει ότι οι πρωτεΐνες της μεμβράνης είναι διασκορπισμένες, σε χαμηλή συγκέντρωση και ότι ταιριάζουν με την υδρόφοβη φάση μίας αδιατάρακτης ομοιογενούς λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Τα λιπίδια θεωρούνται ως μια θάλασσα στην οποία επιπλέουν κυρίως μονομερείς πρωτεΐνες και οι επιφάνειες της διπλοστοιβάδας εκτίθεται άμεσα σε υδατικό περιβάλλον [92, 93].

Ωστόσο, σε αντίθεση με την υποτιθέμενη ομοιογένεια, είναι προφανές ότι κυτταρικές μεμβράνες πρέπει να είναι μερικώς πολωμένες, ώστε να παράγουν συγκεκριμένα περιβάλλοντα για ορισμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Μελέτες με χρώση και η ανάπτυξη ειδικών ανιχνευτών για λιπιδικά μόρια έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη των λιπιδικών τομέων (lipid domains) σε βακτηριακές μεμβράνες, δηλαδή, των περιοχών της μεμβράνης που διαφέρουν ως προς την σύνθεση λιπιδίων. Η άποψη της μεμβράνης ως συνονθυλεύματος (patchwork), αντικαθιστά την υπόθεση της λιπιδικής ομοιογένειας στο μοντέλο ρευστού μωσαϊκού των Singer και Nicolson και οδήγησε σε περαιτέρω μελέτες για τη σημασία αυτής της ετερογένειας στην φυσιολογική λειτουργία της μεμβράνης [93]. Η έρευνα για τον τρόπο σχηματισμού αυτών των λιπιδικών τομέων είναι ένα σχετικά νέο πεδίο, που όμως έχει ήδη δώσει σημαντικές πληροφορίες για το πως οι πρωτεΐνες αναγνωρίζουν αυτές τις ειδικές τοπολογίες. Οι λιπιδικοί τομείς και τα διάφορα φυσικά χαρακτηριστικά της μεμβράνης έχουν μελετηθεί κυρίως σε δύο πρότυπους οργανισμούς τα *Escherichia coli* και *Bacillus subtilis*. Οι μελέτες αυτές έχουν αποδείξει σαφώς ότι αυτά τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης είναι ζωτικής σημασίας για πολλές σημαντικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής διαίρεσης, μεταγωγή σήματος, σπορίωση, σχηματισμό βιομεμβράνης, την έκκριση και τον σχηματισμό του κυτταροσκελετού [94].

Η ρευστότητα είναι μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, η οποία επιτρέπει τη διατήρηση της ομοιόστασης του κυττάρου. Πολλές από τις διεργασίες της μεμβράνης, όπως είναι η μεταφορά ουσιών και η μεταγωγή σήματος, εξαρτώνται από τη ρευστότητα των μεμβρανικών λιπιδίων, που με τη σειρά της εξαρτάται από τις ιδιότητες των αλυσίδων των λιπαρών οξέων. Οι πιο σημαντικές παράμετροι που σχετίζονται με τη ρευστότητα είναι οι μεταπτώσεις από την υγρή κρυσταλλική φάση στη φάση πηκτής. Υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες, η πλειονότητα των φωσfolιπιδίων που σχηματίζουν τη διπλοστιβάδα της βακτηριακής μεμβράνης είναι σε μια υγρή κρυσταλλική κατάσταση. Η μετάπτωση από τη δύσκαμπτη στη ρευστή κατάσταση συμβαίνει όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει τη θερμοκρασία τήξης [95]. Αυτή η θερμοκρασία εξαρτάται από: i) το μήκος των αλυσίδων των λιπαρών οξέων: όσο μικρότερες είναι οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες, τόσο μικρότερη είναι και η τάση να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, οπότε αυξάνεται η ρευστότητα της διπλοστιβάδας, ii) το βαθμό κορεσμού τους: κάθε διπλός δεσμός, σε μια ακόρεστη αλυσίδα, δημιουργεί μια μικρή κάμψη που δυσχεραίνει το πακετάρισμα των αλυσίδων με αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και iii) τον αριθμό των διακλαδώσεων: ύπαρξη διακλαδώσεων στις λιπαρές αλυσίδες παρεμποδίζει την αλληλεπίδρασή τους και έτσι αυξάνεται η

ρευστότητα της διπλοστιβάδας. Στα βακτήρια το μήκος, ο βαθμός κορεσμού καθώς και ο αριθμός των διακλαδώσεων των υδρογονανθρακικών αλυσίδων μεταβάλλονται συνεχώς, με σκοπό τη διατήρηση της ρευστότητας της μεμβράνης στις μεταβολές της θερμοκρασίας [96].

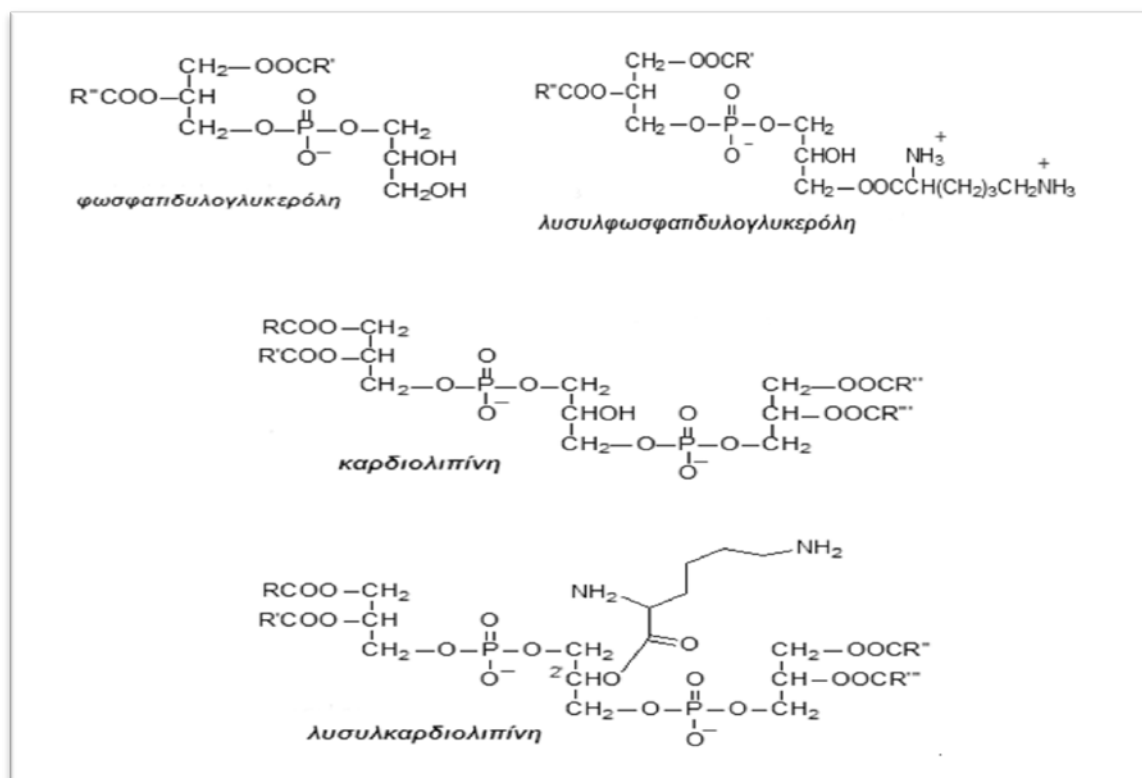
2.2. Λιπιδική σύσταση της μεμβράνης της *Listeria monocytogenes*

Τα κύρια λιπιδικά συστατικά της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου *L. monocytogenes* είναι τα φωσφολιπίδια μολονότι άλλα πολικά λιπίδια και τα ουδέτερα λιπίδια είναι επίσης παρόντα. Τα πολικά λιπίδια ανέρχονται στο 64% του συνόλου των λιπιδίων και από αυτά το 85% είναι φωσφολιπίδια [97, 98]. Ως κύρια φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης της *L. monocytogenes* έχουν ταυτοποιηθεί η φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) και η διφωσφατιδυλογλυκερόλη (DPG), αλλιώς καρδιολιπίνη (CL), και τα λυσυλο-παράγωγα τους η λυσυλοφωσφατιδυλο-γλυκερόλη (LPG) και λυσυλοκαρδιολιπίνη (LCL) (Εικόνα 2.1) [99, 100]. Το γεγονός ότι τα L-λυσυλοφωσφολιπίδια δεν είχαν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες οφείλεται στο γεγονός ότι είναι ενώσεις ευαίσθητες στην μεταβολή του pH και υδρολύονται όταν το pH μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της εκχυλίσεως. Κατά το τέλος της λογαριθμικής φάσης τα σχετικά ποσοστά της καρδιολιπίνης και της L-λυσυλοκαρδιολιπίνης αυξάνονται φτάνοντας το 47-78% του συνολικού λιπιδικού φωσφόρου με μια αναλογία L-λυσυλοκαρδιολιπίνη / καρδιολιπίνη 0,25-1,6 [99]. Τα γλυκολιπίδια της *L. monocytogenes* δεν έχουν χαρακτηριστεί εκτενώς, αλλά η διγλυκοζυλο-διακυλογλυκερόλη (DGDG) και ένα sn-γλυκερο-1-φωσφογλυκολιπίδιο έχουν περιγραφεί ως λιπιδικές άγκυρες του αντίστοιχου λιποτειχοϊκού οξέος (LTA). Δομικά, αυτά είναι τα χαμηλότερα ομόλογα του αντίστοιχου LTA και πιστεύεται ότι είναι και τα πρώτα ενδιάμεσα στην βιοσύνθεση του LTA [99, 101].

Τα ουδέτερα λιπίδια της *L. monocytogenes* αποτελούνται κυρίως από κηρούς, διακυλο-γλυκερόλες και ελεύθερα λιπαρά οξέα [16, 97]. Τα είδη της *Listeria* περιέχουν και μενακινόνες, κοινώς βιταμίνη K2 (τερπενοειδή λιπίδια που παίζουν ρόλο στη μεταφορά ηλεκτρονίων, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και πιθανόν στην ενεργή μεταφορά). Η *Listeria monocytogenes* παράγει μενακινόνες με επτά μονάδες ισοπρενίου (MK-7) και σε μικρότερες αναλογίες MK-5 και MK-6 [102].

Τα λιπαρά οξέα (fatty acids, FA) είναι σημαντικά δομικά στοιχεία του κυτταρικού υλικού. Σε βακτηριακά κύτταρα, τα λιπαρά οξέα εμφανίζονται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες ως τα ακυλο-συστατικά των φωσφολιπιδίων. Τα διακλαδωμένα iso- και anteiso-λιπαρά οξέα (branched chain fatty acids, BCFA) είναι κοινά ελάχιστα

συστατικά των λιπιδίων πολλών χερσαίων ζώων αλλά σε ορισμένα βακτήρια όπως *L. monocytogenes* βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα. Τα λιπίδια της *L. monocytogenes* χαρακτηρίζονται από ένα ασυνήθιστο ποσοστό των BCFA (85%), κυρίως anteiso-C15:0 (a-C15:0) και anteiso-C17:0 (a-C17:0) (Εικόνα 2.2) [97, 98, 102]. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι anteiso-C15:0 και anteiso-C17:0 συνδέονται στην θέση sn-1 και sn-2 του σκελετού της γλυκερόλης, αντίστοιχα σε όλες τις τάξεις των φωσφολιπιδίων [100].



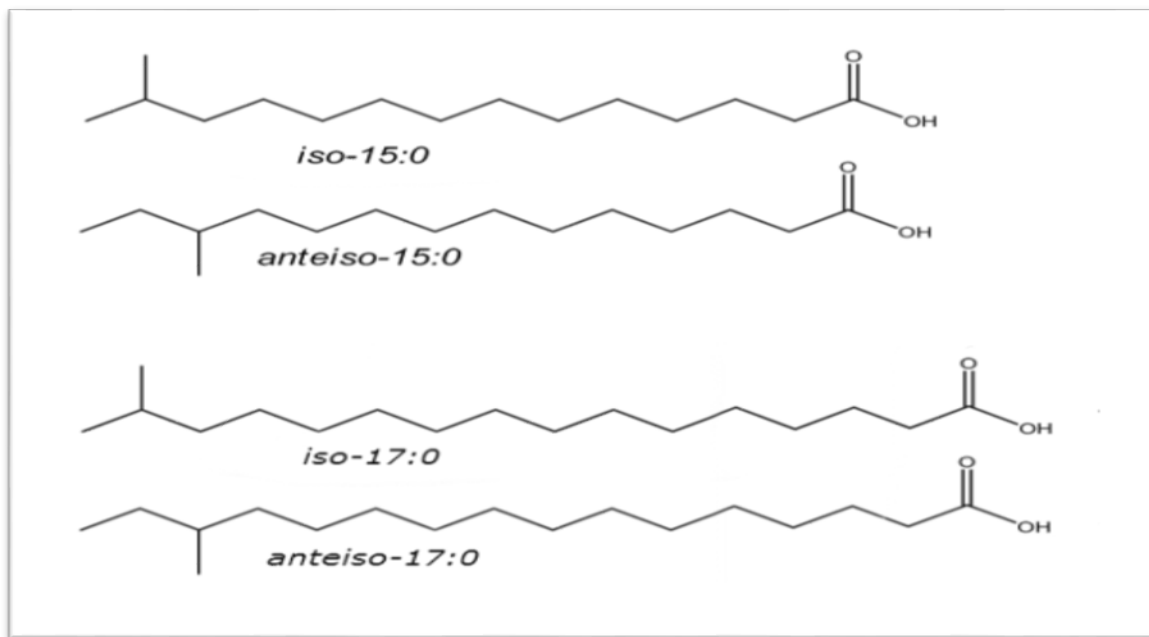
Εικόνα 2.1: Τρεις κυριότερες τάξεις φωσφολιπιδίων που έχουν βρεθεί στη μεμβράνη του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

2.3. Προσαρμογή της μεμβράνης στις δυσμενείς συνθήκες.

Είναι αυτονόητο ότι όλα τα μικροβιακά κύτταρα πρέπει να έχουν μια άθικτη πλασματική μεμβράνη για τη συνέχεια της επιβίωσης και την επιτυχή ανάπτυξή τους. Στα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων και των παθογόνων των τροφίμων, αυτή η μεμβράνη εκτελεί ζωτικής σημασίας λειτουργίες και είναι μια διασύνδεση μεταξύ του εξωτερικού περιβάλλοντος και του κυτταρικού κυτταροπλάσματος, τη σύνθεση του οποίου βοηθάει να ρυθμίσει. Με τη σειρά της, η σύνθεση της μεμβράνης θα μεταβάλλεται σε απόκριση αλλαγών του εξωτερικού, προκειμένου να διατηρήσει τις λειτουργίες της. Οι μεταβολές στη σύνθεση και τη δομή της μεμβράνης γίνονται αντιληπτά από τα βακτήρια ως σήματα, τα οποία θα οδηγούν στη βακτηριακή απόκριση στην εξωτερική καταπόνηση [103]. Επιπλέον, οι μεταβολές αυτές είναι μέρος του

μηχανισμού αντίστασης των βακτηρίων κατά των περιβαλλοντικών καταπονήσεων και διαφόρων αντιμικροβιακών παραγόντων [104].

Αναμφισβήτητα οι πιο σημαντικές περιβαλλοντικές παράμετροι στο πλαίσιο της διατήρησης και ασφάλειας των τροφίμων είναι η θερμοκρασία [χαμηλή (λόγο αποθήκευσης σε ψύξη) και υψηλή θερμοκρασία (παστερίωση, αποστείρωση)., το pH και η μείωση της ενεργότητας του νερού (a_w) με προσθήκη συντηρητικών (άλατα) [105].



Εικόνα 2.2: Δομές των κυριοτέρων λιπαρών οξέων της *Listeria monocytogenes*

2.3.1. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε χαμηλή θερμοκρασία

Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πολύπλοκα ετερογενή συστήματα των οποίων οι ιδιότητες είναι ευρείες και καθορίζονται από την σύσταση και την διάταξη των μορίων τους καθώς και από εξωτερικές επιδράσεις με τη θερμοκρασία να αποτελεί την κυριότερη από αυτές [106].

Επίδραση του ψύχους στη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης της L. monocytogenes: Τα λιπίδια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του βακτηρίου *L. monocytogenes*, το οποίο εξαρτάται από την ομοιότητα των λιπιδίων της μεμβράνης και την ικανότητά του να προσαρμόσει τη σύσταση των λιπιδίων για να φιλοξενηθεί σε διάφορα περιβάλλοντα. Φαινοτυπικά ο κυριότερος τρόπος προσαρμογής είναι η αύξηση των ουδέτερων λιπιδίων και η μεταβολή στην σύσταση των λιπαρών οξέων [16]. Η επίδραση του ψύχους στη σύσταση των λιπαρών οξέων της μεμβράνης της *L. monocytogenes* έχει μελετηθεί εκτενώς [16, 107, 108]. Η κυριότερη αλλαγή με την πτώση της θερμοκρασίας κάτω από την βέλτιστη τιμή, είναι η αύξηση του anteiso-C15:0 εις βάρος του anteiso-C17:0 λιπαρού οξέος. Έξι είδη της *Listeria*

συμπεριλαμβανομένης και της *L. monocytogenes*, αποκρίνονται στο ψύχος αυξάνοντας το C15:0 λιπαρό οξύ. Το anteiso-C15:0 λιπαρό οξύ έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε χαμηλή θερμοκρασία, μέσω των φυσικών ιδιοτήτων και επιπτώσεών τους να διατηρεί τα λιπίδια σε ρευστή υγροκρυσταλλική κατάσταση, εξασφαλίζοντας τη ρευστότητα της μεμβράνης [106, 108]. Η αύξηση του anteiso-C15:0, με de novo βιοσύνθεση μέσω της συνθάσης των λιπαρών οξέων, προχωρεί σε 2 στάδια:

- α) Μια αύξηση αμφοτέρων των anteiso-C15:0 και anteiso-C17:0.
- β) Μια ελάττωση της ποσότητας του anteiso-C17:0 μέσω της μείωσης της ταχύτητας επιμήκυνσης του anteiso-C15:0 προς anteiso-C17:0 λιπαρό οξύ.

Άλλα αποτελέσματα του ψύχους: Για να αντισταθμίσουν τη μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα στο ψύχος τα ψυχρόφιλα παράγουν αυξημένα επίπεδα ενζύμων. Επίσης παράγουν μια συγκεκριμένη σειρά πρωτεϊνών τις επονομαζόμενες ψυχρού σοκ (cold shock) πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγραφή και τη μετάφραση [106].

2.3.2. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε χαμηλό pH

Τα βακτήρια μπορούν να επιβιώσουν σε όξινα περιβάλλοντα, μόνο λόγω της ικανότητάς τους να ρυθμίζουν το εσωτερικό pH τους (pH_i) ως ουδέτερο (pH ομοιόσταση), μια διαδικασία κατά κύριο λόγο οδηγούμενη από την ελεγχόμενη κίνηση κατιόντων διαμέσου της μεμβράνης. Ειδικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιόστασης του pH κατά την έκθεση σε όξινο περιβάλλον συμπεριλαμβάνουν το σύστημα της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (glutamate decarboxylase GAD), το σύστημα της απαμινάσης αργινίνης (arginine deiminase, ADI), την ATP συνθάση, (ATP-synthase, F_0F_1 -ATPase) και γενικές στρες πρωτεΐνες [75, 109].

Επίδραση του χαμηλού pH στη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης: Όπως και με τη θερμοκρασία, η μεμβρανική λιπιδική σύσταση μπορεί να καθοριστεί από το pH του μέσου ανάπτυξης. Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε χαμηλό pH παρουσιάζουν μείωση του λόγου των ακόρεστων προς τα κεκορεσμένα λιπαρά οξέα με σύγχρονη αύξηση του ποσού των κυκλοπροπανικών λιπαρών οξέων. Η μεταβολή αυτή οδηγεί σε μείωση της ρευστότητας της μεμβράνης προστατεύοντας το κύτταρο από το χαμηλό pH [75, 106]. Ομοίως, τα κύτταρα της *L. monocytogenes*, που εκτίθενται σε χαμηλό pH υποβάλλονται στις αλλαγές στο προφίλ των λιπαρών οξέων της μεμβράνης. Ο Giotis et al. (2007) [110] εξέτασαν την ολική περιεκτικότητα των διακλαδωμένων λιπαρών οξέων (BCFA), των ευθείας αλυσίδας λιπαρών οξέων (SCFA), και ακόρεστων λιπαρών οξέων και τους λόγους τους σε

καλλιέργειες του στελέχους *L. monocytogenes* 10403S σε ήπιες όξινες συνθήκες. Αυτή η μελέτη αποκάλυψε ότι η περιεκτικότητα των BCFA όπως και ο λόγος των anteiso- και iso-λιπαρών οξέων τροποποιείται μετά από έκθεση σε χαμηλό pH. Φαίνεται ότι οι αλλαγές μεμβρανών της *L. monocytogenes* διαφέρουν από εκείνες σε άλλα γένη βακτηρίων, όπου η έκθεση στις ήπιες όξινες συνθήκες οδηγεί σε αυξανόμενα επίπεδα των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (MUFA), ενώ στη μεμβράνη της *L. monocytogenes* ενσωματώνονται περισσότερα SCFA. Ο van Schaik et al. (1999) [111] παρατήρησαν ότι στα οξυ-προσαρμοσμένα κύτταρα, η βιοσύνθεση των SCFA C14:0 και C16:0 που ανιχνεύονται στη μεμβράνη αυξήθηκε, με ταυτόχρονη μείωση του C18:0 οξέος. Οι συγγραφείς προτείνουν ότι η διασταυρούμενη προστασία (cross-protection) ως αποτέλεσμα της όξινης προσαρμογής (acid tolerance response, ATR) θα μπορούσαν ενδεχομένως να οφείλονται σε αυτόν τον φαινότυπο [75, 111].

2.3.3. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε ασθενή οξέα που δρουν ως συντηρητικά

Τα ασθενή λιπόφιλα οξέα απαντώνται σε φυσική μορφή σε πολλά φρούτα και λαχανικά και χρησιμοποιούνται ευρέως για να διατηρήσουν τη μικροβιακή σταθερότητα των όξινων τροφίμων όπως χυμοί, οίνοι, λαχανικά (τουρσί) και να συμβάλλουν στη γεύση τροφίμων. Τα περισσότερα από αυτά τα οξέα συμπεριφέρονται ως μυκητοστατικοί παράγοντες, ενώ άλλοι είναι πιο αποτελεσματικοί στην παρεμπόδιση της βακτηριακής ανάπτυξης. Παρεμπόδιση της προσαρμογής των βακτηρίων στις όξινες συνθήκες μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας διάφορους τύπους οξέων, όπως γαλακτικό και οξικό οξύ, που αποτελούν πιο αποτελεσματικά αντιμικροβιακά από άλλα οξέα [106].

Τρόπος δράσης των ασθενών οξέων-συντηρητικών. Κατ' αρχήν, η αναστολή της ανάπτυξης μπορεί να προκληθεί από την αδρανοποίηση ή την παρεμβολή στην κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα, τα μεταβολικά ένζυμα, το σύστημα σύνθεσης πρωτεϊνών ή το γενετικό υλικό. Οι ανασταλτικές επιδράσεις των ασθενών οξέων μπορεί να συσχετίζονται με τις τιμές της σταθεράς διάστασης, pK_a τους [112]. Σε διάλυμα, τα συντηρητικά ασθενή οξέα υπάρχουν σε μία pH-εξαρτώμενη ισορροπία μεταξύ της αδιάστατης και διϊστάμενης μορφής. Η αδιάστατη μορφή μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και έτσι επιτρέπει στα ασθενή οξέα να εισχωρήσουν στο μικροβιακό κύτταρο όπου συναντούν μεγαλύτερο pH, διΐστανται και οξινίζουν το εσωτερικό του κυττάρου εμποδίζοντας τελικά την ανάπτυξή του [113]. Αποδείχθηκε ότι η αναστολή της ανάπτυξης οφείλεται πρωταρχικά στην αδιάστατη

μορφή του οξέος, αλλά τόσο η διϊστάμενη όσο και η αδιάστατη μορφή καταλήγουν σε μια ελάττωση του pH_i. Η ελάττωση του pH_i κάτω από το φυσιολογικό εύρος που προκαλείται από τα ασθενή οξέα οδηγεί σε παράταση της λανθάνουσας φάσης και συνεπώς παρεμπόδιση της ανάπτυξης [106].

Επίδραση των ασθενών οξέων στη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης: Η επίδραση πολλών συντηρητικών ασθενών οξέων επί των βακτηριακών κυττάρων εξαρτάται από τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης [106]. Μελέτες έχουν δείξει ότι παρουσία ασθενών οξέων η σύσταση των λιπιδίων σε λιπαρά οξέα μεταβάλλεται. Οι μεταβολές παρουσία οξέων, όπως το οξικό και το γαλακτικό, σε pH 5.5, είναι: i) μια σημαντική αύξηση των SCFA σε βάρος των BCFA. Η αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως στην αύξηση στα λιπαρά οξέα ουδέτερων λιπιδίων. (ii) Μια ουσιαστική αύξηση του ποσοστού των ουδέτερων λιπιδίων, που υπολογίζεται από την αυξημένη τιμή μάζας στα ολικά λιπίδια [114]. Όταν κύτταρα *L. monocytogenes* αναπτύχθηκαν παρουσία εξωγενών λιπαρών οξέων (C14:0, C18:0), έδειξαν αυξημένη αντίσταση σε μεθυλο- και προπυλο- εστέρες του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος (methyl and propyl parabens), ενώ μειωμένη αντίσταση παρατηρήθηκε στα κύτταρα που αναπτύχθηκαν παρουσία του C18:1 [115].

2.3.4. Απόκριση της μεμβράνης των βακτηρίων σε ωσμωτική πίεση (αλατότητα)

Η αύξηση της ωσμωτικής πίεσης (μείωση ενεργότητας υδάτος a_w) είναι από μία από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη διατήρηση των τροφίμων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του διαθέσιμου ποσού νερού σε ένα μικροοργανισμό. Η a_w ενός προϊόντος (τροφίμου) είναι πολύ σημαντική όσον αφορά τη βακτηριακή ανάπτυξη και οι μικροοργανισμοί έχουν ένα ελάχιστο όριο ενεργότητάς νερού, κάτω από το οποίο η ανάπτυξη τους δεν μπορεί να συμβεί. Αυτή η οριακή τιμή της a_w θα εξαρτηθεί από τη διαλυτή ουσία που χρησιμοποιείται, όπως τα άλατα (π.χ. NaCl και KCl), σάκχαρα ή γλυκερόλη. Ο μηχανισμός απόκρισης στις αλλαγές της ωσμωτικής πίεσης λέγεται ωσμωρύθμιση [106].

Επίδραση της ωσμωτικής πίεσης στη σύσταση των λιπιδίων της μεμβράνης: Ενώ η απόκριση της μεμβράνης σε μεταβολές της θερμοκρασίας συμβαίνει με αλλαγή στα λιπαρά οξέα των λιπιδίων, η απόκριση στην αλατότητα (ωσμωτικό στρες) πετυχαίνεται με μεταβολή στις πολικές κεφαλές των μεμβρανικών λιπιδίων. Η ελάττωση της εξωτερικής ενεργότητας υδάτος εξαιτίας διαλυτών συντηρητικών επάγει αύξηση του ποσοστού των ανιονικών φωσφολιπιδίων ή/και των γλυκολιπιδίων. Η *Listeria monocytogenes* αυξάνει τον λόγο καρδιολιπίνης προς την φωσφατιδυλογλυκερόλη

κατά την προσαρμογή της σε διάλυμα 2% NaCl. Το αλάτι και άλλες διαλυτές ουσίες μπορεί επίσης να επηρεάζουν το προφίλ των FA των μεμβρανικών λιπιδίων. Ωστόσο, για τη *L. monocytogenes* υπάρχει πολύ μικρή επίδραση του 2% NaCl (w/v) επί του προφίλ αυτού του τροφογενούς παθογόνου. Το βακτήριο *L. monocytogenes*, σε ένα πλούσιο θρεπτικό υλικό όπως το BHI, μπορεί να αναπτυχθεί παρουσία συγκεντρώσεων άλατος έως και 10%. Η έλλειψη μεταβολών στο FA προφίλ, κατόπιν επιβολής ωσμωτικού στρες θα μπορούσε να σχετίζεται με τη χαμηλή συγκέντρωση άλατος που χρησιμοποιείται, και η οποία δεν είναι εξαιρετικά δυσμενής για το βακτήριο [105].

Άλλα αποτελέσματα της ωσμωτικής πίεσης: Η συσσώρευση κάποιων συμβατών μορίων αποτελεί μια άλλη σημαντική ωσμωρυθμιστική μεταβολή στην κυτταρική σύνθεση. Αυτοί οι λεγόμενοι ωσμωλύτες σταθεροποιούν τα ενδοκυτταρικά ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες (εμποδίζοντάς τις από τη συσσωμάτωση και διατηρώντας τη διαλυτότητα τους στο κύτταρο) επιτρέποντάς τους να συνεχίσουν να λειτουργούν και σε μειωμένη ενεργότητα ύδατος ή τροποποιώντας τις φυσικές ιδιότητες της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτές οι ουσίες είναι παρούσες σε πολλά τρόφιμα και μπορούν να απορροφηθούν από το εξωτερικό θρεπτικό μέσο, πιστεύεται δε ότι αλληλεπιδρούν με τις μεμβράνες. Η *Listeria monocytogenes* συσσωρεύει, εκτός από τη γλυκίνη βεταΐνη η οποία είναι προτιμώμενος εξωγενής ωσμωλύτης των βακτηρίων, και την καρνιτίνη [105, 106, 116]. Έρευνες έδειξαν ότι η συσσώρευση βεταΐνης και καρνιτίνης γίνεται και υπό την επίδραση ψύχους [106, 117].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

***LISTERIA MONOCYTOGENES* ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

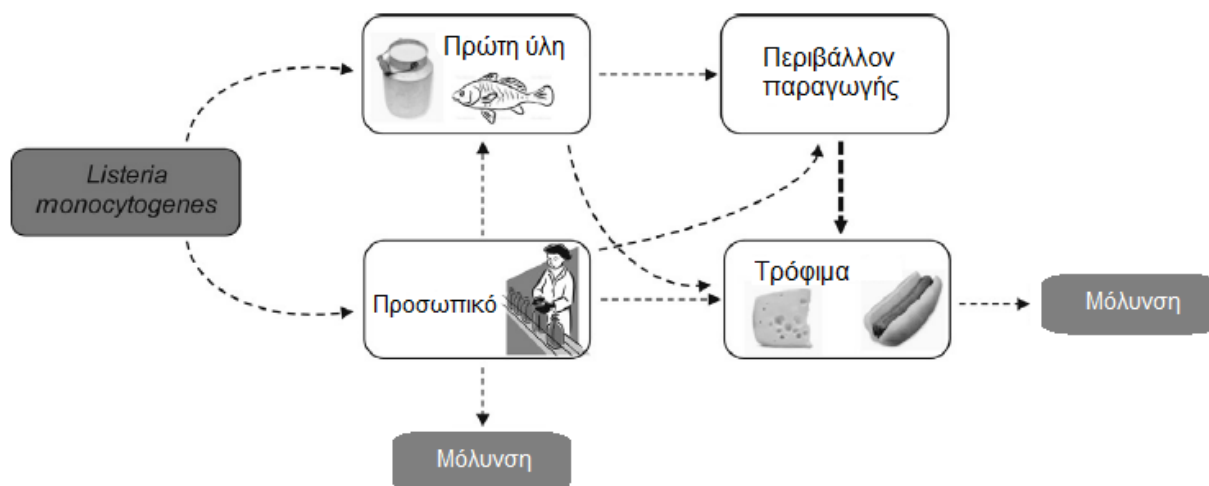
3.1. Εισαγωγή

Η εμφάνιση της λιστερίωσης φαίνεται να είναι ένα αποτέλεσμα της περίπλοκης αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων παραγόντων που αντικατοπτρίζουν αλλαγές στα κοινωνικά δεδομένα [77]. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν:

- την ιατρική πρόοδο και τις επακόλουθες δημογραφικές μεταβολές, όπως την αύξηση του πληθυσμιακού ποσοστού των ανοσοκατεσταλμένων και ηλικιωμένων ατόμων.
- τις αλλαγές στην παραγωγή τροφίμων, π.χ. η παραγωγή μεγάλης κλίμακας των πρώτων υλών, οι τροποποιήσεις στην τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων, η διεύρυνση της βιομηχανίας γεωργικών προϊόντων διατροφής (agrofood) και η ανάπτυξη των συστημάτων αποθήκευσης υπό ψύξη.
- τις αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες, στο χειρισμό και στις πρακτικές προετοιμασίας φαγητού όπως η αυξημένη καταναλωτική ζήτηση για RTE.

Συνολικά, τα περισσότερα περιστατικά λιστερίωσης σε ανθρώπους προκαλούνται από τα τρόφιμα (Υποκεφ. 1.4.3). Παρόλο που είναι κατανοητό, ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να μπει στην τροφική αλυσίδα σε πολλά και, πιθανότατα, σε καθένα από τα σημεία της, το περιβάλλον της παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την εισχώρηση του βακτηρίου στο σύστημα τροφίμων. Η σημαντικότερη και συνηθέστερη οδός μόλυνσης είναι από αποικίες της *L. monocytogenes* στις εσοχές του εξοπλισμού, που επιβίωσαν των διαδικασιών καθαρισμού και απολύμανσης και στη συνέχεια μπορεί να επιμολύνουν τα προϊόντα (Σχήμα 3.1). Η επιμονή στελεχών της *L. monocytogenes* έχει αποδειχθεί σε μεγάλες και μικρές εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, συχνά για πολλά χρόνια. Τα επίμονα στελέχη της *L. monocytogenes* έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σε περιπτώσεις λιστερίωσης και ανακλήσεις προϊόντων [118].

Ενόψει της ασφάλειας των τροφίμων, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε πώς αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να προσαρμόσουν τη φυσιολογία του κυττάρου τους και να ξεπεράσουν αποτελεσματικά τις διάφορες μορφές καταπονήσεων που σχετίζονται με τα τρόφιμα και την επεξεργασία τροφίμων, καθώς και να αντισταθούν στα μέτρα ελέγχου. Οι πληροφορίες αυτές μπορεί να είναι σημαντικές για την ανάπτυξη καλύτερων τρόπων πρόληψης και ελέγχου στα τρόφιμα [83].



Σχήμα 3.1: Διάγραμμα ροής της μόλυνσης από την *L. monocytogenes* μέσω τροφίμων [118]

3.2. Χαρακτηριστικά της *Listeria monocytogenes* που την καθιστούν επικίνδυνη για την ασφάλεια τροφίμων

Η ικανότητα της *L. monocytogenes* να προσαρμόζεται σε διάφορες καταπονήσεις και να επιμένει στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων είναι μια σοβαρή απειλή για την ασφάλεια των τροφίμων. Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν ισχυρές ικανότητες μοριακής προσαρμογής που τους επιτρέπουν να ανταποκριθούν όταν έρχονται αντιμέτωποι με τις προκλήσεις που σχετίζονται με το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων. Η προσαρμογή της *L. monocytogenes* στις χαμηλές θερμοκρασίες, στο χαμηλό pH, στο οσμωτικό στρες και η ικανότητα της για διασταυρόμενη προστασία σε συνδυασμό με την αντοχή στα μέσα καθαρισμού και απολύμανσης και την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων (biofilms), επιτρέπουν τελικά αντίσταση σε κοινές τεχνικές συντήρησης τροφίμων συμπεριλαμβανομένης και της ψύξης, που χρησιμοποιούνται συνήθως.

Επομένως, προβλέπεται ότι η πρόοδος στην κατανόηση της μοριακής βάσης της ικανότητας προσαρμογής της *L. monocytogenes* σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων μπορεί επίσης να ανοίξει δρόμους για την αξιοποίησή τους στην ανάπτυξη πρακτικών εφαρμογών στην ασφάλεια των τροφίμων.

3.2.1. Η αντοχή της *Listeria monocytogenes* στα μέσα καθαρισμού και απολύμανσης

Ο καθαρισμός του περιβάλλοντος επεξεργασίας τροφίμων είναι γενικά μια διαδικασία πολλαπλών βημάτων, το καθένα με ένα συγκεκριμένο σκοπό. Ένα πρώτο ξέβγαλμα αφαιρεί την σκόνη. Κατόπιν το πλύσιμο με απορρυπαντικά, που ακολουθείται από ένα δεύτερο στάδιο έκπλυσης, εφαρμόζεται για την εξάλειψη κατάλοιπων σκόνης.

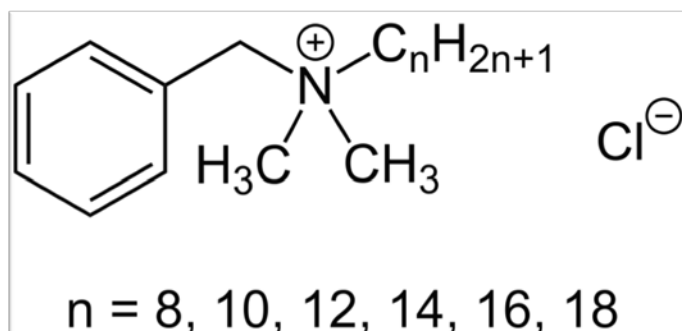
Η πλυμένη επιφάνεια απολυμαίνεται ώστε να αδρανοποιηθούν εναπομένοντες μικροβιακοί μολυντές. Ένα τελικό στάδιο έκπλυσης με πόσιμο νερό απομακρύνει τα αντιμικροβιακά χημικά. Η απολύμανση είναι ένα κρίσιμο βήμα που μειώνει τα παθογόνα και τους μικροοργανισμούς που επιφέρουν αλλοιώσεις στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων και, ως εκ τούτου αποτρέπει τη διασταυρούμενη επιμόλυνση (cross contamination) τροφίμων. Το νερό μπορεί επίσης να διαδώσει μικροοργανισμούς, εκτός εάν ένα κατάλληλο απολυμαντικό προστίθεται στο νερό διεργασίας. Το απολυμαντικό πρέπει να μειώσει τουλάχιστον 5 λογαριθμικές μονάδες τον πληθυσμό ενός δεδομένου οργανισμού, εντός 30 δευτερολέπτων έκθεσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για να θεωρείται αποτελεσματικό. Η αποτελεσματικότητά του μπορεί να επηρεαστεί από πολλές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίας υπολειμμάτων από τα καθαριστικά πριν από την εφαρμογή των αντιμικροβιακών ουσιών [119].

Τα περισσότερα δραστικά απολυμαντικά κατά των ειδών *Listeria* ανήκουν σε μία από τις πέντε κατηγορίες: ενώσεις που περιέχουν χλώριο, βασικές ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, όξινα απολυμαντικά, το όζον και ιωδιοφορείς.

Η αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών μειώνεται με τη θερμοκρασία, την αύξηση του πορώδους της επιφάνειας, και την ανάπτυξη των βιοϋμενίων (biofilms) του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Η ανθεκτικότητα σε πολλαπλά απολυμαντικά μέσω πλασμιδίου είναι ένα προβληματικό φαινόμενο, δεδομένου ότι μπορεί να μεταφερθεί σε υψηλή συχνότητα [120].

Οι ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, στις οποίες ανήκει το χλωριούχο βενζαλκόνιο (Benzalkonium Chloride, BZC) (Εικόνα 3.1) είναι μη-διαβρωτικές κατιονικές επιφανειοδραστικές ουσίες, που χρησιμοποιούνται συχνά για την απολύμανση των επιφανειών του εξοπλισμού [121, 122]. Εφαρμογή 100 έως 200 ppm δραστικών ενώσεων σε επιφάνειες είναι λιστεριοκτόνος (listericidal) [123]. Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ελαφρώς πιο ανθεκτικό σε ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου από σε άλλα απολυμαντικά [120]. Ωστόσο, όταν το παθογόνο εκτέθηκε σε ενώσεις καθαρισμού (4°C για 30min), πριν από τη επεξεργασία με ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου (25°C για 30 s), > 7 λογαριθμικές μονάδες απενεργοποιήθηκαν [119]. Ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου αντιδρούν με τις βακτηριακές καρβοξυλικές ομάδες. Κατά συνέπεια, η κυτταροπλασματική μεμβράνη γίνεται διαπερατή και το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο μπορεί να πήξει [122]. Ενισχυμένη αντίσταση (έως 10 φορές) της *L. monocytogenes* σε απολυμαντικά έχει αναφερθεί μετά από 2 ώρες έκθεση σε υποθανατηφόρο συγκέντρωση των ενώσεων τεταρτοταγούς αμμωνίου [121]. Η

προσαρμογή σε ενώσεις του τεταρτοταγούς αμμωνίου περιλαμβάνει μία μείωση της ενεργού μεταφοράς και τις τροποποιήσεις της δομής του κυτταρικού τοιχώματος, όμως ο μηχανισμός προσαρμογής δεν έχει ακόμα διευκρινηστεί για την *L. monocytogenes* [122, 124, 125]. Η προσαρμογή σε πολλαπλά απολυμαντικά μπορεί να συμβάλει στην αντοχή και τη διατήρηση του παθογόνου στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων. Ωστόσο, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των απολυμαντικών, έναντι των προσαρμοσμένων στις ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου κυτάρων *L. monocytogenes*, είναι κάτω από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται γενικά στην υγιεινή των εργοστασίων τροφίμων [121].



Εικόνα 3.1: Χημικός τύπος για το χλωριούχο βενζαλκόνιο

3.2.2. Σχηματισμός βιοϋμενίων και η αίσθηση απαρτίας (quorum sensing)

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να υπάρχουν στο περιβάλλον είτε ως πλαγκτονικά κύτταρα είτε ως κοινότητες στα βιοϋμένια/βιοφίλμ, τα οποία ορίζονται ως “κυτταρικά συσσωματώματα προσκολλημένα το ένα στο άλλο και/ή σε επιφάνειες ή διασυνδέσεις με αυτο-παραγόμενες εξωκυτταρικές πολυμερές ουσίες (*extracellular polymeric substances*, EPS)” [126]. Τα μικροβιακά κύτταρα στα βιοϋμένια επιδεικνύουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, μεταβολή στα μεταγραφόμενα γονίδια, υψηλότερο ποσοστό μεταφοράς γονιδίων μέσω σύζευξης, αυξημένη παραγωγή EPS, και το πιο σημαντικό, μία ενισχυμένη αντίσταση στα καθαριστικά, απολυμαντικά και αντιμικροβιακά παρασκευάσματα, καθιστώντας ιδιαίτερα δύσκολη την καταπολέμισή τους [127, 128].

Στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων, τα βιοϋμένια μπορεί να εμφανιστούν σε διάφορες περιοχές και διάφορες επιφάνειες όπως πατώματα, επιφάνειες εργασίας, τοίχοι, φλάντζες και σκεύη κοπής που μπορεί να είναι από διάφορα υλικά όπως ο ανοξείδωτος χάλυβας, το γυαλί, πολυστυρένιο, και πολυπροπυλένιο [129]. Τα παθογόνα βακτήρια όπως η *L. monocytogenes* παρουσιάζονται στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων μαζί με άλλους μικροοργανισμούς, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα δημιουργίας μικτών βιοϋμενίων [8, 126, 130]

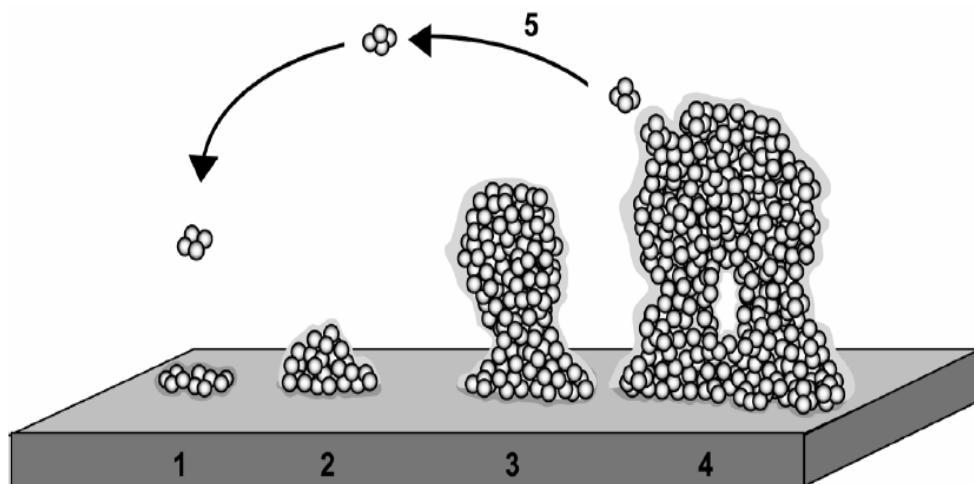
Ο σχηματισμός βιοϋμενίων βασικά περιλαμβάνει πέντε στάδια (Εικόνα 3.2) [131]:

- 1- τα βακτηριακά κύτταρα στη πλαγκτονική μορφή συνδέονται σε μια στερεή επιφάνεια με van der Waals δυνάμεις, ηλεκτροστατικές δυνάμεις και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις,
- 2- συμβαίνει κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η παραγωγή των EPS
- 3- το βιοϋμένιο αναπτύσσεται με σταθερό ρυθμό και πιο σύνθετες δομές κατασκευάζονται,
- 4- σχηματίζεται ένα ώριμο βιοϋμένιο που περιέχει τα κανάλια για τη ροή των θρεπτικών συστατικών και απεκκρίσεων και
- 5- διασπορά των κυττάρων λαμβάνει χώρα, με επακόλουθο αποικισμό των άλλων επιφανειών.

Τα κύτταρα της *L. monocytogenes* σε βιοϋμένιο μπορεί να είναι μέχρι και 500 φορές πιο ανθεκτικά σε χημικές ουσίες απολύμανσης από ότι τα πλαγκτονικά κύτταρα του ίδιου είδους [132]. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις απολυμαντικών και οι χρόνοι έκθεσης σ' αυτά μπορεί να χρειαστεί να αυξηθούν 10 έως 100 φορές για να είναι αποτελεσματικός κατά των κυττάρων σε βιοϋμένιο σε σύγκριση με τις αποτελεσματικές παρεμβάσεις που έχουν βρεθεί ενάντια πλαγκτονικών κυττάρων [133].

Σε πειραματικές μελέτες, οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας επαφής (ηλεκτροστατικό φορτίο και υδροφοβικότητα), και αυτές της κυτταρικής μεμβράνης, η ποικιλία των οροτύπων, η έκφραση των μαστιγίων, η σύνθεση EPS, οι περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι το pH, η θερμοκρασία και το μέσο καλλιέργειας, αποτελούν τους βασικούς παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα της *L. monocytogenes* να προσκολληθεί και να σχηματίσει βιοϋμένιο [126, 134, 135]. Μεταξύ των πολλών παραγόντων, η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων, γνωστή συνήθως ως "Quorum sensing", είναι ένας τομέας που μελετάται εκτενώς και ο ρόλος του στο σχηματισμό βιοϋμενίων έχει αποτελέσει ένα αντικείμενο μεγάλης συζήτησης τα τελευταία χρόνια [136]. Το "Quorum sensing" ορίζεται ως η διαδικασία της βακτηριακής επικοινωνίας κυττάρου προς κύτταρο, που περιλαμβάνει την παραγωγή και την ανίχνευση εξωκυτταρικών μορίων, γνωστών ως αυτοεπαγωγείς. Οι αυτοεπαγωγείς των Gram θετικών βακτηρίων είναι χαρακτηριστικά ολιγοπεπτίδια και επίσης ως και η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων γίνεται μέσω ενός διμερούς συστήματος βασισμένο στον φώσφορο. Υπάρχει πληθώρα μελετών που εξετάζουν την ικανότητα της *L. monocytogenes* να δημιουργεί βιοϋμένια και να τα προσαρμόζει μέσω του Quorum sensing. Η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού επικοινωνίας και η εύρεση ουσιών που δρουν ανταγωνιστικά με τελικό στόχο την απενεργοποίησή του, μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως μέσω ελέγχου των βιοϋμενίων σε περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων [8, 126].



Εικόνα 3.2: Η ανάπτυξη ενός βιοϋμενίου, απεικονιζόμενη ως μια διαδικασία πέντε σταδίων, στάδιο 1- αρχική προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια, στάδιο 2- παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας από εξωπολυσακχαρίτη, στάδιο 3- πρώιμη ανάπτυξη της αρχιτεκτονικής του βιοϋμενίου, στάδιο 4- ωρίμανση αρχιτεκτονικής του βιοϋμενίου, στάδιο 5- διασπορά των βακτηριακών κυττάρων από το βιοϋμένιο [131, 137].

Αρκετές στρατηγικές έχουν εγκριθεί για την πρόληψη και τον έλεγχο σχηματισμού βιοϋμενίων σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, αλλά και στον ιατρικό εξοπλισμό. Σύμφωνα με τους Francolini και Donelli (2010) [138], οι κύριες στρατηγικές είναι:

- αναστολή της αρχικής προσκόλλησης και αποικισμού στην επιφάνεια,
- παρεμβολή στα μοριακά σήματα τα οποία ρυθμίζουν την ανάπτυξη των βιοϋμενίων
- διάσπαση των EPS.

Ο έλεγχος των βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων γίνεται κυρίως με τον καθαρισμό και την απολύμανση του εξοπλισμού, με ενώσεις όπως το οξικό οξύ, το γαλακτικό οξύ, το υποχλωριώδες νάτριο, τεταρτοταγείς βάσεις αμμωνίου και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Είναι σημαντικό να προσδιοριστούν οι καλύτερες συνθήκες όσον αφορά το χρόνο έκθεσης, τη θερμοκρασία και κατάλληλες συγκεντρώσεις που συνδυάζει τη χημική και μηχανική απομάκρυνση [133]. Ωστόσο, αναγνωρίζεται ότι οι συμβατικές μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης είναι πιο αποτελεσματικές κατά των βακτηριακών κυττάρων πρόσφατα εναποτιθεμένων στην επιφάνεια παρά σε μετέπειτα στάδια, κυρίως λόγω της προστασίας που παρέχεται από το EPS στα βιοϋμένια [139]. Επιπλέον, εναλλακτικές βιολογικές λύσεις έχουν προταθεί για τη συμπλήρωση ή/και να υποκαταστήσουν τις συνήθεις διαδικασίες ελέγχου βιοϋμενίων [126, 140].

3.3. Στρατηγικές ενέργειες για τον έλεγχο της *Listeria monocytogenes* σε γαλακτοκομικά προϊόντα

Η *Listeria monocytogenes* είναι αρκετά καλά προσαρμοσμένη στο περιβάλλον του εργοστασίου γαλακτοκομικών προϊόντων. Είναι γενικά πιο κοινή σε εργοστάσια όπου οι συνθήκες τείνουν να είναι υγρές και δροσερές. Οι στρατηγικές ενέργειες για τη μείωση της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα και, κατά συνέπεια, της λιστερίωσης θα εξαρτηθούν πολύ από τις υγιεινές και υγιειονομικές πρακτικές παραγωγής και επεξεργασίας. Σκοπός είναι να μειωθεί ο αποικισμός, η μετάδοση και διασταυρούμενη επιμόλυνση του βακτηρίου *L. monocytogenes* μεταξύ τροφίμων και του περιβάλλοντος. Ένα αποτελεσματικό μέτρο ελέγχου για αυτό το παθογόνο πρέπει να στοχεύει το αγρόκτημα, τις μονάδες επεξεργασίας και τα περιβάλλοντά τους. Σε όλα αυτά τα στάδια πρέπει να ασκηθεί η αυστηρή τήρηση των τυποποιημένων μέτρων λειτουργίας [141].

Στο αγρόκτημα, τα ζώα πρέπει να εκτρέφονται σε καθαρό και ξηρό περιβάλλον. Τα εδάφη, ειδικότερα, δεν θα πρέπει να είναι υγρά ή νοτισμένα, διότι αλλιώς θα παραχθεί ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου. Οι στάβλοι θα πρέπει να καθαρίζονται επιμελώς και να απολυμαίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Πρέπει να αποτραπεί και η εισοδός άγριων ζώων στο αγρόκτημα, ειδικά σε χώρους ή περιοχές φύλαξης της ζωοτροφής [82].

Σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας, κατ'αρχάς, θα πρέπει να ληφθούν μέτρα για να αποτραπεί η είσοδος της *L. monocytogenes* στην περιοχή του εργοστασίου. Τα βήματα αυτά περιλαμβάνουν κυρίως την απομόνωση της περιοχής υποδοχής γάλακτος και του σχετικού προσωπικού, από την περιοχή επεξεργασίας και συσκευασίας και την πρόληψη εισόδου των ακατέργαστων προϊόντων στην περιοχή επεξεργασίας. Η *Listeria monocytogenes* πρέπει να εμποδίζεται να επιμολύνει και να αναπτύσσεται σε κόγχες ή άλλα σημεία που μπορεί να οδηγήσουν σε μολύνσεις των επεξεργασμένων τροφίμων. Αποτελεσματική παστερίωση είναι το βασικό βήμα για τον έλεγχο της *L. monocytogenes* στον τομέα της επεξεργασίας. Στην περίπτωση της HTST παστερίωσης του γάλακτος, τουλάχιστον 72°C για 15 δευτερόλεπτα είναι απαραίτητη. Προϊόντα που περιέχουν λίπος ή υψηλότερα επίπεδα σακχάρου, για να είναι ασφαλή απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες, όπως 75°C για 15 δευτερόλεπτα, ώστε να εξασφαλιστεί η αποτελεσματική καταστροφή των ειδών *Listeria*. Τα προγράμματα καθαρισμού και απολύμανσης είναι ζωτικής σημασίας ώστε η μόλυνση μετά την παστερίωση να μην συμβαίνει. Ένα πρόγραμμα δειγματοληψίας θα πρέπει να υλοποιηθεί που μπορεί να αξιολογήσει σε εύθετο χρόνο αν το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων είναι υπό έλεγχο. Θα πρέπει να υπάρχει μια ταχεία και αποτελεσματική αντιμετώπιση σε κάθε

θετικό δείγμα που λαμβάνεται. Τέλος, θα πρέπει να υπάρχει έλεγχος με επόμενη δειγματοληψία για την επαλήθευση ότι η πηγή μόλυνσεως έχει εντοπιστεί και διορθωθεί. Υπάρχει η ανάγκη για κάθε εταιρία να καταρτίζει επεξεργασμένα περιβαλλοντικά σχέδια παρακολούθησης για την *L. monocytogenes*. Τα σχέδια αυτά πρέπει να προσδιορίζονται στο σχέδιο HACCP (Hazard analysis & critical control points) της εταιρείας. Τα σχέδια παρακολούθησης θα πρέπει να δώσουν έμφαση στις πρακτικές υγιεινής, επεξεργασίας και συσκευασίας, της υγιεινής του προσωπικού, καθώς και στα συνήθη προγράμματα δοκιμών για *L. monocytogenes* [142].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΦΕΤΑ

4. 1. Φέτα και η ιστορία της

Η ιστορία του τυριού είναι τόσο μακρόχρονη όσο και αυτή του ανθρώπινου γένους και συνδέεται με την εξημέρωση κατοικίδιων ζώων εδώ και 10.000 χρόνια π.Χ.. Οι ρίζες της τυροκομίας δεν είναι γνωστές με βεβαιότητα. Πιστεύεται, όμως, ότι το τυρί παρασκευάστηκε πριν 8.000 χρόνια περίπου. Είναι πιθανό η παρασκευή του να έγινε εντελώς τυχαία, κατά τη μεταφορά του γάλακτος μέσα σε στομάχια νεαρών ζώων.

Καταγραφές για παρασκευή και κατανάλωση τυριού στην αρχαία Ελλάδα υπάρχουν πάρα πολλές, όπως από τον Αριστοτέλη, τον Πυθαγόρα και πολλούς αρχαίους κωμωδιογράφους. Από τη μυθολογία ακόμα, λέγεται ότι οι θεοί έστειλαν τον Αρισταίο, γιο του Απόλλωνα, να διδάξει στους Έλληνες την τυροκομία. Το τυρί που παρασκεύαζε ο κύκλωπας Πολύφημος και περιγράφει τον 8ο π.χ. αιώνα ο Όμηρος στην Οδύσσεια του, θεωρείται ο πρόγονος του τυριού φέτα:

“... ταρσοί μὲν τυρῶν βρῖθον, στείνοντο δὲ σηκοὶ ἀρνῶν ἡδ’ ἐρίφων...”

...δ’ ἥμισυ μὲν θρέψας λευκοῖο γάλακτος πλεκοῖς ἐν ταλάροισιν ἀμηςάμενος κατέθηκεν,

ἥμισυ δ’ αὖτ’ ἔστησεν ἐν ἄγγεσιν, ὄφρα οἱ εἴῃ πίνειν αἰνυμένω καὶ οἱ ποτιδόρπιον εἴῃ...”

Ομήρου Οδύσσεια, ραψωδία ι

Οι αρχαίοι Έλληνες το προϊόν που προερχόταν από την πήξη του γάλακτος το έλεγαν τυρί. Η ονομασία φέτα χρονολογείται από τον 17^ο αιώνα και πιθανά αναφέρεται στην πρακτική κοπής του τυριού σε φέτες για να εισαχθεί στα βαρέλια. Η ονομασία φέτα επικράτησε οριστικά τον 19ο αιώνα και χαρακτηρίζει ένα τυρί, που παρασκευάζεται επί αιώνες με την ίδια σε γενικές γραμμές τεχνική και που η καταγωγή του χάνεται βαθιά στον χρόνο.

Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ), η ονομασία “ΦΕΤΑ” (FETA) αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (ΠΟΠ) για το λευκό τυρί άλμης που παράγεται στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στις περιοχές Μακεδονίας, Θράκης, Ηπείρου, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Πελοποννήσου και του νομού Λέσβου, από γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο. Είναι μαλακό τυρί χωρίς επιδερμίδα, με λίγες οπές στη μάζα του και με υφή συμπαγή με λίγες μηχανικές σχισμές, έχει καθαρό λευκό χρώμα και ευχάριστη, ελαφρά όξινη γεύση και πλούσιο άρωμα. Η μέγιστη υγρασία του τυριού φέτα είναι 56%, η ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 43% και το pH της κυμαίνεται από 4,4-4,6 [143].

4.1.1 Διατροφική αξία της φέτας

Το τυρί, αποτελεί για τον άνθρωπο ένα πολύ καλό τρόφιμο, γι' αυτό και καλύπτει ένα μεγάλο κομμάτι της διατροφής του. Ανάλογα με το είδος του και τον τρόπο παρασκευής του, περιέχει πρωτεΐνες, λίπος, ασβέστιο και βιταμίνες σε διάφορα ποσοστά και διατροφική αξία. Πανγκοσμίως, τα γαλακτοκομικά συνεισφέρουν κατά μέσο όρο το 4% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης, ενώ στην Ευρώπη, την Βόρεια Αμερική και την Αυστραλία το 10% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης [144].

Πίνακας 4.1: Κύρια θρεπτικά συστατικά της Φέτας και ποσοστά που καλύπτουν από τις ημερήσιες ανάγκες ενός ενήλικου άνδρα που εργάζεται μέτρια. Πηγή: Εθνική Επιτροπή Γάλακτος

Θρεπτικά συστατικά	Ανά 100g φέτα	Ημερίσιες Ανάγκες Ενήλικου Άντρα	% Ποσοστό κάλυψης Ημερήσιων Αναγκών.
Λίπος, g	21	-	-
Πρωτεΐνες, g	17	55	31
Ενέργεια, Kcal	250	3000	8
Ασβέστιο, mg	490	800	61
Βιταμίνη Α, mg	250	750	33
Βιταμίνη Δ, mg	0,3	10	3
Βιταμίνη Β2, mg	0,75	1,8	41

Το τυρί φέτα είναι το κυριότερο Ελληνικό τυρί. Η ετήσια κατανάλωση τυριών ανά άτομο στην Ελλάδα είναι η μεγαλύτερη στον κόσμο. Σύμφωνα με τα στοιχεία της FAO για το 2000 αυτή η κατανάλωση ήταν 25.4 kg/άτομο [145]. Μόνο η ετήσια κατανάλωση της φέτας υπολογίζεται περίπου 12 kg/άτομο [146] και αποτελεί αρωγό για την καλή υγεία, ιδίως όσον αφορά τα απαραίτητα αμινοξέα που χρειάζεται καθημερινά ο ανθρώπινος οργανισμός. Είναι ένα τυρί με πολύ μεγάλη θρεπτική αξία (Πίνακας 4.1), και παίζει εξέχοντα ρόλο στην ισορρόπηση του καθημερινού μας διαιτολογίου από άποψη θρεπτικών στοιχείων [147]. Η φέτα διανέμεται στην αγορά σε βαρέλια, σε λευκοσιδηρά δοχεία ή με τη μορφή τυλιγμένων σε πλαστικό κομματίων και καταναλώνεται ως επιτραπέζιο τυρί, στη διάσημη ελληνική σαλάτα, σε τυρόπιτες και αρκετά συχνά ως σαγανάκι.

4. 2. Γάλα ως πρώτη ύλη

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, [143] ορίζει ότι: “Γάλα” είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης.

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας των Ενωμένων Εθνών, FAO/WHO [148]: “Γάλα” είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται μετά από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί κάτι και προορίζεται για κατανάλωση σε υγρή μορφή ή για περαιτέρω επεξεργασία.

Όπως είναι γνωστό, ο σημαντικότερος παράγοντας για την ποιότητα του τελικού προϊόντος είναι το είδος και η ποιότητα της αρχικής πρώτης ύλης. Στην προκειμένη περίπτωση της φέτας, πρωτεύοντα ρόλο παίζει το είδος του γάλακτος. Για την παραγωγή φέτας το καταλληλότερο γάλα είναι το αιγοπρόβειο. Ο ΚΤΠ [143] ορίζει της προϋποθέσεις που πρέπει να πληρεί το γάλα για την παρασκευή της φέτας:

- Το χρησιμοποιούμενο γίδινο γάλα δεν μπορεί να υπερβαίνει το 30% κατά βάρος.
- Η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον 6% κατά βάρος.
- Το pH του γάλακτος πρέπει να είναι τουλάχιστον 6.5
- Η πήξη του γάλακτος πρέπει να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη. Το γάλα μέχρι την πήξη διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας.
- Το γάλα, πρέπει να προέρχεται από φυλές προβάτων και αιγών παραδοσιακά εκτρέφόμενες και προσαρμοσμένες στην περιοχή παρασκευής της φέτας και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στην χλωρίδα της εν λόγω περιοχής.
- Το γάλα πρέπει να προέρχεται από αμέλξεις, που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.
- Το γάλα πρέπει να είναι καθαρό, υγιεινό, πλήρες.
- Το γάλα πρέπει να είναι νωπό ή παστεριωμένο.

4.2.1 Χημική σύνθεση του γάλακτος

Η σύνθεση του γάλακτος εξαρτάται κατ' αρχήν από το είδος του ζώου όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.2. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του γάλακτος στο ίδιο είδος ζώου είναι η φυλή, η διατροφή, η εποχή, η γαλακτική περίοδος, η πληρότητα του αρμέγματος, το χρονικό διάστημα που παρεμβάλλεται μεταξύ των αρμεγμάτων, οι αλλαγές του καιρού, η ηλικία του ζώου, τοκετός, αρρώστιες, κλπ.

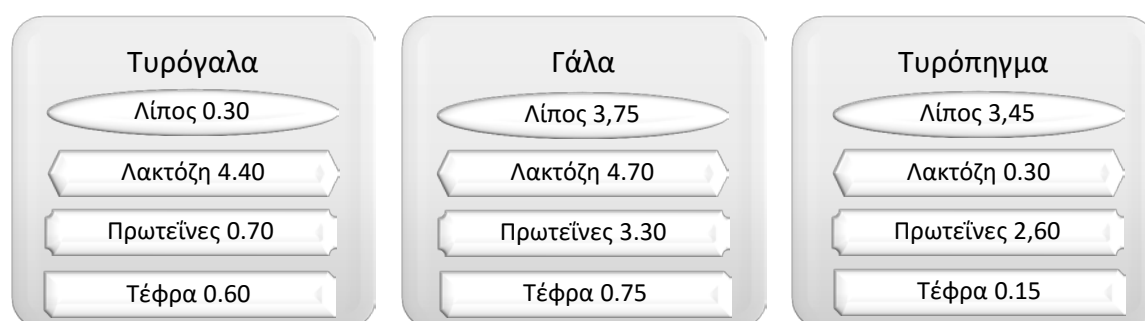
Από τα συστατικά του γάλακτος, αυτά που κυρίως πηγαίνουν στο τυρί είναι η πρωτεΐνη και το λίπος όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1. Από τις πρωτεΐνες μόνο η καζεΐνη πηγαίνει στο τυρί, ενώ οι άλλες σαν υδατοδιαλυτές φεύγουν στο τυρόγαλα. Το λίπος εγκλωβίζεται στο πλέγμα του τυροπήγματος και περιέρχεται στο τυρί εκτός από ένα πολύ μικρό μέρος του που διαφεύγει στο τυρόγαλα. Από τα άλλα συστατικά που είναι

υδατοδιαλυτά λίγη μόνο ποσότητα μένει μέσα στο τυρί ανάλογα με την υγρασία του και τον τρόπο ωριμάνσεως του τυριού [149].

Πίνακας 4.2: % Σύνθεση γάλακτος διαφόρων θηλαστικών [149]

Είδος	Στερεό υπόλειμμα	Λίπος	Πρωτεΐνες	Λακτόζη	Τέφρα
Άνθρωπος	12.2	3.8	1.0	7.0	0.2
Αγελάδα	12.7	3.7	3.4	4.8	0.7
Κατσίκι	12.3	4.5	2.9	4.1	0.8
Πρόβατο	19.3	7.4	4.5	4.8	1.0
Χοίρος	18.8	6.8	4.8	5.5	-
Άλογος	11.2	1.9	2.5	6.2	0.5
Όνος	11.7	1.4	2.0	7.4	0.5
Τάρανδος	33.1	16.9	11.5	2.8	-
Κουνέλι	32.8	18.3	11.9	2.1	1.8
Βίσονας	14.6	3.5	4.5	5.1	0.8
Ελέφαντας	31.9	11.6	4.9	4.7	0.7
Πολική αρκούδα	47.6	33.1	10.9	0.3	1.4
Γκρίζα φώκια	67.7	53.1	11.2	0.7	-

Έτσι για την τυροκομία, κύρια σημασία έχει η περιεκτικότητα του γάλακτος σε καζεΐνη και λίπος και η σχέση μεταξύ τους, (Κ/Λ). Από τα δύο αυτά συστατικά εκείνο που μεταβάλλεται περισσότερο και ρυθμίζεται ευκολότερα είναι η λιποπεριεκτικότητα. Για τη φέτα η σχέση Κ/Λ πρέπει να είναι περίπου 0.8. Αν ληφθεί υπόψη ότι η καζεΐνη του πρόβειου γάλακτος είναι περίπου 4.6%, τότε προκύπτει ότι η λιποπεριεκτικότητα πρέπει να είναι περίπου 5.8%. Ο στόχος είναι η παραγωγή τυριού πρώτης ποιότητας, δηλαδή με λιποπεριεκτικότητα τουλάχιστον 19% επί του τελικού προϊόντος.



Σχήμα 4.1: Παράσταση της κατανομής των συστατικών του γάλακτος στο τυρόπηγμα και στο τυρόγαλα κατά την πήξη του με πυτιά

Επειδή η λιποπεριεκτικότητα του γάλακτος είναι μεγαλύτερη από εκείνη που χρειάζεται για να παραχθεί τυρί πρώτης ποιότητας, συνήθως γίνεται μερική αποκορύφωση του γάλακτος. Αν δεν γίνει αποκορύφωση το επιπλέον λίπος πηγαίνει στο τυρί, το οποίο συγκρατεί και περισσότερη υγρασία και γίνεται μαλακό και

υπερβολικά λιπαρό. Οπότε, δεδομένων αυτών, και για λόγους παραγωγής τυριού σταθερής ποιότητας, επιβάλλεται η τυποποίηση του γάλακτος [150].

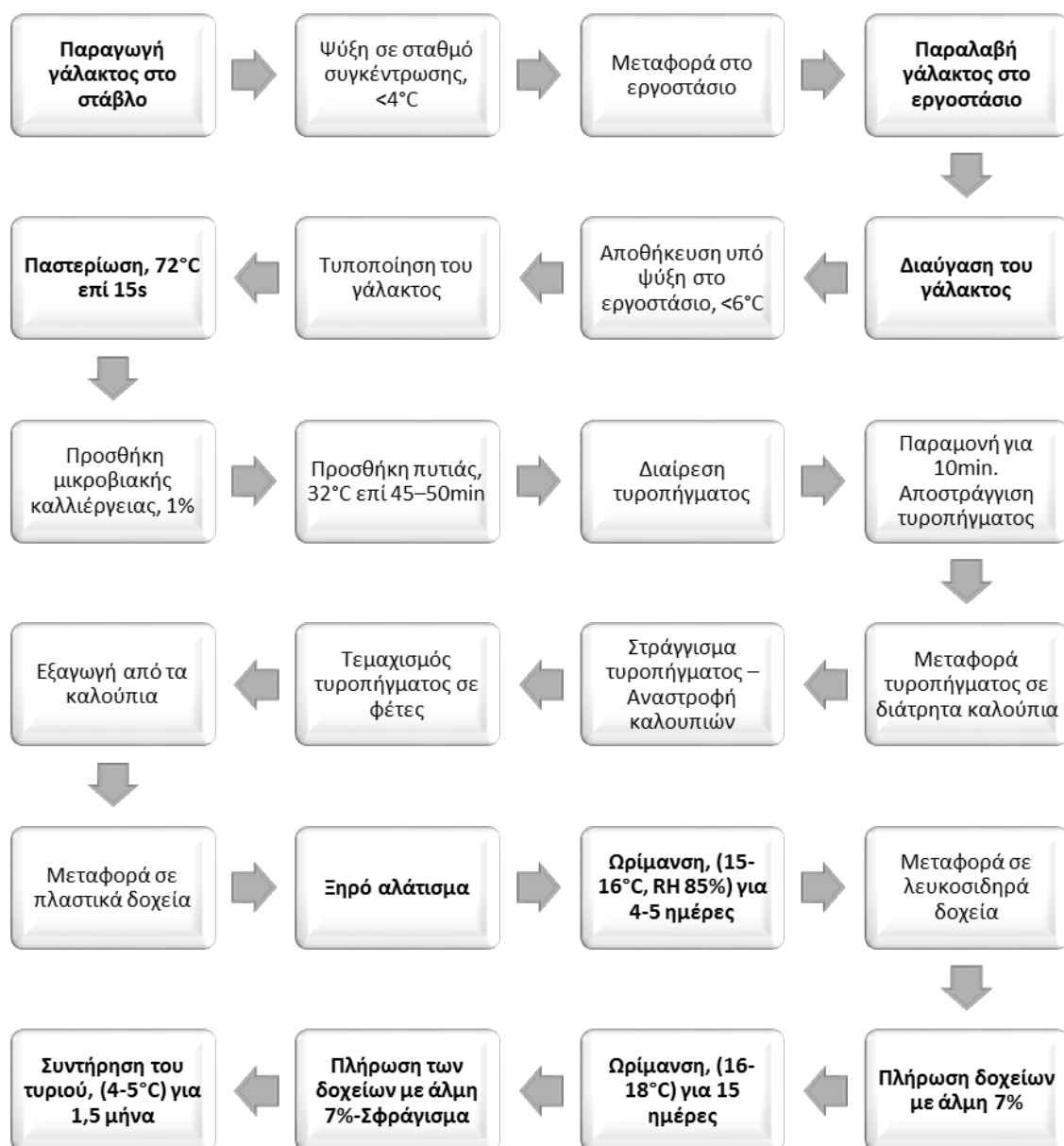
4.2.2 Τεχνολογία παραγωγής της φέτας

Η μετατροπή του γάλακτος σε τυρί γενικά περνάει από τέσσερα στάδια [145]:

- 1- Πήξη: φυσικές και χημικές αλλαγές στα μικκύλια καζεΐνης λόγω της δράσης πρωτεολυτικών ενζύμων και/ή γαλακτικού οξέος που οδηγεί στον σχηματισμό ενός δικτύου πρωτεΐνης.
- 2- Στράγγισμα: διαχωρισμό του ορού μετά από μηχανική κοπή και ανάδευση του πηγματος που ακολουθείται από καλούπιασμα και, ανάλογα με το είδος του τυριού, το πάτημα. Σε αυτό το σημείο, λαμβάνεται το τυρί.
- 3- Αλάτισμα: ενσωμάτωση άλατος δια ξηρού αλατιού στην επιφάνεια ή εντός του σώματος του τυριού, ή με εμβάπτιση σε άλμη.
- 4- Ωρίμανση: βιοχημικές αλλαγές στο τυρί που προκύπτουν κυρίως από βακτηριακά ένζυμα.

Στο Σχήμα 4.2 απεικονίζεται το διάγραμμα ροής παρασκευής της φέτας και επισημαίνονται με έντονο διπλό πλαίσιο τα κρίσιμα σημεία ελέγχου (Critical Control Points) της παραγωγικής διαδικασίας [151].

Μετά την παραλαβή του στο τυροκομείο και τους απαραίτητους ελέγχους (CCP), το γάλα διηθείται (CCP, εξάλειψη φυσικών κινδύνων), ψύχεται στους 4°C και μεταφέρεται σε δεξαμενές συλλογής όπου διατηρείται υπό ψύξη μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τυροκόμιση. Για την παραγωγή φέτας καλής ποιότητας η οξύτητα του γάλακτος κατά την παραλαβή του στο τυροκομείο πρέπει να είναι μικρότερη από 0,23% σε γαλακτικό οξύ (23°D), το pH τουλάχιστον 6,5, και η λιποπεριεκτικότητα τουλάχιστον 6% κατά βάρος. Στη συνέχεια, το γάλα τυποποιείται (καζεΐνη/λίπος=0,8), παστεριώνεται σε HTST σύστημα (72°C για 15s και κατόπιν ψύξη στους 32°C). Η παστερίωση είναι το πιο σημαντικό CCP, για την εξάλειψη μικροβιολογικών κινδύνων, όμως δεν μπορεί να καταστρέψει ούτε να εξαλείψει την παρουσία των τοξινών και τα υπολείμματα των χημικών και φυσικών ουσιών, όπως τα αντιβιοτικά και τα μέταλλα. Ως εκ τούτου, η ύπαρξη τουλάχιστον ενός κρίσιμου σημείου ελέγχου πριν την παστερίωση είναι απαραίτητη (π.χ. παραλαβή του νωπού γάλακτος) [151]. Η καταλληλότερη μέθοδος για την εξασφάλιση ότι η συνήθης διαδικασία παστερίωσης έχει γίνει σωστά είναι το Fluorophos που είναι πολύ πιο ευαίσθητο από τη συνήθη δοκιμή αλκαλικής φωσφατάσης [151, 152].



Σχήμα 4.2: Διάγραμμα ροής παρασκευής φέτας όπου με έντονα γράμματα επισημαίνονται τα κρίσιμα σημεία ελέγχου της παραγωγικής διαδικασίας (critical control points, CCP)

Μετά την μεταφορά στον τυρολέβητα (ανοιχτού ή κλειστού τύπου) προστίθεται η εναρκτική καλλιέργεια μικροοργανισμών γιαούρτης (starter culture) σε αναλογία 1% (CCP). Η οξύτητα της καλλιέργειας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90-120°D, το δε pH της να μην είναι κατώτερο του 4,3 [150]. Το γάλα αφήνεται για περίπου 30 min στους 32°C και στη συνέχεια, προστίθεται CaCl_2 σε αναλογία 50-80 g άνυδρης ουσίας σε 1000 kg γάλα και η πυτιά, η ποσότητα της οποίας ρυθμίζεται ώστε η πήξη να γίνει σε 45-50 min. Αφού διαπιστωθεί ότι η πήξη έγινε κανονικά, ακολουθεί η διαίρεση του τυροπήγματος με τυροκόπτη σε κύβους διαστάσεων 2-3 cm³ [153]. Μετά την διαίρεση, το τυρόπηγμα αφήνεται 5-10 min να ηρεμήσει και να αποβληθεί ένα μέρος από τα υγρά του.

Στην συνέχεια, μεταφέρεται σε διάτρητα καλούπια. Το τυρόπηγμα συνεχίζει το στράγγισμα για άλλες 6h και κατόπιν αναστρέφεται στα καλούπια, κόβεται με ειδικό τυροκόπτη σε φέτες, και τοποθετείται σε πλαστικά δοχεία [151]. Το τυρί αλατίζεται με καθαρό αλάτι και τοποθετείται σε θάλαμο θερμοκρασίας 15-16°C, όπου θα διατηρηθεί 4-5 ημέρες (CCP). Στην συνέχεια, τα δοχεία αδειάζουν και το τυρί μεταφέρεται οριστικά στα λευκοσιδηρά δοχεία χωρητικότητας 17-18kg (CCP). Το δοχείο γεμίζεται με άλμη (7% σε χλωριούχο νάτριο), και τοποθετείται σε θάλαμο ωρίμανσης (16-18°C) για 2 ακόμη εβδομάδες, προκειμένου να αποκτήσει το τυρί υγρασία 56% και τιμή pH 4.4-4.6 [146]. Στην συνέχεια τα δοχεία απογεμίζονται με άλμη ίδιας πυκνότητας (7% σε NaCl), σφραγίζονται και κατόπιν τοποθετούνται στα ψυγεία θερμοκρασίας 4-5°C ή 5-8°C αν η φέτα δεν έχει ωριμάσει καλά και κατόπιν διατίθεται στην κατανάλωση. Ο συνολικός χρόνος ωρίμανσης της φέτας διαρκεί τουλάχιστον 2 μήνες [143, 151].

4. 3. Παράγοντες ασφάλειας του τυριού

Τα τυριά, όταν παρασκευάζονται από παστεριωμένο γάλα και με σωστές συνθήκες υγιεινής, είναι ασφαλή προϊόντα για τον καταναλωτή. Η ωρίμανση, για όσα τυριά ωριμάζουν, αποτελεί μηχανισμό εξυγίανσής τους μόνο από ορισμένα βακτήρια-κυρίως Gram αρνητικά, και όχι όλους τους επικίνδυνους μικροοργανισμούς. Τα σπόρια των βακτηρίων, τα οξυάντοχα βακτήρια, οι τοξίνες βακτηρίων και μυκήτων και πιθανώς ορισμένοι ιοί δεν βλάπτονται από τις δυσμενείς συνθήκες που αναπτύσσονται κατά την ωρίμανση [145]. Οι πιθανοί κίνδυνοι που απειλούν την ασφάλεια των γαλακτοκομικών τροφίμων δίνονται στον Πίνακα 4.3.

Βασιζόμενοι σε επιδημιολογικά στοιχεία και στα χαρακτηριστικά κάθε οργανισμού, πολλοί ερευνητές έχουν κατατάξει τους παθογόνους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με το τυρί σε 3 κατηγορίες επικινδυνότητας: υψηλής, μέσης και χαμηλής επικινδυνότητας.

Η *Listeria monocytogenes*, τα είδη *Salmonella* και η *E. coli* O157:H7 θεωρούνται μικροοργανισμοί υψηλής επικινδυνότητας, αφού και οι τρεις σχετίζονται με κρούσματα ασθένειας λόγω κατανάλωσης μολυσμένου τυριού. Τα μαλακά και ημίσκληρα τυριά με υψηλή ενεργότητα νερού, και ιδιαίτερα όταν παράγονται από μη παστεριωμένο γάλα, απαιτούν επιπλέον προσοχή ακόμη και έλεγχο για παρουσία βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Η επιμόλυνση του γάλακτος μετά την παστερίωση είναι και ο βασικότερος κίνδυνος για τα τυριά που παράγονται από παστεριωμένο γάλα. Πρέπει να επισημανθεί, πάντως, ότι τα τυριά που παρασκευάζονται από μη παστεριωμένο γάλα αποτελούν την κύρια αιτία για εμφάνιση κρουσμάτων λόγω κατανάλωσης τυριού [154].

Πίνακας 4.3: Οι πιθανοί κίνδυνοι και τα ξένα σώματα στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα

Μικροβιολογικοί κίνδυνοι	Χημικοί κίνδυνοι	Φυσικοί κίνδυνοι
• <i>Bacillus cereus</i> • <i>Brucella spp.</i> • <i>Campylobacter jejuni</i> • <i>Coxiella burnetii</i> • <i>Cronobacter sakazakii</i> • <i>Cryptosporidium parvum</i> • <i>Pathogenic Escherichia coli</i> • <i>Enterohaemorrhagic E. coli</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Leptospira</i> • <i>Mycobacterium bovis</i> • <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> • <i>Salmonella (non-typhi)</i> • <i>Shigella spp.</i> • <i>Staphylococcus aureus (enterotoxins)</i> • <i>Yersinia enterocolitica</i> • Μεταδιδόμενα παθογόνα μικρόβια όπως hepatitis A, <i>Salmonella typhi</i> & <i>paratyphi</i>	• Κατάλοιπα αντιβιοτικών • Αντιβιοτικά • Φυτοφάρμακα • Ορμόνες • Διοξίνες • Αφλατοξίνη M1 • Βαρέα μέταλλα • Ραδιοενεργοί ρυπαντές • Ρυπαντές συσκευασίας (δισφαινόλη Α) • Μελαμίνη και άλλες προσμίξεις	• Μεταλλικά θραύσματα, βίδες και καρφιά • Ρινίσματα μηχανήματος • Κομμάτια από γυαλί • Κοσμήματα • Πέτρες • Μονωτικά / χρώμα • Θραύσματα πλαστικών υλικών • Προσωπικά αντικείμενα, όπως κουμπιά, θραύσματα νυχιών, βερνίκι νυχιών, και γάζες • Τρίχες, σκόνη, τμήματα εντόμων

4.3.1. Ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε τυρί και γαλακτοκομικά προϊόντα

Η *Listeria monocytogenes* έχει εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων [141]. Από τα γαλακτοκομικά είδη το τυρί είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο εξαιτίας της σχέσης του με τις τροφικές λοιμώξεις λιστερικού τύπου (Υποκεφ. 1.4.3). Η *Listeria monocytogenes* έχει την ικανότητα να επιβιώνει κατά την παρασκευή και ωρίμανση πολλών τυριών και ιδιαιτέρως στα μαλακά και ημίσκληρα τυριά (0,5%–46% παρουσία), όπου έχουν αναφερθεί πληθυσμοί της τάξης 10^5 και 10^7 cfu/g [155]. Σε μια μελέτη που διεξήχθη στην Ιρλανδία, 351 δείγματα τυριού συλλέχθηκαν από 15 παραγωγούς τυριού και αναλύθηκαν για μικροβιολογική ποιότητα σε μηνιαία βάση καθ' όλη τη χρονιά. Ο αναφερόμενος επιπολασμός (prevalence) της *L. monocytogenes* ήταν 5,9%. Από τα 21 δείγματα τυριού που βρέθηκαν θετικά σε *L. monocytogenes*, μόνο το 3% είχαν αριθμούς που υπερέβαιναν τα $2 \log \text{cfu g}^{-1}$ [156]. Σε μία άλλη μελέτη, από τα 90 δείγματα διαφόρων τυριών που αναλύθηκαν, το 6.7% βρέθηκαν θετικά για την *L. monocytogenes*. Τα δείγματα με πολύ μεγάλη υγρασία είχαν και τον μεγαλύτερο αριθμό θετικών δειγμάτων [155].

Το βακτήριο συγκεντρώνεται συνήθως στο τυρόπηγμα, με μόνο μικρό αριθμό κυττάρων να βρίσκονται στον ορρό γάλακτος [17]. Η παρουσία του μικροοργανισμού στο τελικό προϊόν εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τον αριθμό των χειρισμών του τυριού κατά την παρασκευή του [157]. Συγκεκριμένα, καθορίζεται από τις μικροβιακές,

βιοχημικές και φυσικές ιδιότητες του τυριού. Όντας ένα αρκετά περίπλοκο σύστημα το τυρί, παράγοντες όπως οι ακόλουθοι που δρουν συγχρόνως καθορίζουν την τύχη της *L.monocytogenes* κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσης του τυριού: i) ο τύπος, η ποσότητα και η δραστικότητα της προστιθέμενης καλλιέργειας, ii) το pH έτσι όπως ρυθμίζεται από το γαλακτικό, το οξικό, το μυρμηκικό και άλλα οξέα, iii) η παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου, διακετυλίου και άλλων αντιμικροβιακών (π.χ. νισίνη), iv) το επίπεδο των θρεπτικών ουσιών, του αλατιού, της υγρασίας και του οξυγόνου, v) η θερμοκρασία ωρίμανσης. Στο μαλακό τυρί η μόλυνση εντοπίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην επιδερμίδα (επιφάνεια). Αυτό είναι αποτέλεσμα της αύξησης του pH και της πρωτεόλυσης που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του τυριού κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης [17].

Στην Ελλάδα, τα θετικά για είδη *Listeria* δείγματα ανέρχονταν στο 3.75% για νωπό αγελαδινό, 6% για νωπό κατσικίσιο, 6% για αιγοπρόβειο γάλα και σε 20% για περιβαλλοντικά δείγματα από 8 διαφορετικά γαλακτοκομικά [158].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

5. 1. Ασηπτική τεχνική

Με τον όρο *ασηπτική τεχνική* περιγράφουμε το σύνολο των μέτρων και των χειρισμών με τους οποίους αποφεύγονται οι μολύνσεις αποστειρωμένων υλικών και αντικειμένων. Η ασηπτική τεχνική αποσκοπεί στο να προφυλάξει τον ασκούμενο με καλλιέργειες μικροοργανισμών, από πιθανή μόλυνση, και να διασφαλίσει την ανάπτυξη καθαρής καλλιέργειας του προς μελέτη μικροοργανισμού. Για να επιτευχθεί καθαρή καλλιέργεια πρέπει να αποστειρωθεί το μέσο της καλλιέργειας και να διατηρείται στείρο, καθώς και να εμβολιαστεί το στείρο αυτό μέσο με ένα μόνο μικροοργανισμό χωρίς εξωτερικές μολύνσεις.

Η αποστείρωση του θρεπτικού υλικού που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια γίνεται στους 121 °C για 15 min έτσι ώστε να επιτευχθεί θανάτωση των μικροοργανισμών που πιθανώς υπάρχουν και μπορεί να μολύνουν την καλλιέργεια και να εμποδίσουν τη ομαλή ανάπτυξη του μικροοργανισμού που θέλουμε να καλλιεργήσουμε. Η έναρξη της καλλιέργειας γίνεται με εμβολιασμό. *Εμβολιασμός* είναι η διαδικασία κατά την οποία μικρή ποσότητα (μόλυσμα) κυττάρων ενός μικροοργανισμού μεταφέρεται στο θρεπτικό υλικό. Η μεταφορά γίνεται με ασηπτική τεχνική ώστε να διατηρηθεί αμόλυντη η καλλιέργεια και με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου [159].

Διαδικασία: Τα στάδια που ακολουθούνται είναι οι εξής:

- i) Απολύμανση του χώρου και των χεριών με διάλυμα αιθανόλης/νερού 70/30 v/v.
- ii) Αποστείρωση του μικροβιολογικού κρίκου στην φλόγα του λύχνου Bunsen, που έχουμε ανάψει για 30 min ώστε να θερμανθεί ο χώρος εντός του απαγωγού. Ο κρίκος τοποθετείται κατά την επαπτομένη του εσωτερικού κώνου της φλόγας μέχρι να αποκτήσει έντονο ερυθρό χρώμα.
- iii) Αποστείρωση των χειλών του σωλήνα και της κωνικής φιάλης αμέσως μετά το άνοιγμά τους. Το πώμα κρατείται μεταξύ των δακτύλων του δεξιού χεριού χωρίς να αφήνεται στον πάγκο και συνεχώς εντός του απαγωγού.
- iv) Παραλαβή του μολύσματος (εμβολίου) με τον κρίκο και κλείσιμο του σωλήνα και της φιάλης αφού αποστειρωθούν και πάλι τα χείλη του [159].

5. 2. Ανακαλλιέργεια του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Η ανακαλλιέργεια του βακτηρίου γίνεται για να ανανεωθεί το απόθεμα (stock) φύλαξης του βακτηρίου. Το στέλεχος του βακτηρίου που έχει χρησιμοποιηθεί γενικώς

στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων από την ομάδα μας, είναι το μη παθογόνο *L. monocytogenes* DP-L1044 (D. Portnoy, University of Pennsylvania) που προήλθε από στέλεχος γονέα (parent strain) *L. monocytogenes* L1044S, ορότυπος 1/2a, ανθεκτικό σε 1mg mL^{-1} στρεπτομυκίνη (streptomycin) [35] και προσεφέρθηκε από τον καθηγητή Dr. G.M.Smith (Dep. of Food Science & Technology, University of California, Davis, U.S.A). Αυτό μεταφέρθηκε πάνω σε κεκλιμένες καλλιέργειες (slant cultures) τον Σεπτέμβριο του 1995 από την Ομότιμη Καθηγήτρια Σοφία Μαστρονικολή.

5.2.1 Στερεή ανακαλλιέργεια του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού: Σε 500ml απεσταγμένου ύδατος διαλύονται 18.5 g θρεπτικού υλικού BHI (Brain Heart Infusion), 7.5 g άγαρ (Bacteriological Agar) και 2.5 g εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract). Το μίγμα ομογενοποιείται με συνεχή ανάδευση. Στο διάλυμα των θρεπτικών υλικών εμβαπτίζεται θερμομέτρο των 200 °C, η κωνική σκεπάζεται με αλουμινόχαρτο και οδηγείται στο αυτόκαυστο προς αποστείρωση. Η αποστείρωση γίνεται με την μέθοδο της υγρής θερμότητας και με τις εξής συνθήκες: θερμοκρασία 121 °C για 15 min υπό πίεση 1.5 atm. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, η κωνική φιάλη μεταφέρεται σε απαγωγό ασηπτικών συνθηκών και παρακολουθείται η θερμοκρασία του αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού. Μόλις αυτή φτάσει τους 48-50 °C (το άγαρ έχει σημείο πήξεως 44 °C) τότε αρχίζει η μεταφορά του στα τρυβλία (petri dish). Σε κάθε τρυβλίο μεταφέρονται περίπου 15 mL θρεπτικού υλικού. Τα γεμάτα τρυβλία τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο ώστε η θερμότητα του ενός να παρεμποδίζει τον σχηματισμό υδρατμών στο άλλο. Μετά την πήξη του θρεπτικού υλικού, τα τρυβλία τοποθετούνται ανεστραμένα, το ένα πάνω στο άλλο, σε απαγωγό μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Εφόσον το θρεπτικό υλικό έχει πήξει στα τρυβλία ακολουθεί ο εμβολιασμός του. Από ένα παλιό τρυβλίο (stock) λαμβάνεται μια αποικία κυττάρων του βακτηρίου με το μικροβιολογικό κρίκο και μεταφέρεται σε νέο τρυβλίο με τη μέθοδο των γραμμώσεων. Τελικά τα εμβολιασμένα τρυβλία τοποθετούνται ανάποδα (το θρεπτικό υλικό προς την επάνω πλευρά) σε κλίβανο στους 30 °C για 48 ώρες ώστε να αναπτυχθούν οι νέες αποικίες των κυττάρων του *L. monocytogenes*. Μετά το τέλος της επώασης τα τρυβλία κλείνονται με παραφίλμ και αποθηκεύονται ανάποδα στους 4 °C όπου μπορούν να διατηρηθούν για 3 μήνες.

Αντιδραστήρια - Συσκευές

- BHI (DIFCO, Σύσταση (g/L): Calf Brains Infusion 200, Beef Heart Infusion 250, Bacto Proteose Peptone 10, Sodium Chloride 5, Bacto Dextrose 2, Disodium Phosphate 2, (pH= 7.4±0.2),

- Bacteriological Agar (GIBCO)
- Yeast Extract (OXOID)
- Ζυγός
- Αυτόκαυστο (Autester-Edry CE 95 (CD 4043720, No 296622), J.P Selecta s.a, Espagna)
- Βιδωτοί γυάλινοι σωλήνες pyrex
- Τρυβλία (petri dish)
- Μικροβιολογικός κρίκος

5.2.2 Ανακαλλιέργεια του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε γλυκερόλη

Παρασκευή θρεπτικού υλικού: Τοποθετούνται 0,5 mL γλυκερόλης (analytical grade) σε κάθε κρυοφιαλίδιο (cryovial) των 2ml (το καθένα προορίζεται για μια μόνο χρήση) και οδηγούνται προς αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min, υπό πίεση 1,5 atm. Ζυγίζονται 3,7 g BHI και διαλύονται σε 100 mL απεσταγμένου νερού. Το παραπάνω διάλυμα χωρίζεται σε βιδωτούς σωλήνες ανά 10 mL και αποστειρώνεται. Το κρυοφιαλίδιο όπου φυλάσσεται το επιθυμητό στέλεχος του βακτηρίου, βγαίνει από την κατάψυξη και αφήνεται για περίπου μια ώρα (ίσως και λιγότερο) στον μικροβιολογικό θάλαμο για να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου γίνεται επιμόλυνση κάθε σωλήνα με το βακτήριο, υπό ασηπτικές συνθήκες και οι σωλήνες αφήνονται σε κλίβανο στους 30 °C για 24 h προς επώαση. Την επόμενη ημέρα τα επωασμένα (θολωμένα) εμβόλια βγαίνουν από τον κλίβανο των 30 °C, αναδεύονται και μεταφέρεται 0,5 mL εμβολίου σε κάθε κρυοφιαλίδιο, υπό ασηπτικές συνθήκες, ώστε καθένα να περιέχει 1:1 γλυκερόλη:εμβόλιο. Τα κρυοφιαλίδια αναδεύονται για να προκύψει ομοιογενές μείγμα και αποθηκεύονται στους -20 °C.

Αντιδραστήρια - Συσκευές

- BHI (DIFCO)
- Βιδωτοί γυάλινοι σωλήνες pyrex
- Μικροβιολογικός κρίκος
- Αυτόκαυστο
- Κρυοφιαλίδιο 2 ml
- Γλυκερόλη

5. 3. Υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού: Σε 1 λίτρο ύδατος διαλύονται 37 g BHI. Για την ομογενοποίηση του μίγματος χρησιμοποιείται ανάδευση και θέρμανση σε ζέον υδρόλουτρο. Μετά την πλήρη ομογενοποίηση του μίγματος, μεταφέρονται από 10ml θρεπτικού υλικού σε τρεις βιδωτούς σωλήνες. Ένας από αυτούς τους σωλήνες θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια για τη δημιουργία του εμβολίου ενώ οι άλλοι δύο θα χρησιμοποιηθούν ως τυφλά δείγματα για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας. Η κωνική φιάλη κλείνεται με αλουμινόχαρτο ενώ οι σωλήνες βιδώνονται χαλαρά και οδηγούνται για αποστείρωση στο αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min.

Παρασκευή εμβολίου και εμβολιασμός της καλλιέργειας.

Το εμβόλιο λειτουργεί ως στάδιο αναζωογόνησης του βακτηρίου, μετά από το μεγάλο χρονικό διάστημα φύλαξης του βακτηρίου, σε γλυκερόλη στους -20 °C ή σε εμπλουτισμένα BHI τρυβλία στους 5 °C.

Μετά την αποστείρωση το θρεπτικό υλικό στους σωλήνες αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί ο εμβολιασμός τους με κύτταρα του επιθυμητού βακτηρίου, από αποικία τρυβλίου. Τα κύτταρα αποξέονται από το στερεό θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου ο οποίος στη συνέχεια εμβαπτίζεται στο υγρό θρεπτικό υλικό του σωλήνα. Όλη η διαδικασία γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο σωλήνας με το μόλυσμα επωάζεται στους 30 °C για 24 ώρες. Στην περίπτωση που μετά το πέρας της επώασης, στον πυθμένα του σωλήνα έχουν καταβυθιστεί κύτταρα του βακτηρίου, θα πρέπει ο σωλήνας να ανακινηθεί καλά ώστε αυτά να αναδιασπαρθούν στο διάλυμα. Ακολουθεί απόχυση του περιεχομένου του σωλήνα στην κωνική του 1 L. Η ανάπτυξη της καλλιέργειας έγινε για την παρούσα εργασία στους 30 °C στον κλίβανο.

Αντιδραστήρια - Συσκευές:

- BHI (DIFCO)
- Αυτόκαυστο,
- Κωνική φιάλη των 2 L,
- Βιδωτοί γυάλινοι σωλήνες pyrex
- Μικροβιολογικός κρίκος.

5. 4. Έλεγχος της ανάπτυξης της υγρής καλλιέργειας

Η ανάπτυξη μιας υγρής καλλιέργειας κυττάρων παρακολουθείται μετρώντας μια επιλεγμένη παράμετρο κατά διαστήματα καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Τέτοιες, κατάλληλα επιλεγμένες παράμετροι, είναι η οπτική πυκνότητα OD, ο αριθμός κυττάρων,

το pH, το ξηρό βάρος κυττάρων και η ολική πρωτεΐνη κυττάρων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η οπτική πυκνότητα (θολερότητα).

5.4.1 Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD)

Αρχή της μεθόδου: Η καμπύλη που λαμβάνεται από τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας σε διάφορες χρονικές στιγμές, $A_{(600\text{ nm})}=f(t)$, ονομάζεται καμπύλη ανάπτυξης και αποτελείται από τις εξής φάσεις: (α). Φάση λανθάνουσα ή επωαστική ή αρχικής στασιμότητας, (β). Φάση λογαριθμικής ανάπτυξης, (γ). Φάση στασιμότητας, (δ). Φάση κάμψης. Θα πρέπει να τονιστεί ότι οι συνθήκες ανάπτυξης του βακτηρίου (π.χ. Παροχή οξυγόνου, θερμοκρασία, pH, σύσταση θρεπτικού υλικού, χρόνος κτλ) πρέπει να είναι συγκεκριμένες και να εφαρμόζονται αυστηρά σε κάθε καλλιέργεια. Η αναλυτική πορεία προσδιορισμού της οπτικής πυκνότητας παρατίθεται αναλυτικά παρακάτω.

Διαδικασία: Η υγρή καλλιέργεια των κυττάρων έχει ετοιμαστεί και βρίσκεται στην φάση επώασης στον κλίβανο στους 30 °C. Βγάζουμε αυτήν από τον κλίβανο και την τοποθετούμε σε απαγωγό, με ασηπτικές συνθήκες. Λαμβάνεται με αποστειρωμένο σιφώνιο δείγμα καλλιέργειας 2 mL και αποχύνεται σε κυψελίδα. Επίσης σε μια άλλη κυψελίδα αποχύνεται ποσότητα τυφλού. Κατά τη λήψη του δείγματος η καλλιέργεια αναδεύεται έντονα, ώστε τα κύτταρα που έχουν κατακαθίσει στον πυθμένα της να αναδιασπαρούν στο διάλυμα της καλλιέργειας, και να γίνει αυτό ομογενές. Μετράται η απορρόφηση του δείγματος στους 600 nm σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές και συσχετίζονται οι τιμές απορρόφησης με τη θολερότητα της καλλιέργειας, η οποία οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του βακτηρίου στην δεδομένη στιγμή ανάπτυξης.

Αντιδραστήρια - Συσκευές

- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS (Novaspec II)
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια των 10ml (μιας χρήσης) T.D. 20 °C
- Υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου *L. monocytogenes* & τυφλό
- Κυψελίδες 4ml

5.5. Καταμέτρηση αποικιών του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε εμπλουτισμένο υπόστρωμα BHI

Αρχή της μεθόδου. Η μέθοδος αρίθμησης αποικιών (spread plates count) είναι μια προσαρμογή του τρόπου καλλιέργειας δια μετασποράς. Ξεκινάνε και οι δύο από την ίδια αρχή, ότι δηλαδή από ένα μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται μία και μόνο αποικία και συνεπώς η μέτρηση των αποικιών δίνει τον αριθμό των μικροοργανισμών

απ' όπου προήλθαν. Η μέθοδος όμως αυτή δεν μετρά απαραίτητα τον πραγματικό συνολικό αριθμό των ζωντανών κυττάρων ανά μονάδα δείγματος, αφού τα βακτηριακά κύτταρα υφίστανται μόνα τους ή σε ζευγάρια, αλυσίδες, συμπλέγματα και ομάδες. Έτσι, οι μετρήσεις που προκύπτουν από τη μέθοδο αυτή δεν πρέπει να αναφέρονται ως μετρήσεις ζωντανών κυττάρων, αλλά ως μετρήσεις αποικιών ανά μονάδα ή μονάδες σχηματισμού αποικιών ανά μονάδα (colony forming units, cfu). Η μέτρηση των αποικιών γίνεται σε μια αραιώση τέτοια ώστε να υπάρχουν 20-200 αποικίες ανά τρυβλίο και στη συνέχεια ανάγεται ο αριθμός των βακτηρίων στο αρχικό διάλυμα ή στο τρόφιμο [159, 160].

Διαδικασία: Ποσότητα 1 mL από την υγρή καλλιέργεια μεταφέρεται ασηπτικά σε σωλήνα με 9ml αποστειρωμένο νερό και ακολουθεί η παρασκευή διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Εν συνεχεία ποσότητα 0,1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση που κρίνουμε ότι θα έχει μετρήσιμο αποτέλεσμα ενοφθαλμίζεται με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης σε τρυβλία (BHI, Bacteriological Agar, Yeast Extract) που παρασκευάζονται σύμφωνα με τον τρόπο που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 6.2.1. Τα τρυβλία τοποθετούνται ανάποδα (για την αποφυγή σχηματισμού υδρατμών) σε θάλαμο επώασης (κλίβανο) στους 30 °C για 24 έως 48 h για να αναπτυχθούν οι αποικίες.

Αντιδραστήρια - Συσκευές

- BHI (DIFCO), Bacto Agar (GIBCO), Yeast Extract (OXOID)
- Αυτόκαυστο
- Κλίβανος
- Βιδωτοί γυάλινοι σωλήνες pyrex
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια των 10 mL και 1 mL (μιας χρήσης) T.D. 20 °C
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur 230mm
- Σπάτουλες
- Σακούλες αποστείρωσης 51,5×31 cm
- Παραφίλμ

5. 6. Καταμέτρηση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα

Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος καταμέτρησης των βακτηρίων *L.monocytogenes*, στην εργασία αυτή, βασίζεται στο ISO 11290-2 & Amd.1:2004 για την ανίχνευση και την καταμέτρηση της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα και ζωοτροφές [161]. Περιλαμβάνει τα δυο πρώτα στάδια της διαδικασίας: τον πρωταρχικό εμπλουτισμό και την εκλεκτική απομόνωση. Στην εργασία χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά εκλεκτά θρεπτικά υλικά

το Brilliance Listeria Agar Base και το PALCAM.

Brilliance Listeria Agar Base, παλαιότερα Oxoid Chromogenic Listeria Agar (OCLA), είναι μια τροποποίηση της συνθέσεως που περιγράφεται από Ottaviani και Agosti [162] και έχει χρησιμοποιηθεί πρόσφατα σε αναλύσεις ρουτίνας για την ανίχνευση και καταμέτρηση της *L. monocytogenes* σε δείγματα τροφίμων. Όπως και στην αρχική διαμόρφωση (μέθοδος ALOA¹), το θρεπτικό έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό των *Listeria spp.* και βασίζεται στη χρήση εκ μέρους των, ενός χρωμογόνου υποστρώματος. Ωστόσο, σε αυτή την τροποποίηση, τα παθογόνα *Listeria spp.* στη συνέχεια διαφοροποιούνται περαιτέρω από την ανίχνευση της δραστηριότητας της λεκιθινάσης PC-PLC και όχι της PI-PLC. Αμφότερα τα ένζυμα, συνδέονται με τη μολυσματικότητα των *Listeria spp.*, και, ως εκ τούτου, η παρουσία έστω ενός ενζύμου είναι ένας χρήσιμος δείκτης της παθογένειας. Τα τρυβλία OCLA εμφανίζουν τις αποικίες μόνο του συγκεκριμένου βακτηρίου με μπλε χρώμα και άχρωμη άλος.

PALCAM Agar αναπτύχθηκε το 1989 από τους Van Netten et al [163] ως ένα βελτιωμένο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, για την απομόνωση της *L. monocytogenes* από τα τρόφιμα και από τα κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα. Βελτιωμένη επιλεκτικότητα επιτυγχάνεται με τον συνδυασμό των συμπληρωμάτων αντιβιοτικά και μικροαερόβιο επώασης, ενώ το διπλό σύστημα δεικτών (αισκουλίνης+δισθενούς σιδήρου και μαννιτόλη+ερυθρό φαινόλης) βοηθά την διαφοροποίηση των *Listeria spp* από εντερόκοκκοι και σταφυλόκοκκοι που σε άλλους τύπους μέσων καλλιέργειας μπορεί να συγχέονται. Η *Listeria monocytogenes* υδρολύει την αισκουλίνη με αποτέλεσμα το σχηματισμό μίας μαύρης άλους γύρω από τις αποικίες. Η *Listeria monocytogenes* δεν ζυμώνει την μαννιτόλη, όπως οι εντερόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι. Στην περίπτωση παρουσίας των τελευταίων, το σκεύασμα παράγει μια αλλαγή από κόκκινο σε κίτρινο στο δείκτη ερυθρού φαινόλης. Έχει αναφερθεί ότι η προσθήκη του κρόκου αυγού στο θρεπτικό PALCAM βοηθάει την επιβίωση των κατεστραμμένων κυττάρων [164].

Διαδικασία: Ζυγίζονται 25gr δείγματος σε ειδική αποστειρωμένη σακούλα και προστίθενται υπό ασηπτικές συνθήκες 225ml αποστειρωμένου διαλύματος εμπλουτιστικού μέσου (Fraser για την καταμέτρηση σε OCLA ή Buffered Peptone Water (BPW) για την καταμέτρηση σε PALCAM) που παρασκευάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευαστικής εταιρίας. Το διάλυμα αυτό έχει την ικανότητα να απομονώνει το συγκεκριμένο βακτήριο της *L. monocytogenes* από το γάλα και άλλα γαλακτοκομικά

¹ ALOA (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti)) έχει επικυρωθεί ως έτοιμο προς χρήση θρεπτικό και συνιστάται από την ISO 11290-1 Amd.1:2004 και ISO 11290-2 Amd.1:2004 για την ανίχνευση και την καταμέτρηση της *L.monocytogenes* σε τρόφιμα και ζωοτροφές [161, 193]

προϊόντα. Ακολουθεί ομογενοποίηση με έντονη μάλαξη. Το μίγμα που προκύπτει αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να 'ηρεμήσει' επί 20 min. Εν συνεχεία μαλάσσεται λίγο ακόμη κι αφήνεται ακόμη 5 min να "ηρεμήσει". Ποσότητα 1 mL από το ομογενοποιημένο δείγμα σε εμπλουτιστικό (1:9) μεταφέρεται ασηπτικά σε σωλήνα με 9 mL αποστειρωμένο διαλύματος εμπλουτιστικού και ακολουθεί η παρασκευή διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Εν συνεχεία ποσότητα 0,1 mL από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση που κρίνουμε ότι θα έχει μετρήσιμο αποτέλεσμα ενοφθαλμίζεται με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης στα εκλεκτικά τρυβλία που παρασκευάζονται με τον τρόπο που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 6.2.1, ακολουθώντας τις οδηγίες της παρασκευαστικής εταιρίας [165]. Μετά τον εμβολιασμό τους, τα τρυβλία κλείνονται καλά με παραφίλμ και τοποθετούνται ανάποδα (για την αποφυγή σχηματισμού υδρατμών) σε θάλαμο επώασης (κλίβανο) στους 37 °C για 24 h ενώ η εξέλιξή τους παρακολουθείται για ακόμη 24 - 48 h.

Αντιδραστήρια - Συσκευές.

- Brilliance Listeria Agar Base (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England, code CM1080, Σύσταση (g/L) : Peptone 18,5; Yeast extract 4; Sodium chloride 9,5; Sodium Pyruvate 2; Lithium chloride 15; Maltose 4; X-glucoside chromogenic mix 0,2; Agar 14; pH 7,2±0,2 στους 25°C).
- Fraser Broth Base (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England, code: CM0895 Σύσταση (g/L): Proteose Peptone 5; Tryptone 5; "Lab-Lemco" powder 5; yeast extract 5; Sodium chloride 20; Disodium hydrogen phosphate 12; Potassium dihydrogen phosphate 1.35; Aesculin 1; Lithium chloride 3; pH 7,0±0,2 στους 25°C)
- Εκλεκτικό Συμπληρωματικό OCLA1 (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England code SR0227E, Σύσταση (mg, για 500ml θρεπτικό): Nalidixic acid 13, Polymyxin B 5 , Gefazidime 3, Amphotericin 5)
- Εκλεκτικό Συμπληρωματικό OCLA2 (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England code SR0228E, Σύσταση για 500ml θρεπτικό: Λεκιθίνη 20 mL
- PALCAM Agar Base (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England, code CM0877, Σύσταση (g/L) : Columbia Blood Agar Base 39; Yeast extract 3; Glucose 0.5 Aesculin 0.8; Ferric Ammonium Citrate 0.5; Mannitol 10; Phenol Red 0.08; Lithium chloride 15; pH 7,2±0,2 στους 25°C).
- Buffered Peptone Water, (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England, code CM0509, Σύσταση mg/L: Peptone 10; Sodium chloride 5; Disodium phosphate 3.5; Potassium dihydrogen phosphate 1.5; pH 7,0±0,2 στους 25°C)
- Egg Yolk Emulsion (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England, code SR0047)

- Εκλεκτικό Συμπληρωματικό PALCAM1 (Oxoid LTD, Basingstone, Hampshire, England, code SR0150E, Σύσταση mg/L): Polymyxin B 10, Geftazidime 20, Acriflavine hydrochloride 5)
- Αυτόκαυστο
- Κλίβανος
- Σακούλες δειγματοληψίας – Sterile bags for BagMixer (Bag Light interscience, 20×25cm, 400ml)
- Βιδωτοί γυάλινοι σωλήνες pyrex
- Πλαστικά αποστειρωμένα σιφώνια των 10ml και 1ml (μιας χρήσης) T.D. 20°C
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur 230mm
- Σπάτουλες
- Σακούλες αποστείρωσης 51,5×31cm
- Παραφίλμ

5. 7. Παρατήρηση του βακτηρίου σε μικροσκόπιο

Ιστορικά, ήταν το μικροσκόπιο που αποκάλυψε για πρώτη φορά την παρουσία των βακτηρίων και αργότερα, τα μυστικά της δομής των κυττάρων. Σήμερα, εξακολουθεί να είναι ένα ισχυρό εργαλείο στην κυτταρική βιολογία.

5.7.1 Χρώση Gram και παρατήρηση του βακτηρίου σε οπτικό μικροσκόπιο

Στα τέλη του 1800, ο δανέζος βακτηριολόγος Christian Gram ανέπτυξε μία μέθοδο για τη χρώση των βακτηριακών κυττάρων, που χώριζε εμπειρικά τα κύτταρα σε δυο ομάδες. Οι ομάδες αυτές, γνωριζόμενες ως Gram θετικά (μοβ χρώμα) και Gram αρνητικά (ροζ χρώμα), χωρίζονταν με βάση το χρώμα των κυττάρων μετά από τη χρήση μίας σειράς χρωστικών. Η μέθοδος στηρίζεται στη χρήση μιας κατιονικής χρωστικής (θετικά φορτισμένης), που συνδέεται με αρνητικά φορτισμένα συστατικά του κυττάρου όπως νουκλεϊκά οξέα ή όξινους πολυσακχαρίτες. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στη διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος στους δύο τύπους βακτηρίων και είναι θεμελιακή ιδιότητα που συνδέεται με διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παθογένεια, την αντοχή στα αντιβιοτικά και άλλους παράγοντες [159, 166]. Τα Gram θετικά βακτήρια έχουν παχύτατα τοιχώματα από πολλές στιβάδες πεπτιδογλυκάνης (μουρεΐνης). Με την προσθήκη αιθανόλης, η πεπτιδογλυκάνη αφυδατώνεται και συρρικνώνεται, δημιουργώντας ένα αδιαπέραστο εμπόδιο για το αδιάλυτο σύμπλοκο ιωδίου και κρυσταλλικού ιώδους (μια πορφυρή βαφή) που σχηματίζεται μέσα στο κύτταρο. Αντίθετα στα Gram αρνητικά βακτήρια, η

πεπτιδογλυκάνη στο κυτταρικό τοίχωμα είναι λεπτή με πολλούς πόρους και με την προσθήκη αιθανόλης δεν παρουσιάζεται συρρίκνωση, άρα η αιθανόλη λειτουργεί ως παράγοντας για την απομάκρυνση του συμπλόκου ιωδίου-κρυσταλλικού ιώδους και την μετέπειτα χρώση των κυττάρων με μία διαφορετική χρωστική. Η χρώση Gram είναι μία διαφοροποιητική χρώση. Δείχνει όχι μόνο αν το βακτήριο είναι θετικό ή αρνητικό κατά Gram (άμεση δράση κλινικά, με τα σωστά αντιβιοτικά), αλλά η χρώση αποκαλύπτει και την μορφή του βακτηρίου (σφαιρικό, ραβδόμορφο ή σπειροειδές σχήμα) [166, 167].

Διαδικασία: Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου μίας χρήσεως, απλώνουμε μια σταγόνα από την υπό έξεταση καλλιέργεια σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Στερεώνουμε την αντικειμενοφόρο πλάκα με ξύλινη λαβίδα και την περνάμε λίγες φορές πάνω από τη φλόγα του λύχνου με προσοχή, μέχρι να εξατμιστεί το θρεπτικό υγρό, για προσήλωση του παρασκευάσματος. Καλύπτεται με αιθανόλη για 1 min. Ξεπλένεται με νερό. Διαβρέχουμε το παρασκεύασμα με δυο σταγόνες methyl violet, και μετά από 1 min, απομακρύνεται η περίσσεια της χρωστικής με νερό και το παρασκεύασμα επεξεργάζεται με Lugol για 1 min. Το παρασκεύασμα ξεπλένεται με αλκοόλη (σταγόνα-σταγόνα) ώσπου οι σταγόνες του εκπλύματος να μην έχουν πλέον χρώμα. Στο στάδιο αυτό μόνο τα θετικά Gram κύτταρα διατηρούν το μοβ χρώμα, τα υπόλοιπα αποχρωματίζονται². Το παρασκεύασμα καλύπτεται με φουξίνη για 15 sec και στη συνέχεια ξεπλένεται η περίσσεια της χρωστικής με νερό. Η περίσσεια του νερού απομακρύνεται με απορροφητικό χαρτί, χωρίς αυτό να σύρεται στην επιφάνεια της πλάκας. Ακολουθεί μικροσκοπική παρατήρηση σε μεγέθυνση ×40 και στη συνέχεια ×100 (με ελαιοκατάδυση).

Αντιδραστήρια – Συσκευές:

- Υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*
- Αντικειμενοφόρες πλάκες
- Μικροβιολογικός πλαστικός κρίκος μίας χρήσεως
- Σετ χρώσης Gram (methyl violet, Lugol, φουξίνη)
- Αιθανόλη 95% (Lab Scan)
- Μικροσκόπιο Motic, B1 series με φωτογραφική μηχανή Canon EOS 450D

5.7.2 Παρατήρηση του βακτηρίου σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Αρχή της μεθόδου: Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ΗΜΣ (Scanning Electron Microscope – SEM) δημιουργήθηκε αρχικά από την ανάγκη παρατήρησης, αλλά και χημικής ανάλυσης, επιφανειών.

² Εφόσον έχουμε καθαρή καλλιέργεια της *L.monocytogenes* που είναι Gram θετικό βακτήριο, η διαδικασία χρώσης διακόπτεται σε αυτό το σημείο.

Το ΗΜΣ στηρίζεται στην αρχή λειτουργίας ενός καθοδικού σωλήνα και περιέχει πηνία για την απόκλιση της δέσμης των ηλεκτρονίων, η οποία σαρώνει την επιφάνεια του παρασκευάσματος. Η αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων με το παρασκεύασμα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα: α) την ανάκλαση των ηλεκτρονίων αυτών (οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια - backscattered electrons), β) την έξοδο ηλεκτρονίων από την επιφάνεια του παρασκευάσματος (δευτερογενή ηλεκτρόνια - secondary electrons) και γ) την ελευθέρωση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που χαρακτηρίζει τη σύσταση του παρασκευάσματος. Τα μεταλλικά παρασκευάσματα είναι αγωγά, ενώ τα βιολογικά όχι και για το λόγο αυτό γίνεται κάλυψη με στρώμα Χρυσού –Παλλαδίου Au-Pd (περίπου 10 nm σε πάχος), η οποία όμως αυξάνει το πραγματικό μέγεθος των λεπτομερειών. Η κάλυψη προσφέρει, εκτός από ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, και καλύτερη μηχανική στήριξη πολλών ευαίσθητων παρασκευασμάτων. Επιπλέον, εξασφαλίζεται μια ισχυρότερη δέσμη δευτερευόντων ηλεκτρονίων [168].

Διαδικασία: Η επώαση της καλλιέργειας διακόπτεται την κατάλληλη χρονική στιγμή ώστε η ανάπτυξη του βακτηρίου να βρίσκεται στην επιθυμητή φάση. Μετράται η οπτική πυκνότητα. Η καλλιέργεια του 0,2 L μεταφέρεται από την κωνική φιάλη σε 2 πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 100 ml. Τα δοχεία ζυγοσταθμίζονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000 rpm (5877×g) για 6 min στους 0-4 °C. Σε αυτό το σημείο διακόπτεται η ανάπτυξη της καλλιέργειας. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και αποστειρώνεται ενώ τα κύτταρα διασπείρονται σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (buffer phosphate pH=7) σε κάθε δοχείο και ενώνονται στη συνέχεια με αποτέλεσμα μετά από αυτό το στάδιο να έχουμε συγκεντρώσει το σύνολο των κυττάρων της υγρής καλλιέργειας της *L. monocytogenes* σε ένα δοχείο και σε συνολικό όγκο 50 mL ρυθμιστικού. Το δοχείο ζυγοσταθμίζεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και αποστειρώνεται και τα κύτταρα επαναδιασπείρονται σε 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. 1 mL από το εναιώρημα μεταφέρεται σε μικροσωληνάκι Eppendorf και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες (5877×g, 6 min, 0-4 °C) που αναφέρθηκαν παραπάνω στο επιτραπέζιο φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και αποστειρώνεται. Στο σημείο αυτό έχουμε το επιθυμητό αριθμό κυττάρων και αρχίζει το στάδιο της μονημοποίησης. Προστίθεται στο σωληνάκι Eppendorf 1 mL γλουταρική αλδεΐδη 1% v/v (glutaraldehyde) σε κακοδυλικό νατρίου 0,15 M (sodium cacodylate), και αφήνεται σε ηρεμία στους 4°C, για 30 λεπτά. Μετά, φυγοκέντρηση και απόχυση του υπερκείμενου υγρού. Ακολουθεί

προσθήκη 1ml ρυθμιστικού διαλύματος κακοδυλικού νατρίου pH=7, παραμονή στους 4 °C, για 10 λεπτά, φυγοκέντρηση και απόχυση του υπερκείμενου υγρού. Η τελευταία αυτή φάση επαναλαμβάνεται ακόμη μία φορά. Μετά προστίθεται το 2^ο αντιδραστήριο μονιμοποίησης το οξείδιο του οσμίου OsO₄ 1% (w/v) σε κακοδυλικό νατρίου 0,15M και αφήνεται σε ηρεμία στους 4°C, για 12-20h. Αφυδάτωση του ιστού επιτεύχθηκε μέσω διαβαθμισμένης σειράς αιθανόλης (70%, 80%, 90%, 95% και 3×100%). Το δείγμα τελικά τοποθετείται στον ειδικό υποδοχέα (stub) του ΗΜΣ για να ξεκινήσει η κάλυψη με χρυσό, για 1 λεπτό. Ακολουθεί ηλεκτρονική μικροσκοπική παρατήρηση σε μεγέθυνση ×100 και στη συνέχεια ×1000 [169].

Αντιδραστήρια – Συσκευές:

- Υγρή καλλιέργεια του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*
- Μικροσωληνάκια Eppendorf
- Φυγόκεντρος (Sorvall RC2-B Automatic Superspeed Refrigerated Centrifuge με κεφαλή GSA-3427, ακτίνας 5.75 in, ή Dupont Sorvall RC-5B Automatic Superspeed Refrigerated Centrifuge με κεφαλή Dupont Sorvall HS-4, ακτίνας 5.75in (14.60 cm), 7000 rpm max.)
- Γλυκερική αλδεΐδη (Glutaraldehyde 25%, Serva, Code: 23114)
- Κακοδυλικό νάτριο (Cacodylic acid sodium salt trihydrate, Merck, Code: 1032560100)
- Οξείδιο του οσμίου (Osmium tetroxide, Polyscience, Code: 20816)
- Αιθανόλη (Lab-Scan, HPLC degree)
- Συσκευή κάλυψης δειγμάτων Tousimis Samsputter-2a
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης Philips SEM 515
- Φωτογραφική μηχανή Canon EOS 450D

5. 8. Συλλογή κυττάρων και εκχύλιση λιπιδίων κατά Folch

Δύο από τις σημαντικότερες μεθόδους για την εκχύλιση λιπιδίων από τους ιστούς, είναι η Bligh-Dyer (1959) και η Folch (1957).

Η μέθοδος *Bligh-Dyer* χρησιμοποιεί ένα διαλυτικό σύστημα μιας φάσης με αναλογία χλωροφόρμιο/ μεθανόλη/ νερό 1/2/0,8 v/v/v το οποίο γρήγορα και αποδοτικά εκχυλίζει τα λιπίδια. Στη συνέχεια προστίθεται ένας όγκος χλωροφορμίου και ένα όγκος νερού οπότε σχηματίζεται διφασικό σύστημα που περιλαμβάνει μια χλωροφορμική φάση και μια υδατομεθανολική (μεθανόλη νερό 1/0,9 v/v) [170].

Στη μέθοδο *Folch* προστίθενται διαλύτες ώστε να επιτευχθεί η τελική αναλογία Χλωροφόρμιο/ Μεθανόλη /Νερό 8/4/3 v/v/v η οποία είναι κρίσιμη για την επιτυχία της

εκχύλισης. Στην αναλογία αυτή δημιουργούνται δύο φάσεις. Η πάνω φάση, (Χλωροφόρμιο/ Μεθανόλη/ Νερό 3/48/47 v/v/v) είναι κυρίως υδατομεθανολική και περιέχει όλα τα μη λιπιδικά συστατικά, τα περισσότερα από τα θραύσματα και αμελητέα ποσότητα λιπιδίων. Η κάτω φάση (Χλωροφόρμιο/ Μεθανόλη/ Νερό 86/14/1 v/v/v) είναι χλωροφορμική και περιέχει όλο το λιπιδικό εκχύλισμα [171]

Διαδικασία: Η επώαση της καλλιέργειας διακόπτεται την κατάλληλη χρονική στιγμή ώστε η ανάπτυξη του βακτηρίου να βρίσκεται στην επιθυμητή φάση. Μετράται η οπτική πυκνότητα. Η καλλιέργεια του 1lt μεταφέρεται από την κωνική φιάλη σε 4 πλαστικά δοχεία φυγοκέντρου με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 250 ml. Τα δοχεία ζυγοσταθμίζονται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6000rpm (5877xg) για 10 min στους 0-4°C. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται στην αρχική κωνική φιάλη (συλλέγεται προς αποστείρωση) ενώ τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε κάθε δοχείο. Τα περιεχόμενα των δοχείων ενώνονται στη συνέχεια ανά δύο. Ακολουθεί ζυγοστάθμιση και φυγοκέντρηση στις συνθήκες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και τα κύτταρα, επαναδιαλύονται σταδιακά σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και μεταφέρονται ποσοτικά σε προζυγισμένους σιδερένιους σωλήνες. Οι δύο σιδερένιοι σωλήνες ζυγοσταθμίζονται και πάλι και φυγοκεντρούνται με τις συνθήκες που έχουν προαναφερθεί, και το υπερκείμενο υγρό αποχύνεται και αποστειρώνεται.

Στη συνέχεια ζυγίζονται οι δύο σιδερένιοι σωλήνες μαζί με τα νωπά φυγοκεντρημένα κύτταρα ώστε να προσδιοριστεί το νωπό τους βάρος. Ακολουθεί προσθήκη εικοσαπλάσιου (του νωπού βάρους) όγκου χλωροφορμίου/μεθανόλης 2/1 v/v, σε κάθε σωλήνα και ομογενοποίηση του μίγματος σε δονητή υπερήχων για 15 min με ενδιάμεσες παύσεις. Οι σωλήνες τοποθετούνται σε ποτήρι με πάγο για να μην ανυψώνεται η θερμοκρασία. Προστίθεται 20% του όγκου του ομογενοποιημένου μεθανόλη, σε κάθε σωλήνα, και γίνεται η τελευταία φυγοκέντρηση. (Σε αυτό το στάδιο η ισοστάθμιση κάθε σωλήνα γίνεται ως προς έναν άδειο σωλήνα διότι δεν πρέπει να επηρεάσουμε τις αναλογίες των διαλυτών). Το υπερκείμενο κάθε σωλήνα συλλέγεται σε ογκομετρικό κύλινδρο και ελέγχεται αν είναι διαυγές, αλλιώς επαναλαμβάνεται η τελευταία φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια προστίθεται διπλάσιος (του όγκου μεθανόλης) όγκος χλωροφορμίου. Μετράται ο τελικός όγκος στον κάθε κύλινδρο και υπολογίζεται ο όγκος του νερού που πρέπει να προστεθεί ώστε να δημιουργηθεί η αναλογία Folch χλωροφόρμιο/μεθανόλη/νερό 8/4/3 v/v/v. Οι τύποι για τους υπολογισμούς των όγκων αντιδραστηρίων που προστίθενται σε αυτή την φάση δίνονται στον Πίνακα 5.1 και είναι

επεξεργασία των θεωρητικών για ευκολότερη χρήση, κατά την εργαστηριακή διαδικασία. Το περιεχόμενο του κυλίνδρου αποχύνεται στη διαχωριστική χοάνη και αφήνεται να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Συλλέγεται ξεχωριστά η κάτω φάση (χλωροφορμική) από κάθε μία από τις δύο χοάνες σε προζυγισμένους γυάλινους σωλήνες. Ακολουθεί η εξάτμιση της χλωροφορμικής φάσης στον κάθε σωλήνα σε ρεύμα N₂. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη οι δύο σωλήνες ζυγίζονται μέχρι σταθερού βάρους για τον προσδιορισμό του βάρους των λιπιδίων.

Πίνακας 5.1: Παρουσίαση των τύπων για το υπολογισμό του όγκου των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται στην τελευταία φάση της εκχύλισης λιπιδίων κατά Folch, πριν το διαχωρισμό.

Αντιδραστήριο	Τύπος υπολογισμού Όγκου
Μεθανόλη MeOH	$4,2 \times m_{\text{wet cells}}^*$
Χλωροφόρμιο CHCl ₃	$8,4 \times m_{\text{wet cells}}$
Νερό H ₂ O	$(0,24 - 0,8 \times \frac{m_{\text{wet cells}}}{V_f}) \times V_f^{**}$

* νωπό βάρος κυττάρων που προσδιορίστηκε από ζύγιση.

** τελικός όγκος μετά την προσθήκη του υπολογισμένου χλωροφορμίου.

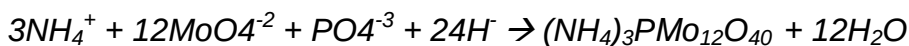
Αντιδραστήρια - Συσκευές.

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Buffer phosphate pH=7, 100mM. 13.6 g KH₂PO₄ (p.a. Merck) σε 990 mL H₂O και το διάλυμα εξουδετερώνεται έως pH=7.0 με σταγόνες από 10 mL διαλύματος KOH 10 M. Τέλος συμπληρώνεται με νερό μέχρι 1 L)
- Χλωροφόρμιο (Lab-Scan, HPLC degree)
- Μεθανόλη (Lab-Scan, HPLC degree)
- Φυγόκεντρος (Sorvall RC2-B Automatic Superspeed Refrigerated Centrifuge με κεφαλή GSA-3427, ακτίνας 5.75 in, ή Dupont Sorvall RC-5B Automatic Superspeed Refrigerated Centrifuge με κεφαλή Dupont Sorvall HS-4, ακτίνας 5.75 in (14.60 cm), 7000 rpm max.)
- Δονητής υπερήχων (Sonics Materials (40) Vibra Cell TM, Sonics & Materialising Danbury USA).
- Σιδερένιοι σωλήνες φυγοκέντρωσης (3×10 cm, Sorvall Cat no 517)

5. 9. Προσδιορισμός Φωσφόρου σε εκχυλισμένα λιπίδια

Αρχή της μεθόδου: Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά, μετά από καύση με υπερχλωρικό οξύ. Η καύση των λιπιδίων γίνεται κατά Long και Staples [172]. Στη συνέχεια, με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου, σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο το οποίο ανάγεται

προς την έγχρωμη ένωση κυανού του φωσφομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Ως αναγωγικό μέσο χρησιμοποιείται το αμινοναφθολοσουλφονικό οξύ (ANSA) [173, 174]. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μετά την καύση της οργανικής ουσίας κατά την οποία ο οργανικός άνθρακας μετατρέπεται σε CO₂ και ο οργανικός φώσφορος σε PO₄ είναι:



Διαδικασία: Προετοιμασία δειγμάτων (εκχυλισμένα λιπίδια): Από κάθε δείγμα λιπιδίων, του οποίου επιθυμούμε να προσδιορίσουμε την περιεκτικότητα σε φώσφορο, υπολογίζεται η ποσότητα που αντιστοιχεί σε 0,5-5 μg φωσφόρου. Η ποσότητα αυτή των λιπιδίων μεταφέρεται με ακρίβεια σε τρεις σωλήνες pyrex. Έτσι προκύπτουν 3 σωλήνες που περιέχουν την ίδια ποσότητα από το ίδιο δείγμα λιπιδίων (τα 3 δείγματα επιτρέπουν την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων). Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη με ρεύμα N₂ και έπειτα προσθήκη, σε κάθε σωλήνα, 0,5 mL HClO₄ 72%. Στη συνέχεια οι σωλήνες τοποθετούνται σε αμμόλουτρο θερμοκρασίας 160-180 °C για 1 h (ο έλεγχος της θερμοκρασίας γίνεται με θερμόμετρα που βρίσκονται βυθισμένα σε σωλήνες που περιέχουν πυκνό H₂SO₄ και έχουν τοποθετηθεί σε διάφορα σημεία του αμμόλουτρου). Μετά την καύση τα δείγματα αφήνονται να ψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολουθεί η προσθήκη των κατάλληλων αντιδραστηρίων τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και τοποθέτηση των σωλήνων σε ζέον υδρόλουτρο για 10 min και έπειτα ψύξη τους για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος τα δείγματα φωτομετρούνται στα 820 nm με φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους.

Πίνακας 5.2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στα δείγματα για τον προσδιορισμό φωσφόρου. Ο όγκος μετράται σε ml

α/α	H ₂ O	Μολυβδαινικό Αμμώνιο	ANSA
Δ ₁	1	3	0,5
Δ ₂			
Δ ₃			

Προετοιμασία προτύπων και τυφλών: Παράλληλα με τα δείγματα προετοιμάζονται και 9 σωλήνες που περιέχουν πρότυπα διαλύματα, τα οποία θα χρησιμεύσουν στην κατασκευή της καμπύλης αναφορά, και δύο σωλήνες τυφλών διαλυμάτων. Αρχικά στους εννέα σωλήνες των προτύπων και στους δύο των τυφλών προστίθενται 0,5 mL HClO₄ 72% και οι σωλήνες τοποθετούνται σε αμμόλουτρο (160 °C

για 1 h) παράλληλα με τα δείγματα για να διατηρούνται ομοιόμορφες συνθήκες. Μετά την καύση ακολουθεί η προσθήκη των κατάλληλων αντιδραστηρίων, τα οποία φαίνονται στον πίνακα 5.3. Η χρήση τριών ίδιων διαλυμάτων για κάθε ομάδα προτύπων γίνεται για να είναι δυνατή η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 5.3: Ο όγκος (ml) αντιδραστηρίων για την προετοιμασία των τριών ομάδων προτύπων διαλυμάτων (Π) και των 2 τυφλών (Τ) για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς στον προσδιορισμό φωσφόρου

α/α	KH ₂ PO ₄	H ₂ O	Μολυβδαινικό Αμμώνιο	ANSA
Π ₁	0,2	0,8	3	0,5
Π ₂				
Π ₃				
Π ₄				
Π ₅	0,5	0,5	3	0,5
Π ₆				
Π ₇				
Π ₈	1	0	3	0,5
Π ₉				
Τ ₁	0	1	3	0,5
Τ ₂				

Αντιδραστήρια - Συσκευές.

- Μολυβδαινικό Αμμώνιο 0,4% (NH₄)₆MO₇O₂₄·4H₂O (p.a. Merck): Διαλύονται 4,233 g μολυβδαινικού αμμωνίου σε 1 L νερού.
- Διάλυμα ANSA: 6 g NaHSO₃ (p.a. Merck) και 1,2 g Na₂SO₃ (p.a. Merck) διαλύονται σε 50mL H₂O, προστίθεται και 0,1 g ANSA (SERVA). Μένει σε ηρεμία για 3 h. Διηθείται και φυλάσσεται σε σκοτεινή φιάλη στο ψυγείο. Το διάλυμα αυτό δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα για 1 μήνα.
- Αντιδραστήριο ANSA: Πριν την εκτέλεση του πειράματος αναμειγνύονται 2 όγκοι διαλύματος ANSA με 3 όγκους απεσταγμένου H₂O. Για να γίνει η ανάμειξη πρέπει το διάλυμα ANSA να βρίσκεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για αυτό αφήνεται 20-30min πριν την ανάμειξη έξω από το ψυγείο.
- Πρότυπο Διάλυμα PO₄³⁻: 0,8788 g KH₂PO₄ (p.a. Merck) σε 500 mL H₂O (175,76 mg KH₂PO₄/100 mL διαλύματος). Λαμβάνεται 1 mL από το διάλυμα αυτό και προστίθενται 99 mL H₂O (οπότε προκύπτει διάλυμα ≈4 μg P ανά mL διαλύματος).
- Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους Novaspec II
- Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου (Pierce 18780),
- Κυκλοαναδευτήρας τύπου vortex,
- Αμμόλουτρο
- Σωλήνες pyrex, διαστάσεων 1,8×18 cm.

5. 10. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Αρχή της μεθόδου: Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκε ως μέσο διαχωρισμού των διαφόρων κλασμάτων των λιπιδίων της *L. monocytogenes*. Στα πειράματα της παρούσης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της αναλυτικής (μονοδιάστατης) χρωματογραφίας.

Διαδικασία: Προετοιμασία της πλάκας και του θαλάμου: Η πλάκα που χρησιμοποιείται χωρίζεται με παράλληλες γραμμές σε λωρίδες πλάτους 1 cm περίπου και ορίζονται περιθώρια και μέτωπο. Η πλάκα τοποθετείται σε πυριαντήριο σε θερμοκρασία 100°C για 15 min προκειμένου να γίνει ενεργοποίηση του πυριτικού οξέος καθώς απομακρύνεται το νερό που κατακρατά. Το χρωματογράφημα αναπτύσσεται στον ειδικό γυάλινο θάλαμο ανάπτυξης, ο οποίος κλείνει καλά αεροστεγώς και περιέχει το κατάλληλο μίγμα διαλυτών ανάπτυξης (σύστημα ανάπτυξης). Ο θάλαμος αφού έχει καθαριστεί καλά, κορεννύεται με ατμούς του συστήματος ανάπτυξης. Ανάλογα με την πολικότητα των λιπιδίων, χρησιμοποιούνται διαφορετικά συστήματα ανάπτυξης. Στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα συστήματα ανάπτυξης:

- ♦ *Ουδέτερο:* χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ 98/2/1 v/v/v
- ♦ *Πολικό:* χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ/νερό 50/25/6/2 v/v/v/v

Σε κάθε λωρίδα και σε απόσταση 1cm από την αρχή της πλάκας τοποθετείται με μικροσύριγγα Hamilton το δείγμα του λιποειδούς, σε μικρές σταγόνες ή μια δίπλα στην άλλη, σε μορφή ζώνης. Τοποθετείται ποσότητα 10 µg λιποειδούς περίπου σε κάθε ζώνη. Συγχρόνως με τα προς ανάλυση δείγματα τοποθετούνται σε μια ή περισσότερες, αν χρειαστεί, λωρίδες διαλύματα λιπιδίων γνωστής σύστασης για σύγκριση (πρότυπα).

Ανάπτυξη της TLC: Η πλάκα εισάγεται στον κορεσμένο (με ατμούς του συστήματος ανάπτυξης) θάλαμο και παραμένει εκεί μέχρι ο διαλύτης να φτάσει στο μέτωπο που έχει οριστεί.

Εμφάνιση του χρωματογραφήματος: Μετά από την ανάπτυξη το χρωματογράφημα απομακρύνεται από τον θάλαμο, εξατμίζονται οι διαλύτες και ψεκάζεται με το κατάλληλο αντιδραστήριο εμφάνισης μέσα στον χώρο του απαγωγού. Η εμφάνιση γίνεται με τα αντιδραστήρια που αναφέρονται παρακάτω:

- ♦ *Έκθεση σε ατμούς ιωδίου:* Τα λιπίδια εμφανίζονται σαν κίτρινες ή καστανόμαυρες κηλίδες. Με την παραμονή στον αέρα το ιώδιο εξαχνώνεται.
- ♦ *Καύση κηλίδων με θειικό χαλκό:* Με αυτό τον τρόπο κάθε οργανική ένωση απανθρακώνεται και εμφανίζεται σαν μαύρη κηλίδα.
- ♦ *Αντιδραστήριο νινυδρίνης:* Για εμφάνιση αμινοξέων, αμινών και αμινοσακχάρων.

♦ *Αντιδραστήριο Dittmer-Lester:* Είναι ειδικό αντιδραστήριο εμφάνισης των φωσφολιπιδίων. Τα φωσφολιπίδια μετά από ψεκασμό εμφανίζονται σαν μπλέ κηλίδες.

Αντιδραστήρια - Συσκευές

- Πλάκες αλουμινίου (Merck 1.05554, 20×20 cm, silica gel 60 F254).
- Θάλαμοι ανάπτυξης (Alltech),
- Διηθητικό χαρτί και Μικροσύριγγα (Hamilton).
- Χλωροφόρμιο (Lab-Scan, HPLC degree)
- Μεθανόλη (Lab-Scan, HPLC degree)
- Οξικό οξύ (p.a. Merck)
- Αντιδραστήρια εμφάνισης χρωματογραφίας
- Πρότυπα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

Ουδέτερα λιπίδια:

- Τριπαλμιτίνη (TG) SIGMA (T-5888) 99%, σε χλωροφόρμιο.
- 1,2-διπαλμιτίνη (1,2-DG) SIGMA (D-2135) 99%, σε χλωροφόρμιο.
- 1,3-διπαλμιτίνη (1,3-DG) SIGMA (D-1639) 99%, σε χλωροφόρμιο.
- 1-μονοπαλμιτολεΐνη (MG) SIGMA (M-7890) 99%, σε χλωροφόρμιο.
- Παλμιτική αλκοόλη (FAIc) SIGMA (C-7882) approx.99%, σε χλωροφόρμιο.
- Ελαϊκό οξύ (FA) SIGMA (O-1008) 99% καθαρότητας, σε χλωροφόρμιο.

Πολικά λιπίδια:

- Καρδιολιπίνη (CL) FLUKA (21978) >98%, από καρδιά βοδιού, σε μεθανόλη.
- Φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG) FLUKA (79398) >99%, από κρόκο αυγού, σε χλωροφόρμιο/μεθανόλη 98/2 v/v.
- Φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI) FLUKA (79401) >98%, από σόγια, σε χλωροφόρμιο.
- Φωσφατιδυλοχολίνη (PC) SIGMA (P-1287) 99%, σε χλωροφόρμιο.
- L-α- φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (L-PE) SIGMA (P6386) ≥97%, από κρόκο αυγού, σε χλωροφόρμιο

5. 11. Οξυκαταλυόμενη Μεθανόλυση σε εκχυλισμένα λιπίδια

Αρχή της μεθόδου: Με την υδρόλυση αυτού του τύπου απομακρύνονται τα λιπαρά οξέα των μονο-άκυλο- και διακυλοφωσφογλυκεριδίων σαν μεθυλεστέρες. Ταυτόχρονα υδρολύονται τα σφιγγολιπίδια δίνοντας μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, σφιγγοσινούχο βάση, ανόργανο φωσφόρο, αμινοβάση ή φωσφονο-αμινοβάση και ένα ποσοστό σφιγγοζυλο-φωσφόρυλο-αμινοβάσης. Τέλος υδρολύονται και οι λιποπολυσακχαρίτες και τα N-ακυλαμινοξέα [97, 175, 176].

Διαδικασία: Τα λιπαρά οξέα από τα λιπίδια μετατρέπεται σε μεθυλεστέρες χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του Vance & Sweely (1967) [176] με τη ακόλουθη τροποποίηση: δείγμα λιπιδίου ~1mg μεταφέρεται σε βιδωτό σωλήνα ο οποίος έχει προηγουμένως ελεγχθεί ώστε να κλείνει αεροστεγώς. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αζώτου και προσθήκη 0,5 mL διαλύματος μεθανολικού HCl 3 N (10% w/v). Στη συνέχεια το δείγμα οδηγείται σε φούρνο στους 100 °C για 5-6 ώρες όπου λαμβάνει χώρα η μετεστεροποίηση. Κατά τη διάρκεια της μετεστεροποίησης το δείγμα ελέγχεται ώστε να μην παρουσιάζει απώλειες διαλύτη (όπου αυτό διαπιστώνεται προστίθεται αντιδραστήριο) και αναδεύεται συχνά. Μετά το πέρας της θέρμανσης το δείγμα αφήνεται για λίγη ώρα σε θερμοκρασία δωματίου για να κρυώσει και στη συνέχεια οι μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίζονται τρεις φορές με 0,8 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολουθεί εξάτμιση του διαλύτη υπό ρεύμα αζώτου. Τελικά οι μεθυλεστέρες αναδιαλύονται σε εξάνιο προκειμένου να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία [97].

Αντιδραστήρια - Συσκευές.

- Μεθανολικό HCl 3 N (10% w/v, Supelco Inc.) και
- Πετρελαϊκός αιθέρας (p.a. Merck).
- Συσκευή εξάτμισης με ρεύμα αζώτου (Pierce 18780).
- Βιδωτοί γυάλινοι στεγανοί σωλήνες pyrex.
- Δοκιμαστικοί σωλήνες απλοί,
- Βιδωτά μικροφιαλίδια με υποφιαλίδια (inserts)

5. 12. Ανάλυση των λιπαρών οξέων με αεριοχρωματογραφία GC

Η αεριοχρωματογραφία (GC) ανήκει στις μεθόδους διαχωρισμού και εφαρμόζεται κυρίως σε αναλυτική κλίμακα (ποσότητες δειγμάτων μικρότερες των 10^{-6} g). Οι ενώσεις πρέπει να είναι ή να καθίστανται πτητικές και θα πρέπει να μεταβαίνουν στην αέρια φάση χωρίς ταυτόχρονη διάσπαση. Η αεριοχρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ταυτότητας (ποιοτική ανάλυση) και της ποσότητας (ποσοτική ανάλυση) των ενώσεων. Επίσης χρησιμοποιείται ως μέθοδος απομόνωσης ενός στατιστικού ενός μίγματος στην καθαρή μορφή του (Preparative Chromatography) [177].

Τα πρότυπα μίγματα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των άγνωστων δειγμάτων ήταν: CPTM Mix CataLog No 1114 Matreya Inc Pleasant Gap, PA (Εικόνα 5.1) και Marine oil FAME mix CataLog No. 35066, Lot No. A026839, Restek Corporation (Εικόνα 5.2) [178, 179].

Για την ανάλυση τους με αεριοχρωματογραφία, τα λιπαρά οξέα από τα λιπίδια μεμβράνης της *L. monocytogenes* μετατρέπονται σε μεθυλεστέρες όπως περιγραφεί

στο υποκεφάλαιο 5.10. Χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογράφος SHIMADZU με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) και τριχοειδής στήλη DB-5ms (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane). Θερμοκρασιακό πρόγραμμα: Το make-up και φέρον αέριο είναι ήλιο, τα καύσιμα αέρια: Υδρογόνο και αέρας. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας φούρνου είναι: από 90 °C στους 170 °C με ρυθμό 70 °C/min και απο 170 °C στους 210 °C με ρυθμό 10 °C/min, με 1 min αρχικό χρόνο κράτησης και 15 min τελικό. Η θερμοκρασία της βαλβίδας εισαγωγής ήταν 250 °C, και του ανιχνευτή 280 °C. Η ροή της στήλης: 1,3 mL/min, Ροή H₂: 40 mL/min, Ροή αέρα: 400 mL/min.



MATREYA LLC
Lipids and Biochemicals
168 Tressler Street, Pleasant Gap, PA 16823
Tel. 814-359-5060 Fax 814-359-5062 www.matreya.com

PRODUCT DATA SHEET

Bacterial Acid Methyl Esters CP Mixture

Catalog No: 1114
Solvent: Methyl hexanoate (caproate)
Storage: -20°C

Components:

Methyl undecanoate, C11:0	Methyl hexadecenoate (<i>cis</i> -9), (palmitoleate), C16:1
Methyl 2-hydroxydecanoate, 2-OH C10:0	Methyl hexadecanoate (palmitate), C16:0
Methyl dodecanoate (laurate), C12:0	Methyl 15-methylhexadecanoate, iso-C17:0
Methyl tridecanoate, C13:0	Methyl methylenehexadecanoate (all <i>cis</i> -9,10), C17:0 <i>delta</i> (all <i>cis</i> -9,10)
Methyl 2-hydroxydodecanoate, 2-OH C12:0	Methyl heptadecanoate (margarate), C17:0
Methyl 3-hydroxydodecanoate, 3-OH C12:0	Methyl 2-hydroxyhexadecanoate, 2-OH C16:0
Methyl tetradecanoate (myristate), C14:0	Methyl octadecadienoate (all <i>cis</i> -9,12), (linoleate), C18:2
Methyl 13-methyltetradecanoate, iso-C15:0	Methyl octadecenoate (<i>cis</i> -9), (oleate), C18:1
Methyl 12-methyltetradecanoate, anteiso-C15:0	Methyl octadecenoate (<i>trans</i> -9), (elaidate), C18:1
Methyl pentadecanoate, C15:0	Methyl octadecanoate (stearate), C18:0
Methyl 2-hydroxytetradecanoate, 2-OH C14:0	Methyl methyleneoctadecanoate (all <i>cis</i> -9,10), C19:0 <i>delta</i> (all <i>cis</i> -9,10)
Methyl 3-hydroxytetradecanoate, 3-OH C14:0	Methyl nonadecanoate, C19:0
Methyl 14-methylpentadecanoate, iso-C16:0	Methyl eicosanoate (arachidate), C20:0

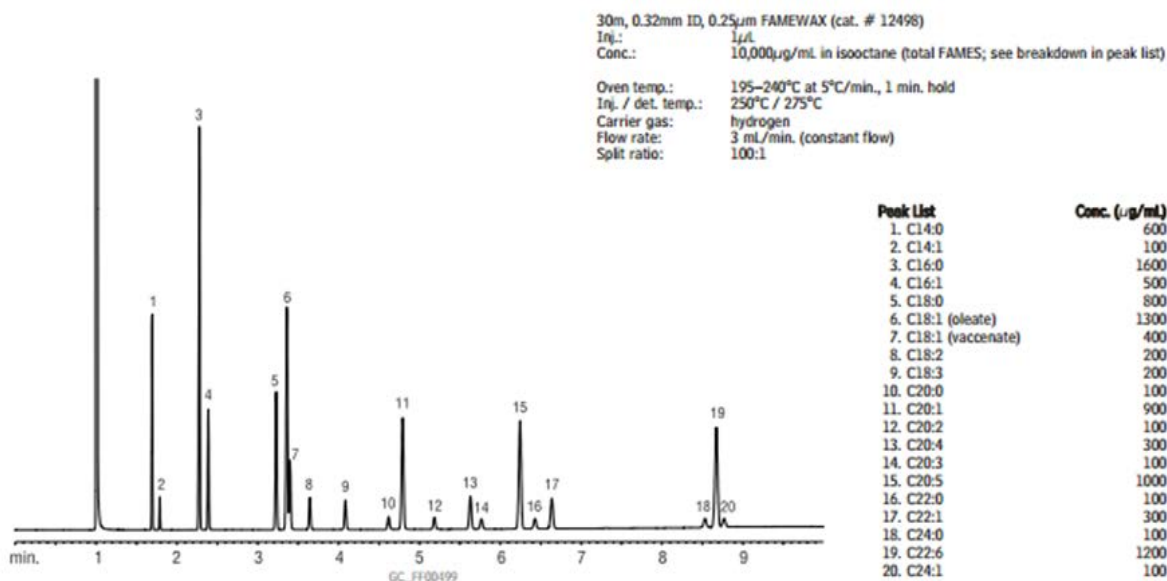
Εικόνα 5.1: Πίνακας με τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων του βακτηριακού προτύπου Bacterial Acid Methyl Esters CP Mixture Matreya LLC, που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των λιπιδίων του βακτηρίου *L. monocytogenes*, όπως δίνεται στα συνοδευτικά έγγραφα του προτύπου.

Αντιδραστήρια-Συσκευές.

Αεριοχρωματογράφος SHIMADZU με Ανιχνευτή Ιονισμού Φλόγας, FID, (Shimadzu Scientifics Instruments Inc., Columbia, MD, USA)

- Στήλη DB-5ms (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane); 30 m ± 0,25 mm, 0,25 µm; Cat No. 1225532, Serial No. US3270652H, Agilent Technologies J&W.
- Μικροσύριγγα Hamilton 5µl
- Εξάνιο (p.a. Merck)

FAMES (Marine Oil Standard)
FAMEWAX™



Restek Corporation 110 Benner Circle Bellefonte, PA 16823
814-353-1300 • 800-356-1688 • Fax: 814-353-1309 • www.restek.com

Εικόνα 5.2: Χρωματογράφημα του προτύπου Marine oil FAME mix που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων των λιπιδίων του βακτηρίου *L. monocytogenes*, όπως δίνεται στα συνοδευτικά έγγραφα του προτύπου.

5. 13. Αναλύσεις γάλακτος και τυριού

Η ανάλυση τροφίμων έχει μεγάλη σημασία επειδή δίνει την δυνατότητα μεταξύ άλλων να γίνει ο καθορισμός της σύστασης των τροφίμων και των μεταβολών που αυτή υφίσταται κατά την παρασκευή και την διατήρηση των τροφίμων, καθώς και ο έλεγχος των αλλιώσεων, της νοθείας και των απομιμήσεων των τροφίμων. Επίσης προσδιορίζονται τα χημικά πρόσθετα και κατάλοιπα τα οποία καθιστούν τα τρόφιμα επικίνδυνα, όταν είναι πέραν απο επιτρεπόμενα ανώτατα όρια. Μέγιστη σημασία έχει η ανάλυση τροφίμων και για την βιομηχανία τροφίμων, επειδή στηρίζονται σε αυτή για το έλεγχο των πρώτων υλών και των ενδιάμεσων και των τελικών προϊόντων [180, 181].

5.13.1 Προσδιορισμός ειδικού βάρους γάλακτος

Το ειδικό βάρος του νωπού γάλακτος ποικίλλει αναλόγως του περιεχομένου λίπους, του περιεχομένου στερεού υπολείμματος άνευ λίπους και του περιεχομένου ύδατος. Όπως είναι προφανές, η αυξημένη περιεκτικότητα σε λίπος ελαττώνει το ειδικό βάρος του γάλακτος και αντίθετα η αφαίρεση του λίπους από το γάλα αυξάνει το ειδικό βάρος αυτού. Η αυξημένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, σάκχαρα ή άλατα αυξάνει το

ειδικό βάρος ενώ η αυξημένη περιεκτικότητα σε νερό την ελαττώνει. Ο προσδιορισμός του ειδικού βάρους αποτελεί μια απλή μέθοδο διαπιστώσεως της νοθείας του γάλακτος διά αποβουτήρωσις ή προσθήκη νερού. Δεν είναι όμως αρκετό.

Ο προσδιορισμός του ειδικού βάρους γάλακτος επιτελείται με ειδικό αραιόμετρο, το γαλακτοαραιόμετρο. Οι βαθμοί του ($1\beta\alpha\theta\mu\acute{o}\varsigma = (\epsilon\iota\delta\iota\kappa\acute{o}\ \beta\acute{\alpha}\rho\omicron\varsigma - 1) \times 1000$) παρέχουν το δευτερό και τρίτο δεκαδικό ψηφίο του ειδικού βάρους [150, 181].

Διαδικασία προσδιορισμού: Το εξεταζόμενο γάλα μετά από επιμελή ανάμιξη, μεταέρεται σε ένα κατάλληλο κύλινδρο, εμβαπτίζεται το γαλακτοαραιόμετρο με προσοχή και αναγνώσκεται ο βαθμός. Συγχρόνως μετρίεται η θερμοκρασία του γάλακτος. Η εύρεση του ειδικού βάρους του γάλακτος πρέπει να γίνεται στους 15 °C ακριβώς. Όταν η θερμοκρασία του γάλακτος είναι διαφορετική, τότε ειδικό βάρος ανάγεται εις τους 15 °C:

α) κατά προσεγγίση διά του τύπου:

$$\epsilon_{15^{\circ}\text{C}} = \epsilon_{\text{πειρ}} + (t_{\text{πειρ}} - 15) \times 0,0002$$

β) ακριβέστερα από ειδικό πίνακα [181].

Αντιδραστήρια-Συσκευές.

- Γαλακτοαραιόμετρο
- Ογκομετρικό κύλινδρο
- Θερμόμετρο

5.13.2 Προσδιορισμός στερεού υπολείμματος άνευ λίπους στο γάλα

Πορεία προσδιορισμού: Σε προζυγισμένη κάψα φέρονται 10μλ γάλακτος και προστίθενται 3 σταγόνες οξικού οξέος προς καθίζηση πρωτεϊνών και για εύκολη εξάτμηση. Η κάψα τοποθετείται σε ατμόλουτρο μέχρι εξατμίσεως του μεγαλύτερου μέρους του νερού και ακολουθεί ξήρανση σε πυραντήριο στους 105 °C μέχρι σταθερού βάρους. Από το ζυγισμένο στερεό υπόλειμμα και το ειδικό βάρος υπολογίζεται το %στερεο υπόλειμμα του γάλακτος και αφαιρώντας το ποσό του λίπους υπολογίζεται το %ΣΥΑΛ (Στερεό Υπόλειμμα Άνευ Λίπους). Το στερεό υπόλειμμα του γάλακτος υπολογίζεται από το τύπο του Fleischman:

$$t = 1,2 \times f + 2,665 \times \frac{100s - 100}{s}$$

όπου:

t = το ζητούμενο στερεό υπόλειμμα, s = το ειδικό βάρος του γάλακτος,

f = % περιεκτικότητα σε λίπος του γάλακτος

Αντιδραστήρια - Συσκευές.

- Κάψα

- Οξικό οξύ (p.a. Merck)
- Ατμόλουτρο
- Πυραντήριο
- Ζυγός

5.13.3 Προσδιορισμός λίπους στο γάλα, κατά Bozindsky

Ο προσδιορισμός του λίπους έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Schmidt-Bondzynski. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη παραλαβή του λίπους από το δείγμα δια αναταράξεως με το κατάλληλο διαλύτη μετά από προκατεργασία με οξύ

Πορεία προσδιορισμού: Σε ειδικό σωλήνα των Schmidt-Bondzynski τοποθετούνται 10 mL γάλακτος και 10 mL πυκνού υδροχλωρικού οξέος και το μίγμα βράζεται με ήπια θέρμανση μέχρι τη διάλυση των καθιζανουσών κατά την ανάμιξη λευκωματοειδών υλών. Στη συνέχεια το μίγμα αφήνεται να ψυχθεί μέχρι τη θερμοκρασία των 35 °C και μετά τη προσθήκη 30-35 mL αιθέρα αναταράσσεται καλά και αφήνεται να παραμείνει σε ηρεμία για 15 λεπτά σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 35 °C. Όταν η αιθερική στιβάδα διαχωριστεί αρκετά σαφώς από το κάτωθεν υγρό, το οποίο επιταχύνεται με περιστροφή μεταξύ των παλαμών, διαβάζεται ο όγκος αυτής, λαμβάνεται με σιφώνιο ορισμένη ποσότητα (20 mL) η οποία μεταφέρεται σε φιαλίδιο που έχει προζυγιστεί και μετά την απόσταξη του αιθέρα, ξηραίνεται και ζυγίζεται. Με υπολογισμούς, λαμβάνοντας υπόψη και του ειδικού βάρους του γάλακτος, βρίσκεται το επί τοις εκατό ποσό του λίπους [153, 180, 181].

Αντιδραστήρια - Συσκευές:

- Ειδικός σωλήνας των Schmidt-Bondzynski
- Πυκνό υδροχλωρικό οξύ
- Αιθέρας

5.13.4 Προσδιορισμός λίπους στο τυρί, κατά Gerber-Van Gulik

Το λίπος στο τυρί μπορεί να προσδιοριστεί με διάφορες μεθόδους, από τις οποίες η πιο σημαντική είναι η μέθοδος Van Gulik (IDF/ ISO3433:2008), στην οποία χρησιμοποιείται το ειδικό τυροβουτυρόμετρο του Gulik.

Πορεία προσδιορισμού: του βουτυρόμετρου τυριού Van Gulik και στη συνέχεια εφαρμόζεται ο υποδοχέας στο σώμα του βουτυρομέτρου και το οποίο γεμίζεται από το λαιμό με πυκνό θειικό οξύ, μέχρι να καλυφθεί όλη η μάζα του τυριού. Στη συνέχεια το βουτυρόμετρο τοποθετείται σε υδατόλουτρο, στους 62 °C για 20 λεπτά περίπου μέχρι να διαλυθεί η μάζα του τυριού από το θειικό οξύ. Έπειτα, προστίθεται 1 σταγόνα αμυλικής αλκοόλης και το βουτυρόμετρο συμπληρώνεται με θειικό οξύ μέχρι τα $\frac{3}{4}$ του

λαιμού του. Τέλος, το βουτυρόμετρο τοποθετείται σε φυγόκεντρο με θερμοκρασία 65°C και φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 1200 στροφές/min. Αφού τα βουτυρόμετρα βγουν από τη φυγόκεντρο, τοποθετούνται σε υδατόλουτρο των 65 °C για 5 λεπτά , γίνεται ανάγνωση της κατώτερης τιμής, που αντιστοιχεί στη διαχωριστική γραμμή μεταξύ λίπους και υπόλοιπου περιεχομένου του βουτυρομέτρου, και της ανώτερης που αντιστοιχεί στο μηνίσκο που σχηματίζεται στην κορυφή της στήλης του λίπους. Υπολογίζεται το ποσοστό του λίπους που έχει το τυρί μας με αναγωγή στο ακριβές βάρος που έχει ζυγιστεί, με τη βοήθεια του παρακάτω τύπου:

$$\% \text{λίπος} = \frac{\text{Διαφορά βουτυρομέτρου} \times 3}{\text{Βάρος δείγματος τυριού}}$$

Αντιδραστήρια - Συσκευές:

- Τυροβουτυρόμετρο Gulik
- Υδρόλουτρο
- Φυγόκεντρο
- Θεϊκό οξύ, ρ=1,50, (512 mL πυκνό θεϊκό οξύ αραιώνονται έως 1 L)
- Αμυλική αλκοόλη

5.13.5 Προσδιορισμός υγρασίας στο τυρί.

Η περιεκτικότητα του τυριού σε νερό (υγρασία) είναι ένα από τα κριτήρια για να προσδιοριστεί η ποιότητα του τυριού. Ο προσδιορισμός της γίνεται είτε με την άμεση μέθοδο (απόσταξη με τολουόλιο ή ξυλόλιο), είτε με την έμμεση μέθοδο της ξήρανσης στους 105 °C. Η έμμεση μέθοδος που χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία βασίζεται στον προσδιορισμό της απώλειας βάρους, λόγω εξατμίσεως του νερού κατά την θέρμανση του τροφίμου. Ο προσδιορισμός της υγρασίας έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της FIL-IDF 58:1970 και με τη μετέπειτα τροποποίησή και περιγραφή του στο ISO 2920/IDF 058:2004 [161].

Πορεία προσδιορισμού: Πορσελάνινη κάψα με ένα γυάλινο ραβδάκι και μια καθορισμένη ποσότητα καθαρής άμμου (διευκολύνει τη εξατμισμό του νερού) τοποθετούνται στον κλίβανο(θ=100 °C) για 24 ώρες. Αφού περάσουν οι 24 ώρες τοποθετούνται σε ξηραντήριο όπου αφήνονται μέχρι να αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό. Σημειώνεται η μάζα του συστήματος αυτού ως m₀. Μετά τοποθετούνται 3 g από το τυρί και αναμειγνύονται με την άμμο με τη βοήθεια της γυάλινης ράβδου ώστε να γίνει ένα ομοιογενές μείγμα. Ζυγίζεται η κάψα με αναλυτικό ζυγό (σημειώνεται ως m₁) και τοποθετείται στον κλίβανο για 24 ώρες. Μετά τις 24 ώρες, τοποθετούνται σε ξηραντήριο όπου αφήνονται μέχρι να

αποκτήσουν θερμοκρασία περιβάλλοντος και στη συνέχεια ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό (σημειώνεται ως m_2) και υπολογίζεται το ποσοστό της υγρασίας από τον τύπο:

$$\% \text{υγρασία} = 100 - \left(\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \right) \times 100$$

Αντιδραστήρια και Συσκευές:

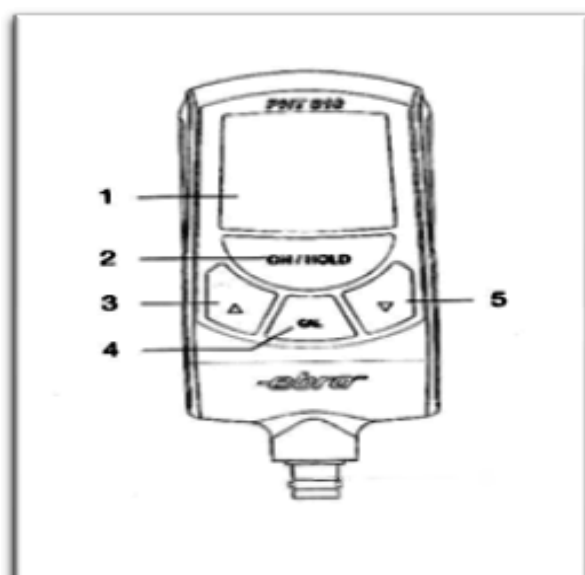
- Κάψα
- Κλίβανο
- Ξυραντήριο
- Ζυγός
- Καθαρή άμμος

5. 14. Μέτρηση pH στα στερεά τρόφιμα, (τυρί) και λειτουργία του πεχαμέτρου

Κατά την ανάκτηση του βακτηρίου *L.monocytogenes* από το επιμολυσμένο τρόφιμο μελετάται και η επίδραση της επιβίωσης/ανάπτυξης του παθογόνου στο pH του τυριού (στερεό τρόφιμο). Η μέτρηση του pH σε στερεά τρόφιμα μπορεί να γίνει με κανονικό πεχάμετρο, φτιαχνοντας ένα εναιώρημα του τροφίμου σε απεσταγμένο νερό 1:9 w/v ή με ειδικό για στερεά τρόφιμα παχάμετρο. Σε αυτή την εργασία η μέτρηση του pH πραγματοποιείται με pH-μετρο Ebro PHT 810.

Διαδικασία μέτρησης: Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Ανοίγουμε το πεχάμετρο πατώντας το πλήκτρο 2 (ON/HOLD) (Εικόνα 5.3) και μετά από μερικά δευτερόλεπτα η συσκευή είναι έτοιμη για μετρήσεις. Πριν τη κάθε μέτρηση είναι απαραίτητη η εισχώρηση της θερμοκρασίας του τροφίμου στο pH-μετρο. Η μέτρηση της θερμοκρασίας του τροφίμου γίνεται τοποθετώντας μέσα σε αυτό θερμόμετρο. Η εισχώρηση της θερμοκρασίας γίνεται πατώντας σύντομα το πλήκτρο 4 (CAL). Στη συνέχεια πατάμε τα πλήκτρα 3 ή 5 μέχρι να εμφανιστεί στην οθόνη 1 η ένδειξη της θερμοκρασίας του τροφίμου που θέλουμε να μετρήσουμε (την έχουμε μετρήσει προηγουμένως με θερμόμετρο). Έπειτα πατάμε το πλήκτρο 2 (ON/HOLD). Εν συνεχεία βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο στο δείγμα και διαβάζουμε την ένδειξη που εμφανίζεται στην οθόνη 1 (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3: pH-μετρο ebro PHT 810

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΙΑΣ. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

6. 1. Μέτρηση μικροβιακού φορτίου καλλιεργείων που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση του γάλακτος

Για την επιμόλυνση του γάλακτος προς παρασκευή του τυριού, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί ο αριθμός του μικροβιακού φορτίου της καλλιέργειας (cfu/ml) του βακτηρίου *L. monocytogenes* που θα χρησιμοποιηθεί ως εμβόλιο (1 mL) της εκάστοτε επιμόλυνσης. Για την επιμόλυνση, χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές καλλιέργειες του βακτηρίου *L. monocytogenes*, ανεπτυγμένες στους $\theta=30\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε 1 L BHI, έως την στάσιμη φάση (stationary phase), μία σε βέλτιστες συνθήκες (δείγμα ελέγχου, pCo) και η άλλη σε καταπονητικές συνθήκες, παρουσία 2.5 mg/L χλωριούχο βενζαλκονίου, (καταπονημένη, pBc).

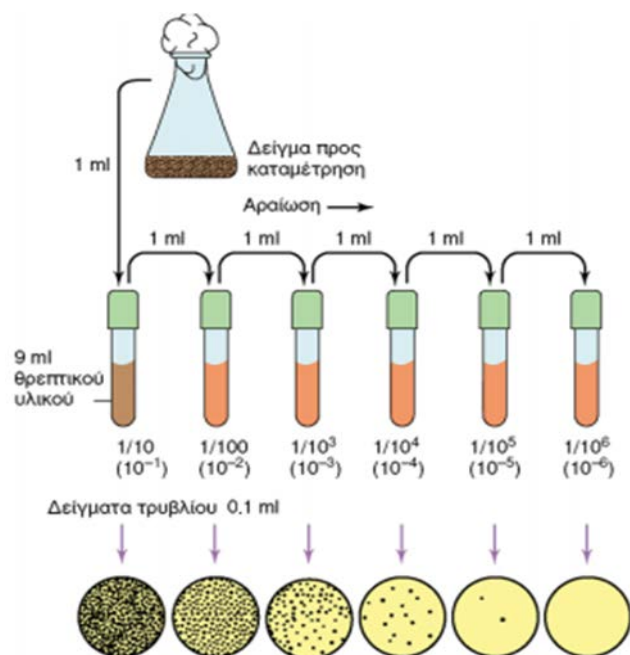
Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του αριθμού μικροβιακού φορτίου ήταν στο σύνολο 5 (2 καλλιέργειες pCo και 3 καλλιέργειες pBC). Η παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης των καλλιεργείων έγινε με τη μέθοδο μέτρησης της θολρότητας (Υποκεφ. 5.4.1). Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση είναι η μέθοδος αρίθμησης αποικιών με την τεχνική της επειφανιακής εξάπλωσης (Σχήμα 6.1). Η καταμέτρηση καθεμίας καλλιέργειας έγινε σε δυο θρεπτικά υλικά: σε εμπλουτισμένο BHI και σε OCLA ή PALCAM (Υποκεφ. 5.5 και 5.6).

6.1.1 Αποτελέσματα μέτρησης μικροβιακού φορτίου καλλιεργείων

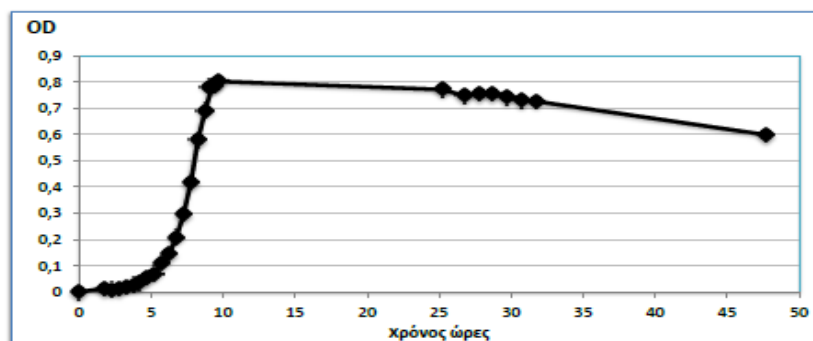
Οι μετρούμενες τιμές της θολρότητας, OD, τη στιγμή της καταμέτρησης ήταν $0,814\pm0,016$ για τις pCo και $0,618\pm0,013$ για τις pBc καλλιέργειες (Σχήμα 6.2). Τα αποτελέσματα των καταμετρήσεων αποικιών και οι μετέπειτα υπολογισμοί για έυρεση του αριθμού μικροβιακού φορτίου δίνονται στους Πίνακες 6.1 και 6.2. Δεν υπάρχει στατιστική διαφορά ανάμεσα στα δύο εκλεκτικά θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήσαμε.

Οι μέσοι όροι του αριθμού του μικροβιακού φορτίου είναι $8,37\pm0,35\text{ log cfu/ml}$ για την pCo καλλιέργεια και $9,09\pm0,21\text{ log cfu/ml}$ για την pBc καλλιέργεια (Πίνακας 6.3).

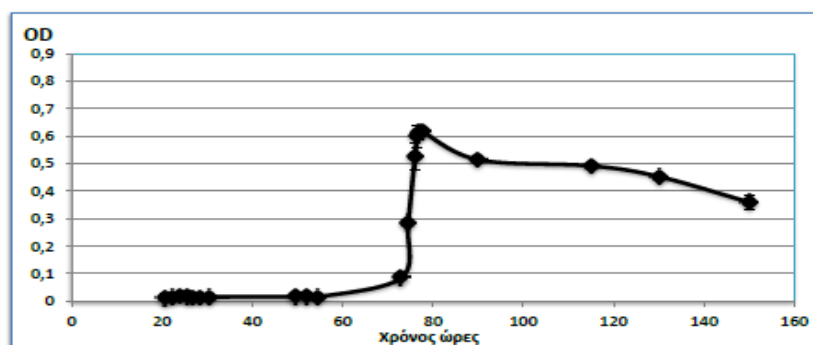
Πρέπει να σημειωθεί ότι τα τρυβλία των εκλεκτικών θρεπτικών OCLA και PALCAM εμβολιασμένα με το καταπονημένο βακτήριο δεν έδωσαν μετρήσιμες τιμές στα αποδεκτά όρια της μεθόδου. Για το λόγο αυτό οι καταμετρήσεις έγιναν σε τρυβλία BHI και σε μία επιπλέον καλλιέργεια του στέλεχους αυτού.



Σχήμα 6.1: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας καταμέτρησης των αποικιών του βακτηρίου *L. monocytogenes*, ανεπτυγμένο στους 30°C. Για κάθε αραίωση αντιστοιχούν 3 τρυβλία με θρεπτικό υλικό BHI ή OCLA ή PALCAM.



α)



β)

Σχήμα 6.2: Καμπύλες ανάπτυξης για τις καλλιέργειες α) pCo και β) pBc. Στον κάθετο άξονα δίνονται οι μετρούμενες τιμές της θολερότητας (OD) σε συνάρτηση του χρόνου ανάπτυξης (ώρες) (οριζόντιος άξονας)

Πίνακας 6.1: Αποτελέσματα της καταμέτρησης των αποικιών της καλλιέργειας του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* σε βέλτιστες συνθήκες (pCo) σε τρυβλία με εμπλουτισμένο γενικό θρεπτικό υλικό BHI, καθώς και σε τρυβλία με εκλεκτικά θρεπτικά υλικά OCLA, PALCAM. Δίνονται και τα αποτελέσματα υπολογισμών για το μικροβιακό φορτίο της καλλιέργειας.

Καλλιέργεια	Αραίωση	Αριθμός αποικιών	cfu/ml	log cfu/ml	Μέσος Όρος και απόκλιση log(cfu/ml)
pCo 1 (BHI)	10 ⁻⁵	152	1,52×10 ⁸	8,18	8,17±0,02
	10 ⁻⁵	153	1,53×10 ⁸	8,18	
	10 ⁻⁵	140	1,40×10 ⁸	8,15	
	10 ⁻⁶	17			
	10 ⁻⁶	11			
	10 ⁻⁶	13			
	10 ⁻⁷	1			
	10 ⁻⁷	2			
	10 ⁻⁷	0			
pCo 1 (OCLA)	10 ⁻⁵	103	1,03×10 ⁸	8,01	8,08±0,08
	10 ⁻⁵	112	1,12×10 ⁸	8,05	
	10 ⁻⁵	147	1,47×10 ⁸	8,17	
	10 ⁻⁶	19			
	10 ⁻⁶	17			
	10 ⁻⁶	15			
	10 ⁻⁷	2			
	10 ⁻⁷	0			
	10 ⁻⁷	0			
pCo 2 (BHI)	10 ⁻⁶	75	7,50×10 ⁸	8,88	8,86±0,08
	10 ⁻⁶	61	6,10×10 ⁸	8,79	
	10 ⁻⁶	82	8,20×10 ⁸	8,91	
	10 ⁻⁷	5			
	10 ⁻⁷	15			
	10 ⁻⁷	9			
	10 ⁻⁸	1			
	10 ⁻⁸	0			
	10 ⁻⁸	0			
pCo 2 (PALCAM)	10 ⁻⁵	240	2,40×10 ⁸	8,38	8,37±0,05
	10 ⁻⁵	275	2,75×10 ⁸	8,44	
	10 ⁻⁵	220	2,20×10 ⁸	8,34	
	10 ⁻⁶	20	2,00×10 ⁸	8,30	
	10 ⁻⁶	25	2,50×10 ⁸	8,40	
	10 ⁻⁶	15			
	10 ⁻⁷	0			
	10 ⁻⁷	3			
	10 ⁻⁷	2			

Πίνακας 6.2: Αποτελέσματα της καταμέτρησης των αποικιών καλλιέργειας καταπονημένη με χλωρίδιο βενζαλκόνιο (pBc) του παθογόνο βακτηρίου *L. monocytogenes* σε τρυβλία με εμπλουτισμένο γενικό θρεπτικό υλικό BHI. Δίνονται και τα αποτελέσματα υπολογισμών για τον μικροβιακό φορτίο της καλλιέργειας.

Καλλιέργεια	Αραίωση	Αριθμός αποικιών	cfu/ml	log cfu/ml	Μέσος Όρος και απόκλιση log(cfu/ml)
pBc1	10 ⁻⁶	98	9,80×10 ⁸	8,99	8,89±0,07
	10 ⁻⁶	83	8,30×10 ⁸	8,92	
	10 ⁻⁶	112	1,12×10 ⁹	9,05	
	10 ⁻⁷	11			
	10 ⁻⁷	5			
	10 ⁻⁷	17			
	10 ⁻⁸	1			
	10 ⁻⁸	2			
pBc 2	10 ⁻⁶	211	2,11×10 ⁹	9,32	9,20±0,11
	10 ⁻⁶	130	1,30×10 ⁹	9,11	
	10 ⁻⁶	190	1,90×10 ⁹	9,28	
	10 ⁻⁷	12			
	10 ⁻⁷	18			
	10 ⁻⁷	26			
	10 ⁻⁸	1			
	10 ⁻⁸	9			
pBc 3	10 ⁻⁶	130	1,30×10 ⁹	9,11	9,16±0,05
	10 ⁻⁶	148	1,48×10 ⁹	9,17	
	10 ⁻⁶	163	1,63×10 ⁹	9,21	
	10 ⁻⁷	0			
	10 ⁻⁷	13			
	10 ⁻⁷	13			
	10 ⁻⁸	0			
	10 ⁻⁸	4			
	10 ⁻⁸	2			

Πίνακας 6.3: Συνοπτική παρουσίαση των τιμών της θολερότητας OD και του μικροβιακού φορτίου για τις τρεις καλλιέργειες του βακτηρίου *L. monocytogenes*, την pCo, την pBc και για την υγρή οξυκαταπονημένη καλλιέργεια του βακτηρίου, ανεπτυγμένη στους 30°C 1L BHI, με αρχικό pH 5.5 λόγω παρουσίας του γαλακτικού οξέος (lactic acid), (pLa)³

Καλλιέργεια	OD	Λογαριθμός του μικροβιακού φορτίου log(cfu/ml)
pCo	0,814±0,016	8,37 ± 0,35
pBC	0,618±0,013	9,09 ± 0,21
pLA	0,114±0,001	8,05 ± 0,42

³ Η μελέτη συμπεριφοράς του βακτηρίου *L. monocytogenes*, ανεπτυγμένο σε αυτές τις συνθήκες, κατά την αποθήκευση του τυριού, είναι μέρος της ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης της Π.Δημαρέλη

6. 2. Μικροσκοπική παρατήρηση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

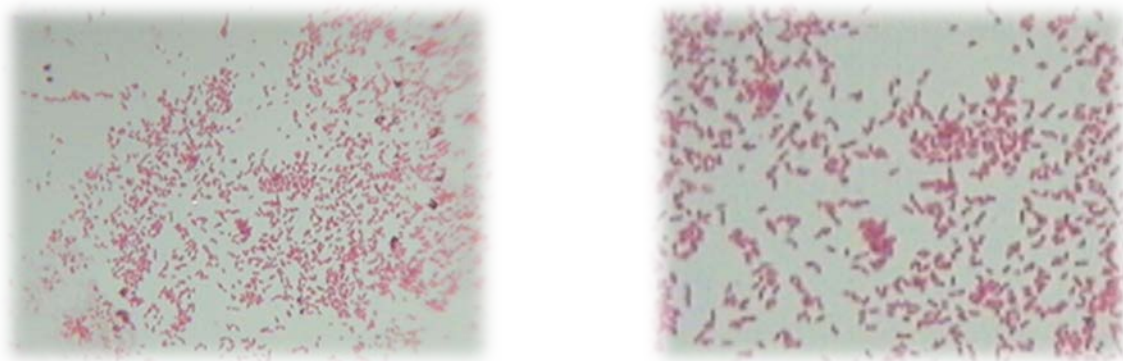
Η μικροσκοπική παρατήρηση του βακτηρίου *L. monocytogenes* δεν ήταν σχεδιασμένη απο την αρχή του πειράματος και έγινε εφόσον παρατηρήσαμε ότι σε καλλιέργειες με μεγάλη διαφορά στις τιμές της θολερότητας το μικροβιακό φορτίο είναι της ίδιας τάξης. Στον πίνακα 6.3 δίνονται αυτές οι τιμές για τρεις καλλιέργειες, την pCo, την pBc και για την υγρή οξυκαταπονημένη καλλιέργεια του βακτηρίου, ανεπτυγμένη στους 30 °C, 1 L BHI, με αρχικό pH 5.5 λόγω παρουσίας του γαλακτικού οξέος (pLa). Μία πιθανή εξήγηση θα ήταν οι μεγάλες διαφορές στις διαστάσεις των κυττάρων, ως αποτέλεσμα των διαφόρων συνθηκών ανάπτυξης. Σε άλλες μελέτες [182-184, έχουν παρατηρηθεί οι μορφολογικές αλλαγές του βακτηρίου προς απάντηση των εξωτερικών συνθηκών. Στη προσπάθεια να συλλεχθούν δεδομένα για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, έγινε και το πείραμα της ηλεκτρονικής μικροσκοπικής παρατήρησης.

6.2.1 Παρατήρηση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στο οπτικό μικροσκόπιο

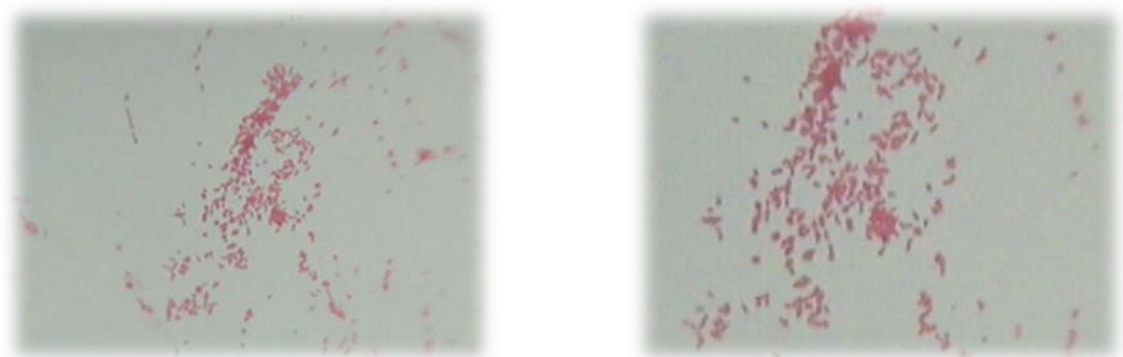
Η προετοιμασία παρασκευασμάτων του βακτηρίου *L. monocytogenes* για παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που αναγράφεται στο εδάφιο 5.7.1. Στις φωτογραφίες (Εικόνες 6.1, 6.2, 6.3) που έγιναν κατά την παρατήρηση των παρασκευασμάτων στο οπτικό μικροσκόπιο στην ίδια μεγένθυση ($\times 100$), φαίνεται καθαρά η ραβδοειδής μορφή του. Το σκούρο ροζ χρώμα, και όχι μοβ όπως θεωρητικά έπρεπε να είναι, ωφείλεται στο πιθανώς παραπάνω ξέπλυμα του παρασκευάσματος με αιθανόλη, κατά την παρασκευή του. Οι φωτογραφίες της καλλιέργειας pLa είναι πιάθω σε σχέση με τις φωτογραφίες των δυο άλλων καλλιεργειών δίνοντας μια ένδειξη αλλαγής διαστάσεων αυτών των κύτταρων σε σχέση με τα άλλα.

6.2.2 Παρατήρηση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

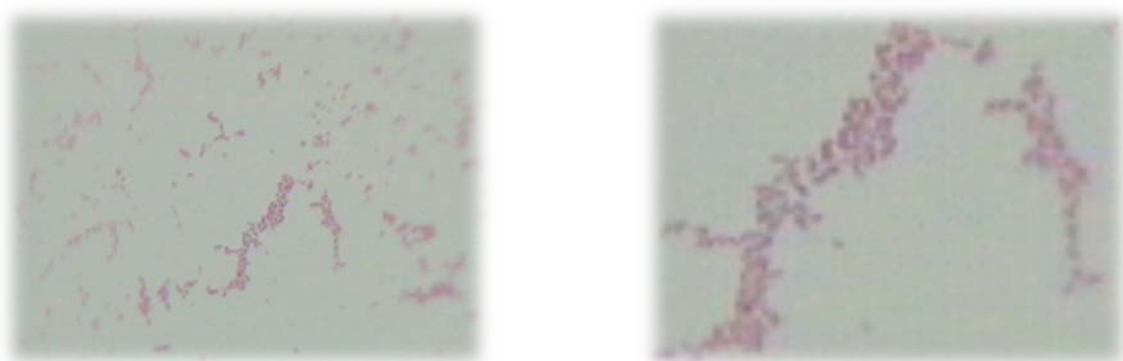
Η προετοιμασία παρασκευασμάτων του βακτηρίου *L.monocytogenes* για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έγινε σύμφωνα με την μέθοδο που αναγράφεται στο Υποκεφ. 5.7.2. Στις φωτογραφίες (Εικόνες 6.4, 6.5, 6.6) που έγιναν κατά την παρατήρηση των παρασκευασμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην ίδια μεγένθυση ($\times 1000$), η μπάρα της κλίμακας είναι 10μm. Συγκρίνοντας τις φωτογραφίες των τριών διαφόρων καλλιεργιών παρατηρούμε ότι οι μορφές των βακτηρίων είναι πιο θολές για τις καταπονημένες καλλιέργειες pBc και pLa δίνοντας μια ένδειξη αλλαγής των



Εικόνα 6.1: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε βέλτιστες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI (καλλιέργεια pCo). Η δεξιά εικόνα είναι ψηφιακή επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας.

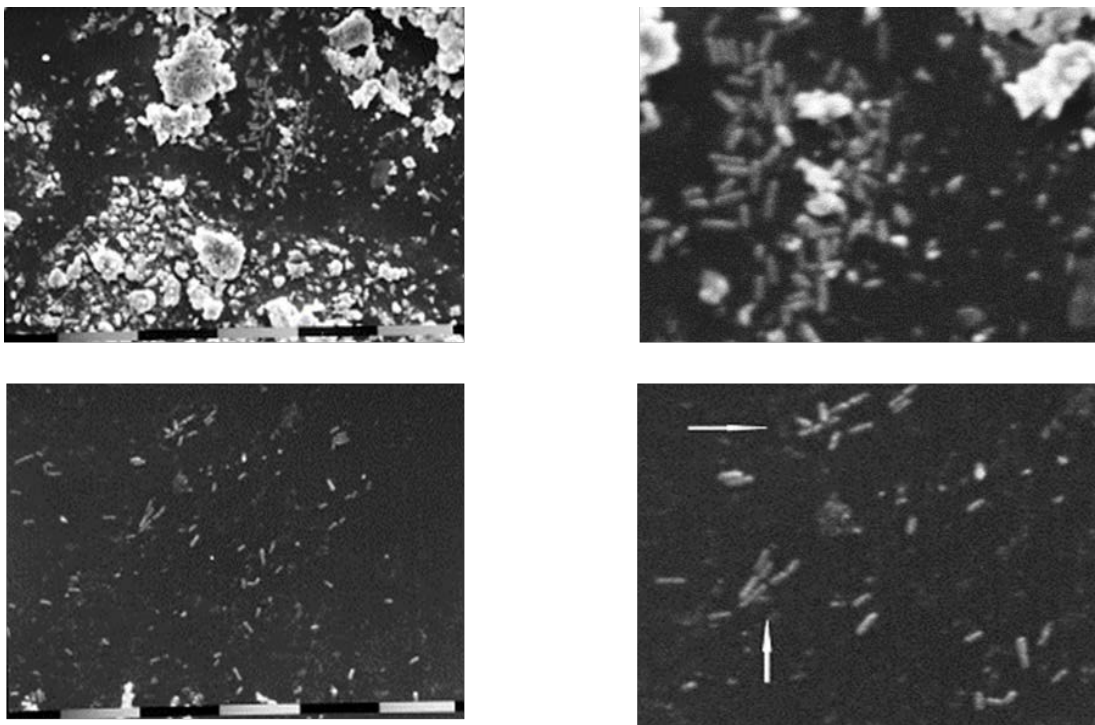


Εικόνα 6.2: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI παρουσία 2,5 µg/L χλωρίδιο βενζαλκονίου (καλλιέργεια pBc). Η δεξιά εικόνα είναι ψηφιακή επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας

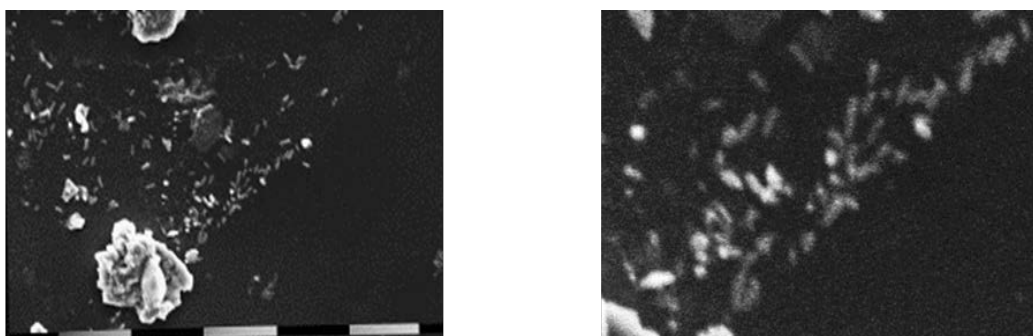


Εικόνα 6.3: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες 30 °C, 1 L BHI, pH 5,5 παρουσία του γαλακτικού οξέος (καλλιέργεια pLa). Η δεξιά εικόνα είναι ψηφιακή επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας

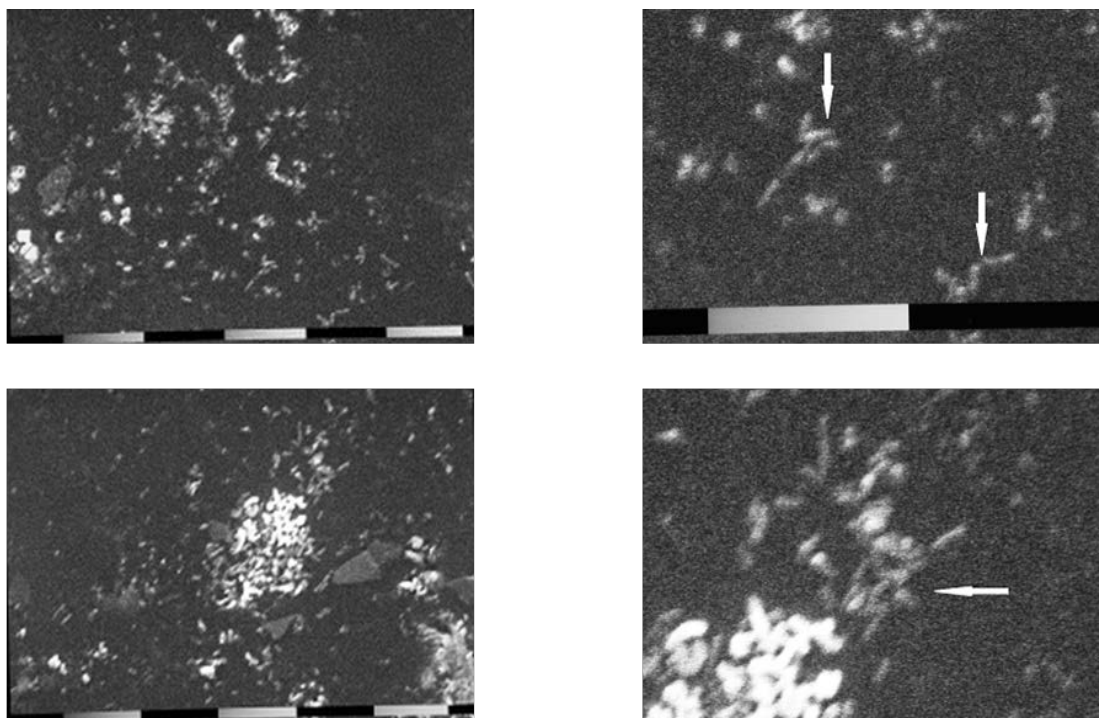
διαστάσεων αυτών των κύτταρων σε σχέση με τα κύτταρα της βέλτιστης καλλιέργειας, pCo. Δεν είναι όμως αρκετά για την επιβεβαίωση της υπόθεσης για την αλλαγή του μεγέθους των κυττάρων, σε συνάρτηση με τις συνθήκες ανάπτυξης. Παρατήρηση σε μεγαλύτερη μεγένθυση ή σε άλλο είδος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου μπορεί να δίνουν περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με τις διαφορές στο μέγεθος των κυττάρων του βακτηρίου *L. monocytogenes*.



Εικόνα 6.4: Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε βέλτιστες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI, (καλλιέργεια pCo). Οι δεξιές εικόνες είναι ψηφιακή επεξεργασία των αντίστοιχων αριστερών πρωτότυπων φωτογραφιών. Με τα βέλη στην κάτω δεξιά εικόνα, δείχνονται κάποια από τα κύτταρα.



Εικόνα 6.5: Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες, 30 °C, 1 L BHI παρουσία 2.5 μg/L χλωρίδιο βενζαλκονίου (καλλιέργεια pBc). Η δεξιά εικόνα είναι ψηφιακή επεξεργασία της αριστερής πρωτότυπης φωτογραφίας



Εικόνα 6.6: Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο του βακτηρίου *L. monocytogenes* ανεπτυγμένο σε καταπονημένες συνθήκες 30 °C, 1 L BHI, pH 5.5 παρουσία του γαλακτικού οξέος (καλλιέργεια ρLa). Οι δεξιές εικόνες είναι ψηφιακή επεξεργασία των αντίστοιχων αριστερών πρωτότυπων φωτογραφιών και με τα βέλη δείχνονται κάποια από τα κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ΣΤΟ ΤΥΡΙ ΤΥΠΟΥ ΦΕΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

7. 1. Εισαγωγή

Το πείραμα μελετά την συμπεριφορά του βακτηρίου καταπονημένο και μη, στο τυρί τύπου φέτα, κατά την δίμηνη αποθήκευση του (σε άλμη 6% NaCl w/v, 5°C). Για το λόγο αυτό, επιμολύναμε με κύτταρα του βακτηρίου το γάλα από τον οποίο παρασκευάστηκε το τυρί. Τα γάλατα (πρόβειο και κατσικίσιο) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ανάμειξη σε αναλογία κατ'όγκο 70% πρόβειο και 30% κατσικίσιο, έγινε στο εργαστήριό μας, αμέσως μετά την πρόσληψη.

Η επιμόλυνση του γάλακτος έγινε με μία από τις 2 καλλιέργειες του βακτηρίου *L.monocytogenes*, ανεπτυγμένες στους 30 °C σε 1 L BHI, έως την στάσιμη φάση (stationary phase), μία σε βέλτιστες συνθήκες, (pCo) και η άλλη σε καταπονητικές συνθήκες, παρουσία 2.5 mg/L χλωριούχο βενζαλκωνίου, (pBc). Ο έλεγχος της συμπεριφοράς του βακτηρίου έγινε σε τρία χρονικά σημεία: 1, 30 και 60 μέρες μετά την στράγγιση του τυροπήγματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και σε κάθε πείραμα έγιναν 2 μετρήσεις (ολικό n=4).

7. 2. Χημικές αναλύσεις του γάλακτος.

Τα γάλατα (πρόβειο και κατσικίσιο) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η ανάμειξη (70% πρόβειο : 30% κατσικίσιο) έγινε στο εργαστήριό μας, αμέσως μετά την πρόσληψη. Πριν την ανάμειξη πήραμε από κάθε είδος γάλακτος μια σειρά δειγμάτων (n=3) για να γίνουν χημικές αναλύσεις. Το ίδιο αριθμό δειγμάτων πήραμε και από το ανάμεικτο αιγοπρόβειο γάλα.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων δίνονται στον Πίνακα 7.1, ενώ οι υπολογισμένες τιμές για το στερεό υπόλειμμα απο τον τύπο του Fleischman δίνονται στον Πίνακα 7.2. Οι πειραματικές τιμές δεν διαφέρουν στατιστικά ($P \geq 0,05$) απο τις υπολογισμένες με τον τύπο του Fleischman.

Σύμφωνα με τον Ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, το γάλα που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή της φέτας, πρέπει να έχει λιποπεριεκτικότητα

τουλάχιστον 6% κατά βάρος και pH τουλάχιστον 6.5. Το ανάμεικτο γάλα που θα χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή τυριού τύπου φέτα πληρεί την προϋπόθεση αυτή.

Πίνακας 7.1: Πειραματικά αποτελέσματα χημικών αναλύσεων στα χρησιμοποιημένα γάλατα. Το αιγοπρόβειο είναι σε αναλογία 70% πρόβειο και 30% κατσικίσιο γάλα .

Είδος γάλακτος	pH	Ειδ. Βάρος στους 15°C	% Λίπος	%Στερεό Υπόλειμμα	%ΣΥΑΛ
Πρόβειο	6,75	1,0368	6,49 ± 0,20	17,41 ± 0,25	9,26 ± 0,17
Κατσικίσιο	6,53	1,0316	5,28 ± 0,24	14,65 ± 0,15	9,37 ± 0,19
Αιγοπρόβειο	6,67	1,0328	6,14 ± 0,21	15,25 ± 0,82	9,10 ± 1,01

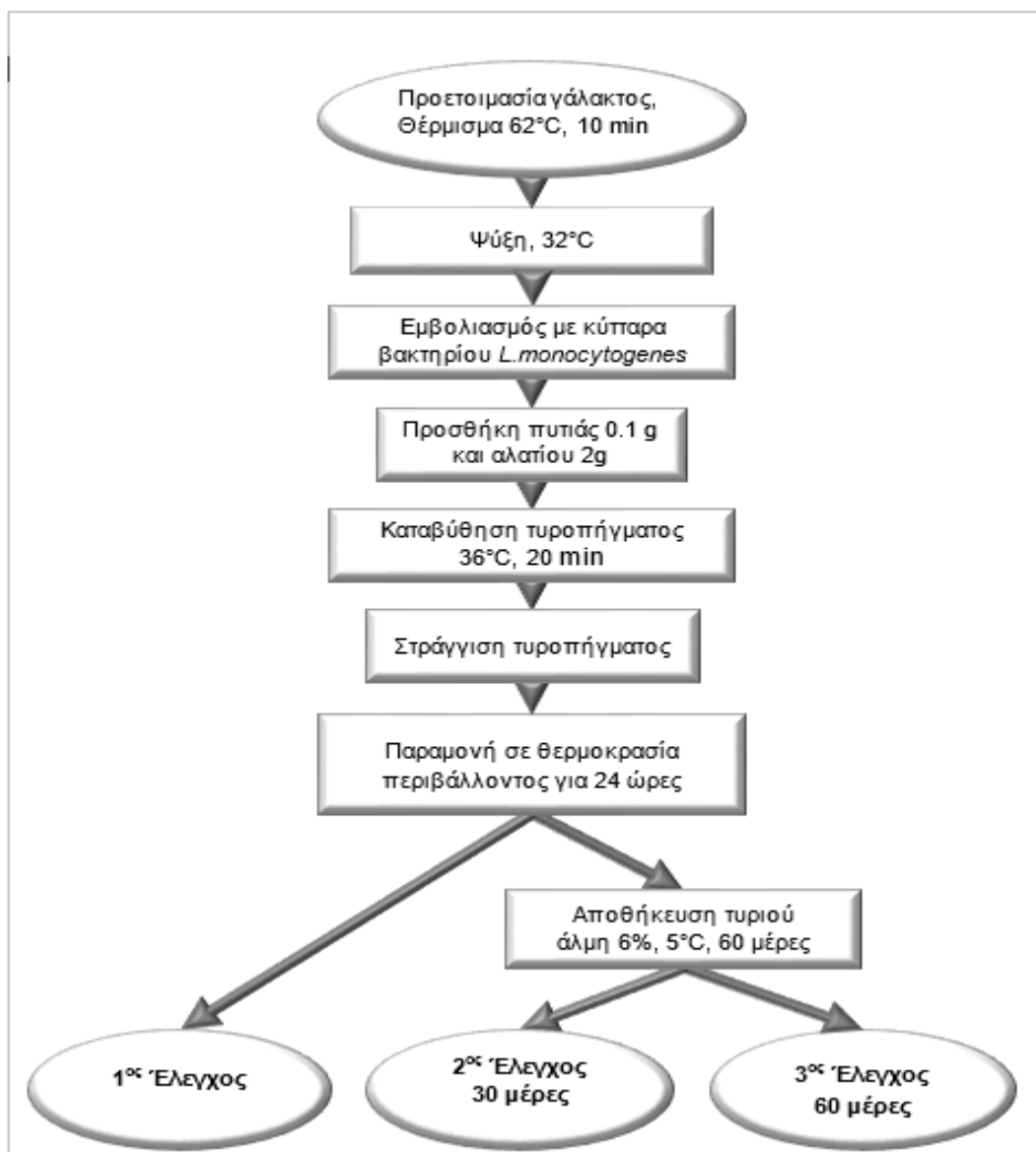
Πίνακας 7.2: Αποτελέσματα υπολογισμένα απο το τύπο του Fleischman με βάση την τιμή επί τοις εκατό του λίπους στα χρησιμοποιημένα γάλατα. Το αιγοπρόβειο είναι σε αναλογία 70% πρόβειο και 30% κατσικίσιο γάλα

Είδος γάλακτος	% Στερεό Υπόλειμμα	%ΣΥΑΛ
Πρόβειο	17,25 ± 0,24	10,76 ± 0,04
Κατσικίσιο	14,51 ± 0,35	9,23 ± 0,12
Αιγοπρόβειο	15,64 ± 0,26	9,69 ± 0,05

7. 3. Παρασκευή λευκού τυριού τύπου φέτα μετά την επιμόλυνση του γάλακτος

Το λευκό τυρί τύπου φέτα παρασκευάστηκε στο εργαστήριο με βάση τη διαδικασία παραγωγής φέτας. Η πορεία της παρασκευής τυριού δίνεται στο Σχήμα 7.1. Όπως είπαμε στο υποκεφάλαιο 6.3, το αιγοπρόβειο γάλα από το οποίο παρασκευάστηκε το τυρί, έχει λιποπεριεκτικότητα 6.14% w/w. Μετά το θέρμισμα, προετοιμάστηκαν 15 δείγματα γάλακτος των 200ml χωρισμένες σε δυο ομάδες των 6 δειγμάτων και μια ομάδα των 3 δειγμάτων. Κάθε εξάδα εμβολιάστηκε από μία συγκεκριμένη καλλιέργεια δίνοντας δύο σειρές δειγμάτων, την σειρά CO (εμβολιασμένη με κύτταρα απο την καλλιέργεια pCo), και την σειρά BC (εμβολιασμένη με κύτταρα απο την καλλιέργεια pBc). Η ομάδα των τριών δειγμάτων δεν εμβολιάστηκε για να εξυπηρετεί ως μάρτυρας σε κάθε έλεγχο. Κάθε δείγμα κωδικοποιήθηκε με βάση το πείραμα (A ή B), έναν αριθμό (1 έως 6) και την σειρά (CO ή BC). Μετά τον εμβολιασμό, σε κάθε δείγμα προστέθηκε ύπο ανάδευση αλάτι (2g) και πυτιά (0.1g). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο (36 °C) για 20 λεπτά προς καταβύθιση του

τυροπήγματος. Μετά το πέρας των 20 min, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό βαμβακερό πανί (τυρόπανο ή τουλουπάνι) προκειμένου να στραγγίσουν. Την επόμενη μέρα αφού έχουν στραγγίσει καλά, τα δείγματα που δεν θα χρειαστούν για τον 1^ο έλεγχο, τα μεταφέρουμε σε σακούλες stomacher και τα τοποθετούμε για αποθήκευση στους 5 °C, μέχρι να γίνει ο έλεγχος, αφού έχουμε προσθέσει στις σακούλες και 200 mL άλμη 6%.



Σχήμα 7.1: Πορεία παρασκευής τυριού τύπου φέτα από αιγοπρόβριο γάλα

Η επιμόλυνση έγινε προσθέτοντας σε κάθε δείγμα, εμβόλιο όγκου 1 ml, που περιέχει τέτοιο αριθμό κυττάρων, ώστε να μπορούμε να συγκρίνουμε τη συμπεριφορά των βέλτιστων και καταπονημένων κυττάρων του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Αυτό επιτεύχθηκε κάνοντας μια δεκαδική αραιώση για τις καλλιέργειες pCo και δυο δεκαδικές αραιώσεις για τις καλλιέργειες pBc. Στον Πίνακα 7.3 δίνονται τα δεδομένα των

καλλιέργειών που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση, και ο μικροβιακός αριθμός του εμβολίου.

Πίνακας 7.3: Δεδομένα για τις καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για την επιμόλυνση των δειγμάτων αιγοπρόβειου γάλακτος στις δύο πειραματικές σειρές, και ο μικροβιακός αριθμός του επιμολυσμένου γάλακτος

Καλλιέργεια	OD	Μικροβιακός Αριθμός (MA) καλλιέργειας cfu/ml	MA εμβολίου cfu/ml	MA επιμολυσμένου γάλακτος cfu/ml	Λογάριθμος του MA
pCo1	0,803	$1,35 \times 10^8$	$1,35 \times 10^7$	$6,73 \times 10^4$	4,83
pCo2	0,827	$4,82 \times 10^8$	$4,82 \times 10^7$	$2,41 \times 10^5$	5,38
pBc1	0,611	$7,33 \times 10^8$	$7,33 \times 10^6$	$3,66 \times 10^4$	4,56
pBc2	0,627	$1,47 \times 10^9$	$1,47 \times 10^7$	$7,35 \times 10^4$	4,87

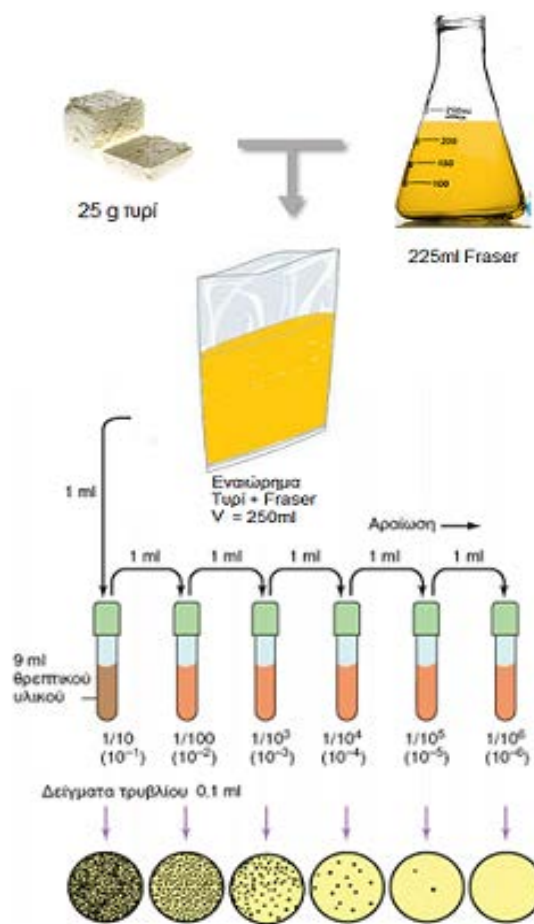
7. 4. Έλεγχος της συμπεριφοράς του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στο επιμολυσμένο τυρί τύπου φέτα κατά την ωρίμανση του.

Ο έλεγχος της συμπεριφοράς του βακτηρίου έγινε σε τρία χρονικά σημεία, 1 , 30 και 60 μέρες μετά τη στράγγιση του τυροπήγματος. Τα κύτταρα ανακτήθηκαν και καταμετρήθηκαν με τη μέθοδο που αναγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.6. Η πορεία δίνεται σχηματικά στο Σχήμα 7.2. Για την καταμέτρηση χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό OCLA.

7.4.1 Αποτελέσματα του πρώτου ελέγχου του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στα δείγματα τυριού.

Ο πρώτος έλεγχος έγινε 24 ώρες μετά την παρασκευή του τυριού, (στράγγιση του τυροπήγματος). Οι ζυγισμένες ποσότητες από κάθε δείγμα και ο τελικός όγκος του εναιωρήματος τυρί+Fraser δίνονται στον Πίνακα 7.4. Οι θερμοκρασίες των δειγμάτων την στιγμή της καταμέτρησης, κυμαίνονταν από 18-21°C, ενώ το pH $6,26 \pm 0,07$. Η ενοφθάλμηση των τρυβλίων έγινε απο τις αραιώσεις 10^{-3} έως 10^{-6} για τα δείγματα της σειράς CO και από 10^0 έως 10^{-3} για τα δείγματα της σειράς BC. Τα αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και για τα δυο πειράματα Α και Β δίνονται στον Πίνακα 7.5. Τα τρυβλία με μηδενικό αποτέλεσμα ή με αμέτρητες αποικίες δεν αναγράφονται στον πίνακα. Από των αριθμό των αποικιών υπολογίζεται ο μικροβιακός αριθμός (MA) στο εναιώρημα τυρί+Fraser του καθενός από τα δείγματα τυριού. Ο υπολογισμός γίνεται μόνο για όσα τρυβλία έχουν εμπιστευτικά αποτελέσματα. Το μικροβιακό φορτίο (ΜΦ) του τυριού σε cfu/g υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας το MA κάθε δείγματος με τον

τελικό όγκο του εναιωρήματος και διαιρώντας με τη μάζα του δείγματος. Τα αποτελέσματα δίνονται στον Πίνακα 7.6.



Σχήμα 7.2: Σχηματική παράσταση της διαδικασίας των διαδοχικών αραιώσεων με διάλυμα Fraser Broth Base του ομογενοποιημένου μίγματος (τυριού+Fraser) και της μεταφοράς 0,1 mL από τις αραιώσεις σε τρυβλία OCLA, με σκοπό την καταμέτρηση των αποικιών της *L.monocytogenes*

Πίνακας 7.4: Δεδομένα από τον 1^ο έλεγχο (24 ώρες) στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B.

Δείγμα	Μάζα δείγματος g	Τελικός όγκος εναιωρήματος τυρί+Fraser ml
A ₁ CO	24,979	241
A ₂ CO	25,375	246
B ₁ CO	25,220	250
B ₂ CO	25,578	251
A ₁ BC	25,130	246
A ₂ BC	25,340	251
B ₁ BC	25,293	246
B ₂ BC	25,279	246

Πίνακας 7.5: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμών του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, για τον 1^ο έλεγχο (24 ώρες).

Δείγμα	Αραίωση	Αριθμός αποικιών	Μικροβιακός Αριθμός MA, εναιωρήματος τυρί+Fraser cfu/ml	Μέσος Όρος του MA ανά δείγμα cfu/ml
A ₁ CO	10 ⁻⁴	37	3,70×10 ⁶	4,37×10 ⁶
	10 ⁻⁴	47	4,70×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	47	4,70×10 ⁶	
A ₂ CO	10 ⁻⁴	15	1,50×10 ⁶	1,83×10 ⁶
	10 ⁻⁴	18	1,80×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	22	2,20×10 ⁶	
B ₁ CO	10 ⁻³	214	2,14×10 ⁶	2,00×10 ⁶
	10 ⁻³	229	2,29×10 ⁶	
	10 ⁻³	138	1,38×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	22	2,20×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	24	2,40×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	16	1,60×10 ⁶	
	10 ⁻⁵	4		
B ₂ CO	10 ⁻³	225	2,25×10 ⁶	2,49×10 ⁶
	10 ⁻³	230	2,30×10 ⁶	
	10 ⁻³	209	2,09×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	34	3,40×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	24	2,40×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	6		
	10 ⁻⁵	1		
A ₁ BC	10 ⁰	15	1,50×10 ²	3,23×10 ²
	10 ⁰	43	4,30×10 ²	
	10 ⁰	39	3,90×10 ²	
	10 ⁻¹	3		
	10 ⁻¹	1		
	10 ⁻¹	2		
A ₂ BC	10 ⁰	2		
	10 ⁻¹	1		
B ₁ BC	10 ⁰	5	5,00×10 ¹	3,50×10 ¹
	10 ⁰	2	2,00×10 ¹	
	10 ⁻¹	1		
B ₂ BC	10 ⁰	9	9,00×10 ¹	6,00×10 ¹
	10 ⁰	3	3,00×10 ¹	
	10 ⁰	6	6,00×10 ¹	
	10 ⁻¹	1		
	10 ⁻¹	1		
	10 ⁻¹	2		

Πίνακας 7.6: Αποτελέσματα των υπολογισμών του μικροβιακού φορτίου τυριού ΜΦ σε cfu/gr και του λογαριθμού του, από τους αντίστοιχους μικροβιακούς αριθμούς ΜΑ εναιωρήματος τυρί+Fraser, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β, κατά τον 1^ο έλεγχο (24 ώρες).

Δείγμα	Μικροβιακός Αριθμός ΜΑ, εναιωρήματος τυρί+Fraser, cfu/ml	Μικροβιακό Φορτίο ΜΦ, δείγματος τυρι cfu/gr	Λογάριθμος ΜΦ log(cfu/gr)	Μέσος όρος λογάριθμου ΜΦ log(cfu/gr)
A ₁ CO	4,37×10 ⁶	4,21×10 ⁷	7,62	7,93±0,17
A ₂ CO	1,83×10 ⁶	1,78×10 ⁷	7,25	
B ₁ CO	2,00×10 ⁶	1,98×10 ⁷	7,30	
B ₂ CO	2,49×10 ⁶	2,44×10 ⁷	7,39	
A ₁ BC	3,23E×10 ²	3,13×10 ³	3,5	2,93±0,51
A ₂ BC	-	-	-	
B ₁ BC	3,50×10 ¹	3,40×10 ²	2,53	
B ₂ BC	6,00×10 ¹	5,84×10 ²	2,77	

7.4.2 Αποτελέσματα του δεύτερου ελέγχου του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στα δείγματα τυριού

Ο δεύτερος έλεγχος έγινε 30 μέρες μετά την παρασκευή του τυριού. Οι ζυγισμένες ποσότητες από κάθε δείγμα και ο τελικός όγκος του εναιωρήματος τυρί+Fraser δίνονται στον Πίνακα 7.7

Πίνακας 7.7: Δεδομένα από τον 2^ο έλεγχο (30 μέρες) στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β.

Δείγμα	Μάζα δείγματος τυριού g	Τελικός όγκος εναιωρήματος τυρί+Fraser
A ₃ CO	25,276	246
A ₄ CO	25,391	241
B ₃ CO	25,074	246
B ₄ CO	25,767	246
A ₃ BC	25,260	246
A ₄ BC	25,213	241
B ₃ BC	25,108	251
B ₄ BC	25,314	251

Οι θερμοκρασίες των δειγμάτων την στιγμή της καταμέτρησης, κυμαίνονταν από 7-13°C, ενώ το pH 6,69±0,30. Η ενοφθάλμιση των τρυβλίων έγινε, όπως και στην πρώτη καταμέτρηση, από τις αραιώσεις 10⁻³ έως 10⁻⁶ για τα δείγματα της σειράς CO και από

10^0 έως 10^{-3} για τα δείγματα της σειράς BC. Οι υπολογισμοί για τους MA και MΦ γίνονται όπως αναγράφεται στο υποκεφάλαιο 7.3.1. Τα αποτελέσματα για τα δυο επαναλήψεις A και B του πειράματος δίνονται στον Πίνακα 7.8 για την σειρά CO, και στον Πίνακα 7.9 για την σειρά BC. Στον Πίνακα 7.10 δίνονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών για το μικροβιακό φορτίο MΦ του τυριού.

Πίνακας 7.8: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς CO, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα A και B, για τον 2^ο έλεγχο (30 μέρες).

Δείγμα	Αραίωση	Αριθμός αποικιών	Μικροβιακός Αριθμός MA, εναιωρήματος τυρί+Fraser cfu/ml	Μέσος Όρος του MA ανά δείγμα cfu/ml
A ₃ CO	10^{-3}	233	$2,33 \times 10^6$	$1,96 \times 10^6$
	10^{-3}	180	$1,80 \times 10^6$	
	10^{-3}	192	$1,92 \times 10^6$	
	10^{-4}	20	$2,00 \times 10^6$	
	10^{-4}	23	$2,30 \times 10^6$	
	10^{-4}	14	$1,40 \times 10^6$	
	10^{-5}	5		
	10^{-5}	2		
	10^{-5}	1		
A ₄ CO	10^{-3}	251	$2,51 \times 10^6$	$2,53 \times 10^6$
	10^{-3}	108	$1,08 \times 10^6$	
	10^{-3}	236	$2,36 \times 10^6$	
	10^{-4}	31	$3,10 \times 10^6$	
	10^{-4}	31	$3,10 \times 10^6$	
	10^{-4}	30	$3,00 \times 10^6$	
	10^{-5}	3		
	10^{-5}	1		
	10^{-5}	3		
B ₃ CO	10^{-3}	168	$1,68 \times 10^6$	$1,82 \times 10^6$
	10^{-3}	203	$2,03 \times 10^6$	
	10^{-3}	143	$1,43 \times 10^6$	
	10^{-4}	19	$1,90 \times 10^6$	
	10^{-4}	23	$2,30 \times 10^6$	
	10^{-4}	16	$1,60 \times 10^6$	
	10^{-5}	6		
	10^{-5}	2		
B ₄ CO	10^{-3}	189	$1,89 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$
	10^{-3}	179	$1,79 \times 10^6$	
	10^{-3}	173	$1,73 \times 10^6$	
	10^{-4}	19	$1,90 \times 10^6$	
	10^{-4}	16	$1,60 \times 10^6$	
	10^{-4}	24	$2,40 \times 10^6$	
	10^{-5}	2		

Πίνακας 7.9: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β, για τον 2^ο έλεγχο (30 μέρες).

Δείγμα	Αραίωση	Αριθμός αποικιών	Μικροβιακός Αριθμός MA, εναιωρήματος τυρί+Fraser cfu/ml	Μέσος Όρος του MA ανά δείγμα cfu/ml
A ₃ BC	10 ⁰	54	5,40×10 ²	3,10×10 ²
	10 ⁰	18	1,80×10 ²	
	10 ⁰	21	2,10×10 ²	
	10 ⁻¹	1		
	10 ⁻¹	8		
	10 ⁻¹	7		
	10 ⁻²	1		
	10 ⁻²	1		
	10 ⁻³	1		
A ₄ BC	10 ⁰	39	3,90×10 ²	3,13×10 ²
	10 ⁰	24	2,40×10 ²	
	10 ⁰	31	3,10×10 ²	
	10 ⁻¹	13		
	10 ⁻¹	3		
	10 ⁻¹	9		
	10 ⁻²	1		
B ₄ BC	10 ⁰	17	1,70×10 ²	1,67×10 ²
	10 ⁰	21	2,10×10 ²	
	10 ⁰	12	1,20×10 ²	
	10 ⁻¹	5		
	10 ⁻¹	2		
B ₄ BC	10 ⁰	22	2,20×10 ²	2,57×10 ²
	10 ⁰	29	2,90×10 ²	
	10 ⁰	26	2,60×10 ²	
	10 ⁻¹	2		
	10 ⁻¹	3		
	10 ⁻²	1		

Πίνακας 7.10: Αποτελέσματα των υπολογισμών του μικροβιακού φορτίου τυριού ΜΦ σε cfu/gr και του λογαριθμού του, από τους αντίστοιχους μικροφιακούς αριθμούς ΜΑ εναιωρήματος τυρί+Fraser, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β, κατά τον 2^ο έλεγχο (30 μέρες).

Δείγμα	Μικροβιακός Αριθμός ΜΑ, εναιωρήματος τυρί+Fraser, cfu/ml	Μικροβιακό Φορτίο ΜΦ, δείγματος τυρι cfu/gr	Λογάριθμος ΜΦ log(cfu/gr)	Μέσος όρος λογάριθμου ΜΦ log(cfu/gr)
A ₃ CO	1,96×10 ⁶	1,91×10 ⁷	7,28	7,29±0,06
A ₄ CO	2,53×10 ⁶	2,40×10 ⁷	7,38	
B ₃ CO	1,82×10 ⁶	1,79×10 ⁷	7,25	
B ₄ CO	1,89×10 ⁶	1,80×10 ⁷	7,26	
A ₃ BC	3,10×10 ²	3,02×10 ³	3,48	3,40±0,12
A ₄ BC	3,13×10 ²	3,00×10 ³	3,48	
B ₃ BC	1,67×10 ²	1,67×10 ³	3,22	
B ₄ BC	2,57×10 ²	2,54×10 ³	3,41	

7.4.3 Αποτελέσματα του τρίτου ελέγχου του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στα δείγματα τυριού.

Ο τρίτος έλεγχος έγινε 60 μέρες μετά την παρασκευή του τυριού. Οι ζυγισμένες ποσότητες από κάθε δείγμα και ο τελικός όγκος του εναιωρήματος τυρί+Fraser δίνονται στον Πίνακα 7.11. Οι θερμοκρασίες των δειγμάτων τη στιγμή της καταμέτρησης, κυμαίνονταν από 10-13 °C, ενώ το pH 6,58±0,15. Η ενοφθάλμηση των τρυβλίων έγινε, όπως και στις άλλες δυο καταμετρήσεις, από τις αραιώσεις 10⁻³ έως 10⁻⁶ για τα δείγματα της σειράς CO και από 10⁰ έως 10⁻³ για τα δείγματα της σειράς BC.

Πίνακας 7.11: Δεδομένα από τον 3^ο έλεγχο (60 μέρες) στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β.

Δείγμα	Μάζα δείγματος τυριού g	Τελικός όγκος εναιωρήματος τυρί+Fraser
A ₅ CO	25,451	246
A ₆ CO	25,376	246
B ₅ CO	25,166	251
B ₆ CO	25,457	251
A ₅ BC	25,000	251
A ₆ BC	25,009	251
B ₅ BC	25,237	251
B ₆ BC	25,130	251

Οι υπολογισμοί για τους ΜΑ και ΜΦ γίνονται όπως αναγράφεται στο υποκεφάλαιο 7.3.1. Τα αποτελέσματα για τα δυο επαναλήψεις Α και Β του πειράματος δίνονται στον Πίνακα 7.12 για τη σειρά CO, και στον Πίνακα 7.13 για την σειρά BC. Στον Πίνακα 7.14 δίνονται τα αποτελέσματα των υπολογισμών για το μικροβιακό φορτίο ΜΦ του τυριού.

Πίνακας 7.12: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού ΜΑ, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς CO, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β, για τον 3^ο έλεγχο (60 μέρες).

Δείγμα	Αραίωση	Αριθμος αποικιών	Μικροβιακός Αριθμός ΜΑ, εναιωρήματος τυρί+Fraser cfu/ml	Μέσος Όρος του ΜΑ ανά δείγμα cfu/ml
A₅CO	10 ⁻³	164	1,64×10 ⁶	1,97×10⁶
	10 ⁻³	153	1,53×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	13	1,30×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	34	3,40×10 ⁶	
	10 ⁻⁵	3		
	10 ⁻⁵	3		
	10 ⁻⁶	1		
A₆CO	10 ⁻³	163	1,63×10 ⁶	1,32×10⁶
	10 ⁻³	93	9,30E+05	
	10 ⁻⁴	9	9,00E+05	
	10 ⁻⁴	18	1,80×10 ⁶	
	10 ⁻⁵	2		
B₅CO	10 ⁻³	160	1,60×10 ⁶	1,85×10⁶
	10 ⁻³	120	1,20×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	26	2,60×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	20	2,00×10 ⁶	
	10 ⁻⁵	8		
	10 ⁻⁵	3		
B₆CO	10 ⁻³	128	1,28×10 ⁶	1,65×10⁶
	10 ⁻³	120	1,20×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	23	2,30×10 ⁶	
	10 ⁻⁴	18	1,80×10 ⁶	
	10 ⁻⁵	5		
	10 ⁻⁵	2		
	10 ⁻⁵	1		

Πίνακας 7.13: Αποτελέσματα της καταμέτρησης αποικιών και υπολογισμοί του μικροβιακού αριθμού MA, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού της σειράς BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β, για τον 3^ο έλεγχο (60 μέρες).

Δείγμα	Αραίωση	Αριθμός αποικιών	Μικροβιακός Αριθμός MA, εναιωρήματος τυρί+Fraser cfu/ml	Μέσος Όρος του MA ανά δείγμα cfu/ml
A ₅ BC	10 ⁰	34	3,40×10 ²	4,27×10 ²
	10 ⁰	47	4,70×10 ²	
	10 ⁰	47	4,70×10 ²	
	10 ⁻¹	2		
	10 ⁻¹	10		
	10 ⁻¹	10		
	10 ⁻²	1		
	10 ⁻²	1		
A ₆ BC	10 ⁰	40	4,00×10 ²	4,33×10 ²
	10 ⁰	35	3,50×10 ²	
	10 ⁰	55	5,50×10 ²	
	10 ⁻¹	4		
	10 ⁻¹	5		
	10 ⁻¹	4		
	10 ⁻²	3		
B ₅ BC	10 ⁰	9	9,00×10 ¹	7,67×10 ¹
	10 ⁰	8	8,00×10 ¹	
	10 ⁰	6	6,00×10 ¹	
	10 ⁻¹	1		
	10 ⁻¹	1		
	10 ⁻¹	3		
B ₆ BC	10 ⁰	3	3,00×10 ¹	7,00×10 ¹
	10 ⁰	7	7,00×10 ¹	
	10 ⁰	11	1,10×10 ²	
	10 ⁻¹	2		
	10 ⁻¹	3		

Πίνακας 7.14: Αποτελέσματα των υπολογισμών του μικροβιακού φορτίου τυριού ΜΦ σε cfu/gr και του λογαριθμού του, από τους αντίστοιχους μικροβιακούς αριθμούς ΜΑ εναιωρήματος τυρί+Fraser, στα επιμολυσμένα δείγματα του τυριού των δυο σειρών CO και BC, από τα δυο επαναληπτικά πειράματα Α και Β, κατά τον 3^ο έλεγχο (60 μέρες).

Δείγμα	Μικροβιακός Αριθμός ΜΑ, εναιωρήματος τυρί+Fraser, cfu/ml	Μικροβιακό Φορτίο ΜΦ, δείγματος τυρι cfu/gr	Λογάριθμος ΜΦ log(cfu/gr)	Μέσος όρος λογάριθμου ΜΦ log(cfu/gr)
A ₅ CO	1,97×10 ⁶	1,90×10 ⁷	7,28	7,19±0,08
A ₆ CO	1,32×10 ⁶	1,27×10 ⁷	7,11	
B ₅ CO	1,85×10 ⁶	1,85×10 ⁷	7,27	
B ₆ CO	1,65×10 ⁶	1,62×10 ⁷	7,21	
A ₅ BC	4,27×10 ²	4,28×10 ³	3,63	3,12±0,45
A ₄ BC	4,33×10 ²	4,35×10 ³	3,64	
B ₅ BC	7,67×10 ¹	7,63×10 ²	2,88	
B ₆ BC	7,00×10 ¹	6,99×10 ²	2,84	

7. 5. Συγκρίσεις των αποτελεσμάτων της επιμόλυνσης του τυριού

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις πειραματικές διαδικασίες συνοψίζονται στον Πίνακα 7.15. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το STATISTICA, 7^η έκδοση (Statsoft 224, Tulsa, ΗΠΑ).

Πίνακας 7.15: Αποτελέσματα της μεταβολής των πληθυσμών σε log(cfu/g) του βακτηρίου *L.monocytogenes* σε δείγμα τυριού τύπου φέτα κατά την αποθήκευση του. Δίνονται οι μέσοι όροι των δύο πειραμάτων, μετά από στατιστική επεξεργασία.

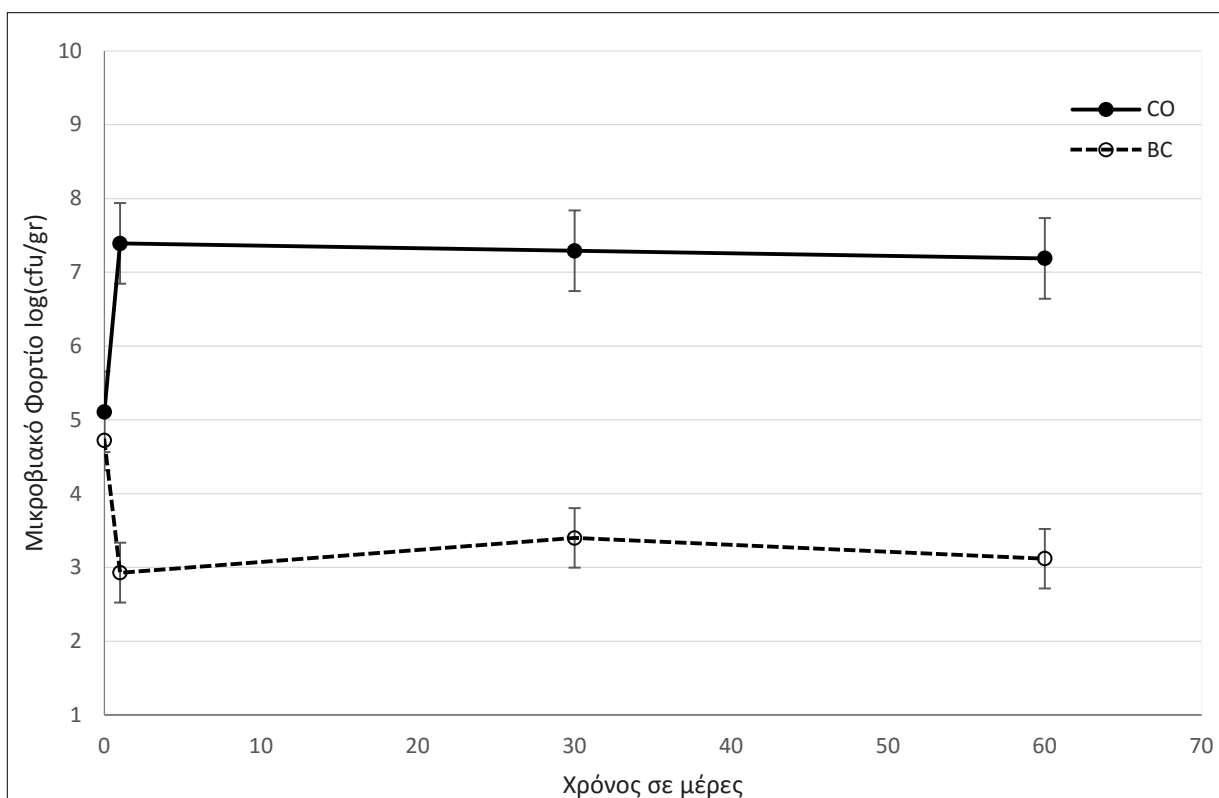
Σειρά επιμολυσμένων δειγμάτων τυριού	Λογάριθμος Μικροβιακού Αριθμού επιμολυσμένου γάλακτος log(cfu/ml)	Λογάριθμος Μικροβιακού Φορτίου δείγματος τυριού log(cfu/gr)		
		Έλεγχος 1 (24 ώρες)	Έλεγχος 2 (30 μέρες)	Έλεγχος 3 (60 μέρες)
CO	5,11 ± 0,39	7,39 ± 0,17	7,29 ± 0,06	7,19 ± 0,08
BC	4,72 ± 0,22	2,93 ± 0,51	3,40 ± 0,12	3,12 ± 0,45

Ο αριθμός των κυττάρων του βακτηρίου *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκαν σε βέλτιστες συνθήκες, πριν τον εμβολιασμό στο γάλα από το οποίο παρασκευάστηκε το τυρί, αυξήθηκε κατά 2,28 λογαριθμικές μονάδες ή κατά ~190 φορές, στις 24 πρώτες ώρες, σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων τη στιγμή του εμβολιασμού. Σε όλο το χρονικό διάστημα (60 μέρες) του πειράματος, παρατηρούμε ότι η *L. monocytogenes* συνεχίζει να επιβιώνει χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει σημαντική περαιτέρω ανάπτυξη

διατηρώντας την τάξη μεγέθους του πληθυσμού της στο επίπεδο των 7 λογαριθμικών μονάδων και στους δύο ελέγχους (Σχήμα 7.3).

Διαφορετική συμπεριφορά εκδηλώθηκε από τα κύτταρα που αρχικά είχαν αναπτυχθεί παρουσία του απολυμαντικού χλωριδίου του βενζαλκονίου. Στις 24 πρώτες ώρες, ο αριθμός των κυττάρων μειώθηκε κατά 1.79 λογαριθμικές μονάδες, σε σχέση με τον αριθμό των κυττάρων τη στιγμή του εμβολιασμού. Στο επόμενο χρονικό διάστημα του πειράματος, ο αριθμός των κυττάρων παρέμεινε σταθερός στο επίπεδο των 3 λογαριθμικών μονάδων (Σχήμα 7.3).

Συμπερασματικά, τα κύτταρα των δυο καλλιιεργιών pCO και pBC, στις παρούσες εργαστηριακές συνθήκες επέδειξαν διαφορετική συμπεριφορά στην αρχή. Αν και το επίπεδο επιβίωσης των καταπονεμένων κυττάρων του βακτηρίου, διέφερε από το επίπεδο των βέλτιστων, συνεχίζει να το καθιστά ωστόσο, το βακτήριο, επικίνδυνο.



Σχήμα 7.3: Μεταβολή των πληθυσμών των καλλιιεργιών pCo και pBC κατά τη διάρκεια της παρασκευής από επιμολυσμένο γάλα και αποθήκευσης λευκού τυριού τύπου φέτα που συντηρήθηκε σε άλμη 6%. Οι στατιστικές μπάρες προέρχονται από την επεξεργασία των δύο πειραματικών σειρών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΥΡΙΟΥ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ

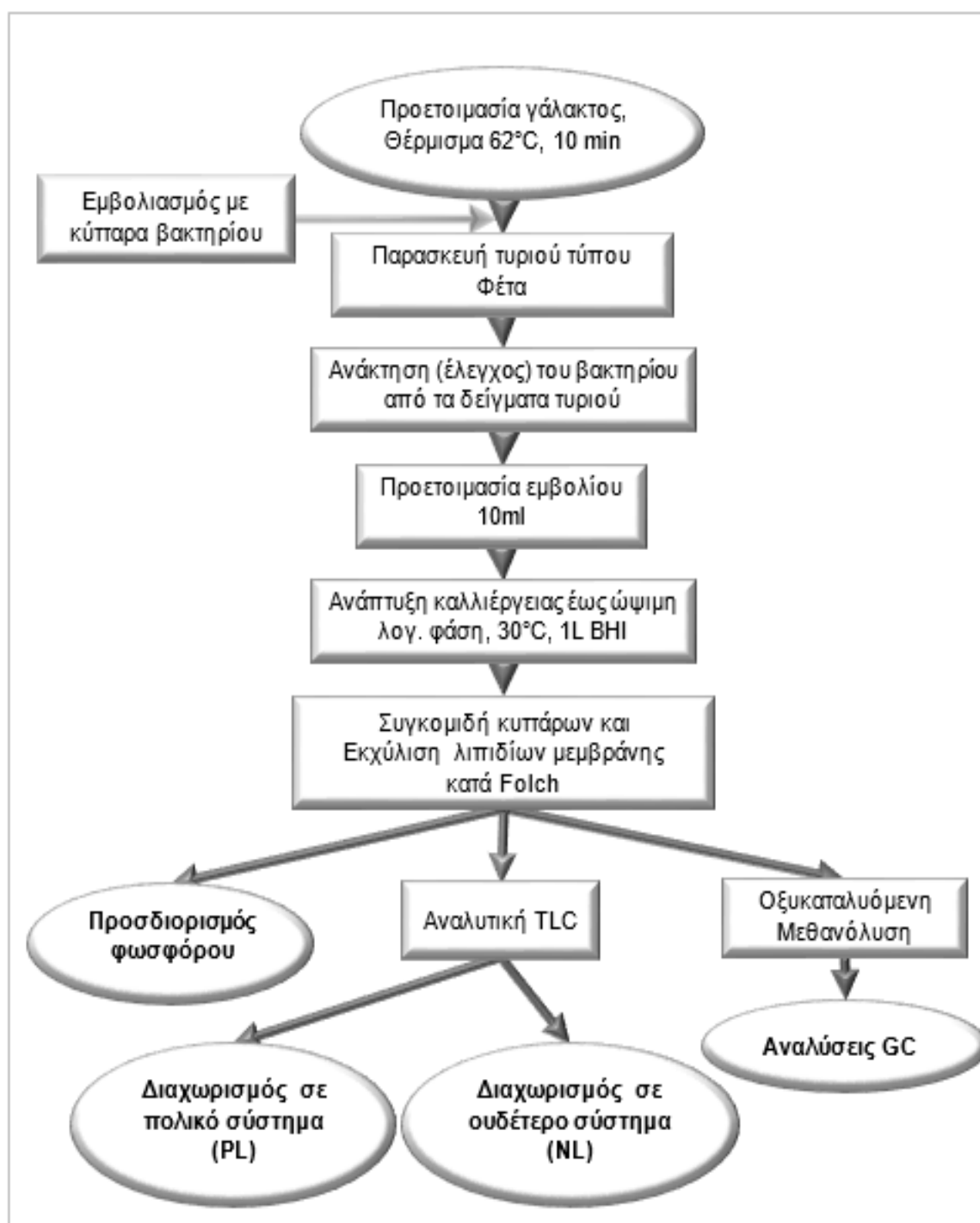
8. 1. Σχεδιασμός της πειραματικής διαδικασίας.

Η ικανότητα του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* να προσαρμόζεται (να επιβιώνει ή και να αναπτύσσεται) σε ποικίλα γαλακτοκομικά προϊόντα και κυρίως τυριά έχει μελετηθεί αρκετά. Οι μεταβολές στη λιπιδική σύσταση της μεμβράνης κατά την επιβίωση ή/και ανάπτυξη του βακτηρίου σε ένα τέτοιο περιβάλλον όπως το τυρί, έχουν απασχολήσει λίγο τους ερευνητές, λόγω της πολυπλοκότητας της δομής (matrix) του.

Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στην αποσαφήνιση των τροποποιήσεων που επέρχονται στην λιπιδική σύσταση της μεμβράνης του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την προσαρμογή του στις συνθήκες παρασκευής και συντήρησης τροφίμων και συγκεκριμένα, ενός εργαστηριακά παρασκευασμένου μαλακού τυριού (τύπου φέτα).

Για τη μελέτη των λιπιδίων της μεμβράνης του βακτηρίου *L. monocytogenes* ακολουθήθηκε κατ'αρχή η γενική πορεία που παρουσιάζεται στο σχήμα 8.1.

Σε κάθε έλεγχο που έγινε στα επιμολυσμένα δείγματα τυριού, ελήφθησαν κύτταρα από κάθε σειρά δειγμάτων (CO, BC), συμπεριλαμβανομένου της σειράς εμβολιασμένη με κύτταρα καταπονημένα σε pH 5,5 παρουσία γαλακτικού οξέος (LA). Η μελέτη συμπεριφοράς των κυττάρων του βακτηρίου *L. monocytogenes*, ανεπτυγμένα σε αυτές τις συνθήκες, κατά την αποθήκευση του τυριού, είναι μέρος της ερευνητικής εργασίας διπλώματος ειδίκευσης της Παρασκευή Δημαρέλη [182]. Τα κύτταρα ξύστηκαν από το τρυβλίο με την βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου και προστέθηκαν σε 10ml αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό BHI εντός γυάλινου βιδωτού σωλήνα (εμβόλιο) και ακολούθησε επώαση του εμβολίου στους 30 °C για 20 ώρες. Από κάθε τρυβλίο ετοιμάστηκαν δυο εμβόλια. Στην συνέχεια τα εμβόλια χρησιμοποιήθηκαν είτε για τον εμβολιασμό 1 L αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού BHI, είτε για την φύλαξη του ανακτημένου βακτηρίου σε cryovials (βλ. Υποκεφάλαιο 5.2.2) Τα ολικά λιπίδια εκχυλίστηκαν από τα κύτταρα του βακτηρίου που απομονώθηκαν από υγρές καλλιέργειες όγκου 1 L, ανεπτυγμένων έως την όψιμη λογαριθμική φάση, σε BHI, στους 30 °C. Στη συνέχεια στα ολικά λιπίδια έγινε αναλυτικός προσδιορισμός φωσφόρου, κλασμάτωση και ανάλυση με μονοδιάστατη TLC και οξυκαταλυόμενη μεθανόλυση για την παραλαβή των λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά οξέα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία.



Σχήμα 8.1: Διάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας και των αναλυτικών προσδιορισμών που έγιναν στα λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων της *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκε σε καλλιέργειες του 1 L BHI εμβολιασμένου με τα ανακτημένα από τα δείγματα τυριού κύτταρα, στους 30 °C, έως την όριμη λογαριθμική φάση.

8. 1. Εκχύλιση των ολικών λιπιδίων των καλλιέργειων με την μεθοδο Folch.

Η απομόνωση των κυττάρων της *L. monocytogenes* και η εκχύλιση των ολικών λιπιδίων από τις καλλιέργειες έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Folch, όπως περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 5.8. Πριν από την απομόνωση των κυττάρων κάθε καλλιέργειας λήφθηκαν 2-4 δείγματα των 2mL για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

(θολερότητας). Το υπόλοιπο του όγκου της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των κυττάρων της με φυγοκέντρηση και την εκχύλιση των ολικών λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης. Τα ολικά λιπίδια των καλλιεργειών εκφράστηκαν σε mg ανά g νωπών κυττάρων (TL/NK) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1. Δίνονται επίσης οι μέσοι όροι των τιμών της θολερότητας μετρούμενης στα 600nm. Οι τιμές του τελικού pH κυμαίνονταν από 5.40 έως 5.91 για όλες τις καλλιέργειες, με εξαίρεση την pLA, της οποίας το τελικό pH ήταν 5.19 ± 0.04 .

Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα της συγκομιδής κυττάρων από υγρές καλλιέργειες 1 L της *L.monocytogenes* που επωάστηκαν στους 30 °C, έως την όψιμη λογαριθμική φάση και της εκχύλισης των μεμβρανικών λιπιδίων με τη μέθοδο Folch. Δίνονται οι μέσοι όροι των δύο πειραμάτων.

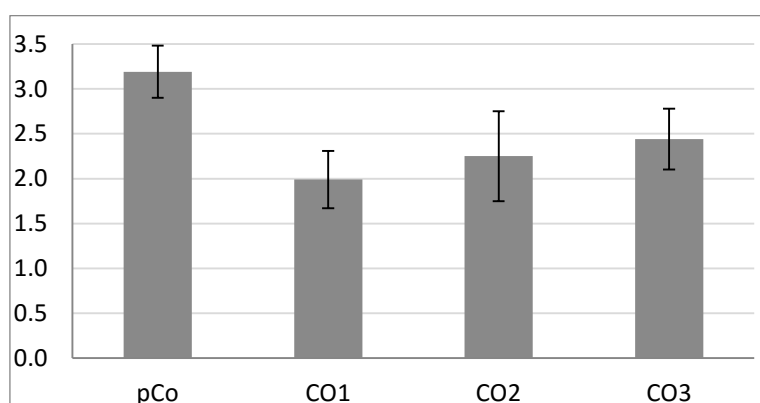
Καλλιέργεια	OD _{600nm}	Βάρος νωπών κυττάρων καλλιέργειας (g)	Βάρος λιπιδίων καλλιέργειας (mg)	Λόγος λιπίδια/ νωπά κύτταρα (TL/NK) (mg/g)
CO1	0,801 ± 0,003	2,31 ± 0,12	11,70 ± 0,36	5,07 ± 0,11
CO2	0,811 ± 0,002	2,45 ± 0,01	11,84 ± 0,08	4,84 ± 0,01
CO3	0,807 ± 0,005	2,29 ± 0,01	8,03 ± 0,59	3,51 ± 0,28
BC1	0,798 ± 0,007	2,14 ± 0,24	12,02 ± 1,69	5,63 ± 0,87
BC2	0,801 ± 0,003	2,42 ± 0,42	8,59 ± 0,41	3,62 ± 0,48
BC3	0,799 ± 0,004	2,28 ± 0,03	6,88 ± 1,16	3,01 ± 0,47
LA1	0,796 ± 0,008	2,50 ± 0,15	11,82 ± 0,76	4,73 ± 0,02
LA2	0,797 ± 0,007	2,38 ± 0,04	6,76 ± 0,36	2,85 ± 0,12
LA3	0,807 ± 0,003	2,36 ± 0,03	5,80 ± 0,67	2,46 ± 0,32
pCo	0,815 ± 0,017	2,56 ± 0,26	8,48 ± 0,47	3,31 ± 0,28
pBc	0,619 ± 0,011	2,03 ± 0,67	5,47 ± 0,17	2,70 ± 0,13
pLa	0,114 ± 0,001	0,51 ± 0,32	2,21 ± 0,19	4,39 ± 0,65

8. 2. Προσδιορισμός φωσφόρου στα ολικά λιπίδια. Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Ο προσδιορισμός φωσφόρου στα ολικά λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης της *L. monocytogenes* έγινε με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο 5.9. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τα ολικά λιπίδια παρατίθενται στον Πίνακα 8.2 και στα Σχήματα 8.2, 8.3 και 8.4. Η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε φώσφορο για τα κύτταρα της καλλιέργειας CO1, μειώνεται κατά 37,7% σε σχέση με τα κύτταρα της αρχικής καλλιέργειας pCO (βλέπε σχήμα 8.2). Η μείωση αυτή για τις δυο άλλες καλλιέργειες CO2 και CO3 είναι 29,2% και 23,4% αντίστοιχα ($P < 0,05$). Η διαφορά ανάμεσα στις τιμές για τις καλλιέργειες CO1 και CO2 είναι 13,5% (αύξηση). Στατιστικώς, δεν υπάρχει διαφορά της περιεκτικότητας του λιπιδικού φωσφόρου, ανάμεσα στις καλλιέργειες CO2 και CO3.

Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα του προσδιορισμού της % περιεκτικότητας σε φώσφορο των ολικών λιπιδίων μεμβράνης των κυττάρων από υγρές καλλιέργειες 1 L της *L. monocytogenes* που επωάστηκαν στους 30 °C, έως την όψιμη λογαριθμική φάση.

Καλλιέργεια	% Περιεκτικότητα Φωσφόρου
pCo	3,19 ± 0,29
pBC	2,81 ± 0,10
pLA	1,14 ± 0,07
CO1	1,99 ± 0,32
CO2	2,25 ± 0,50
CO3	2,44 ± 0,34
BC1	1,73 ± 0,48
BC2	1,95 ± 0,35
BC3	1,27 ± 0,25
LA1	2,13 ± 0,32
LA2	1,95 ± 0,30
LA3	2,58 ± 0,54



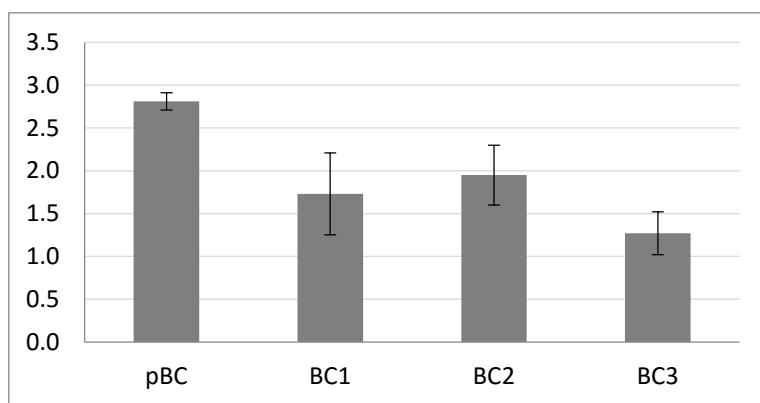
Σχήμα 8.2: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της *L. monocytogenes* από καλλιέργειες επωασμένες στους 30 °C. Οι καλλιέργειες CO1, CO2, CO3 έχουν εμβολιαστεί με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα. Τα δείγματα τυριού είχαν αρχικά επιμολυνθεί με κύτταρα από καλλιέργεια pCO, ανεπτυγμένα σε βέλτιστες συνθήκες (30 °C, 1 L BHI)

Για τα κύτταρα της καλλιέργειας BC1, η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε φώσφορο μειώνεται κατά 38.4% σε σχέση με τα κύτταρα της αρχικής καλλιέργειας pBC (βλέπε σχήμα 8.3). Η διαφορά ανάμεσα στις τιμές για τις καλλιέργειες BC1 και BC2 είναι 12,6% (αύξηση, $P < 0.05$), ενώ για τις καλλιέργειες BC2 και BC3 υπάρχει μία μείωση κατά 34,9% ($P < 0,05$). Η εκατοστιαία περιεκτικότητα φωσφόρου της καλλιέργειας BC3 είναι κατά 54,8% αυξημένη σε σχέση με αυτή της αρχικής καλλιέργειας pBC ($P < 0,05$).

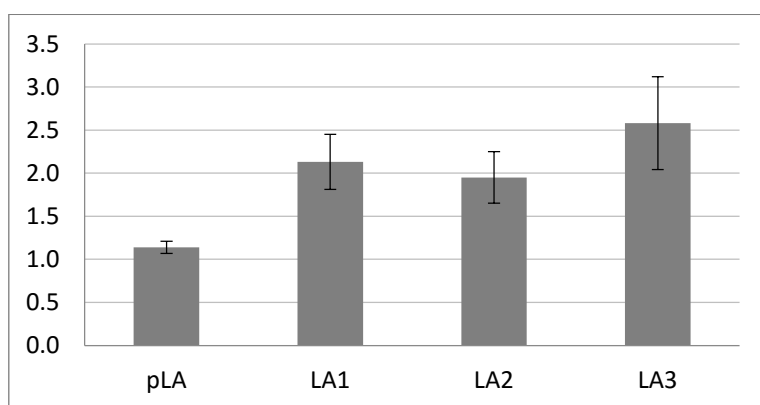
Η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε φώσφορο για τα κύτταρα της καλλιέργειας LA1, αυξάνεται κατά 87,1% ($P < 0,05$) σε σχέση με τα κύτταρα της αρχικής καλλιέργειας pLA (βλέπε σχήμα 8.4). Η αύξηση αυτή για τις δυο άλλες καλλιέργειες LA2 και LA3 είναι

70,9% και 126,3% αντίστοιχα ($P < 0,05$). Η διαφορά ανάμεσα στις τιμές για τις καλλιέργειες LA1 και LA2 είναι 8,6% (μείωση) ενώ για τις καλλιέργειες LA2 και LA3 υπάρχει μία αύξηση κατά 34,9% ($P < 0,05$).

Συμπερασματικά, οι ανάλυσεις του φωσφόρου στα λιπίδια των αρχικών επιμολυντικών καλλιεργειών pCo, pBC και pLA, συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου ($P > 0.05$) [114, 125]. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν μία σαφή μεταβολή στην % περιεκτικότητα του φωσφόρου στα λιπίδια των ανακτημένων κυττάρων (σειρές CO, BC, και LA) από τα αρχικά επιμολυντικά κύτταρα.



Σχήμα 8.3: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της *L. monocytogenes* από καλλιέργειες επωασμένες στους 30 °C. Οι καλλιέργειες BC1, BC2, BC3 έχουν εμβολιαστεί με ανακτημένα από τα δείγματα τυριού κύτταρα. Τα δείγματα τυριού είχαν αρχικά επιμολυνθεί με κύτταρα από καλλιέργεια pBC, ανεπτυγμένα σε καταπονικές συνθήκες, παρουσία χλωριδίου βενζαλκονίου 2.5 mg/L.



Σχήμα 8.4: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της *L. monocytogenes* από καλλιέργειες επωασμένες στους 30 °C. Οι καλλιέργειες LA1, LA2, LA3 έχουν εμβολιαστεί με ανακτημένα από τα δείγματα τυριού κύτταρα. Τα δείγματα τυριού είχαν αρχικά επιμολυνθεί με κύτταρα από καλλιέργεια pLA, ανεπτυγμένα σε καταπονικές συνθήκες (pH 5,5 λόγω παρουσίας γαλακτικού οξέος)

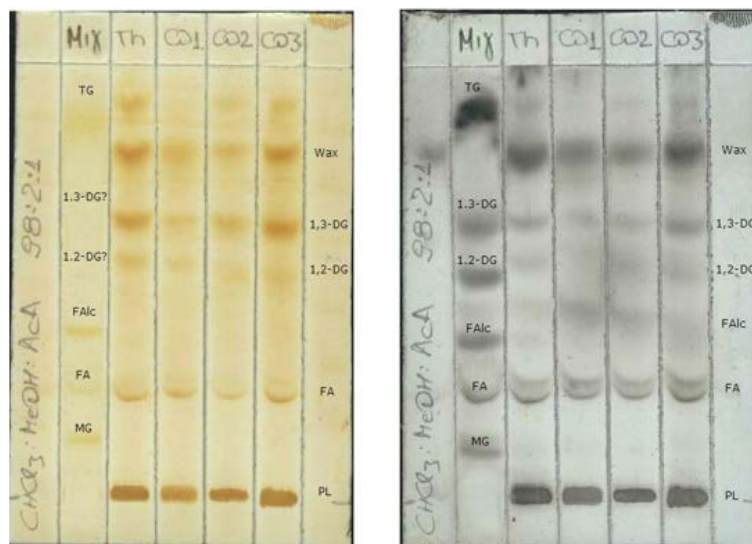
8. 3. Ανάλυση λιπιδίων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Τα ολικά λιπίδια στο συνολό τους, από τις καλλιέργειες της *L. monocytogenes* που αναπτύχθηκαν στους 30 °C υπεβλήθησαν σε κλασμάτωση με αναλυτική μονοδιάστατη TLC, όπως περιγράφεται στο Υποκεφάλαιο 5.10. Τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ σε αναλογία όγκων 98/2/1 για το διαχωρισμό των ουδέτερων λιπιδίων και χλωροφόρμιο/μεθανόλη/οξικό οξύ/νερό σε αναλογία όγκων 50/25/6/2 για το διαχωρισμό των πολικών λιπιδίων. Σε κάθε λωρίδα της μονοδιάστατης πλάκας τοποθετήθηκαν δείγμα (150-300 μg) ολικών λιπιδίων από της καλλιέργειες των ανακτηθέντων (από τα δείγματα τυριού) κυτάρων (CO, BC, LA) και πρότυπα λιπίδια ή/και από τις αρχικές καλλιέργειες (pCo, pBc, pLa).

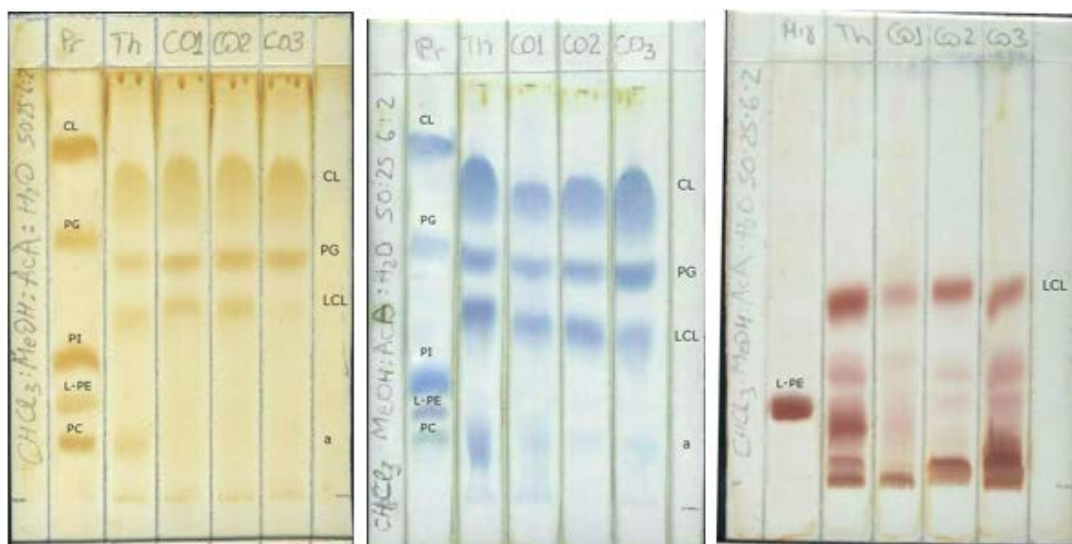
Η εμφάνιση των χρωματογραφιμάτων έγιναν με έκθεση σε ατμούς I₂, αρχικά, και στη συνέχεια για τα ουδέτερα λιπίδια με καύση κηλίδων στους 150°C μετά από ψεκασμό με θειικό χαλκό (Εικόνες 8.1, 8.3, 8.5) και για τα πολικά λιπίδια με αντιδραστήριο Dittmer-Lester (εμφάνιση φωσφολιπιδίων) και αντιδραστήριο νινυδρίνης (Εικόνες 8.2, 8.4, 8.6).

Όπως φαίνεται στις Εικόνες 8.1, 8.3 και 8.5, τα ουδέτερα λιπίδια του βακτηρίου *L. monocytogenes* διαχωρίζονται σε 4 λιπιδικές τάξεις: κηρούς, 1,3-διγλυκερίδια, 1,2-διγλυκερίδια και ελεύθερα λιπαρά οξέα, όπως και τα ουδέτερα λιπίδια του βακτηρίου που αναπτύσσεται σε βέλτιστες συνθήκες (καλλιέργεια pCO). Επιπλέον παρατηρείται μια τάξη που συγχρωματογραφείται με το πρότυπο των λιπαρών αλκοολών. Αυτή η τάξη έχει παρατηρηθεί σε καλλιέργειες που έχουν αναπτυχθεί παρουσία του βενζοϊκού ή οξικού οξέος, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο μας [21, 183].

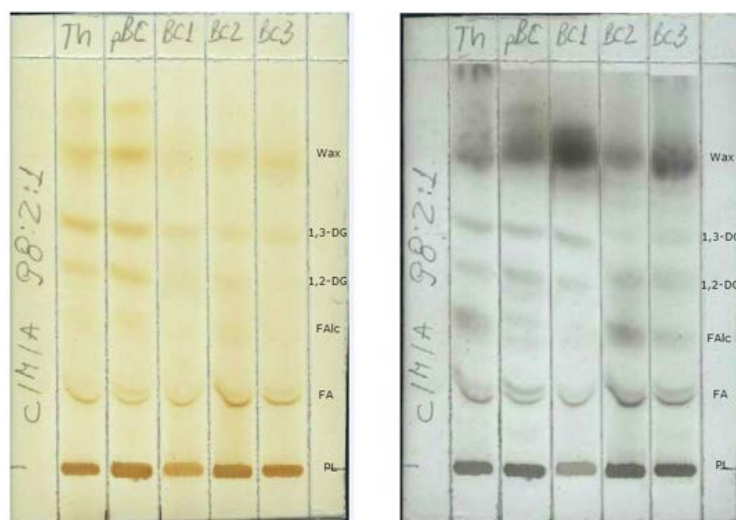
Τα πολικά λιπίδια του βακτηρίου αποτελούνται από φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια και αμινολιπίδια. Η κλασμάτωση των φωσφολιπιδίων (Εικόνες 8.2, 8.4, 8.6) έδειξε τις τρεις καλά αναγνωρισμένες τάξεις της καρδιολιπίνης, φωσφατιδυλογλυκερόλης και λυσουλ-καρδιολιπίνης. Για τις καλλιέργειες της σειράς CO μία τέταρτη συνιστώσα (επισημασμένη στο χρωματογράφημα ως a) κινείται σε παραπλήσιο R_f με τη φωσφατιδυλοχολίνη, PC. Στα δείγματα καλλιέργειών των σειρών BC και LA, υπάρχουν δυο συνιστώσες, (a και b) που συγχρωματογραφούνται με τη φωσφατιδυλοχολίνη PC, και τη φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, PI, αντίστοιχα. Η παρουσία της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας [97, 98, 114].



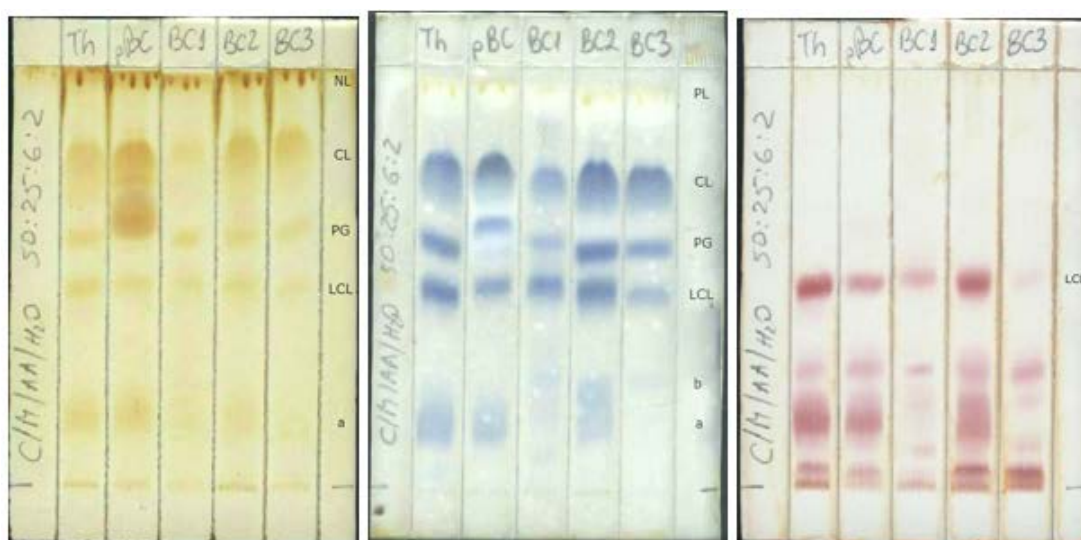
Εικόνα 8.1: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~150 μg , ~6 μg P) από καλλιέργειες της σειράς CO, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pCO (επισημασμένη ως TH). Πρότυπα λιπίδια: Τριπαλμιτίνη (TG), 1,2-διπαλμιτίνη (1,2-DG), 1,3-διπαλμιτίνη (1,3-DG), 1-μονοπαλμιτολεΐνη (MG), Παλμιτική αλκοόλη (FAlc), Ελαϊκό οξύ. Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ 98:2:1 v/v/v Εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I_2 , (αριστερή εικόνα) β) Καύση κηλίδων μετά από ψεκασμό με θειικό χαλκό (δεξιά εικόνα).



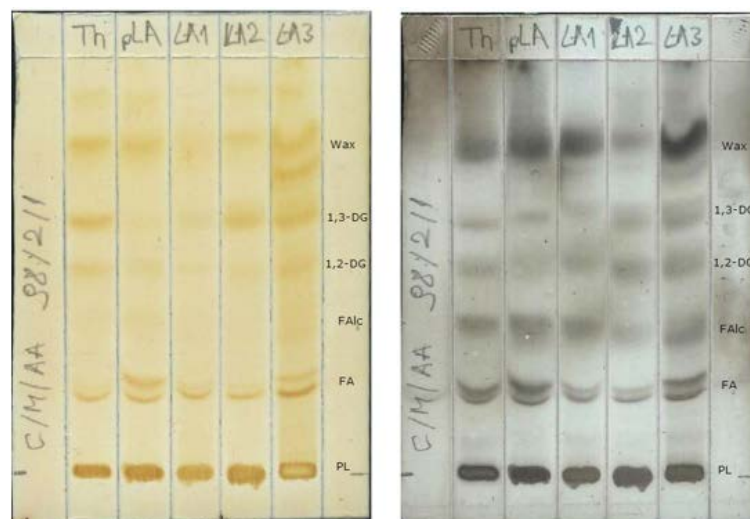
Εικόνα 8.2: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~150 μg , ~6 μg P) από καλλιέργειες της σειράς CO, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pCO (επισημασμένη ως TH). Πρότυπα λιπίδια: καρδιολιπίνη CL, φωσφατιδυλογλυκερόλη (PG), Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI), L- α - φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (L-PE) Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ /Νερό 50:25:6:2 v/v/v/v. Εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I_2 , (αριστερή εικόνα) και β) Αντιδραστήριο Dittmer-Lester, (μεσαία εικόνα) γ) Αντιδραστήριο νινυδρίνης (δεξιά εικόνα)



Εικόνα 8.3: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~200 μg , ~6 $\mu\text{g P}$) από καλλιέργειες της σειράς BC, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα από τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pBC. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 μg) από την αρχική επιμολυντική καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ 98:2:1 v/v/v. Εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I_2 , (αριστερή εικόνα) β) Καύση κηλίδων μετά από ψεκασμό με θειικό χαλκό (δεξιά εικόνα).



Εικόνα 8.4: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~200 μg , ~6 $\mu\text{g P}$) από καλλιέργειες της σειράς BC, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα από τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pBC. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 μg) από την καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Πολικό Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ /Νερό 50:25:6:2 v/v/v/v. Εμφάνιση έγινε με: α) Έκθεση σε ατμούς I_2 , (αριστερή εικόνα) β) Αντιδραστήριο Dittmer-Lester, (μεσαία εικόνα) γ) Αντιδραστήριο νινυδρίνης (δεξιά εικόνα)



Εικόνα 8.5: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~250 μg , ~6 μg P) από καλλιέργειες της σειράς LA, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pLA. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 μg) από την καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ 98:2:1 v/v/v και η εμφάνιση έγινε με: α) Έκθεση σε ατμούς ιωδίου, (αριστερή εικόνα) και β) Καύση κηλίδων μετά από ψεκασμό με θειικό χαλκό (δεξιά εικόνα).



Εικόνα 8.6: Αναλυτική TLC στα ολικά λιπίδια (~200 μg , ~6 μg P) από καλλιέργειες της σειράς LA, που εμβολιάστηκαν με ανακτημένα απο τα δείγματα τυριού κύτταρα και της αρχικής επιμολυντικής καλλιέργειας pLA. Μάρτυρας δείγμα λιπιδίων (150 μg) από την καλλιέργεια pCO (επισημασμένη ως TH). Σύστημα ανάπτυξης: Χλωροφόρμιο /Μεθανόλη /Οξικό οξύ /Νερό 50 :25: 6: 2 v/v/v/v. Η εμφάνιση με: α) Έκθεση σε ατμούς I_2 , (αριστερή εικόνα) και β) Αντιδραστήριο Dittmer-Lester, (μεσαία εικόνα) γ) Αντιδραστήριο νινυδρίνης (δεξιά εικόνα)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΚΤΗΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΥΡΙΟΥ

9. 1. Εισαγωγή

Όπως αναφερθήκαμε σε προηγούμενα κεφάλαια, οι αλλαγές των λιπαρών οξέων (FA) των μεμβρανικών λιπιδίων είναι μέρος του μηχανισμού προσαρμογής του βακτηρίου σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η μελέτη των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία γίνεται με σκοπό να ερευνήσουμε τις αλλαγές στο προφίλ τους, ώστε να κατανοήσουμε πληρέστερα των μηχανισμό προσαρμογής του βακτηρίου στο περιβάλλον τροφίμων.

Δείγματα (~500 µg) ολικών λιπιδίων της *L. monocytogenes* από καλλιέργειες που εμβολιάστηκαν με ανακτηθέντα κύτταρα από τα δείγματα τυριού και αναπτύχθηκαν μέχρι τη όψιμη λογαριθμική φάση, στους 30°C, τοποθετήθηκαν σε σωλήνες καύσης και μεθυλεστεροποιήθηκαν τα λιπαρά τους οξέα (Υποκεφάλαιο 5.11). Ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα δείγματα ολικών λιπιδίων από τις αρχικές καλλιέργειες, με τις οποίες επιμολύνθηκε το γάλα κατά την παρασκευή τυριού. Τα δείγματα μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που προέκυψαν αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία (GC). Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε στήλη DB-5ms (5%-Phenyl)-methylpolysiloxane). Η αναγνώριση των λιπαρών οξέων έγινε με βάση τον χρόνο εκλούσεως σε συνδυασμό με τα πρότυπα Marine και Matreya (Υποκεφ. 5.12). Ο όγκος δειγμάτων που εισήχθησε στον αέριο χρωματογράφο ήταν 1µL και οι ενέσεις για κάθε δείγμα ήταν τρείς.

9. 2. Μελέτη λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων μεμβράνης από τα κύτταρα των καλλιιεργειών της σειράς CO.

Τα αποτελέσματα υπολογισμών της εκατοστιαίας περιεκτικότητας για τα λιπαρά οξέα που αποτελούν το ~90% της σύστασης των ολικών λιπιδίων σε FA, από τις καλλιέργειες της σειράς CO, δίνονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 9.1 και παρουσιάζονται σχηματικά στο Σχήμα 9.1. Παρουσιάζονται επίσης και τα αποτελέσματα της % περιεκτικότητας των λιπαρών οξέων από τα ολικά λιπίδια της καλλιέργειας pCO. Υπενθυμίζεται ότι για τον εμβολιασμό των καλλιιεργειών της σειράς CO, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ανακτηθέντα απο δείγματα τυριού τα οποία είχαν παρασκευαστεί από γάλα επιμολυσμένο με κύτταρα καλλιέργειας pCO, ανεπτυγμένα σε βέλτιστες συνθήκες (30 °C, 1 L BHI, pH 7,1). Οι % περιεκτικότητες για την κάθε ένεση της καθεμιάς καλλιέργειας δίνονται στους πίνακες 1, 2 και 3 του παραρτήματος II.

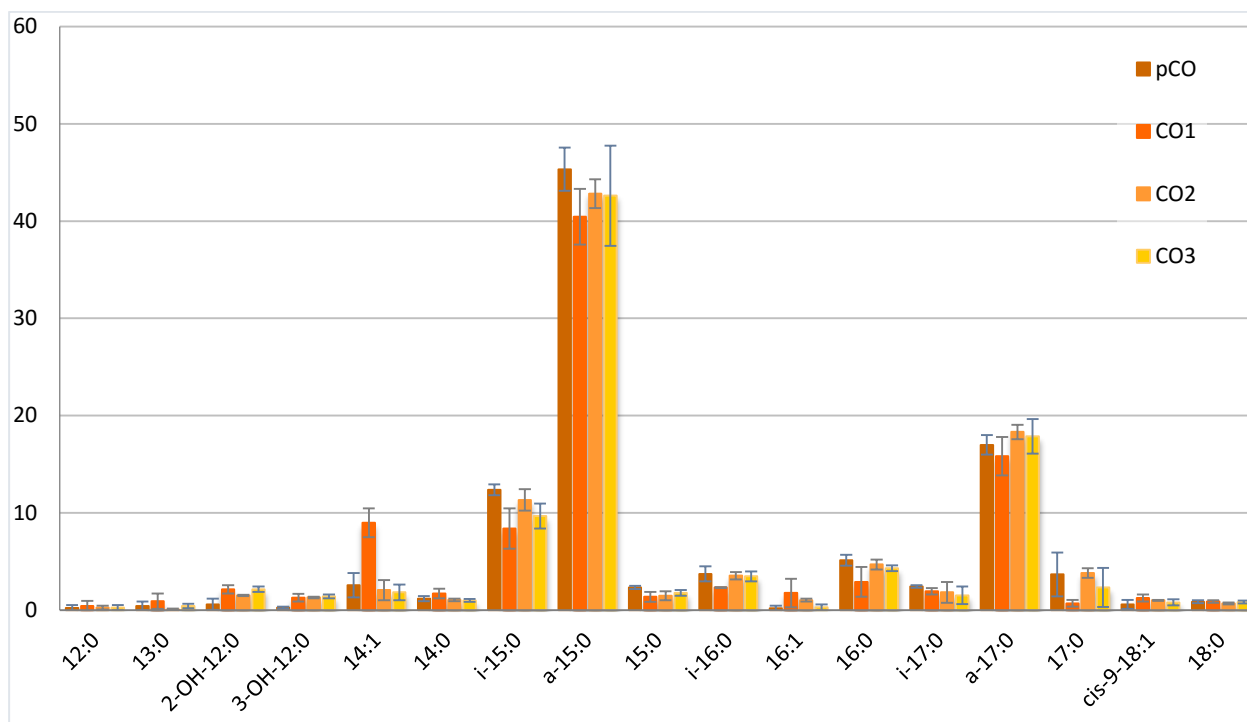
Τα λιπαρά οξέα διακλαδιζόμενης αλυσίδας (iso και anteiso), αποτελούν το 80.87% των λιπαρών οξέων για την καλλιέργεια pCO (βέλτιστες συνθήκες επώασης), ενώ στα λιπίδια των καλλιεργειών της σειράς CO το άθροισμα τους είναι 68,94% για την CO1, στο 77,74% για την CO2 και 75,15% για την CO3. Ο λόγος των διακλαδωμένων C15:0 προς C17:0 (br-15:0/br-17:0) δεν μεταβάλλεται ($p > 0.05$).

Παρατηρείται ότι τα λιπαρά οξέα ευθύγραμμης αλυσίδας (SCFA) αυξάνονται στα ολικά λιπίδια των ανακτηθέντων κυττάρων (CO1, CO2, CO3) σε σχέση με την καλλιέργεια pCO. Συγκεκριμένα από 19.13% που είναι στα λιπίδια της pCO, αυξάνουν στο 31,06% για την CO1, 22,26% για την CO2 και 24,85% για την CO3.

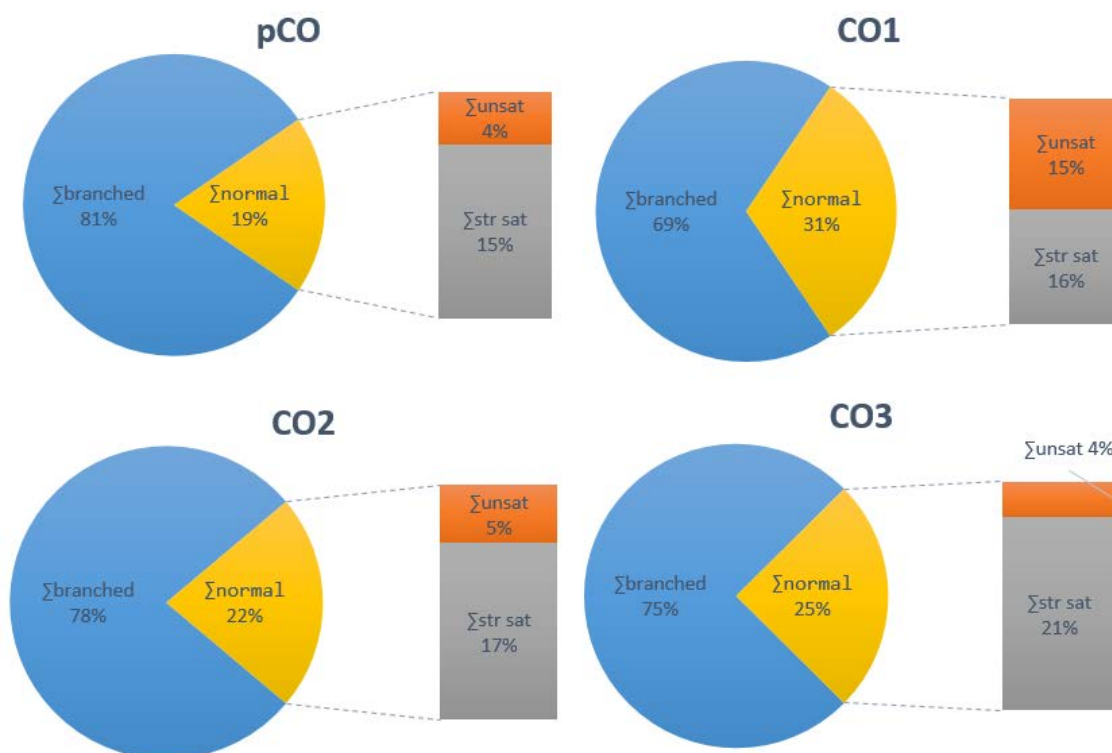
Οι αλλαγές αυτές παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.2. Στα ίδια σχήματα παρουσιάζονται και οι περιεκτικότητες των ακόρεστων και κορεσμένων ευθύγραμμων λιπαρών οξέων.

Πίνακας 9.1: Συγκεντρωτικός πίνακας για τις % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς CO και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pCO.

Λιπαρό οξύ	CO1	CO2	CO3	pCO
12:0	0,44 ± 0,51	0,27 ± 0,21	0,27 ± 0,28	0,24 ± 0,29
13:0	0,93 ± 0,79	0,08 ± 0,10	0,42 ± 0,23	0,44 ± 0,45
2-OH-12:0	2,15 ± 0,43	1,52 ± 0,07	2,15 ± 0,27	0,60 ± 0,58
3-OH-12:0	1,28 ± 0,39	1,31 ± 0,08	1,42 ± 0,20	0,25 ± 0,10
14:1	8,99 ± 1,48	2,07 ± 1,03	1,84 ± 0,80	2,57 ± 1,26
14:0	1,71 ± 0,49	1,06 ± 0,13	1,00 ± 0,14	1,19 ± 0,27
i-15:0	8,39 ± 2,07	11,33 ± 1,10	9,68 ± 1,29	12,38 ± 0,57
a-15:0	40,45 ± 2,86	42,81 ± 1,47	42,61 ± 5,15	45,33 ± 2,22
15:0	1,37 ± 0,51	1,48 ± 0,46	1,79 ± 0,30	2,33 ± 0,16
i-16:0	2,33 ± 0,06	3,55 ± 0,38	3,48 ± 0,50	3,73 ± 0,78
16:1	1,77 ± 1,46	1,03 ± 0,15	0,29 ± 0,32	0,19 ± 0,26
16:0	2,91 ± 1,53	4,69 ± 0,52	4,31 ± 0,29	5,13 ± 0,56
i-17:0	1,95 ± 0,34	1,83 ± 1,08	1,53 ± 0,91	2,44 ± 0,13
a-17:0	15,82 ± 1,97	18,32 ± 0,73	17,86 ± 1,78	16,99 ± 1,01
17:0	0,70 ± 0,35	3,82 ± 0,49	2,34 ± 2,00	3,68 ± 2,26
cis-9-18:1	1,26 ± 0,36	1,01 ± 0,05	0,81 ± 0,32	0,6 ± 0,46
18:0	0,90 ± 0,14	0,69 ± 0,10	0,84 ± 0,14	0,86 ± 0,15
Σbranched	68,94 ± 3,39	77,74 ± 3,00	75,15 ± 6,26	80,87 ± 1,17
Σnormal	31,06 ± 3,39	22,26 ± 3,00	24,85 ± 6,26	19,13 ± 1,17
Σstr unsat	15,29 ± 0,16	5,45 ± 1,13	3,88 ± 0,81	4,44 ± 2,49
Σstr sat	15,78 ± 3,55	16,82 ± 1,87	20,97 ± 7,07	14,69 ± 1,78
Σbranched/Σnormal	2,22 ± 0,35	3,50 ± 0,54	3,02 ± 1,10	4,23 ± 0,34
iso/anteiso	0,23 ± 0,05	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,07	0,30 ± 0,02
a-15:0/a-17:0	2,56 ± 0,16	2,36 ± 0,17	2,39 ± 0,09	2,67 ± 0,29
br-15:0/br17:0	2,75 ± 0,07	2,74 ± 0,06	2,70 ± 0,15	2,97 ± 0,32



Σχήμα 9.1: Διάγραμμα παρουσίασης των % περιεκτικοτήτων (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς CO και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pCO.



Σχήμα 9.2: Σχηματική παρουσίαση των αθροισμάτων των: διακλαδιζόμενης αλυσίδας (Σbranched), ευθύγραμμης αλυσίδας (Σnormal), ακόρεστων (Σstr unsat) και κορεσμένων (Σstr sat) λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες της σειράς CO και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pCO

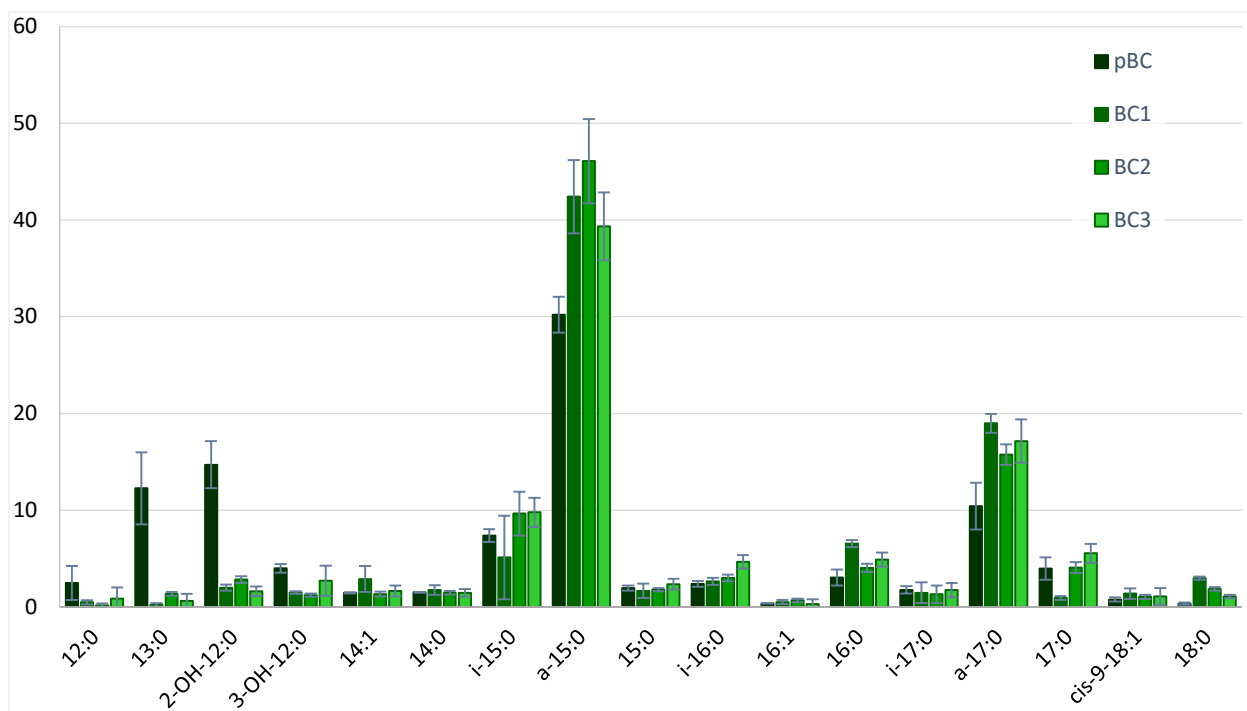
9. 3. Μελέτη λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων μεμβράνης από τα κύτταρα των καλλιέργειών της σειράς BC.

Στον Πίνακα 9.2 και στο Σχήμα 9.3 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές εκατοστιαίας περιεκτικότητας για τα λιπαρά οξέα που αποτελούν το ~90% της σύστασης των ολικών λιπιδίων σε FA για τις καλλιέργειες της σειράς BC. Παρουσιάζονται επίσης και οι τιμές της καλλιέργειας pBC, ανεπτυγμένη σε 30 °C, σε 1L BHI, παρουσία χλωριούχου βενζαλκονίου. Οι % περιεκτικότητες για την κάθε ένεση της καθεμιάς καλλιέργειας δίνονται στους πίνακες 4,5 και 6 του παραρτήματος II.

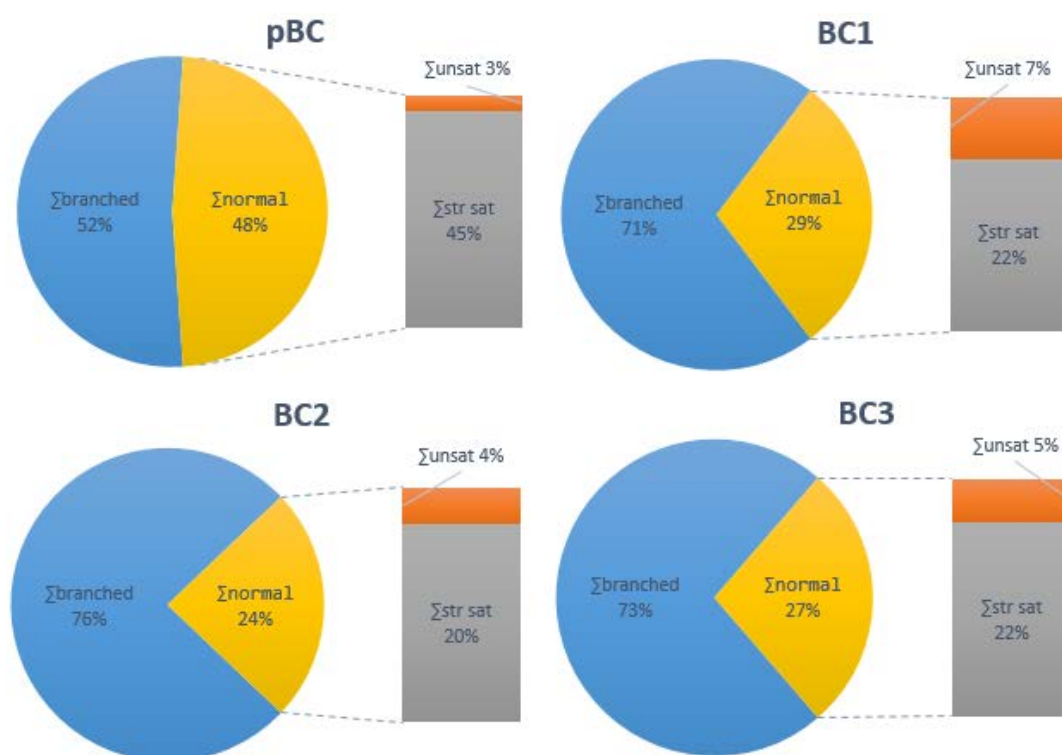
Τα διακλαδιζόμενα λιπαρά οξέα αποτελούν το 52,19% των λιπαρών οξέων για την καλλιέργεια pBC. Ενώ για τη σειρά BC το άθροισμα τους είναι 70,64% για την BC1, 75,82% για την BC2 και 72,70% για την BC3. Ο λόγος br-15:0/br-17:0 μεταβάλλεται από 2,32 στο pBC στα 3,27, 2,61 και 3,08 για τις BC1, BC2 και BC3 αντίστοιχα. Τα λιπαρά οξέα ευθύγραμμης αλυσίδας μειώνονται από 47,81% στην pBC σε 29,36%, 24,18% και 27.31% για τις BC1, BC2, BC3, αντίστοιχα. Στο Σχήμα 9.4 παρουσιάζονται οι περιεκτικότητες των διακλαδιζομένων, ευθύγραμμων, ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων.

Πίνακας 9.2: Συγκεντρωτικός πίνακας για τις % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC.

Λιπαρό οξύ	BC1	BC2	BC3	pBC
12:0	0,49 ± 0,21	0,18 ± 0,20	0,86 ± 1,17	2,49 ± 1,76
13:0	0,22 ± 0,19	1,36 ± 0,21	0,62 ± 0,75	12,27 ± 3,73
2-OH-12:0	1,99 ± 0,31	2,84 ± 0,35	1,63 ± 0,50	14,71 ± 2,44
3-OH-12:0	1,49 ± 0,13	1,23 ± 0,17	2,72 ± 1,56	4,00 ± 0,44
14:1	2,90 ± 1,35	1,34 ± 0,24	1,65 ± 0,56	1,46 ± 0,07
14:0	1,76 ± 0,50	1,47 ± 0,18	1,48 ± 0,40	1,51 ± 0,03
i-15:0	5,12 ± 4,32	9,65 ± 2,27	9,79 ± 1,50	7,38 ± 0,67
a-15:0	42,41 ± 3,78	46,09 ± 4,36	39,34 ± 3,50	30,22 ± 1,85
15:0	1,66 ± 0,75	1,78 ± 0,17	2,35 ± 0,56	1,95 ± 0,27
i-16:0	2,66 ± 0,37	3,01 ± 0,35	4,66 ± 0,70	2,39 ± 0,29
16:1	0,51 ± 0,21	0,69 ± 0,18	0,31 ± 0,50	0,38 ± 0,02
16:0	6,55 ± 0,36	4,05 ± 0,44	4,89 ± 0,74	3,05 ± 0,84
i-17:0	1,47 ± 1,08	1,32 ± 0,91	1,74 ± 0,75	1,77 ± 0,39
a-17:0	18,98 ± 0,97	15,76 ± 1,06	17,15 ± 2,23	10,43 ± 2,41
17:0	0,94 ± 0,20	4,08 ± 0,56	5,55 ± 0,98	3,98 ± 1,16
cis-9-18:1	1,38 ± 0,53	1,05 ± 0,21	1,10 ± 0,85	0,78 ± 0,20
18:0	2,98 ± 0,16	1,87 ± 0,19	1,08 ± 0,18	0,35 ± 0,11
Σbranched	70,64 ± 1,64	75,82 ± 2,63	72,70 ± 3,83	52,19 ± 5,42
Σnormal	29,36 ± 1,64	24,18 ± 2,63	27,31 ± 3,83	47,81 ± 5,42
Σstr unsat	7,62 ± 1,70	3,74 ± 0,48	4,99 ± 1,18	3,36 ± 0,19
Σstr sat	21,74 ± 0,06	20,44 ± 2,15	22,32 ± 2,64	44,45 ± 5,59
Σbranched/Σnormal	2,41 ± 0,19	3,14 ± 0,47	2,70 ± 0,52	1,09 ± 0,25
iso/anteiso	0,16 ± 0,13	0,23 ± 0,07	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,01
a-15:0/a-17:0	2,23 ± 0,11	2,93 ± 0,23	2,29 ± 0,00	2,90 ± 0,46
br-15:0/br17:0	2,32 ± 0,02	3,27 ± 0,32	2,61 ± 0,13	3,08 ± 0,49



Σχήμα 9.3: Διάγραμμα παρουσίασης των % περιεκτικότητας (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC.



Σχήμα 9.4: Σχηματική παρουσίαση των αθροισμάτων των: διακλαδιζόμενης αλυσίδας (Σbranched), ευθύγραμμης αλυσίδας (Σnormal), ακόρεστων (Σstr unsat) και κορεσμένων (Σstr sat) λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC.

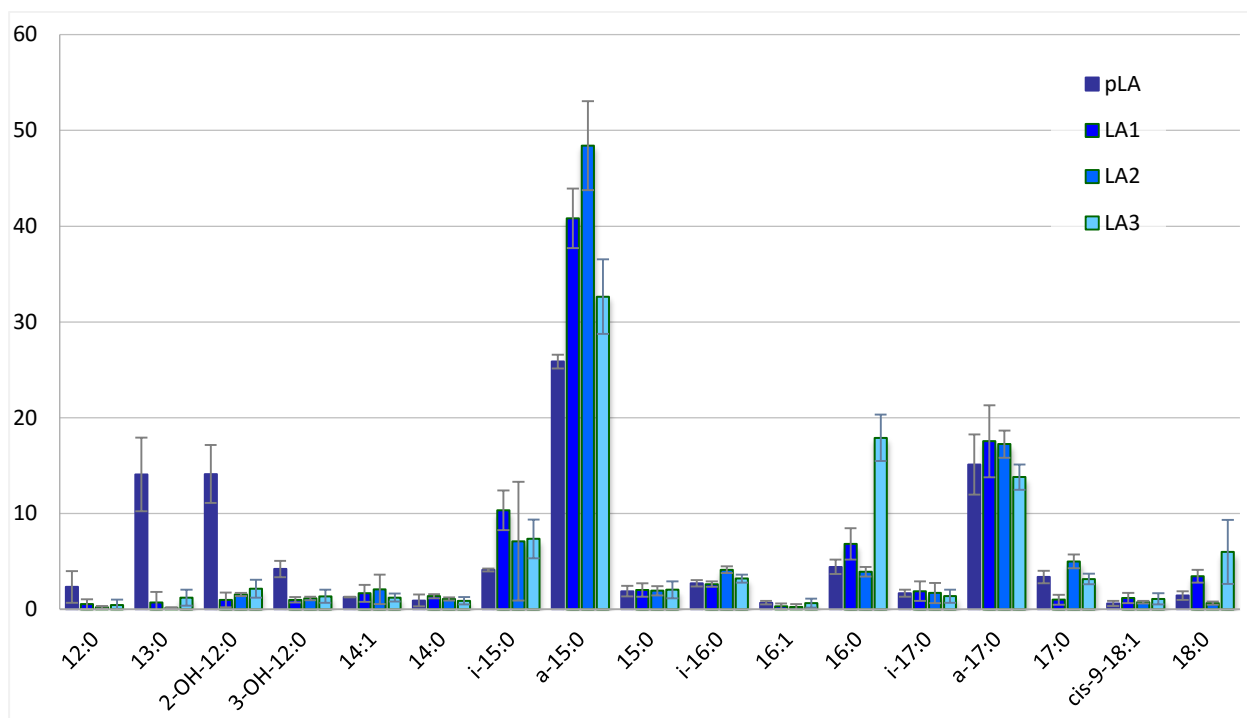
9. 4. Μελέτη λιπαρών οξέων των ολικών λιπιδίων μεμβράνης από τα κύτταρα των καλλιέργειών της σειράς LA

Οι τιμές % περιεκτικότητας για τα λιπαρά οξέα που αποτελούν το ~90% της σύστασης των ολικών λιπιδίων σε FA, για τις καλλιέργειες της σειράς LA παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 9.3 και σχηματικά στο Σχήμα 9.5. Παρουσιάζονται επίσης και οι τιμές % περιεκτικότητας των FA της καλλιέργειας pLA, ανεπτυγμένη σε 30°C, σε 1L BHI, αρχικό pH 5.5 παρουσία γαλακτικού οξέος. Οι % περιεκτικότητες για την κάθε ένεση της κάθε καλλιέργειας δίνονται στους πίνακες 7,8 και 9 του παραρτήματος II.

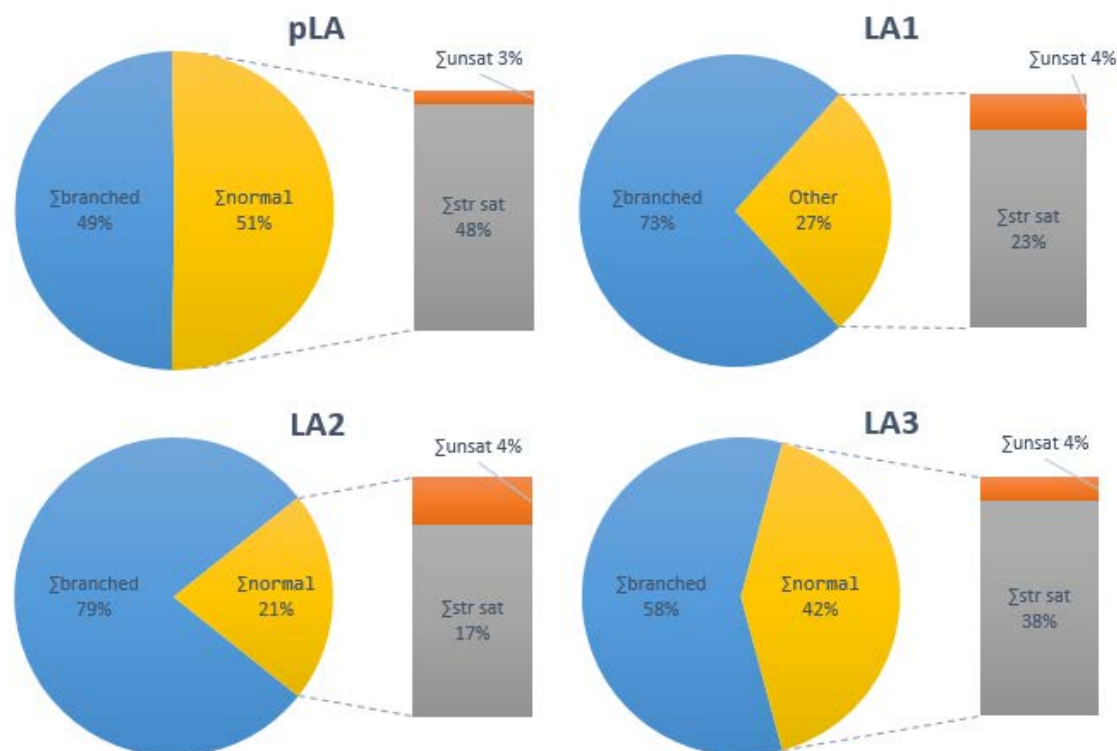
Τα διακλαδιζόμενα λιπαρά οξέα αποτελούν το 49,51% των λιπαρών οξέων για την καλλιέργεια pLA. Για τη σειρά LA το άθροισμα τους είναι 73,21%, 78,60% και 58,37% για την LA1 LA2 και LA3 αντίστοιχα. Ο λόγος br-15:0/br-17:0 δεν δείχνει μεταβολές στατιστικά σημαντικές ($p>0,05$). Τα λιπαρά οξέα ευθύγραμμης αλυσίδας μειώνονται από 50,49% στην pLA σε 26,80%, 21,40% και 41,63% για τις LA1, LA2, LA3 αντίστοιχα. Στο Σχήμα 9.6 παρουσιάζονται οι περιεκτικότητες των διακλαδισμένων, ευθύγραμμων, ακόρεστων και κορεσμένων λιπαρών οξέων.

Πίνακας 9.3: Συγκεντρωτικός πίνακας για τις % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς LA και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pLA.

Λιπαρό οξύ	LA1	LA2	LA3	pLA
12:0	0,53 ± 0,53	0,20 ± 0,13	0,43 ± 0,58	2,34±1,65
13:0	0,70 ± 1,11	0,15 ± 0,07	1,21 ± 0,82	14,09±3,84
2-OH-12:0	0,97 ± 0,77	1,55 ± 0,17	2,15 ± 0,92	14,13±3,04
3-OH-12:0	0,99 ± 0,29	1,14 ± 0,19	1,36 ± 0,69	4,21±0,89
14:1	1,67 ± 0,90	2,07 ± 1,53	1,22 ± 0,42	1,27 ± 0,04
14:0	1,37 ± 0,21	1,09 ± 0,17	0,89 ± 0,37	0,92 ± 0,62
i-15:0	10,34 ± 2,08	7,11 ± 6,19	7,36 ± 2,02	4,11 ± 0,15
a-15:0	40,82 ± 3,10	48,41 ± 4,64	32,64 ± 3,89	25,87 ± 0,72
15:0	2,00 ± 0,70	1,94 ± 0,49	2,04 ± 0,89	1,89 ± 0,55
i-16:0	2,63 ± 0,28	4,13 ± 0,36	3,20 ± 0,40	2,72 ± 0,33
16:1	0,32 ± 0,29	0,25 ± 0,30	0,64 ± 0,46	0,69 ± 0,19
16:0	6,83 ± 1,65	3,93 ± 0,49	17,90 ± 2,43	4,43 ± 0,76
i-17:0	1,89 ± 1,02	1,70 ± 1,04	1,36 ± 0,68	1,68 ± 0,37
a-17:0	17,55 ± 3,78	17,25 ± 1,43	13,81 ± 1,32	15,13 ± 3,14
17:0	0,44 ± 0,55	5,00 ± 0,71	0,12 ± 0,18	3,37 ± 0,64
cis-9-18:1	1,18 ± 0,53	0,75 ± 0,14	3,16 ± 0,56	0,62 ± 0,27
18:0	3,45 ± 0,66	0,64 ± 0,17	1,09 ± 0,58	1,43 ± 0,44
Σbranched	73,21 ± 0,23	78,60 ± 1,94	58,37 ± 2,64	49,51 ± 4,35
Σnormal	26,80 ± 0,23	21,40 ± 1,94	41,63 ± 2,64	50,49 ± 4,35
Σunsat	4,15 ± 0,28	4,28 ± 0,91	4,10 ± 0,41	2,87 ± 0,66
Σstr sat	22,65 ± 0,04	17,12 ± 1,03	37,53 ± 2,23	47,62 ± 5,01
Σbranched/Σnormal	2,73 ± 0,03	3,67 ± 0,42	1,40 ± 0,15	0,99 ± 0,18
iso/anteiso	0,26 ± 0,00	0,19 ± 0,16	0,26 ± 0,05	0,21 ± 0,01
a-15:0/a-17:0	2,40 ± 0,43	2,81 ± 0,13	2,36 ± 0,09	1,75 ± 0,31
br-15:0/br17:0	2,76 ± 0,69	2,9 ± 0,10	2,64 ± 0,11	1,83 ± 0,33



Σχήμα 9.5: Διάγραμμα παρουσίασης των % περιεκτικότητων (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) εκάστης καλλιέργειας της σειράς LA και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pLA.



Σχήμα 9.6: Παρουσίαση σχηματική των αθροισμάτων των: διακλαδιζόμενης αλυσίδας (Σbranched), ευθύγραμμης αλυσίδας (Σnormal), ακόρεστων (Σstr unsat) και κορεσμένων (Σstr sat) λιπαρών οξέων για τις καλλιέργειες της σειράς BC και της αρχικής επιμολυσματικής καλλιέργειας pBC

9. 5. Συμπεράσματα από την μελέτη των λιπαρών οξέων

Μετά την μεθυλεστεροποίηση έγιναν αναλύσεις των λιπαρών οξέων σε αερια χρωματογραφία με σκοπό να ερευνήσουμε τις αλλαγές στο προφίλ των λιπαρών οξέων, ώστε να κατανοήσουμε πληρέστερα των μηχανισμό προσαρμογής του βακτηρίου στο περιβάλλον τροφίμων.

Συμπερασματικά, τα κύτταρα της *L. monocytogenes* προερχόμενες από τα δείγματα επιμολυσμένα με κύτταρα που πριν την επιμόλυνση είχαν αναπτυχθεί σε βέλτιστες συνθήκες (σειρά CO), συνδιάζουν την αύξηση των SCFA με την μείωση των BCFA, χωρίς ταυτόχρονα να μεταβάλλουν τον λόγο των διακλαδωμένων br-C15:0 και br-C17:0 λιπαρών οξέων και τον λόγο των iso προς anteiso λιπαρών οξέων. Για την περίπτωση των αρχικά (πριν την επιμόλυνση του γάλακτος) καταπονημένων κυττάρων λόγω της παρουσίας απολυμαντικού (σειρά BC), διατηρούν στο χρόνο τις μεταβολές στα SCFA και μεταβάλλουν τους λόγους των br-C15:0 προς br-C17:0 και iso προς anteiso λιπαρών οξέων. Τα αρχικά καταπονημένα με γαλακτικό οξύ (σειρά LA) κύτταρα της *L. monocytogenes* μεταβάλλουν την περιεκτικότητα σε SCFA και διατηρούν τους λόγους των br-C15:0 προς br-C17:0 και iso προς anteiso λιπαρών οξέων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΣΥΖΥΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

10.1. Εισαγωγή

Έτοιμα προς κατανάλωση και νωπά τρόφιμα με εκτεταμένη διάρκεια ζωής είναι όλο και πιο δημοφιλή. Ωστόσο, πολλά από αυτά τα τρόφιμα περιέχουν πρώτες ή ελάχιστα επεξεργασμένα συστατικά και περιέχουν ως εκ τούτου τον κίνδυνο επιβίωσης παθογόνων βακτηρίων. Το τροφογενές ανθρώπινο παθογόνο *L. monocytogenes* προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία σε αυτά τα τρόφιμα λόγω ευρείας διανομής της στο περιβάλλον και συνεπώς, της παρουσίας της στις πρώτες ύλες τροφίμων. Επιπλέον, το βακτήριο είναι γνωστό για την ικανότητά του να αντιμετωπίσει μία ποικιλία περιβαλλοντικών καταπονήσεων, όπως το χαμηλό pH και να ανταπεξέλθει στα διάφορα απολυμαντικά χρησιμοποιούμενα στο περιβάλλον της βιομηχανίας των τροφίμων. Αυτά τα χαρακτηριστικά, και οι σοβαρές συνέπειες της εκδήλωσης λιστερίωσης κάνουν την *L. monocytogenes* μία σημαντική απειλή για τους καταναλωτές και τη βιομηχανία τροφίμων. Η διατριβή αυτή ασχολήθηκε με την

1- την επιβίωση του βακτηρίου σε συνθήκες παραγωγικής διαδικασίας και συντήρησης τροφίμων και συγκεκριμένα λευκού τυριού τύπου φέτα και

2- με την αποσαφήνιση των μεταβολών που επέρχονται στην λιπιδική σύσταση μεμβράνης του βακτηρίου *L. monocytogenes*, κατά την προσαρμογή του στις συνθήκες αυτές. Η αποσαφήνιση αυτή θα έχει ως απόρροια τη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών προσαρμογής του παθογόνου *L. monocytogenes* στις δυσμενείς συνθήκες, ώστε να συμβάλλει στον σχεδιασμό αποτελεσματικότερων εφαρμογών της τεχνολογίας συνδυασμού εμποδίων.

10.2. Παρουσία του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στο τυρί τύπου Φέτα.

Η *Listeria monocytogenes* έχει εντοπιστεί σε μια μεγάλη ποικιλία γαλακτοκομικών προϊόντων. Το τυρί είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο εξαιτίας της σχέσης του με τις τροφικές λοιμώξεις λιστερικού τύπου. Το βακτήριο έχει την ικανότητα να επιβιώνει κατά την παρασκευή και ωρίμανση πολλών τυριών και ιδιαίτερος στα μαλακά και ημίσκληρα τυριά [184].

Στο Κεφάλαιο 7, μελετήθηκε η συμπεριφορά του βακτηρίου καταπονημένο και μη, στο τυρί τύπου φέτα, κατά την δίμηνη αποθήκευσή του (σε άλμη 6% NaCl w/v, 5 °C). Το λευκό τυρί τύπου φέτα παρασκευάστηκε στο Εργαστήριο μας με βάση τη διαδικασία παραγωγής φέτας από επιμολυσμένο γάλα. Η επιμόλυνση του γάλακτος έγινε

εμβολιάζοντας κύτταρα του βακτηρίου *L. monocytogenes* από δυο καλλιέργειες ανεπτυγμένες στους 30 °C σε 1 L BHI, έως τη στάσιμη φάση, μία σε βέλτιστες συνθήκες, (pCo) και η άλλη σε καταπονητικές συνθήκες, παρουσία 2.5 mg/L χλωριούχο βενζαλκωνίου, (pBc). Ο αριθμός του μικροβιακού φορτίου (cfu/ml) της καθεμίας επιμολυντικής ή αρχικής καλλιέργειας του βακτηρίου *L. monocytogenes* προσδιορίστηκε στο $8,37 \pm 0,35 \log \text{ cfu/ml}$ για την pCo καλλιέργεια και στο $9,09 \pm 0,21 \log \text{ cfu/ml}$ για την pBc καλλιέργεια (Υποκεφ. 6.1, Πίνακας 6.3).

Ο έλεγχος της συμπεριφοράς του βακτηρίου έγινε σε τρία χρονικά σημεία, 1, 30 και 60 μέρες μετά την παρασκευή του τυριού (στράγγιση του τυροπήγματος).

Κατά τον 1^ο έλεγχο (24 ώρες), ο αριθμός των κυττάρων που αναπτύχθηκαν σε βέλτιστες συνθήκες αυξήθηκε κατά 2,28 λογαριθμικές μονάδες σε σχέση με το εμβόλιο, ενώ ο αριθμός των κυττάρων που αρχικά είχαν αναπτυχθεί παρουσία του απολυμαντικού χλωριούχου του βενζαλκωνίου μειώθηκε κατά 1,79 λογαριθμικές μονάδες. Στους δυο επόμενους ελέγχους (όλο το χρονικό διάστημα 60 ημερών του πειράματος) ο αριθμός των κυττάρων παρέμεινε στατιστικά σταθερός στο επίπεδο των 7 και 3 λογαριθμικών μονάδων για την βέλτιστη αρχική καλλιέργεια και την καταπονημένη καλλιέργεια, αντίστοιχα. Αυτή η διαφορετική τάση των δυο καλλιεργιών pCO και pBC, στις παρούσες εργαστηριακές συνθήκες παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.3 (υποκεφ. 7.5).

Η συμπεριφορά του βακτηρίου στο τυρί έχει ελεγχθεί και σε άλλες μελέτες που έγιναν στο Εργαστήριό μας [185,188-190.. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έδειξαν μία τάση αναπτύξεως των βέλτιστων αλλά και, των κρυο- ή οξινο-καταπονημένων κυττάρων στις πρώτες 24 ώρες. Τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής για τα καταπονημένα λόγω απολυμαντικού κύτταρα (pBc) έδειξαν τάση μείωσης, ενώ τα βέλτιστα έδειξαν ανάπτυξη.

Σε άλλες μελέτες στην Ελλάδα και παγκοσμίως, έχει μελετηθεί η συμπεριφορά των διαφόρων στελεχών της *L. monocytogenes* σε διάφορα μαλακά τυριά [158, 187, 191-195.. Σύμφωνα με τους Papageorgiou & Marth (1989), η παρατηρούμενη ανάπτυξη οφείλεται στο γεγονός ότι κατά το αρχικό στάδιο της τυροκομίας, όπου το pH είναι πάνω από 5,0, οι συνθήκες δεν είναι επαρκώς περιοριστικές. Τα κύτταρα του βακτηρίου *L. monocytogenes* ήταν σε θέση να αναπτυχθούν και να αυξηθούν κατά μέσο όρο $1,5 \log(\text{cfu/g})$ στις δύο πρώτες μέρες της ωρίμανσης της φέτας. Παρ' όλα αυτά, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα διάφορα στελέχη δεν έχουν καμία επίδραση στη συμπεριφορά του παθογόνου [185]. Οι Morgan et al. (2001) αποδίδουν την αύξηση της τιμής από 10^2 cfu/ml στο γάλα σε $3,3 \log(\text{cfu/g})$ στο τυρόπηγμα, στην φυσική παγίδευση του *L.*

monocytogenes κατά την αποστράγγιση του τυροπήγματος [186]. Τα αποτελέσματα αυτής της διατριβής συμφωνούν με τις μελέτες όσον αφορά τα κύτταρα που αρχικά είχαν αναπτυχθεί σε βέλτιστες συνθήκες. Η αύξηση τους κατά 2,28 λογαριθμικές μονάδες είναι σαφώς μεγαλύτερη από τις τιμές που προτίθενται από την ως άνω βιβλιογραφία. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην διαφορετική σύσταση του γάλακτος ή/και την απουσία της εναρκτηκής καλλιέργειας.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της διατριβής δείχνουν ότι η *L. monocytogenes* όντας παρούσα στο γάλα, μπορεί να επιβιώσει κατά την παρασκευή και την αποθήκευση του τυριού. Αν και το επίπεδο επιβίωσης των καταπονημένων κυττάρων του βακτηρίου διέφερε από το επίπεδο των βέλτιστων, συνεχίζει να είναι άνω του επιτρεπόμενου ορίου σε όλη την περαματική διάρκεια αποθήκευσης. Επιπλέον, η προϊστορία των κυττάρων που επιμολύνουν το τρόφιμο έχει επίδραση στην συμπεριφορά τους κατά την αποθήκευση του τυριού.

10.3. Μελέτη των μεμβρανικών λιπιδίων του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Ο μηχανισμός που χρησιμοποιεί το βακτήριο *L. monocytogenes* για να επιβιώσει σε συνθήκες καταπόνησης είναι σύνθετος. Ένας από τους τρόπους είναι ή μεταβολή της σύστασης των λιπιδίων της μεμβράνης του.

Στο Κεφάλαιο 8, αναλύθηκαν τα ολικά λιπίδια της μεμβράνης των κυττάρων που ανακτήθηκαν από το τυρί και των κυττάρων που είχαν αρχικά επιμολύνει το γάλα που χρησιμοποιήθηκε παρασκευή τυριού.

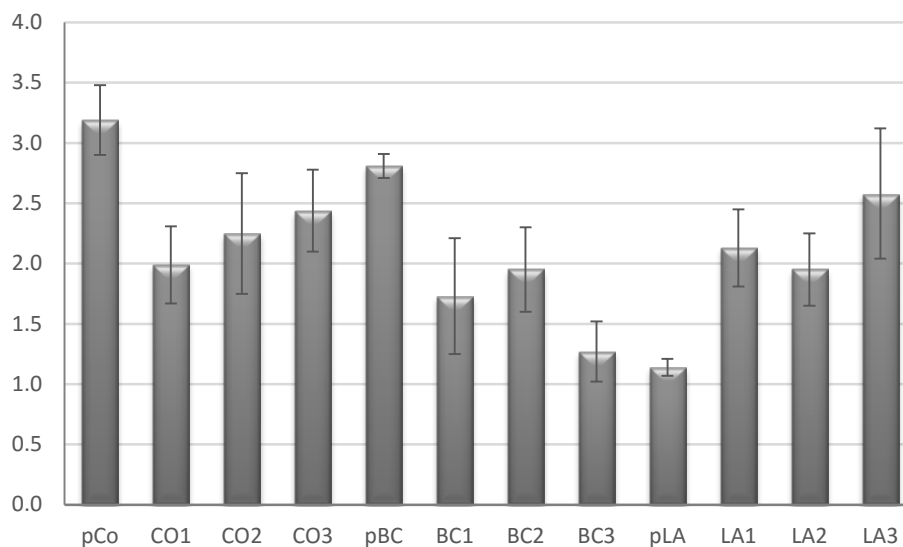
Οι ανάλυσεις του φωσφόρου στα λιπίδια των αρχικών επιμολυντικών καλλιεργειών pCo, pBC και pLA, συμφωνούν με τις προηγούμενες μελέτες του Εργαστηρίου ($P > 0.05$) [114, 125]. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων έδειξαν μία σαφή μεταβολή στην % περιεκτικότητα του φωσφόρου στα λιπίδια των ανακτημένων κυττάρων (σειρές CO, BC, και LA) από τα αρχικά επιμολυντικά κύτταρα.

Στις καλλιέργειες των ανακτημένων κυττάρων από το τυρί, 24 ώρες μετά την παρασκευή του, η περιεκτικότητα των λιπιδίων σε φώσφορο μειώνεται στο 37,7% για τα βέλτιστα κύτταρα (CO1) και στο 38,4% για τα καταπονημένα με απολυμαντικό κύτταρα (BC1) σε σχέση με τα αντίστοιχα αρχικά επιμολυντικά κύτταρα pCo και pBC (Σχήμα 10.1). Ενώ στα ανακτημένα καταπονημένα σε όξινο περιβάλλον παρουσία γαλακτικού οξέος κύτταρα (LA1), η περιεκτικότητα του φωσφόρου αυξάνεται 87,1% σε σχέση με τα αρχικά τους pLA. Μειωμένη περιεκτικότητα του λιπιδικού φωσφόρου, σε σχέση με τα αρχικά pCo και pBC υπάρχει και για τις καλλιέργειες CO2, CO3, BC2, BC3, όπως

υπάρχει η αυξημένη περιεκτικότητα σε φώσφορο των LA2 και LA3 σε σχέση με τα αρχικά τους επιμολυντικά κύτταρα pLA.

Οι μεταβολές στην περιεκτικότητα των λιπιδίων σε φώσφορο υποδηλώνουν μεταβολές στη σύσταση των ολικών λιπιδίων σε φωσφολιπίδια. Οι μεταβολές αυτές μπορεί να οφείλονται στις μεταβολές στα ολικά (μεταβολές των ουδέτερων λιπιδίων) ή στα πολικά λιπίδια (μεταβολές σε γλυκολιπίδια και αμινολιπίδια) [16, 114]. Συγκεκριμένα, οι παρατηρούμενες μειώσεις στην περιεκτικότητα φωσφόρου στα λιπίδια των σειρών CO και BC δηλώνουν μείωση στα φωσφολιπίδια και σε συνδυασμό με τις αυξήσεις του λόγου TL/NK (Πίνακας 8.1) και μία πιθανή αύξηση της περιεκτικότητας των ουδέτερων λιπιδίων, συγκριτικά με τα αρχικά τους επιμολυντικά κύτταρα pCo και pBC. Για τα όξινοκαταπονημένα κύτταρα της σειράς LA, η αύξηση της περιεκτικότητας του φωσφόρου δηλώνει αύξηση των φωσφολιπιδίων με ή χωρίς ταυτόχρονη αύξηση των ουδέτερων λιπιδίων.

Μείωση της περιεκτικότητας των φωσφολιπιδίων έχει επίσης χρησιμοποιηθεί από την *L. monocytogenes* και άλλα βακτήρια ως απόκριση σε διαφορετικές περιβαλλοντικές καταπονήσεις, όπως τα αντιβιοτικά [196 - 198].



Σχήμα 10.1: Γραφική παράσταση της εκατοστιαίας περιεκτικότητας φωσφόρου στα μεμβρανικά λιπίδια κυττάρων της *L. monocytogenes* που ανακτήθηκαν από το τυρί 24 ώρες μετά την παρασκευή του και επωάστηκαν στους 30 °C.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της διατριβής δείχνουν μεταβολές στην λιπιδική σύσταση της μεμβράνης (μεταβολές φωσφολιπιδίων με ή χωρίς ταυτόχρονη αύξηση των ουδέτερων λιπιδίων) ως απόκριση στο περιβάλλον (τυρί), οι οποίες εξαρτώνται από την προϊστορία των κυττάρων που επιμόλυναν το γάλα από το οποίο παρασκευάστηκε το τυρί.

10.4. Μελέτη των λιπαρών οξέων του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί να μεταβάλλει την σύσταση των λιπαρών οξέων ώστε να ρυθμίζει την ρευστότητα της μεμβράνης του σε απόκριση στις περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Τα λιπίδια της *L. monocytogenes* χαρακτηρίζονται από ένα ασυνήθιστο ποσοστό των BCFA (85%), κυρίως anteiso-C15:0 και anteiso-C17:0 [97, 98, 102]. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι anteiso-C15:0 και anteiso-C17:0 λιπαρά οξέα συνδέονται στην θέση sn-1 και sn-2 του σκελετού της γλυκερόλης, αντίστοιχα σε όλες τις τάξεις των φωσφολιπιδίων [100]. Στο πλαίσιο της διατήρησης και ασφάλειας των τροφίμων, περιβαλλοντικές παράμετροι όπως η θερμοκρασία, το pH και η ενεργότητα του νερού (a_w) είναι οι πιο σημαντικές.

Οι μεταβολές των λιπαρών οξέων στα ανακτημένα από το τυρί κύτταρα σε σύγκριση με τα αρχικά επιμολυντικά κύτταρα, παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 9.

Η σύσταση των FA για τα λιπίδια της pCo (βέλτιστες συνθήκες επώασης) αποτελείται από 80,87 % BCFA, με το άθροισμα των δυο επικρατέστερων λιπαρών οξέων a-C15:0 και a-C17:0 να ανέρχεται στο 62,32 %. Το προφίλ αυτό συμφωνεί και με τις προηγούμενες μελέτες στο Εργαστήριο [16]. Ενώ τα λιπίδια των καλλιιεργειών pBC (επώαση σε καταπονημένες συνθήκες παρουσία 2,5mg/L BZC) και pLA (επώαση σε καταπονημένες συνθήκες αρχικό pH=5,5, λόγο γαλακτικού οξέος) παρουσιάζουν ένα διαφορετικό προφίλ FA. Το σύνολο των BCFA ανέρχεται στο 52,19 % για την καλλιέργεια pBC όταν σε προηγούμενες μελέτες η τιμή που δίνεται είναι 78,9 % [125, 187]. Τα a-C15:0 και a-C17:0 είναι μόνο το 40,65% και λιπαρά οξέα με 12 και 13 άτομα άνθρακα αποτελούν το 33,47 % του συνόλου των FA (Πίνακας 9.2). Στις προηγούμενες μελέτες δεν αναφέρονται λιπαρά οξέα με τέτοιο αριθμό ανθράκων και το άθροισμα των a-C15:0 και a-C17:0 φτάνει το 65% του συνόλου. Σε μια μελέτη [188], η ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes* παρουσία απολύμαντικού Tween 20 είχε ως αποτέλεσμα το άθροισμα των διακλαδιζομένων C15:0 και C17:0 να είναι το 45 % του FA συνόλου. Για την καλλιέργεια pLA, τα BCFA ανέρχονται στο 49,51 %, (Πίνακας 9.3) που συμφωνεί με την αναφερόμενη τιμή των 48,4% στις προηγούμενες μελέτες [114, 189]. Όμως, στις προηγούμενες μελέτες τα 4 επικρατέστερα FA είναι σε φθίνουσα σειρά το a-C15:0, a-C17:0, C16:0 και C18:0 αποτελώντας το 69,4 % του συνόλου των FA, ενώ στα αποτελέσματα της διατριβής αυτής τα C16:0 και C18:0 ανέρχονται μόνο στο 5,9 % και τα FA με C12 και C13 αποτελούν το 36,96 % του συνόλου των FA. Οι διαφορές αυτές πιθανώς να οφείλονται στο διαφορετικό χρόνο ανάπτυξης της καλλιέργειας pLA (31 ώρες έως την στάσιμη φάση) σε σχέση με τις προηγούμενες μελέτες. Η παρουσία των FA με μικρότερη των 15 άτομα άνθρακα

αλυσίδα, έχει αναφερθεί και από άλλες μελέτες [108, 190, 191]. Έχει αναφερθεί επίσης από τους Julotok et al. (2010) ότι η παρουσία 100 mM προπιονικού στους 37 °C, μείωσε το ποσοστό του συνόλου των anteiso λιπαρά οξέα έως 70 % από 84,3 % και είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση n-C13:0 στο 10,6 % των FA [192].

Τα ανακτημένα από το τυρί κύτταρα παρουσιάζουν γενικά ένα προφίλ FA διαφορετικό από τα αντίστοιχα αρχικά επιμολυντικά κύτταρα. Τα BCFA των ανακτημένων κυττάρων 24 ώρες μετά την παρασκευή του τυριού (καλλιέργειες CO1, BC1 και LA1) δεν διαφέρουν μεταξύ τους. Αυτό που διαφέρει είναι τα MUFA, τα οποία ανέρχονται στα 15,29 %, 7,62 % και 4,15 % για τις CO1, BC1 και LA1 καλλιέργειες, αντίστοιχα (Σχήμα 10.2). Στην επόμενη χρονική στιγμή ανάκτησης των κυττάρων (30 μέρες) τα ανακτημένα κύτταρα των τριών καλλιεργιών CO2, BC2 και LA2 παρουσιάζουν παρόμοιο ($P>0.05$) προφίλ FA με τα SCFA να ανέρχονται στο 22,26 %, 24,18 % και 21,40 % αντίστοιχα (Σχήμα 10.3). Στο τέλος της αποθήκευσης (60 μέρες) τα ανακτημένα κύτταρα, εμφανίζουν διαφορετική τάση ως προς τις μεταβολές στο FA προφίλ τους. Ενώ τα κύτταρα των καλλιεργιών CO3 και BC3 δεν παρουσιάζουν μετάβολές (στατιστικά $P>0.05$), τα κύτταρα της καλλιέργειας LA3 αυξάνουν το ποσοστό των SCFA στο 41,63% του συνόλου (Σχήμα 10.4). Η αύξηση αυτή οφείλεται στα κορεσμένα λιπαρά οξέα, sSCFA και ειδικά στο C16:0 που παρουσιάζει περιεκτικότητα $17,90 \% \pm 2,43$. (Σχήμα 9.5)

Συμπερασματικά το προφίλ FA των μεμβρανικών λιπιδίων της *L. monocytogenes* κυριαρχείται από τα μονά διακλαδιζόμενα λιπαρά οξέα C15:0 και C17:0. Το βακτήριο για να διατηρήσει τη βέλτιστη ρευστότητα, επομένως και την λειτουργία της μεμβράνης του στις συνθήκες του παρόντος πειράματος, (παρασκευής και αποθήκευσης τυριού), φαίνεται να ακολουθεί διάφορους τρόπους σε συνάρτηση του χρόνου και της προϋστορίας του. Τα κύτταρα (σειρά CO) που πριν την επιμόλυνση είχαν αναπτυχθεί σε βέλτιστες συνθήκες (30 °C, 1 L BHI, pH 7), χρησιμοποιούν το μηχανισμό της αύξησης των SCFA και μείωσης των BCFA, χωρίς να μεταβάλλουν τον λόγο των διακλαδωμένων br-C15:0 και br-C17:0 λιπαρών οξέων και τον λόγο των iso προς anteiso λιπαρών οξέων, διατηρώντας τις αλλαγές αυτές σε όλο το πειραματικό διάστημα. Διαφορετικό τρόπο ακολουθούν τα κύτταρα που είχαν αρχικά αναπτυχθεί σε καταπονημένες συνθήκες. Η ισορροπία μεταξύ ρευστής και συμπαγούς φάσης της μεμβράνης επιτυγχάνεται τώρα όχι μόνο με τη μεταβολή στα SCFA, αλλά και με τις μεταβολές στους λόγους br-C15:0/br-C17:0 και iso προς anteiso λιπαρών οξέων. Και ενώ τα κύτταρα, αρχικά καταπονημένα λόγω παρουσίας απολυμαντικού (σειρά BC), διατηρούν στο χρόνο τις μεταβολές στα SCFA και μεταβάλλουν τους λόγους, το

αντίθετο συμβαίνει με τα αρχικά οξινο-καταπονημένα κύτταρα. Τα τελευταία μεταβάλλουν την περιεκτικότητα σε SCFA και διατηρούν τους λόγους των br-C15:0 προς br-C17:0 και iso προς anteiso λιπαρών οξέων.

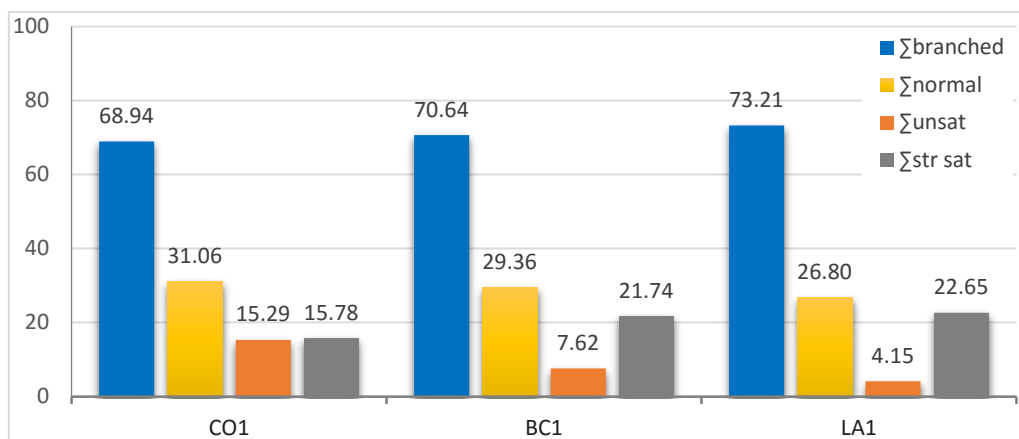
10.5. Εισηγήσεις για μελλοντικές μελέτες

Ο κύριος στόχος της διατριβής αυτής ήταν η αποσαφήνιση των τροποποιήσεων που επέρχονται στην λιπιδική σύσταση της μεμβράνης του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά την προσαρμογή του στις συνθήκες παρασκευής και συντήρησης τροφίμων και συγκεκριμένα, ενός εργαστηριακά παρασκευασμένου μαλακού τυριού (τύπου φέτα). Η αποσαφήνιση αυτή θα έχει ως απόρροια τη βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών προσαρμογής του παθογόνου στις δυσμενείς συνθήκες.

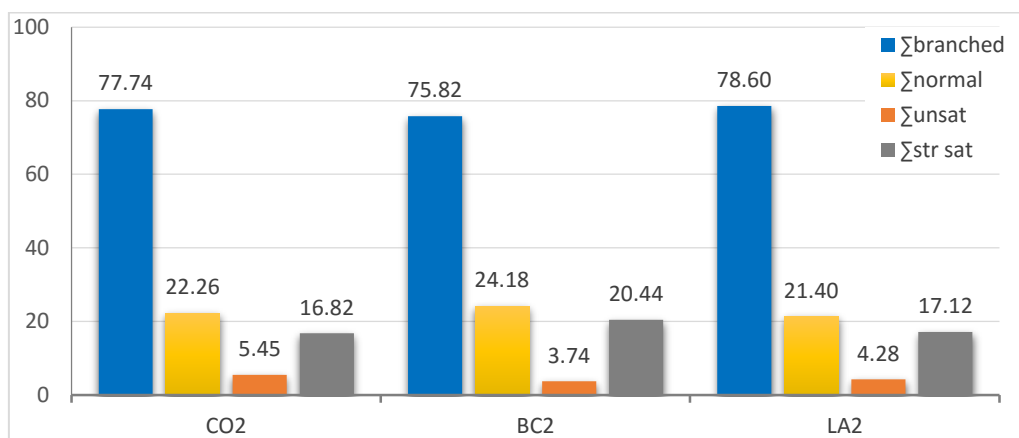
Συνολικά, στις συνθήκες της μελέτης αυτής, το βακτήριο φαίνεται να ακολουθεί διαφορετικούς τρόπους, προκειμένου να διατηρήσει τη βέλτιστη ρευστότητα και τις λειτουργίες της μεμβράνης ανάλογα με την προϊστορία των εμβολιασμένων κυττάρων και τον χρόνο αποθήκευσης του τυριού. Ως εκ τούτου, το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ικανό να επιβιώσει κάτω από αντίξοες συνθήκες και να ξεπεράσει τα εμπόδια που του τίθενται κατά την παρασκευή και την ωρίμανση των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Εμβάθυνση ως προς τη μελέτη των λιπαρών οξέων με λιγότερα από 15 άτομα άνθρακα που παρουσιάζονται στο προφίλ FA του βακτηρίου *L. monocytogenes* αναπτυγμένο παρουσία απολυμαντικών, θα έδινε περισσότερες πληροφορίες για να διευκρινιστεί και κατανοηθεί πλήρως ο μηχανισμός προσαρμογής του βακτηρίου στα απολυμαντικά τεταρτοταγούς αμμωνίου. Επίσης οι μεταβολές στα λιπίδια της μεμβράνης αφορούν και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της μεμβράνης, οι οποίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία των βιοϋμενίων (biofilms). Μία βαθύτερη έρευνα πάνω στην ρύθμιση της βιοσύνθεσης των λιπιδίων θα συμβάλλει στην κατανόηση της ικανότητας της *L. monocytogenes* να δημιουργεί biofilms ώστε να βρεθούν τρόποι και μέθοδοι καταπολέμησής τους.

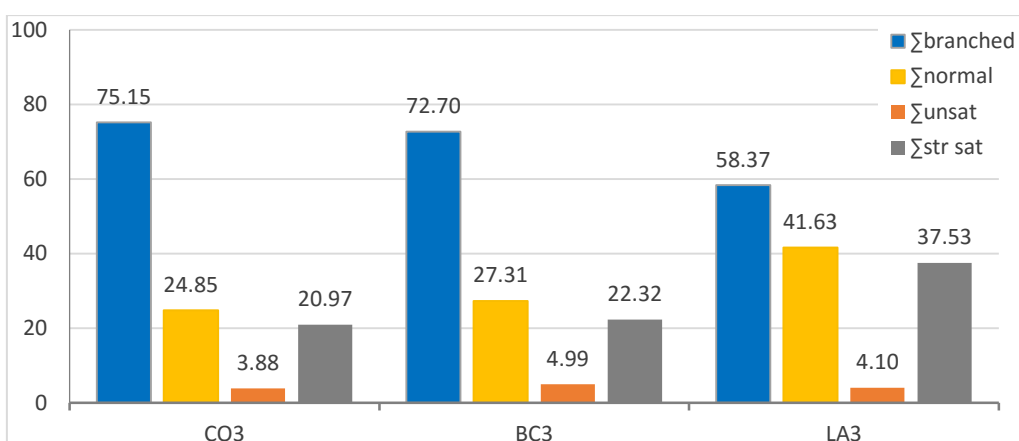
Η μελέτη της δομής και των μεταβολών των λιπιδικών μορίων υπό τη δράση στρες συμβάλλει επίσης στην έρευνα της αντοχής των μικροοργανισμών σε διάφορα αντιμικροβιακά (βιοσυντηρητικά) όπως η νισίνη. Η βιοσύνθεση των λιπιδίων και των λιπαρών οξέων συνδέονται με την ανάπτυξη του βακτηρίου ως μέρος της απόκρισής του στην μεταβολή του περιβάλλοντος, προσφέροντας μοναδικές θέσεις για επιλεκτική αναστολή προς αντιμετώπιση της μικροβιακής μόλυνσης (εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών παραγόντων).



Σχήμα 10.2: Παρουσίαση των BCFA (Σbranched), SCFA (Σnormal), MUFA (Σunsat) και sSCFA (Σstr sat) του βακτηρίου *L. monocytogenes* που ανακτήθηκε 24 ώρες μετά την παρασκευή του τυριού. Στο διάγραμμα δίνονται οι τιμές των αθροισμάτων της καθεμίας ομάδας λιπαρών οξέων



Σχήμα 10.3: Παρουσίαση των BCFA (Σbranched), SCFA (Σnormal), MUFA (Σunsat) και sSCFA (Σstr sat) του βακτηρίου *L. monocytogenes* που ανακτήθηκε 30 μέρες μετά την παρασκευή του τυριού. Στο διάγραμμα δίνονται οι τιμές των αθροισμάτων της καθεμίας ομάδας λιπαρών οξέων



Σχήμα 10.4: Παρουσίαση των BCFA (Σbranched), SCFA (Σnormal), MUFA (Σunsat) και sSCFA (Σstr sat) του βακτηρίου *L. monocytogenes* που ανακτήθηκε 60 ώρες μετά την παρασκευή του τυριού. Στο διάγραμμα δίνονται οι τιμές των αθροισμάτων της καθεμίας ομάδας λιπαρών οξέων

Στη διάρκεια των πειραμάτων της καταμέτρησης του βακτηρίου, *L.monocytogenes* σε διάφορα θρεπτικά υλικά, δεν ήταν δυνατό η καταμέτρηση του καταπονημένου παρουσία του απολυμαντικού BZC, στο εκλεκτικό θρεπτικό PALCAM. Διάφορες μελέτες έχουν εκτιμήσει την καταμέτρηση του βακτηρίου στο συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό, χρησιμοποιώντας διάφορα στελέχη, όχι όμως ανεπτυγμένα σε τέτοιες συνθήκες. Θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί περισσότερο σε σχέση με την ανάπτυξη του καταπονημένου παρουσία BZC σε αυτό το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό. Επίσης θα ήταν ενδιαφέρον να ερευνηθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπική μελέτη η μορφολογία του καταπονημένου βακτηρίου από διάφορα συντηρητικά και απολυμαντικά. Οι πληροφορίες από τέτοιες έρευνες σε συνδυασμό με τη μελέτη της ικανότητας του βακτηρίου *L. monocytogenes* για να είναι βιώσιμο και όχι καλλιεργίσιμο, θα έδιναν σημαντικές πληροφορίες που θα αφορούσαν τον έλεγχο της παρουσίας του βακτηρίου *L. monocytogenes* στα τρόφιμα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
agrofood	γεωργικά προϊόντα διατροφής
arginine deiminase ADI	απμινάση αργινίνης
ATP-synthase, F0F1-ATPase	ATP συνθάση
Benzalkonium Chloride, BZC	χλωριούχο βενζαλκώνιο
biofilms	βιοϋμένια
cholesterol-dependent cytolysin	
cold shock proteins	ψυχρού σοκ πρωτεΐνες
diglycosyldiacylglycerol DGDG	διγλυκόζυλο-διάκυλο γλυκερόλη
glutamate decarboxylase GAD	γλουταμινική αποκαρβοξυλάση
glutaraldehyde	γλουταρική αλδεΐδη
extracellular polymeric substances, EPS	εξωκυτταρικές πολυμερές ουσίες
sn-Glycerol-1-phosphoglycolipid	sn-γλυκερό-1-φωσφογλυκολιπίδιο
Internalin, Inl	ιντερναλίνη
lipid domains	λιπιδικοί τομείς
listericidal	λιστεριοκτόνος
neonatal septicemia	νεογνική σηψαιμία
parabens	εστέρες του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος
patchwork	συνονθύλευμα
Preparative Chromatography	
pseudotuberculosis	ψευδοφυματίωση
quorum sensing	αισθησή απαρτίας
Scanning Electron Microscope – SEM	ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ΗΜΣ
serotype	ορότυπος
slant cultures	κεκλιμένες καλλιέργειες
sodium cacodylate	κακοδυλικό νατρίου
starter culture	εναρκτική καλλιέργεια μικροοργανισμών

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

ActA	μεμβρανική πρωτεΐνη
ALOA	Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti
BCFA	Λιπαρά Οξέα Διακλαδιζόμενης Αλυσίδας
CAMP	Christie–Atkins–Munch–Petersen
Cap	Καταβολιτικό ενεργοποιητής πρωτεΐνη
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cfu	Colony Forming Unit
CL, DPG	Καρδιολιπίνη
c-Met	Πρωτεΐνη υποδοχέας κινάσης τυροσίνης
CPP	Critical Control Points, κρίσιμα σημεία ελέγχου
Crp	Ρυθμιστική Πρωτεΐνη υποδοχέας της κυκλικής AMP
DG	Διγλυκερίδια
FA	Λιπαρά Οξέα
FAO/WHO	Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας και το Πανκόσμιο Οργανισμό Υγείας των Ενωμένων Εθνών
GC-FID	Αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας
gC1q-R	Γλυκοπρωτεΐνη
Gp96	Σύνοδο-πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού δικτύου
HACCP	Hazard analysis & critical control points
HTST	High temperature short time παστερίωση
LCL	Λυσυλο-καρδιολιπίνη
LLO	Λιστεριολυσίνη O
LPG	Λυσυλο-φωσφατιδυλογλυκερόλη
LTA	Λιποτειχοϊκό οξύ
MG	Μονογλυκερίδια
MUFA	Μονοακόρεστα Λιπαρά Οξέα
OD	Οπτική πυκνότητα, θολερότητα
OCLA	Oxoid Chromogenic Listeria Agar
PC-PLC	Φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλοχολίνης

PI-PLC	Φωσφολιπάση C της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης
PLC	Φωσφολιπάση C
PTS	φωσφοενολο-πυροσταφυλικό-εξαρτώμενης φωσφομεταφοράση
PrfA	Μεταγραφικό ενεργοποιητής πρωτεΐνη
PC	φωσφατιδυλοχολίνη
PG	Φωσφατιδυλογλυκερόλη
rpm, xg	Μονάδες φυγοκέντρωσης
RTE	Ready To Eat foods
SCFA	Λιπαρά Οξέα Ευθείας Αλυσίδας
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας
TG	Τριγλυκερίδια
Vip	Virulence protein
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΚΤΠ	Κώδικα Τροφίμων και Ποτών
ΠΟΠ	προστατευόμενη ονομασία προέλευσης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Πίνακας Π1. 1: Αποτελέσματα των μετρήσεων της απορρόφησης για τον προσδιορισμό φωσφόρου σε δείγματα ολικών λιπιδίων κυτταρικών μεμβράνων του βακτηρίου *L.monocytogenes*, που αναπτύχθηκε στους 30°C, σε 1L BHI

Καλλιέργεια	Απορρόφηση στα 820nm					
	Ομάδα Σωλήνων Α (50μg ολικά λιπίδια)			Ομάδα σωλήνων Β (100μg ολικά λιπίδια)		
pCO1	0,282	0,283	0,283	0,639	0,64	0,641
pCO2	0,345	0,342	0,348	0,697	0,698	0,698
pBC1	0,277	0,266	0,290	0,559	0,561	0,521
pBC2	0,283	0,294	0,278	0,543	0,548	0,572
pLA1	0,119	0,123	0,115	0,224	0,236	0,260
pLA2	0,117	0,106	0,123	0,239	0,241	0,260
CO1A	0,192	0,190	0,190	0,325	0,325	0,325
	0,197	0,199	0,197	0,321	0,320	0,321
CO1B	0,222	0,223	0,224	0,440	0,448	0,440
	0,240	0,240	0,240	0,512	0,492	0,463
CO2A	0,233	0,233	0,233	0,608	0,604	0,601
	0,219	0,219	0,219	0,600	0,591	0,593
CO2B	0,217	0,216	0,217	0,423	0,421	0,42
	0,205	0,209	0,204	0,319	0,321	0,318
CO3A	0,237	0,237	0,237	0,501	0,501	0,500
	0,234	0,234	0,234	0,589	0,595	0,596
CO3B	0,235	0,234	0,235	0,570	0,576	0,570
	0,210	0,205	0,216	0,474	0,474	0,474
BC1A	0,163	0,164	0,165	0,274	0,272	0,274
	0,257	0,259	0,260	0,357	0,359	0,360
BC1B	0,156	0,152	0,156	0,239	0,239	0,239
	0,257	0,251	0,251	0,359	0,38	0,361
BC2A	0,180	0,184	0,182	0,365	0,342	0,341
	0,163	0,164	0,161	0,330	0,331	0,336
BC2B	0,245	0,241	0,24	0,486	0,481	0,480
	0,224	0,224	0,221	0,422	0,432	0,430
BC3A	0,133	0,135	0,136	0,255	0,258	0,254
	0,147	0,148	0,140	0,251	0,260	0,256
BC3B	0,123	0,128	0,124	0,269	0,272	0,274
	0,126	0,123	0,121	0,272	0,270	0,271
LA1A	0,213	0,214	0,214	0,438	0,438	0,438
	0,237	0,235	0,235	0,354	0,354	0,354
LA1B	0,286	0,288	0,286	0,43	0,427	0,428
	0,221	0,223	0,223	0,354	0,356	0,351
LA2A	0,230	0,233	0,236	0,359	0,358	0,358
	0,241	0,244	0,248	0,348	0,346	0,351
LA2B	0,170	0,172	0,175	0,326	0,323	0,326
	0,231	0,234	0,232	0,421	0,420	0,421
LA3A	0,214	0,218	0,217	0,562	0,566	0,562
	0,330	0,329	0,330	0,665	0,665	0,664
LA3B	0,220	0,219	0,223	0,552	0,553	0,552
	0,242	0,241	0,244	0,322	0,325	0,326

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Πίνακας Π2.1: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια CO1. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% περιεκτικότητα						Μέσος Όρος
	1 ^ο Πείραμα			2 ^ο Πείραμα			
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	
12:0	1,00	1,17	0,27	0,09	0,00	0,10	0,44 ± 0,51
13:0	2,31	1,19	0,94	0,00	0,5	0,65	0,93 ± 0,79
2-OH-12:0	2,46	2,86	1,94	1,71	2,08	1,84	2,15 ± 0,43
3-OH-12:0	1,94	1,56	1,19	0,97	0,97	1,04	1,28 ± 0,39
14:1	7,49	8,46	8,54	10,10	7,92	11,42	8,99 ± 1,48
14:0	1,63	2,51	1,32	1,35	2,10	1,33	1,71 ± 0,49
i-15:0	7,64	5,14	7,23	9,93	10,08	10,34	8,39 ± 2,07
a-15:0	36,16	40,69	45,04	39,70	39,96	41,14	40,45 ± 2,86
15:0	1,54	2,31	1,08	1,03	1,28	0,97	1,37 ± 0,51
i-16:0	2,38	2,27	2,36	2,28	2,26	2,40	2,33 ± 0,06
16:1	1,60	3,16	3,95	0,67	0,65	0,56	1,77 ± 1,46
16:0	3,37	1,20	0,75	4,05	3,95	4,16	2,91 ± 1,53
i-17:0	1,98	1,81	1,35	2,16	2,07	2,31	1,95 ± 0,34
a-17:0	14,42	12,84	18,32	16,41	15,73	17,22	15,82 ± 1,97
17:0	1,29	0,65	0,53	0,91	0,34	0,47	0,70 ± 0,35
cis-9-18:1	1,88	1,46	1,18	1,10	0,89	1,05	1,26 ± 0,36
18:0	1,06	0,65	0,92	0,97	0,84	0,93	0,90 ± 0,14
19:0	0,25	0,05	0,06	0,07	0,00	0,00	0,07 ± 0,09
20:1	0,13	0,08	0,06	0,19	0,00	0,00	0,08 ± 0,07
20:0	1,47	0,32	0,22	0,00	0,5	0,24	0,46 ± 0,52
22:1	2,08	0,33	0,29	2,96	0,51	0,31	1,08 ± 1,15
22:0	0,15	0,14	0,18	0,22	0,21	0,20	0,18 ± 0,03
Σbranched	62,58	62,75	74,30	70,48	70,10	73,41	68,94 ± 3,39
Σnormal	37,42	37,25	25,70	29,52	29,90	26,59	31,07 ± 3,39
Σunsat	13,44	17,65	14,40	15,70	16,71	13,81	15,28 ± 0,16
Σstr sat	23,98	19,60	11,30	13,82	13,19	12,78	15,79 ± 3,55
Σbranched/Σnormal	1,67	1,68	2,89	2,39	2,34	2,76	2,24 ± 0,35
iso/anteiso	0,24	0,17	0,17	0,26	0,26	0,26	0,22 ± 0,05
a-15:0/a-17:0	2,51	3,17	2,46	2,42	2,54	2,39	2,56 ± 0,16
br-15:0/br17:0	2,67	3,13	2,66	2,67	2,81	2,64	2,75 ± 0,07

Πίνακας Π2.2: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή τον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια CO₂. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% περιεκτικότητα							Μέσος Όρος
	1° Πείραμα			2° Πείραμα				
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E4	
12:0	0,41	0,45	0,38	0,00	0,20	0,00	0,47	0,27 ± 0,21
13:0	0,19	0,19	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08 ± 0,10
2-OH-12:0	1,49	1,44	1,48	1,49	1,49	1,58	1,64	1,52 ± 0,07
3-OH-12:0	1,32	1,27	1,17	1,36	1,34	1,30	1,42	1,31 ± 0,08
14:1	1,93	1,47	3,33	1,41	1,54	3,73	1,09	2,07 ± 1,03
14:0	0,98	0,90	1,00	1,09	1,03	1,15	1,30	1,06 ± 0,13
i-15:0	10,53	9,99	13,34	11,64	10,63	11,38	11,8	11,33 ± 1,10
a-15:0	45,85	42,42	43,2	42,41	41,29	41,83	42,7	42,81 ± 1,47
15:0	1,68	1,61	1,50	1,75	1,74	1,61	0,46	1,48 ± 0,46
i-16:0	3,29	3,69	3,09	3,70	4,22	3,61	3,27	3,55 ± 0,38
16:1	0,92	1,13	0,84	0,98	1,25	0,93	1,14	1,03 ± 0,15
16:0	4,63	3,85	4,24	5,32	4,63	5,08	5,10	4,69 ± 0,52
i-17:0	0,51	1,18	0,44	2,74	2,67	2,60	2,69	1,83 ± 1,08
a-17:0	18,65	17,67	17,08	19,24	18,83	18,37	18,37	18,32 ± 0,73
17:0	3,92	3,33	3,43	4,16	3,48	3,73	4,71	3,82 ± 0,49
cis-9-18:1	1,07	1,00	1,03	1,08	0,99	0,94	0,97	1,01 ± 0,05
18:0	0,62	0,78	0,61	0,71	0,84	0,68	0,57	0,69 ± 0,10
19:0	0,39	0,43	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17 ± 0,22
20:1	0,03	0,07	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02 ± 0,03
20:0	0,15	1,04	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20 ± 0,38
22:1	0,13	1,50	0,29	0,15	1,84	0,36	0,00	0,61 ± 0,74
22:0	0,13	0,19	0,15	0,15	0,23	0,18	0,00	0,15 ± 0,07
Σbranched	78,83	74,95	77,15	79,73	77,64	77,79	78,83	77,74 ± 1,07
Σnormal	21,17	25,05	22,85	20,27	22,36	22,21	21,17	22,26 ± 1,07
Σunsat	4,56	6,45	7,35	3,76	5,99	6,16	3,20	5,45 ± 0,93
Σstr sat	16,61	18,60	15,50	16,51	16,37	16,05	17,97	16,82 ± 0,15
Σbranched/Σnormal	3,72	2,99	3,38	3,93	3,47	3,50	3,72	3,50 ± 0,22
iso/anteiso	0,22	0,25	0,28	0,29	0,29	0,29	0,29	0,27 ± 0,03
a-15:0/a-17:0	2,46	2,40	2,53	2,20	2,19	2,28	2,32	2,36 ± 0,15
br-15:0/br17:0	2,94	2,78	3,23	2,46	2,41	2,54	2,59	2,74 ± 0,34

Πίνακας Π2.3: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια CO₃. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% περιεκτικότητα							Μέσος Όρος
	1ο Πείραμα			2ο Πείραμα				
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E4	
12:0	0,31	0,34	0,31	0,11	0,00	0,00	0,80	0,27 ± 0,28
13:0	0,33	0,60	0,59	0,00	0,39	0,4	0,66	0,42 ± 0,23
2-OH-12:0	2,13	2,11	2,13	1,98	1,97	2,01	2,74	2,15 ± 0,27
3-OH-12:0	1,41	1,52	1,29	1,28	1,39	1,21	1,81	1,42 ± 0,20
14:1	1,32	3,25	1,63	1,19	2,69	1,48	1,31	1,84 ± 0,80
14:0	1,09	0,96	0,91	1,01	0,90	0,87	1,27	1,00 ± 0,14
i-15:0	8,45	8,27	9,03	9,76	10,03	10,11	12,09	9,68 ± 1,29
a-15:0	47,51	47,43	48,19	37,43	37,07	37,78	42,84	42,61 ± 5,15
15:0	1,91	1,85	1,88	1,25	1,65	1,71	2,25	1,79 ± 0,30
i-16:0	3,99	3,89	3,87	3,05	3,67	3,20	2,69	3,48 ± 0,50
16:1	0,00	0,00	0,00	0,48	0,23	0,45	0,84	0,29 ± 0,32
16:0	3,70	4,42	4,46	4,57	4,27	4,33	4,42	4,31 ± 0,29
i-17:0	0,56	0,57	0,55	2,16	2,25	2,40	2,20	1,53 ± 0,91
a-17:0	18,4	19,25	20,67	16,11	16,63	18,12	15,82	17,86 ± 1,78
17:0	0,21	0,34	0,25	3,13	3,42	4,65	4,35	2,34 ± 2,00
cis-9-18:1	0,93	1,12	1,03	0,29	0,45	0,82	1,01	0,81 ± 0,32
18:0	0,85	0,92	0,99	0,80	0,83	0,92	0,57	0,84 ± 0,14
19:0	0,26	0,30	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13 ± 0,16
20:1	0,05	0,04	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02 ± 0,03
20:0	0,72	0,41	0,06	0,00	0,00	0,00	0,83	0,29 ± 0,36
22:1	0,93	0,55	0,05	0,93	0,55	0,00	0,00	0,43 ± 0,42
22:0	0,15	0,19	0,39	0,15	0,19	0,39	0,00	0,21 ± 0,14
Σbranched	78,91	79,41	82,31	68,51	69,65	71,61	75,64	75,78 ± 6,26
Σnormal	21,09	20,59	17,69	31,49	30,35	28,39	24,36	24,22 ± 6,26
Σunsat	3,45	6,25	3,91	3,25	4,10	3,06	3,16	3,97 ± 0,81
Σstr sat	17,64	14,34	13,78	28,24	26,25	25,33	21,20	20,25 ± 7,07
Σbranched/Σnormal	3,74	3,86	4,65	2,18	2,29	2,52	3,11	3,27 ± 1,10
iso/anteiso	0,20	0,19	0,20	0,28	0,30	0,28	0,29	0,24 ± 0,07
a-15:0/a-17:0	2,58	2,46	2,33	2,32	2,23	2,08	2,71	2,39 ± 0,09
br-15:0/br17:0	2,95	2,81	2,70	2,58	2,49	2,33	3,05	2,71 ± 0,15

Πίνακας Π2.4: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια BC1. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% περιεκτικότητα						Μέσος Όρος
	1° Πείραμα			2° Πείραμα			
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	
12:0	0,64	0,62	0,71	0,28	0,47	0,21	0,49 ± 0,21
13:0	0,44	0,00	0,37	0,29	0,00	0,23	0,22 ± 0,19
2-OH-12:0	2,25	1,56	2,34	2,04	1,67	2,10	1,99 ± 0,31
3-OH-12:0	1,59	1,31	1,68	1,43	1,40	1,50	1,49 ± 0,13
14:1	1,53	4,28	2,97	1,32	4,58	2,71	2,90 ± 1,35
14:0	1,15	1,92	2,22	1,11	2,06	2,11	1,76 ± 0,50
i-15:0	1,42	1,36	0,79	9,01	8,61	9,52	5,12 ± 4,32
a-15:0	45,83	43,15	47,39	39,19	37,63	41,27	42,41 ± 3,78
15:0	1,98	2,26	0,92	1,81	2,42	0,58	1,66 ± 0,75
i-16:0	2,90	2,11	2,91	2,87	2,26	2,90	2,66 ± 0,37
16:1	0,36	0,75	0,47	0,33	0,80	0,33	0,51 ± 0,21
16:0	6,83	6,27	6,06	7,01	6,72	6,40	6,55 ± 0,36
i-17:0	0,54	0,39	0,52	2,44	2,47	2,46	1,47 ± 1,08
a-17:0	20,39	19,09	19,64	18,79	17,65	18,32	18,98 ± 0,97
17:0	0,79	1,26	1,07	0,76	0,79	0,97	0,94 ± 0,20
cis-9-18:1	1,58	1,23	2,04	0,46	1,32	1,64	1,38 ± 0,53
18:0	3,13	2,72	2,96	3,16	2,92	2,99	2,98 ± 0,16
19:0	0,48	0,25	0,38	0,00	0,00	0,00	0,19 ± 0,22
20:1	0,17	0,10	0,06	0,18	0,00	0,00	0,09 ± 0,08
20:0	1,36	1,13	0,44	1,44	1,21	0,48	1,01 ± 0,44
22:1	2,06	1,56	0,53	2,18	1,67	0,57	1,43 ± 0,72
22:0	0,31	0,29	0,17	0,33	0,31	0,00	0,24 ± 0,13
Σbranched	71,08	66,10	71,25	72,30	68,62	74,47	70,64 ± 1,64
Σnormal	28,92	33,90	28,75	27,70	31,38	25,53	29,36 ± 1,64
Σunsat	6,08	12,40	7,98	5,65	8,37	5,25	7,63 ± 1,70
Σstr sat	22,84	21,50	20,77	22,05	23,01	20,28	21,74 ± 0,06
Σbranched/Σnormal	2,46	1,95	2,48	2,61	2,19	2,92	2,41 ± 0,19
iso/anteiso	0,07	0,06	0,06	0,25	0,24	0,25	0,16 ± 0,13
a-15:0/a-17:0	2,25	2,26	2,41	2,09	2,13	2,25	2,23 ± 0,11
br-15:0/br17:0	2,26	2,28	2,39	2,27	2,30	2,44	2,32 ± 0,02

Πίνακας Π2.5: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια BC2. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ						Μέσος Όρος
	1° Πείραμα			2° Πείραμα			
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	
12:0	0,17	0,19	0,10	0,10	0,00	0,51	0,18 ± 0,20
13:0	1,43	1,63	1,15	1,43	1,13	1,40	1,36 ± 0,21
2-OH-12:0	2,88	3,07	2,39	3,14	2,52	3,02	2,84 ± 0,35
3-OH-12:0	1,28	1,35	1,03	1,33	1,05	1,36	1,23 ± 0,17
14:1	1,09	1,72	1,37	1,15	1,19	1,54	1,34 ± 0,24
14:0	1,61	1,45	1,25	1,72	1,32	1,49	1,47 ± 0,18
i-15:0	9,80	7,81	6,58	11,32	11,47	10,94	9,65 ± 2,27
a-15:0	49,18	48,91	50,69	44,55	43,34	39,86	46,09 ± 4,36
15:0	1,97	1,88	1,56	1,71	1,63	1,95	1,78 ± 0,17
i-16:0	2,91	3,27	3,03	3,19	3,23	2,42	3,01 ± 0,35
16:1	0,67	0,66	0,54	0,69	0,56	1,00	0,69 ± 0,18
16:0	3,40	3,63	4,38	3,82	4,71	4,33	4,05 ± 0,44
i-17:0	0,59	0,47	0,46	1,99	2,24	2,14	1,32 ± 0,91
a-17:0	14,88	15,99	17,33	14,84	16,53	14,96	15,76 ± 1,06
17:0	3,86	3,61	4,24	3,59	4,21	4,96	4,08 ± 0,56
cis-9-18:1	1,15	0,89	0,80	1,20	0,96	1,31	1,05 ± 0,21
18:0	1,64	1,77	1,76	1,84	1,97	2,22	1,87 ± 0,19
19:0	0,24	0,25	0,23	0,21	0,23	0,33	0,25 ± 0,05
20:1	0,03	0,04	0,05	0,00	0,12	0,00	0,04 ± 0,05
20:0	0,10	0,19	0,05	0,11	0,06	0,64	0,19 ± 0,25
22:1	0,08	0,20	0,03	0,09	0,00	0,00	0,07 ± 0,08
22:0	0,19	0,19	0,19	0,21	0,20	0,00	0,16 ± 0,09
Σbranched	77,36	76,45	78,09	75,89	76,81	70,32	76,19 ± 2,63
Σnormal	22,64	23,55	21,91	24,11	23,19	29,68	23,81 ± 2,63
Σunsat	3,29	3,72	3,20	3,62	3,40	5,23	3,74 ± 0,48
Σstr sat	19,35	19,83	18,71	20,49	19,79	24,45	20,07 ± 2,15
Σbranched/Σnormal	3,42	3,25	3,56	3,15	3,31	2,37	3,23 ± 0,47
iso/anteiso	0,21	0,18	0,15	0,28	0,28	0,28	0,23 ± 0,07
a-15:0/a-17:0	3,31	3,06	2,92	3,00	2,62	2,66	2,92 ± 0,23
br-15:0/br17:0	3,81	3,45	3,22	3,32	2,92	2,97	3,29 ± 0,32

Πίνακας Π2.6: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια BC3. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ								Μέσος Όρος
	1ο Πείραμα				2ο Πείραμα				
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4	
12:0	3,38	0,34	1,82	0,63	0,24	0,00	0,00	0,45	0,86 ± 1,17
13:0	2,36	0,50	0,71	0,56	0,59	0,26	0,00	0,00	0,62 ± 0,75
2-OH-12:0	2,47	1,60	2,25	1,37	1,45	1,70	1,06	1,17	1,63 ± 0,50
3-OH-12:0	5,99	1,58	2,57	3,24	3,60	1,69	1,28	1,81	2,72 ± 1,56
14:1	2,81	1,57	2,07	1,19	1,53	1,71	1,18	1,16	1,65 ± 0,56
14:0	2,35	1,06	1,59	1,31	1,60	1,24	1,27	1,38	1,48 ± 0,40
i-15:0	12,67	9,60	8,16	8,84	8,99	9,26	9,34	11,43	9,79 ± 1,50
a-15:0	32,36	41,84	35,47	40,41	41,20	41,65	41,54	40,27	39,34 ± 3,50
15:0	3,32	2,05	3,05	1,64	2,09	2,23	2,00	2,38	2,35 ± 0,56
i-16:0	5,17	4,77	5,76	4,62	5,17	4,14	3,84	3,82	4,66 ± 0,70
16:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	1,34	0,39	0,31 ± 0,50
16:0	4,02	4,63	5,17	5,18	5,47	5,56	5,50	3,61	4,89 ± 0,74
i-17:0	1,14	2,18	1,11	0,40	2,29	2,32	2,33	2,18	1,74 ± 0,75
a-17:0	13,01	16,59	15,86	19,96	18,24	18,09	19,31	16,16	17,15 ± 2,23
17:0	3,87	5,05	6,57	5,31	5,02	5,50	6,16	6,92	5,55 ± 0,98
cis-9-18:1	0,37	1,39	2,96	0,49	0,41	1,38	1,03	0,78	1,10 ± 0,85
18:0	0,67	0,99	1,25	1,11	1,13	1,16	1,21	1,12	1,08 ± 0,18
19:0	0,12	0,19	0,30	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10 ± 0,12
20:1	0,04	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02 ± 0,02
20:0	0,12	0,04	0,09	0,00	0,00	0,00	0,14	0,30	0,09 ± 0,10
22:1	2,60	0,00	0,12	3,55	0,00	0,00	0,18	0,00	0,81 ± 1,42
22:0	0,21	0,22	0,26	0,00	0,35	0,28	0,4	0,00	0,22 ± 0,15
Σbranched	64,35	74,98	66,36	74,23	75,89	75,46	76,36	73,86	72,70 ± 3,83
Σnormal	35,65	25,02	33,64	25,77	24,11	24,54	23,64	26,14	27,31 ± 3,83
Σunsat	6,66	5,88	5,45	5,23	2,28	4,29	4,03	5,95	4,99 ± 1,18
Σstr sat	28,99	19,14	28,19	20,54	21,83	20,25	19,61	20,19	22,32 ± 2,64
Σbranched/Σnormal	1,81	3,00	1,97	2,88	3,15	3,07	3,23	2,83	2,70 ± 0,52
iso/anteiso	0,42	0,28	0,29	0,23	0,28	0,26	0,25	0,31	0,29 ± 0,02
a-15:0/a-17:0	2,49	2,52	2,24	2,02	2,26	2,30	2,15	2,49	2,29 ± 0,00
br-15:0/br17:0	3,18	2,74	2,57	2,42	2,44	2,49	2,35	2,82	2,61 ± 0,13

Πίνακας Π2.7: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια LA1. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% περιεκτικότητα							Μέσος Όρος
	1ο Πείραμα			2ο Πείραμα				
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E4	
12:0	0,90	1,52	0,46	0,52	0,19	0,14	0,00	0,53 ± 0,53
13:0	1,28	2,98	0,39	0,00	0,22	0,00	0,00	0,70 ± 1,11
2-OH-12:0	2,14	0,00	1,13	1,47	0,00	0,98	1,10	0,97 ± 0,77
3-OH-12:0	1,43	1,26	0,80	1,14	0,82	0,69	0,77	0,99 ± 0,29
14:1	1,75	3,23	1,12	0,95	2,54	1,03	1,04	1,67 ± 0,90
14:0	1,60	1,25	1,17	1,72	1,39	1,18	1,28	1,37 ± 0,21
i-15:0	12,10	13,98	7,82	8,71	10,05	9,95	9,77	10,34 ± 2,08
a-15:0	37,08	45,61	44,42	40,12	40,2	39,95	38,38	40,82 ± 3,10
15:0	2,36	2,06	1,50	3,40	1,70	1,40	1,60	2,00 ± 0,70
i-16:0	2,89	2,76	2,92	2,25	2,23	2,67	2,70	2,63 ± 0,28
16:1	0,76	0,00	0,00	0,11	0,55	0,38	0,43	0,32 ± 0,29
16:0	5,09	3,99	7,54	6,69	8,06	8,35	7,81	6,83 ± 1,65
i-17:0	0,91	0,77	0,77	2,39	2,67	2,86	2,85	1,89 ± 1,02
a-17:0	14,77	11,15	21,14	15,61	19,96	20,75	19,45	17,55 ± 3,78
17:0	0,80	0,63	0,87	2,13	0,79	0,92	0,86	0,44 ± 0,55
cis-9-18:1	1,43	0,99	0,77	2,21	0,82	0,75	1,29	1,18 ± 0,53
18:0	3,30	2,26	3,41	3,25	3,82	3,74	4,39	3,45 ± 0,66
19:0	0,41	0,35	0,24	0,00	0,16	0,16	0,17	0,21 ± 0,14
20:1	0,87	0,11	0,15	0,00	0,25	0,04	0,13	0,22 ± 0,30
20:0	1,57	0,07	0,14	0,00	0,17	0,16	1,47	0,51 ± 0,69
22:1	0,40	0,13	0,23	0,47	0,17	0,10	0,68	0,31 ± 0,21
22:0	0,19	0,15	0,28	0,00	0,36	0,32	0,33	0,23 ± 0,13
Σbranched	67,75	74,27	77,07	69,08	75,11	76,18	73,15	73,21 ± 0,23
Σnormal	32,25	25,73	22,93	30,92	24,89	23,82	26,85	26,80 ± 0,23
Σunsat	5,38	5,04	2,62	4,13	4,62	3,15	3,81	4,15 ± 0,28
Σstr sat	26,87	20,69	20,31	26,79	20,27	20,67	23,04	22,65 ± 0,04
Σbranched/Σnormal	2,10	2,89	3,36	2,23	3,02	3,20	2,72	2,73 ± 0,03
iso/anteiso	0,31	0,31	0,18	0,24	0,25	0,26	0,26	0,26 ± 0,00
a-15:0/a-17:0	2,51	4,09	2,10	2,57	2,01	1,93	1,97	2,40 ± 0,43
br-15:0/br17:0	3,14	5,00	2,38	2,71	2,22	2,11	2,16	2,76 ± 0,69

Πίνακας Π2.8: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οξέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο δειγμάτων για την καλλιέργεια LA2. Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% περιεκτικότητα							Μέσος Όρος
	1ο Πείραμα			2ο Πείραμα				
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E4	
12:0	0,25	0,23	0,34	0	0,09	0,15	0,37	0,20 ± 0,13
13:0	0,18	0,20	0,23	0,15	0,15	0,16	0,00	0,15 ± 0,07
2-OH-12:0	1,74	1,35	1,59	1,75	1,34	1,50	1,57	1,55 ± 0,17
3-OH-12:0	1,25	0,91	1,16	1,24	0,90	1,07	1,43	1,14 ± 0,19
14:1	1,65	4,19	1,59	0,17	4,20	1,50	1,20	2,07 ± 1,53
14:0	0,97	1,33	0,95	1,01	1,31	0,93	1,12	1,09 ± 0,17
i-15:0	1,00	0,00	0,55	11,78	11,67	11,85	12,92	7,11 ± 6,19
a-15:0	52,66	52,57	54,6	44,8	43,68	44,88	45,67	48,41 ± 4,64
15:0	2,06	1,93	2,44	0,93	1,91	2,32	2,00	1,94 ± 0,49
i-16:0	4,63	4,17	4,22	3,93	4,25	4,26	3,47	4,13 ± 0,36
16:1	0,00	0,00	0,22	0,70	0,00	0,19	0,63	0,25 ± 0,30
16:0	4,11	4,49	3,64	3,66	4,60	3,73	3,25	3,93 ± 0,49
i-17:0	0,64	0,60	0,53	2,41	2,53	2,68	2,52	1,70 ± 1,04
a-17:0	16,87	18,53	19,56	15,51	16,82	17,54	15,91	17,25 ± 1,43
17:0	4,21	5,06	5,41	4,13	4,84	5,17	6,19	5,00 ± 0,71
cis-9-18:1	0,86	0,60	0,91	0,82	0,54	0,74	0,81	0,75 ± 0,14
18:0	0,83	0,63	0,64	0,85	0,58	0,60	0,34	0,64 ± 0,17
19:0	0,05	0,05	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03 ± 0,03
20:1	0,07	0,02	0,03	0,07	0,00	0,00	0,00	0,03 ± 0,03
20:0	1,48	0,07	0,14	1,60	0,00	0,00	0,00	0,47 ± 0,73
22:1	2,01	0,06	0,15	2,17	0,00	0,16	0,00	0,65 ± 0,99
22:0	0,11	0,11	0,15	0,12	0,12	0,16	0,00	0,11 ± 0,05
Σbranched	75,80	75,87	79,46	78,43	78,95	81,21	80,49	78,42 ± 1,94
Σnormal	24,20	24,13	20,54	21,57	21,05	18,79	19,51	21,58 ± 1,94
Σunsat	4,76	7,19	3,09	4,07	4,88	2,74	3,23	4,38 ± 0,91
Σstr sat	19,44	16,94	17,45	17,50	16,17	16,05	16,28	17,20 ± 1,03
Σbranched/Σnormal	3,13	3,14	3,87	3,64	3,75	4,32	4,13	3,65 ± 0,42
iso/anteiso	0,09	0,07	0,07	0,30	0,30	0,30	0,31	0,19 ± 0,16
a-15:0/a-17:0	3,12	2,84	2,79	2,89	2,60	2,56	2,87	2,81 ± 0,13
br-15:0/br17:0	3,06	2,75	2,75	3,16	2,86	2,81	3,18	2,92 ± 0,10

Πίνακας Π2,9: Οι % περιεκτικότητες (w/w) των λιπαρών οέων (FA) για κάθε εισαγωγή στον αέριο χρωματογράφο ειγμάτων για την καλλιέργεια LA3, Κάθε ένεση δίνεται ως EN (N=1-3). Δίνονται επίσης τα αθροίσματα των ευθείας αλυσίδας κεκορεσμένων και ακόρεστων και των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων όπως και οι λόγοι τους που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων

Λιπαρό οξύ	% περιεκτικότητα						Μέσος Όρος
	1° Πείραμα			2° Πείραμα			
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	
12:0	1,42	0,16	0,86	0,00	0,07	0,08	0,43 ± 0,58
13:0	2,77	0,80	1,21	1,29	0,69	0,51	1,21 ± 0,82
2-OH-12:0	3,59	1,72	1,59	3,00	1,70	1,29	2,15 ± 0,92
3-OH-12:0	2,68	1,07	1,09	1,54	1,00	0,78	1,36 ± 0,69
14:1	1,90	0,85	1,49	1,24	0,81	1,05	1,22 ± 0,42
14:0	0,25	1,28	0,86	0,91	1,25	0,81	0,89 ± 0,37
i-15:0	5,44	4,46	8,30	9,77	8,61	7,57	7,36 ± 2,02
a-15:0	30,73	38,02	29,56	36,74	32,21	28,59	32,64 ± 3,89
15:0	3,76	1,75	2,10	1,24	1,68	1,69	2,04 ± 0,89
i-16:0	3,91	2,86	3,38	3,24	2,93	2,90	3,20 ± 0,40
16:1	1,54	0,51	0,36	0,68	0,45	0,30	0,64 ± 0,46
16:0	13,78	18,24	16,29	19,82	19,54	19,75	17,90 ± 2,43
i-17:0	1,28	0,44	0,67	1,89	1,88	2,02	1,36 ± 0,68
a-17:0	11,39	14,84	14,21	13,44	13,96	15,00	13,81 ± 1,32
17:0Δ	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	0,32	0,12 ± 0,18
17:0	3,32	3,05	3,87	2,36	2,76	3,62	3,16 ± 0,56
cis-9-18:1	2,21	0,78	1,24	0,85	0,70	0,78	1,09 ± 0,58
18:0	4,49	6,96	7,66	0,00	7,47	9,36	5,99 ± 3,33
19:0	0,21	0,08	0,13	0,00	0,00	0,12	0,09 ± 0,08
20:1	0,03	0,03	0,05	0,00	0,00	0,07	0,03 ± 0,03
20:0	0,06	0,20	0,59	0,00	0,14	0,22	0,20 ± 0,21
22:6	0,00	0,00	0,19	0,00	0,00	0,00	0,03 ± 0,08
22:1	0,02	0,26	0,90	0,00	0,28	1,13	0,43 ± 0,47
22:0	0,07	0,17	0,28	0,12	0,18	0,35	0,20 ± 0,10
Σbranched	52,75	60,62	56,12	65,08	59,59	56,08	58,37 ± 2,64
Σnormal	47,25	39,38	43,88	34,92	40,41	43,92	41,63 ± 2,64
Σunsat	5,78	2,61	4,79	3,67	3,14	4,58	4,09 ± 0,41
Σstr sat	41,47	36,77	39,09	31,25	37,27	39,34	37,54 ± 2,23
Σbranched/Σnormal	1,12	1,54	1,28	1,86	1,47	1,28	1,41 ± 0,15
iso/anteiso	0,25	0,15	0,28	0,30	0,29	0,29	0,26 ± 0,05
a-15:0/a-17:0	2,70	2,56	2,08	2,73	2,31	1,91	2,37 ± 0,09
br-15:0/br17:0	2,85	2,78	2,54	3,03	2,58	2,12	2,64 ± 0,11

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. B. Lorber, Listeriosis, in *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*, New York, Springer Science + Business Media, LLC, 2007, p. 13-32.
2. J. C. Low and W. Donachie, A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis, *The Veterinary Journal*, vol. 153, pp. 9-29, 1997.
3. L. J. Pearson and E. H. Marth, *Listeria monocytogenes*- Threat to a Safe Food Supply : A Review, *Journal of Dairy Science*, vol. 73, no. 4, pp. 912-928, 1990.
4. J. M. Jay, M. J. Loessner and D. A. Golden, Chapter 25 - Foodborne Listeriosis in *Modern Food Microbiology, 7th Edition*, Gaithersburg, Maryland, Aspen Publishers Inc., 2005, p. 591-617.
5. *Listeria monocytogenes*; <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. Accessed October 2014
6. J. Rocourt and C. Buchrieser, The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification, in *Listeria, Listeriosis and Food Safety, 3rd Edition by E.T. Ryser and E.H. Marth*, CRC Press, 2007, p. 1-20.
7. H. Hof, History and epidemiology of listeriosis, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 35, pp. 199-202, 2003.
8. M. Gandhi and M. L. Chikindas, *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 113, p. 1–15, 2007.
9. D. Jones, The place of *Listeria* among gram-positive bacteria, *Infection*, vol. 16, no. 2 Supplement, pp. S85-S88, 1988.
10. E. T. Ryser and E. H. Marth, *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition, CRC Press, 2007.
11. D. Liu, *Handbook of Listeria*, Boca Raton: CRC Press, 2008.
12. S. Kathariou, C. Mizumoto, R. Kanenaka, R. D. Allen and A. K. Fok,

Repression of motility and flagellin production at 37 °C is stronger in *Listeria monocytogenes* than in the nonpathogenic species *Listeria innocua*, *Can. J. Microbial.*, vol. 41, no. 7, pp. 572-577, 1995.

13. K. Todar, Online Textbook of Bacteriology, 2008; <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>. Accessed May 2010
14. K. B. Weinstein, www.medscape.com, WebMD LLC., 1994; <http://emedicine.medscape.com/article/220684-overview>. Accessed April 2014
15. S. K. Mastronicolis, I. Diakogiannis and A. Berberi, Effect of cold adaptation on the survival of *Listeria monocytogenes* in ice-cream formulations during long-term frozen storage., *Annals of Microbiology*, vol. 61, 2011.
16. S. K. Mastronicolis, A. Boura, A. Karaliota, P. Magiatis, N. Arvanitis, C. Litos, A. Tsakirakis, P. Paraskevas, H. Mustaka and G. Heropoulos, Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*: Focus on neutral lipids, *Food Microbiology*, vol. 23, pp. 183-194, 2006.
17. J. M. Farber and P. I. Peterkin, *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen, *Microbiological Reviews*, vol. 55, no. 4, pp. 476-511, 1991.
19. M. Cole, M. Jones and C. Holyoak, The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 69, no. 1, pp. 63-72, 1990.
20. R. J. Premaratne, W. J. Lin and E. A. Johnson, Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*., *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 10, pp. 3046-3048, 1991.
22. D. P. Christensen and R. W. Hutkins, Glucose Uptake by *Listeria monocytogenes* Scott A and Inhibition by Pediocin JD, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 10, pp. 3870-3873, 1994.
24. M. Bonazzi and P. Cossart, Bacterial entry into cells: A role for the endocytic machinery, *FEBS Letters*, vol. 580, pp. 2962-2967, 2006.
25. W.-D. Schubert and D. W. Heinz, Structural Aspects of Adhesion to and Invasion of Host Cells by the Human Pathogen *Listeria monocytogenes*,

ChemBioChem, vol. 4, pp. 1285-1291, 2003.

26. C. Schoen, D. I. Loeffler, A. Frentzen, S. Pilgrim, W. Goebel and J. Stritzker, *Listeria monocytogenes* as novel carrier system for the development of live vaccines, *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 298, pp. 45-58, 2008.
27. K. Ireton, Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells, *Cellular Microbiology*, vol. 9, no. 6, p. 1365–1375, 2007.
28. S. Seveau, J. Pizarro-Cerda and P. Cossart, Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion, *Microbes and Infection*, vol. 9, pp. 1167-1175, 2007.
29. J. Mengaud, H. Ohayon, P. Gounon, R. -. M. Mege and P. Cossart, E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells., *Cell*, vol. 84, no. 6, pp. 923-932, 1996.
30. M. Lecuit, Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers, *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 11, no. 6, p. 430–436, 2005.
31. Y. Shen, M. Naujokas, M. Park and K. Ireton, *Cell*, vol. 103, no. 3, pp. 501-510, 2000.
32. L. Braun, B. Ghebrehiwet and P. Cossart, gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*, *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 7, p. 1458–1466, 2000.
33. R. Jonquieres, J. Pizarro-Cerda and P. Cossart, Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*, *Molecular Microbiology*, vol. 42, no. 4, pp. 955-965, 2001.
34. K. J. Perry and D. E. Higgins, A Differential Fluorescence-Based Genetic Screen Identifies *Listeria monocytogenes* Determinants Required for Intracellular Replication, *Journal of Bacteriology*, vol. 195, no. 15, pp. 3331-3340, 2013.
36. H. Goldfine and S. J. Wadsworth, Macrophage intracellular signaling induced

- by *Listeria monocytogenes*, *Microbes and Infection*, vol. 4, p. 1335–1343, 2002.
37. K. A. Lewis, V. R. Garigapati, C. Zhou and M. F. Roberts, Substrate Requirements of Bacterial Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C, *Biochemistry*, vol. 32, pp. 8836-8841, 1993.
 38. H. Fsihi, P. Steffen and P. Cossart, Chapter16 - *Listeria monocytogenes*, in *Principles of Bacterial Pathogenesis*, New York, Academic Press Inc., 2001, p. 751-803.
 39. J. Rossjohn, S. C. Fei, W. J. McKinstry, R. K. Tweten and M. W. Parker, Structure of a Cholesterol-Binding, Thiol-Activated Cytolysin and a Model of Its Membrane Form, *Cell*, vol. 89, pp. 685-692, 1997.
 40. M. A. Hamon, D. Ribet, F. Stavru and P. Cossart, Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*, *Trends in Microbiology*, vol. 20, no. 8, pp. 360-368, 2012.
 41. T. Jacobs, A. Darji, N. Frahm, M. Rohde, J. Wehland, T. Chakraborty and S. Weiss, Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes, *Molecular Microbiology*, vol. 28, no. 6, p. 1081–1089, 1998.
 42. R. K. K. Tweten, Cholesterol-Dependent Cytolysins, a Family of Versatile Pore-Forming Toxins, *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 10, pp. 6199-6209, 2005.
 43. K. E. Beauregard, K.-D. Lee, R. J. Collier and J. A. Swanson, pH-dependent Perforation of Macrophage Phagosomes by Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*, *J. Exp. Med.*, vol. 186, no. 7, pp. 1159-1163, 1997.
 44. P. Schnupf, D. A. Portnoy and A. I. Decatur, Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence, *Cellular Microbiology*, vol. 8, no. 2, pp. 353-364, 2006.
 45. P. Schnupf and D. A. Portnoy, Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin, *Microbes and Infection*, vol. 9, pp. 1176-1187, 2007.
 46. R. J. C. Gilbert, Pore-forming toxins - Review, *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 59, pp. 832-844, 2002.

47. G. A. Smith, H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Portnoy and H. Goldfine, The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread., *Infection and Immunity*, vol. 63, no. 11, p. 4231–4237, 1995.
48. P. S. M. Yeung, Y. Na, A. J. Kreuder and H. Marquis, Compartmentalization of the Broad-Range Phospholipase C Activity to the Spreading Vacuole Is Critical for *Listeria monocytogenes* Virulence, *Infection and Immunity*, vol. 75, no. 1, pp. 44-51, 2007.
49. M. Ryan, T. O. Zaikova, J. F. W. Keana, H. Goldfine and O. H. Griffith, *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C: activation and allostery, *Biophysical Chemistry*, vol. 101 – 102, p. 347–358, 2002.
50. J. G. Songer, Bacterial phospholipases and their role in virulence, *Trends in Microbiology*, vol. 5, no. 4, pp. 156-161, 1997.
51. C. Geoffroy, J. Raveneau, J.-L. Beretti, A. Lecroisey, J.-A. Vazquez-Boland, J. E. Alouf and P. Berche, Purification and Characterization of an Extracellular 29-Kilodalton Phospholipase C from *Listeria monocytogenes*, *Infection and Immunity*, vol. 59, no. 7, pp. 2382-2388, 1991.
52. J.-A. Vazquez-Boland, C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud and P. Cossart, Nucleotide Sequence of the Lecithinase Operon of *Listeria monocytogenes* and Possible Role of Lecithinase in Cell-to-Cell Spread, *Infection and Immunity*, vol. 60, no. 1, pp. 219-230, 1992.
53. J. Pizarro-Cerdá, B. Payraastre, Y.-J. Wang, E. Veiga, H. L. Yin and P. Cossart, Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria monocytogenes* entry into target cells, *Cellular Microbiology*, vol. 9, no. 10, p. 2381–2390, 2007.
54. M. Kuhn, T. Pfeuffer, L. Greiffenberg and W. Goebel, Host Cell Signal Transduction during *Listeria monocytogenes* Infection, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 372, no. 1, p. 166–172, 1999.
55. H. Hilbi, Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria, *Cellular Microbiology*, vol. 8, no. 11, p. 1697–1706, 2006.
56. P. Steffen, D. A. Schafer, V. David, E. Gouin, J. A. Cooper and P. Cossart, *Listeria monocytogenes* ActA Protein Interacts With Phosphatidylinositol 4,5-

- Bisphosphate In Vitro, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 45, p. 58–66, 2000.
57. L. G. Tilney, P. S. Cormelly and D. A. Portnoy, Actin Filament Nucleation by the Bacterial Pathogen, *Listeria monocytogenes*, *The Journal of Cell Biology*, vol. 111, no. 6, pp. 2979-2988, 1990.
 58. L. G. Tilney and D. A. Portnoy, Actin Filaments and the Growth, Movement, and Spread of the Intracellular Bacterial Parasite, *Listeria monocytogenes*, *The Journal of Cell Biology*, vol. 109, no. 4, pp. 1597-1608, 1989.
 59. D. A. Portnoy, A 20-year Perspective on *Listeria monocytogenes* Pathogenesis, in *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*, New York, Springer Science+Business Media, LLC, 2007, p. 1-12.
 60. C. Deshayes, M. K. Bielecka, R. J. Cain, M. Scotti, A. de las Heras, Z. Pietras, B. F. Luisi, R. Núñez Miguel and J. A. Vázquez-Boland, Allosteric mutants show that PrfA activation is dispensable for vacuole escape but required for efficient spread and *Listeria* survival in vivo, *Molecular Microbiology*, vol. 85, no. 3, p. 461–477, 2012.
 61. A. de las Heras, R. J. Cain, M. K. Bielecka and J. A. Vazquez-Boland, Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander, *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, no. 2, pp. 118-127, 2011.
 62. M. Scotti, H. J. Monzo, L. Lacharme-Lora, D. A. Lewis and J. A. Vazquez-Boland, The PrfA virulence regulon, *Microbes and Infection*, vol. 9, pp. 1196-1207, 2007.
 63. P. Glaser, C. Rusniok and C. Buchrieser, *Listeria* Genomics, in *Listeria Monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*, New York, Springer Science+Business Media, LLC, 2009, pp. 33-62.
 64. D. Cabanes, P. Dehoux, O. Dussurget, L. Frangeul and P. Cossart, Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*, *Trends in Microbiology*, vol. 10, no. 5, pp. 238-245, 2002.
 65. D. Cabanes, S. Sousa, A. Cebria, M. Lecuit, F. Garcia-del Portillo and P. Cossart, Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence

- factor, Vip, a surface protein, *The EMBO Journal*, vol. 24, p. 2827–2838, 2005.
66. E. Milohanic, R. Jonquieres, P. Cossart, P. Berche and J.-L. Gaillard, The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor, *Molecular Microbiology*, vol. 39, no. 5, pp. 1212-1224, 2001.
 67. D. Cabanes, O. Dussurget, P. Dehoux and P. Cossart, Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence, *Molecular Microbiology*, vol. 51, no. 6, p. 1601–1614, 2004.
 68. D. F. Welch, Role of catalase and superoxide dismutase of the virulence of *Listeria monocytogenes*, *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, vol. 138, no. 2, p. 265–268, 1987.
 69. R. J. Lamont, R. Postlethwaite and A. P. MacGowan, *Listeria monocytogenes* and its role in human infection, *Journal of Infection*, vol. 17, no. 1, pp. 7-28, 1988.
 70. A. W. Dallmier and S. E. Martin, Catalase, Superoxide Dismutase, and Hemolysin Activities and Heat Susceptibility of *Listeria monocytogenes* after Growth in Media Containing Sodium Chloride, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 56, no. 9, pp. 2807-2810, 1990.
 71. C. P. Sword, Mechanisms of Pathogenesis in *Listeria monocytogenes* Infection I. Influence of Iron, *J. Bacteriol.*, vol. 92, no. 3, pp. 536-542, 1966.
 72. Y. Samra, M. Hertz and G. Altmann, Adult listeriosis-a review of 18 cases, *Postgraduate Medical Journal*, vol. 60, pp. 267-269, 1984.
 73. FAO/WHO, Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Interpretative summary. Microbiological Risk Assessment Series 4, Food and Agricultural Organization of the United Nations, World Health Organization, 2004.
 74. FDA/FSIS, US Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Chapter IV: Hazard characterization., Food and Drug

Administration, US Food Safety and Inspection Services, 2003.

75. S. Ryan, C. Hill and C. G. M. Gahan, Chapter 3 - Acid Stress Responses in *Listeria monocytogenes*, in *Advances in Applied Microbiology, Volume 65*, Elsevier Inc., 2008, pp. 67-91.
76. J. A. Vázquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland and J. Kreft, *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, no. 3, pp. 584-640, 2001.
77. S. S. Deshpande, *Handbook of Food Toxicology*, New York: Marcel Dekker Inc., 2002.
78. P. Cossart and A. Toledo-Arana, *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview, *Microbes and Infection*, vol. 10, pp. 1041-1050, 2008.
79. O. Disson and M. Lecuit, In vitro and in vivo models to study human listeriosis: mind the gap, *Microbes and Infection*, vol. 15, pp. 971-980, 2013.
80. H. P. R. Seeliger, Listeriosis - History and Actual Developments, *Infection*, vol. 16, no. Suppl. 2, pp. S80-S84, 1988.
81. Α. Τ. Κύρου, Λιστέρια – Λιστεριώσεις,, *Επιδημιολογικό Δελτίο Λοιμωδών Νοσημάτων Ελλάδος*, vol. 12, p. 73 – 75, 1999.
82. J. M. Farber and P. I. Peterkin, *Listeria monocytogenes*, in *Microbiological Safety and Quality of Food*, Gaithersburg, Aspen Publishers Inc., 2000, pp. 1178-1232.
83. T. Tasara and R. Stephan, Cold Stress Tolerance of *Listeria monocytogenes*: A Review of Molecular Adaptive Mechanisms and Food Safety Implications, *Journal of Food Protection*, vol. 69, no. 6, pp. 1473-1484, 2006.
84. V. Ramaswamy, V. M. Cresence, J. S. Rejitha, M. U. Lekshmi, K. Dharsana, S. P. Prasad and H. M. Vijila, *Listeria* — review of epidemiology and pathogenesis, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, vol. 40, no. 1, pp. 4 - 13, 2007.
85. CDC, *Listeria (Listeriosis)*, CDC, Centers for Disease Control and Prevention,

2014. <http://www.cdc.gov/listeria/surveillance.html>. Accessed 9 May 2014
86. CDC, Foodborne Outbreak Online Database (FOOD), CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 2014. Accessed 9 May 2014. <http://www.n.cdc.gov/foodborneoutbreaks/default.aspx>.
87. CDC, www.cdc.gov, <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>. Accessed 9 May 2014
88. R. Magalhaes, C. Mena, V. Ferreira, J. Silva, G. Almeida, P. Gibbs and P. Teixeira, Bacteria: *Listeria monocytogenes*, in *Encyclopedia of Food Safety 1st Edition Volume 1*, Elsevier Inc., 2014, pp. 450-461.
89. Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), Υπουργείο Υγείας, Γραφείο Τροφιμογενών Νοσημάτων, 2012. <http://www.keelpno.gr/Portals/>. Accessed 2014
90. Ν. Γαλανοπούλου, Δομή και Λειτουργίες Βιολογικών Μεμβρανών-Συστήματα Μεταφοράς, Αθήνα: Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Χημείας, 1995.
91. T. J. Denich, L. A. Beaudette, H. Lee and J. T. Trevor, Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes, *Journal of Microbiological Methods*, vol. 52, pp. 149-182, 2003.
92. D. M. Engelman, Membrane are more mosaic than fluid, *Nature*, vol. 438, pp. 578-580, 2005.
93. K. Matsumoto, J. Kusaka and A. Nishibori, Lipid domains in bacterial membranes, *Molecular Microbiology*, vol. 61, no. 5, p. 1110–1117, 2006.
94. I. Barák and K. Muchová, The Role of Lipid Domains in Bacterial Cell Processes, *Int. J. Mol. Sci.* , vol. 14, pp. 4050-4065, 2013.
95. L. Stryer, Βιοχημεία, Ηρακλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997.
96. W. Dowhan, M. Bogdanov and E. Mileykovskaya, Functional roles of lipids in membrane, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 5th edition*, Amsterdam, Elsevier, 2008, p. 1-38.
97. S. K. Mastronicolis, B. J. German and G. M. Smith, Isolation and fatty acid analysis of neutral and polar lipids of the food bacterium *Listeria*

monocytogenes, *Food Chemistry*, vol. 57, no. 3, pp. 451-456, 1996.

99. W. Fischer and K. Leopold, Polar lipids of four listeria species containing L-lysylcardiolipin, a novel lipid structure, and other unique phospholipids, *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 49, pp. 653-662, 1999.
100. R. V. Tatituri, B. J. Wolf, M. B. Brenner, J. Turk and F.-F. Hsu, Characterization of polar lipids of *Listeria monocytogenes* by HCD and low-energy CAD linear ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization, *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, vol. 407, pp. 2519-2528, 2015.
101. N. W. Hether and L. L. Jackson, Lipoteichoic Acid from *Listeria monocytogenes*, *Journal of Bacteriology*, vol. 156, no. 2, pp. 809-817, 1983.
102. N. Kosaric and K. Carroll, Phospholipids of *Listeria monocytogenes*, *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 239, pp. 428-442, 1971.
103. C. Baysse, M. Cullinane, V. Denervaud, E. Burrowes, J. M. Dow, J. P. Morrissey, L. Tam, J. T. Trevors and F. O'Gara, Modulation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* through alteration of membrane properties, *Microbiology*, vol. 151, pp. 2529-2542, 2005.
104. X. Ming and M. A. Daeschel, Correlation of Cellular Phospholipid Content with Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A, *Journal of Food protection*, vol. 58, no. 4, pp. 416-420, 1995.
105. N. J. Russell, R. I. Evans, P. F. ter Steeg, J. Hellemons, A. Verheul and T. Abee, Membranes as a target for stress adaptation, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 28, pp. 255-261, 1995.
106. N. Beales, Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review., *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 3, no. 1, pp. 1-20, 2004.
107. S. K. Mastronicolis, J. German, N. Megoulas, E. Petrou, P. Foka and G. Smith, Influence of cold shock on the fatty-acid composition of different lipid classes of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*, *Food Microbiology*, vol. 15, p. 299-306, 1998.
108. B. A. Annous, L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda and B. J. Wilkinson,

- Critical Role of Anteiso-C15:0 Fatty Acid in the Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 10, pp. 3887-3894, 1997.
109. I. R. Booth, Regulation of Cytoplasmic pH in Bacteria, *Microbiological Reviews*, vol. 49, no. 4, pp. 359-378, 1985.
 110. E. S. Giotis, D. A. McDowell, I. S. Blair and B. J. Wilkinson, Role of Branched-Chain Fatty Acids in pH Stress Tolerance in *Listeria monocytogenes*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 3, pp. 997-1001, 2007.
 111. W. van Schaik, C. G. Gahan and C. Hill, Acid-Adapted *Listeria monocytogenes* Displays Enhanced Tolerance against the Lantibiotics Nisin and Lacticin 3147, *Journal of Food Protection*, vol. 62, no. 4, p. 536–539, 1999.
 112. P. S. Ita and R. W. Hutkins, Intracellular pH and Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic Soy Broth containing Acetic, lactic, Citric and hydrochloric acid, *Journal of Food Protection*, vol. 54, no. 1, pp. 15-19, 1991.
 113. S. Brul and P. Coote, Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, pp. 1-17, 1999.
 114. S. K. Mastronicolis, A. Berberi, I. Diakogiannis, E. Petrova, I. Kiaki, T. Baltzi and P. Xenikakis, Alteration of the phospho- or neutral lipid content and fatty acid composition in *Listeria monocytogenes* due to acid adaptation mechanisms for hydrochloric, acetic and lactic acids at pH 5.5 or benzoic acid at neutral pH, *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 98, pp. 307-316, 2010.
 115. V. K. Juneja and P. M. Davidson, Influence of Altered Fatty Acid Composition on Resistance of *Listeria monocytogenes* to Antimicrobials, *Journal of Food Protection*, vol. 56, no. 4, pp. 302-305, 1993.
 116. A. S. Angelidis and G. M. Smith, Three Transporters Mediate Uptake of Glycine Betaine and Carnitine by *Listeria monocytogenes* in Response to Hyperosmotic Stress, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 2, pp. 1013-1022, 2003.
 117. A. S. Angelidis and G. M. Smith, Role of the Glycine betaine and Carnitine transporters in Adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill Stress in defined

medium, *Applied and environmental Microbiology*, vol. 69, no. 12, pp. 7492-7498, 2003.

118. M. Halberg Larsen, M. Dalmasso, H. Ingmer, S. Langsrud, M. Malakauskas, A. mader, T. Moretro, S. Smole Mozina, K. Rychli, M. Wagner, R. J. Wallace, J. Zentek and K. Jordan, Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains, *Food Control*, vol. 44, pp. 92-109, 2014.
119. P. J. Taormina and L. R. Beuchat, Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, pp. 71-80, 2002.
120. A. A. Mafu, D. Roy, J. Goulet, L. Savoie and R. Roy, Efficiency of Sanitizing Agents for Destroying *Listeria monocytogenes* on Contaminated Surfaces, *Journal of Dairy Science*, vol. 73, no. 12, pp. 3428-3432, 1990.
121. J. Lunden, T. Autio, A. Markkula, S. Hellstrom and H. Korkeala, Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 82, pp. 265-272, 2003.
122. M. S. To, S. Favrin, N. Romanova and M. W. Griffiths, Postadaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modifications of *Listeria monocytogenes*, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 11, pp. 5258-5264, 2002.
123. J. A. Lopes, Evaluation of Dairy and Food Plant Sanitizers Against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, *Journal of Dairy Science*, vol. 69, no. 11, pp. 2791-2796, 1986.
124. L. Mereghetti, R. Quentin, N. Marquet-van der Mee and A. Audurier, Low Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to Quaternary Ammonium Compounds, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 11, pp. 5083-5086, 2000.
125. P. Bisbiroulas, M. Psylou, I. Iliopoulou, I. Diakogiannis, A. Berberi and S. K. Mastronikolis, Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress

- response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride, *Letters in Applied Microbiology*, vol. 52, pp. 275-280, 2011.
126. E. Pereira da Silva and E. C. Pereira De Martinis, Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*, *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 97, p. 957–968, 2013.
 127. R. M. M. Donlan, Biofilms: Microbial Life on Surfaces, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 8, no. 9, pp. 881-890, 2002.
 128. J. W. Costerton, P. S. Stewart and E. P. Greenberg, Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science, New Series*, vol. 284, no. 5418, pp. 1318-1322, 1999.
 129. M. S. Gião and C. W. Keevil, *Listeria monocytogenes* Can Form Biofilms in Tap Water and Enter Into the Viable but Non-Cultivable State, *Microbial Ecology*, vol. 67, no. 3, pp. 603-611, 2014 .
 130. B. Carpentier and D. Chassaing, Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 97, p. 111 –122, 2004.
 131. R. F. Stier, Beating Back Biofilms in Food, February/March 2005; <http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2005/beating-back-biofilms-in-food-processing>. Accessed 16 May 2014
 132. B. Carpentier and P. Cerf, Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 145, pp. 1-8, 2011.
 133. J. N. Sofos, Biofilms: our constant enemies., *Food Safety Magazine*, vol. 38, pp. 40-41, 2009.
 134. S. R. Kadam, H. M. den Besten, S. van der Veen, M. H. Zwietering, R. Moezelaar and T. A. Abee, Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 165, p. 259–264, 2013.
 135. A. Gianotti, D. Serrazanetti, S. S. Kamdem and M. E. Guerzoni, Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of

Listeria monocytogenes, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 123, pp. 9-17, 2008.

136. D. G. Davies, M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton and E. P. Greenberg, The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm, *Science*, vol. 280, pp. 295-298, 1998.
137. I. Lasa, Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development, *International Microbiology*, vol. 9, pp. 21-28, 2006.
138. I. Francolini and G. Donelli, Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections, *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 59, p. 227–238, 2010.
139. K. Czaczyk and K. Myszk, Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation, *Polish J. of Environ. Stud.*, vol. 16, no. 6, pp. 799-806, 2007.
140. A. Taraszkieicz, G. Fila, M. Grinholc and J. Nakonieczna, Innovative strategies to overcome biofilm resistance, *BioMed Research International*, vol. 2013, p. Article ID 150653, 2013.
141. J. Kozak, T. Balmer, R. Byrne and K. Fisher, Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products, *Food Cont*, vol. 7, no. 4/5, pp. 215-221, 1996.
142. P. J. Jooste, L. Anelich and Y. Motarjemi, Milk and Dairy Products, in *Encyclopedia of Food Safety*, 1 ed., vol. 3, Y. Motarjemi, G. G. Moy and E. C. Todd, Eds., London, Academic Press, 2014, pp. 285-296.
143. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2011.
144. N. M. O'Brien and T. P. O'Connor, Nutritional Aspects of Cheese, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. 3rd Ed.*, pp. 573-583.
145. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, Cheese: An Overview, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1: General Aspects, 3rd Ed.*, London, Elsevier Academic Press, 2004, pp. 1-18.
146. E. Manolopoulou, P. Sarantinopoulos, E. Zoidou, A. Aktypis, E. Moschopoulou, I. G. Kandarakis and E. M. Anifantakis, Evolution of microbial

- populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 82, pp. 153-161, 2003.
148. Food And Agriculture Organization of the United Nations, 2011. Online.. Available: <http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>.
 149. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, Production and utilization of milk, New York: Thomson Science, 1998, pp. 1-20.
 150. Χ. Κεχαγιάς and Σ. Κουλούρης, Στοιχεία Τεχνολογίας & Έλεγχοι Ποιότητας Γάλακτος & Γαλακτοκομικών Προϊόντων, Εκδόσεις ΙΩΝ, 2005.
 151. A. A. Mauropoulos and , I. S. Arvanitoyannis, Implementation of hazard analysis critical control point to Feta and Manouri cheese production lines., *Food Control*, pp. 213-219, vol. 10, pp. 213-219, 1999.
 152. C. Payne and R. A. Wilbey, Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: A quantitative comparison of Fluorophos and colourimetric procedures, *International Journal of Dairy Technology*, vol. 62, no. 3, pp. 308-314, 2009.
 153. Σ. Καμιναρίδης and Γ. Μοάτσου, Γαλακτοκομία, Εκδόσεις Έμβρυο, 2009.
 154. M. Muhlemann, Dairy products: Cheese, in *Encyclopedia of Food Safety*, London, Academic Press, 2014, pp. 297-308.
 155. W. Abrahao Moscalewski, P. R. d. S. Abrahao, C. L. B. Monteiro and R. Pontarolo, Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 44, no. 2, pp. 289-296, 2008.
 156. M. Kousta, M. Mataragas, P. Skandamis and E. H. Drosinos, Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels, *Food Control*, vol. 21, pp. 805-815, 2010.
 157. E. T. Ryser, Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in Cheese and Other Fermented Dairy Products, in *Listeria, Listeriosis and Food Safety, 3rd Edition by E.T. Ryser and E.H. Marth*, CRC Press, 2007, pp. 405-502.
 158. A. K. Theodoridis, D. K. Papageorgioz, A. Abraham and P. G. Karaioannoglou, Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Chevre Metsovo and Pichtogalo chanion cheeses, *Italian Journal of Food Science*, vol.

18, no. 1, pp. 51-61, 2006.

160. Κ. Τζιά, Π. Ταούκης and Β. Ωραιοπούλου, Κεφάλαιο 3 - Μικροβιολογία Τροφίμων, in *Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων: Συστατικά-Ιδιότητες-Ρεολογία-Μικροβιολογία-Ποιότητα-Συσκευασία (Σημειώσεις μαθήματος)*, Αθήνα, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2007.
161. ISO-International Organization for Standardization, International Organization for Standardization, 2004. Online.. Available: http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_ics/catalogue_ics_browse.htm?ICS1=07&ICS2=100&ICS3=30.
162. F. Ottaviani, M. Ottaviani and M. Agosti, Differential agar Medium for *Listeria monocytogenes*., in *Quimper Froid.* , Quimper, 1997.
163. P. Van Netten, I. Perales, G. D. Curtis and D. A. Mossel, Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp., *International Journal of Food Microbiology*, vol. 8, no. 4, pp. 299-316, 1989.
164. P. H. in't Veld and E. de Boer, Recovery of *Listeria monocytogenes* on selective agar media in a collaborative study using reference samples, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 13, no. 4, pp. 295-300, 1991.
165. Oxoid - Dedicated to Microbiology, Thermo Fisher Scientific Inc., 2006. <http://www.oxoid.com>. Accessed 2010
166. M. T. Madigan, J. M. Martinko and J. Parker, Κεφάλαιο 4: Κυτταρική δομή και λειτουργία, in *Brock - Βιολογία των Μικροοργανισμών. Τομος Ι. Ελληνική Έκδοση*, Ηράκλειο, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005, p. 65-116.
167. G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel and S. A. Morse, Chapter 2. Cell Structure, in *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology 25th Edition*, The McGraw-Hill Companies, 2010, pp. 14-54.
168. P. J. Goodhew, J. Humphreys and R. Beanland, *Electron Microscopy and Analysis*. 3rd Edition, London: Taylor & Francis, 2001.
169. P. D. Velentzas, A. D. Velentzas, A. D. Pantazi, V. E. Mpakou, C. G. Zervas, I. S. Papassideri and D. J. Stravopodis¹, Proteasome, but Not Autophagy,

- Disruption Results in Severe Eye and Wing Dysmorphia: A Subunit- and Regulator-Dependent Process in *Drosophila*., *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, p. e80530. doi:10.1371/journal.pone.0080530, 2013.
170. E. G. Bligh and W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* , vol. 37, pp. 911-917, 1959.
 173. D. S. Galanos and V. M. Kapoulas, A rapid method for the determination of organic nitrogen and phosphorus based on a single perchloric acid digestion, *Analytica Chimica ACTA*, vol. 34, pp. 360-366, 1966.
 174. E. J. King, The colorimetric determination of phosphorus, *Biochemical Journal*, vol. 26, no. 2, pp. 292-297, 1932.
 176. D. E. Vance and C. C. Sweeley, Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides in human blood, *Journal of Lipid Research*, vol. 8, pp. 621-630, 1967.
 177. Ε. Μπακέας, Αεριοχρωματογραφία, *Σημειώσεις Μαθήματος Σύγχρονες Αναλυτικές Τεχνικές*, Αθήνα, ΕΚΠΑ, 2008.
 178. Matreya LLC, 2006. <http://www.matreya.com/msds/1114%20SDS.pdf>. Accessed May 2010
 179. Restek Corporation, 2014. <http://www.restek.com/catalog/view/6099/35066>. Accessed June 2014
 182. Π. Δημαρέλη, Μελέτη της ανάπτυξης του ψυχρότροφου παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε τυρόι και ελιά, ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2013.
 183. Ι. Η. Διακογιάννης, Επίδραση του συντηρητικού οξικού οξέος στα λιπίδια και στην ρευστότητα της μεμβράνης του τροφογενούς παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Επίδραση κρύας προσαρμογής στην επιβίωση του βακτηρίου σε παγωτά με διαφορετική σύσταση, ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2009.
 184. C.-I. A. Belessi, S. Arapaki, A. S. Gounadaki and P. N. Skandamis, Effect of contamination stage and inoculum history on the survival and growth of *Listeria monocytogenes* in semi-hard and hard cheese, in *11th International Congress on Engineering and Food*, Athens, 2011.
 185. D. K. Papageorgiou and E. H. Marth, Fate of *Listeria monocytogenes* during

the manufacture, ripening and storage of Feta cheese, *Journal of Food Protection*, vol. 52, pp. 82-87, 1989.

186. F. Morgan, V. Bonnin, M.-P. Mallereau and G. Perrin, Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 64, pp. 217-221, 2001.
187. Π. Μπισμπιρούλας, Επίδραση του απολυμαντικού Benzalkonium Chloride στο τροφογενές παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* και μελέτη της μεταβολής των λιποειδών του. Επιβίωση κρυοπροσαρμοσμένου βακτηρίου που εμβολιάστηκε σε γαλακτοκομικά (τυρί - παγωτό), ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2008.
188. J. Li, M. L. Chikindas, R. D. Ludescher and T. J. Montville, Temperature- and Surfactant-Induced Membrane Modifications That Alter *Listeria monocytogenes* Nisin Sensitivity by Different Mechanisms, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 12, pp. 5904-5910, 2002.
189. Τ. Μπαλτζή, Αναστολή του τροφογενούς βακτηρίου *Listeria monocytogenes* με γαλακτικό οξύ – Μεταβολή των λιποειδών της μεμβράνης του. Ανάπτυξη καταπονημένης *Listeria* (pH 3) σε επιμολυσμένο τυρί άλμης, ως προς αλάτι και θερμοκρασία πήξης του τυριού, ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2007.
190. M. R. Neunlist, M. Federighi, M. Laroche, D. Sohier, G. Delattre, C. Jacquet and N.-E. Chihib, Cellular lipid fatty acid pattern heterogeneity between reference and recent food isolates of *Listeria monocytogenes* as a response to cold stress, *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 88, pp. 199-206, 2005.
191. N.-E. Chihib, M. R. da Silva, G. Delattre, M. Laroche and M. Federighi, Different cellular fatty acid pattern behaviours of two strain of *Listeria monocytogenes* ScottA and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions, *FEMS microbiology Letters*, Vols. 155-160, p. 218, 2003.
192. M. Julotok, A. K. Singh, C. Gatto and B. J. Wilkinson, Influence of Fatty Acid Precursors, Including Food Preservatives, on the Growth and Fatty Acid Composition of *Listeria monocytogenes* at 37 and 10°C, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 5, pp. 1423-1432, 2010.
193. S. Artault, J. L. Bind, Y. Delaval and N. G. Dureuil, AFNOR Validation of the

ALOA method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs., Colloque de la Societé Francaise de Microbiologie, Paris, 2000.

195. Α. Κρηπιώτη, Ε. Βουδιά, Β. Σωτηρούδης, Ν. Σουρούνης, Ε. Πέτροβα, Μ. Σάπκα, Κ. Τζιά and Σ. Μαστρονικολή, Επιβίωση της *Listeria monocytogenes* προσαρμοσμένης σε όξινο ή σε ψυχρό περιβάλλον κατά την εργαστηριακή παρασκευή λευκού τυριού (τύπου Φέτα). Σχέση λιπαρών οξέων της μεμβράνης του βακτηρίου, in *2ο πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογία και τεχνολογία τροφίμων*, Αθήνα, 2007.
196. S. Mastronikolis, C. Tzia, E. Petrova, M. Sapka, N. Sourounis, V. Sotiroudis, A. Kritioti and E. Voudia, Fate of the Acid and Cold Adapted pathogen *Listeria monocytogenes* which contaminated two types of artificially prepared soft cheeses, in *ISOPOL XVI*, Savannah, 2007.
197. K. J. Rogga, J. Samelis, A. Kakouri, M. C. Katsiari, I. N. Savvaidis and M. G. Kontominas, Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4C and 12C, *International Dairy Journal*, vol. 15, pp. 59-67, 2005.
199. D. K. Papageorgiou, M. Bori and A. Mantis , Growth of *Listeria monocytogenes* in the whey cheeses Myzithra, Anthotyros and manouri during storage at 5, 12 and 22C, *Journal of Food Protection*, vol. 59, pp. 1193-1199, 1996.
200. V. Vadyvaloo, J. W. Hastings, M. J. van der Merwe and M. Rautenbach, Membranes of Class IIa Bacteriocin-Resistant *Listeria monocytogenes* Cells Contain Increased Levels of Desaturated and Short-Acyl-Chain Phosphatidylglycerols, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 11, pp. 5223-5230, 2002.
201. A. Verheul, N. J. Russell, R. Van't Hof, F. M. Rombouts and T. Abee, Modifications of Membrane Phospholipid Composition in Nisin-Resistant *Listeria monocytogenes* Scott A, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 9, pp. 3451-3457, 1997.
202. X. Ming and M. A. Daeschel , Correlation of cellular phospholipid content with nisin resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A, *Journal of Food Protection*, vol. 58, pp. 416-420, 1995.

203. J. Tholozan, M. Ritz, . F. Jugiau, M. Federighi and J. Tissier, Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, *Journal of Applied Microbiology* , vol. 88, p. 202–212, 2000.
204. G. Cataldo, M. Conte, F. Chiarini, L. Seganti, M. Ammendolia, F. Superti and C. Longhi, Acid adaptation and survival of *Listeria monocytogenes* in Italian-style soft cheeses, *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103, pp. 185-193, 2007.
205. N. J. Rowan and J. G. Anderson, Effects of Above-Optimum Growth Temperature and Cell Morphology on Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* Cells Suspended in Bovine Milk, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 6, pp. 2065-2071, 1998.