

**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**  
**Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων**



# **Ψυχρή παστερίωση πορτοκαλοχυμού ποικιλίας Navel με Υπερυψηλή Πίεση**

---

**Διπλωματική εργασία: Γουργουλέτης Άγγελος**

**Επιβλέπων καθηγητής: Ταούκης Πέτρος**



**Αθήνα 2013**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με τον τομέα της χημείας και τεχνολογίας των τροφίμων και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγησή του σε όλη τη διάρκεια αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον υποψήφιο Διδάκτορα Ζαχαρία Αλεξανδράκη καθώς με την αμέριστη καθημερινή βοήθεια του, τις πολύτιμες συμβουλές του και την υπομονή του, αποτέλεσε βασικό παράγοντα για την περάτωση της παρούσας εργασίας. Οφείλω ακόμα ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Διδάκτορα Γιώργο Κατσαρό για την καθοδήγησή του και την πολύτιμη βοήθεια του σε διάφορα ζητήματα που προέκυψαν.

Ευχαριστώ, ακόμα τους Καθηγητές, τους Υποψήφιους Διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων του Ε.Μ.Π. για τη συνεργασία μας και το φιλικό κλίμα καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ πάρα πολύ τους γονείς μου, τα αδέρφια μου και όλους τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την υπομονή που έδειξαν, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ποιότητα του φρέσκου χυμού πορτοκαλιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία των πηκτινολυτικών ενζύμων, καθώς και την ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση του πορτοκαλοχυμού περιλαμβάνουν βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Οι ζύμες είναι η επικρατούσα χλωρίδα για ανεπεξέργαστο πορτοκαλοχυμό, όμως μετά την επεξεργασία με Υπερυψηλή Πίεση (ΥΠ) η επικρατούσα χλωρίδα είναι τα γαλακτικά βακτήρια. Από τα πηκτινολυτικά ένζυμα, το σημαντικότερο για την περίπτωση του πορτοκαλοχυμού είναι η πηκτινομεθυλεστεράση (ΠΜΕ). Η δράση της ΠΜΕ προκαλεί την διαύγαση των χυμών πορτοκαλιού υποβαθμίζοντας την ποιότητά τους καθώς η θολότητα είναι ένα σημαντικό ποιοτικό χαρακτηριστικό του χυμού για την αποδοχή του από τους καταναλωτές. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος απενεργοποίησης των δύο αυτών παραγόντων αλλοίωσης είναι η θερμική παστερίωση, με μειονέκτημα όμως την παράλληλη υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και των θρεπτικών συστατικών κατά την επεξεργασία. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσεται μια νέα μη-θερμική τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων, η τεχνολογία της Υπερυψηλής Πίεσης με την οποία επιτυγχάνεται απενεργοποίηση των παραγόντων αλλοίωσης των τροφίμων, ενώ παράλληλα διατηρούνται αναλλοίωτα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τα θρεπτικά συστατικά τους.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ΥΠ για την παραγωγή NFC πορτοκαλοχυμού ποικιλίας Navel. Μελετήθηκε η απενεργοποίηση της ΠΜΕ και των γαλακτικών βακτηρίων σε χυμό πορτοκαλιού με συνδυασμένη εφαρμογή ΥΠ (100-600MPa) και θερμοκρασίας (20-40°C).

Αρχικά, προσδιορίστηκαν τα δύο πιο ανθεκτικά στην πίεση γαλακτικά βακτήρια (LAB1 και LAB2) και στη συνέχεια μελετήθηκε η θερμική απενεργοποίησή τους. Για κάθε θερμοκρασία (47.5 έως 55°C) υπολογίστηκε ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού (D) του κάθε μικροοργανισμού με εφαρμογή του μοντέλου Baranyi. Προσδιορίστηκε επιπλέον η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από τη θερμοκρασία μέσω της σταθεράς θερμικής αντίστασης

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της ΥΠ στην απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων του χυμού. Εφαρμόστηκαν πιέσεις μεταξύ 150 και 300MPa για θερμοκρασίες 25, 30 και 35°C και υπολογίστηκε ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού (D) των μελετώμενων μικροοργανισμών για κάθε συνθήκη χρησιμοποιώντας το

μοντέλο Baranyi. Από τις τιμές που προέκυψαν έγινε φανερό ότι η πίεση και η θερμοκρασία επιδρούν συνεργιστικά στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών αυτών και ιδιαίτερα η αύξηση της πίεσης επιφέρει σημαντική αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης. Επίσης προσδιορίστηκε η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού από την πίεση και τη θερμοκρασία μέσω των σταθερών αντίστασης λόγω εφαρμογής πίεσης και θερμικής αντίστασης αντίστοιχα. Τέλος, υπολογίστηκαν οι παράμετροι του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απενεργοποίησης των εξεταζόμενων μικροοργανισμών καθώς και οι παράμετροι αυτές για την απενεργοποίηση ενός υποθετικού μικροοργανισμού που περιλάμβανε τα πιο ανθεκτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τους δύο πραγματικούς μικροοργανισμούς.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επεξεργασίας της ενδογενούς ΠΜΕ του χυμού με συνδυασμένη εφαρμογή ΥΠ (200-600MPa) και θερμοκρασίας (20, 30 και 40°C). Υπολογίστηκε ο ρυθμός απενεργοποίησης του μελετώμενου ενζύμου σε κάθε συνθήκη επεξεργασίας και προσδιορίστηκε η εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης (Ea) καθώς και η εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση μέσω του όγκου ενεργοποίησης (Va). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει τη συνδυασμένη επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ, λαμβάνοντας υπόψη την εξάρτηση του όγκου ενεργοποίησης από την θερμοκρασία και της ενέργειας ενεργοποίησης από την πίεση.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προέκυψε ότι για την επεξεργασία του χυμού οι συνθήκες που απαιτούνται για την επιθυμητή απενεργοποίηση του ενζύμου είναι κατά πολύ πιο έντονες από αυτές που απαιτούνται για την επιθυμητή απενεργοποίηση του πιο ανθεκτικού στελέχους μικροοργανισμών (υποθετικός LAB). Συγκεκριμένα, συνδυάζοντας τα δύο μαθηματικά μοντέλα, **οι προτεινόμενες συνθήκες για την επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού (Navel) με ΥΠ είναι 600 MPa, 40°C για 3 min.** Στις συγκεκριμένες συνθήκες επιτυγχάνεται 90% απενεργοποίηση της ΠΜΕ και μείωση των γαλακτικών βακτηρίων κατά 7D. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το βέλτιστο σχεδιασμό μιας διεργασίας ΥΠ για την παραγωγή ενός ποιοτικά ανώτερου πορτοκαλοχυμού NFC ποικιλίας Navel. Το κόστος αυτής της διεργασίας στις προτεινόμενες συνθήκες θα ανερχόταν στα 0,15€/L.

## ABSTRACT

The overall quality of fresh orange juice is highly correlated to the effect of its endogenous PME and the growth of spoilage microorganisms. Therefore, control of these quality indices is a prerequisite to produce a high quality, NFC (not from concentrate) orange juice product of commercial stability. High Pressure (HP) technology could be used for this purpose inactivating spoilage factors while simultaneously retaining superior sensorial and nutritional characteristics.

The objective of this research was to investigate the inactivation kinetics of the indigenous enzyme (PME) and the more pressure resistant indigenous species of lactic acid bacteria (LAB) in orange juice (*Navel* cv.) under pressure (100- 600MPa) combined with moderate temperature (20-40°C).

Thermal and high pressure inactivation of Navel orange juice PME followed first order kinetics with a residual PME activity (10%) at all pressure–temperature combinations used. To serve as a tool for calculation of adequate process conditions, a composite mathematical model was described. The model describes the PME inactivation rate as a function of pressure and temperature process conditions, taking into account the dependence of both activation energy and activation volume on the applied pressure and temperature, respectively. The most pressure and temperature resistant spoilage microorganism isolated from HP treated Navel orange juice was adequately inactivated by HP processing and the corresponding  $z_T$  and  $z_P$  values of LAB inactivation were also estimated at all conditions tested. A mathematical model for LAB inactivation as a function of pressure and temperature was also developed. These functions allow the determination of the pressure/temperature conditions that achieve the target enzyme and microbial inactivation at a selected processing time. An inactivation of 90% of the pressure/temperature labile PME fraction should be considered as process target, while for LAB a 7D reduction of the most resistant strain should also be considered. Based on the above, **the process conditions of 600 MPa at 40°C for 3 min are proposed as effective for Navel orange juice cold pasteurization.**

The developed mathematical models can be used as tools for the optimal design of high pressure processing conditions for commercial production of superior quality NFC Navel orange juice.





## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	IV
ABSTRACT.....	VI
<b>1. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ .....</b>	<b>1</b>
1.1 Ποικιλίες πορτοκαλιών .....	1
1.1.1. Κοινά πορτοκάλια.....	1
1.1.2 Πορτοκάλια Navel.....	2
1.1.3. Σαγκουίνια.....	3
1.1.4. Πορτοκάλια φτωχά σε οξέα (Πορτοκάλια ζάχαρη).....	3
1.2 Δομή του πορτοκαλιού.....	4
1.3 Χημική σύσταση πορτοκαλιού.....	5
1.4 Παραγωγή του χυμού .....	8
1.4.1 Συγκομιδή.....	8
1.4.2 Διαλογή.....	8
1.4.3 Πλύσιμο .....	9
1.4.4 Εξαγωγή του χυμού .....	9
1.4.5 Ανάμειξη.....	12
1.4.6. Αποελαίωση και απαέρωση.....	12
1.4.7 Παστερίωση.....	13
1.5 Τύποι πορτοκαλοχυμών .....	15
1.6 Πικρή γεύση στο χυμό .....	16
1.6.1 Λιμονοειδή.....	16
1.6.2 Φλαβονοειδή.....	16
1.6.3 Διαδικασίες αποτίκρανσης.....	17
1.7 Παραπροϊόντα και χρήση τους.....	18

1.8 Μικροβιολογία πορτοκαλοχυμού.....	20
<b>2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ .....</b>	<b>21</b>
2.1 Γενικές αρχές.....	21
2.2 Μικροβιολογική μόλυνση των τροφίμων .....	23
2.2.1 Πηγές Μολύνσεων.....	23
2.2.2 Καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών .....	23
2.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα .....	25
2.3 Κινητική απενεργοποίησης μικροοργανισμών .....	27
2.4 Χρόνος Θερμικού Θανάτου .....	28
2.5 Τιμή D .....	28
2.6 Τιμή z .....	28
2.7 Καμπύλη του Χρόνου Θερμικού Θανάτου .....	29
2.8 Βακτήρια .....	29
2.8.1 Παθογόνα βακτήρια.....	31
2.8.2 Μη παθογόνα βακτήρια .....	31
2.9 Γαλακτικά Βακτήρια .....	32
2.9.1 Κατάταξη των γαλακτικών βακτηρίων.....	33
2.9.2 Μεταβολισμός των γαλακτικών βακτηρίων .....	33
2.10 Γένη γαλακτικών βακτηρίων.....	36
2.10.1 Γένος <i>Lactobacillus</i> .....	36
2.10.2 Γένος <i>Leuconostoc</i> .....	37
2.10.3 Γένος <i>streptococcus</i> .....	38
2.10.4 Γένος <i>Pediococcus</i> .....	38
<b>3. ΠΗΚΤΙΝΟΛΥΤΙΚΑ ENZYMA .....</b>	<b>41</b>
3.1 Ένζυμα .....	41

3.1.1 Γενικά .....	41
3.1.2 Ένζυμα και τρόφιμα .....	42
3.1.3 Κινητική των ενζύμων.....	43
3.2 Πηκτινικές ουσίες.....	44
3.2.1 Εισαγωγή .....	44
3.2.2 Πηκτινικά υποστρώματα .....	45
3.3 Πηκτινολυτικά ένζυμα .....	46
3.3.1 Κατηγορίες πηκτινολυτικών ενζύμων .....	47
3.3.2 Εφαρμογές πηκτινολυτικών ενζύμων .....	49
3.4 Πηκτινομεθυλεστεράση (ΠΜΕ).....	51
3.4.1 Βιοφυσικές ιδιότητες της ΠΜΕ .....	51
3.4.2 Η δομή της ΠΜΕ .....	52
3.4.3 Καταλυτική δράση.....	53
3.4.4 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα της ΠΜΕ .....	54
3.5 Απώλεια θολότητας στους χυμούς.....	55
3.5.1 Αντιμετώπιση της απώλειας θολότητας .....	56
<b>4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ .....</b>	<b>59</b>
4.1 Θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας .....	59
4.1.1 Παστερίωση και αποστείρωση .....	59
4.1.2 Μικροκύματα και ραδιοσυχνότητες .....	60
4.1.3 Ωμική θέρμανση .....	60
4.2 Εναλλακτικές μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας.....	61
4.2.1 Κατάψυξη .....	62
4.2.2 Οσμωτική αφυδάτωση.....	62
4.2.3 Παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία .....	62
4.2.4 Επεξεργασία με υπέρηχους .....	63

4.2.5	Επεξεργασία με ακτινοβολίες.....	64
4.2.6	Τεχνολογία παλμικού φωτος .....	65
4.2.7	Κρύο πλάσμα.....	66
4.2.8	Πυκνή φάση διοξειδίου του άνθρακα.....	66
4.2.9	Υπερυψηλή Πίεση .....	67
<b>5.</b>	<b>.Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ .....</b>	<b>73</b>
5.1	Εισαγωγή.....	73
5.2	Μηχανισμός της Υπερυψηλής Πίεσης .....	75
5.3	Μηχανολογικός εξοπλισμός της ΥΠ.....	77
5.4	Τρόποι άσκησης πίεσης.....	77
5.5	Συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας.....	78
5.6	Κόστος του εξοπλισμού .....	79
5.7	Εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης σε συγκεκριμένες κατηγορίες τροφίμων.....	80
5.8	Επίδραση Υπερυψηλής πίεσης στους μικροοργανισμούς.....	82
5.8.1	Επίδραση της ΥΠ στα βακτήρια.....	83
5.9	Επίδραση της υψηλής πίεσης στα ένζυμα .....	86
5.9.1	Επίδραση στην Πηκτινομεθυλεστεράση .....	87
5.10	. Επίδραση της ΥΠ στα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά .....	89
5.11	Επεξεργασία πορτοκαλοχυμού ποικιλίας Navel με ΥΠ.....	91
<b>6.</b>	<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>93</b>
6.1	Σκοπός.....	93
6.2	Προελευση του χυμου .....	93
6.3	Απομόνωση των μικροοργανισμών .....	94
6.4	Προετοιμασία των Εμβολίων των Μικροοργανισμών.....	94
6.5	Θερμική επεξεργασία των LAB στον πορτοκαλοχυμο.....	95
6.6	Επεξεργασία των LAB και της ΠΜΕ του πορτοκαλοχυμού με ΥΠ.....	96

6.6.1 Η Μονάδα της Υπερυψηλής Πίεσης .....	96
6.6.2 Επεξεργασία των LAB του Πορτοκαλοχυμού με ΥΠ.....	98
6.6.3 Επεξεργασία της ΠΙΜΕ του Πορτοκαλοχυμού με ΥΠ.....	99
6.6.4 Μέτρηση ενεργότητας της ΠΙΜΕ με τιτλοδότηση .....	100
6.6.5 Μέτρηση του πληθυσμού των LAB μετά την επεξεργασία .....	101
6.6.6 Μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων .....	104
<b>7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>105</b>
7.1 Προσδιορισμός των πιο ανθεκτικών μικροοργανισμών στη θερμοκρασία και την υπερυψηλή πίεση .....	105
7.2 Θερμική απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων .....	106
7.2.1 Θερμική απενεργοποίηση του LAB1 .....	106
7.2.2 Θερμική απενεργοποίηση του LAB2 .....	109
7.2.3 Προσδιορισμός της Σταθεράς Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία ( $Z_T$ ) των Εξεταζόμενων Μικροοργανισμών .....	112
7.3 Επεξεργασία των γαλακτικών βακτηρίων με συνδυασμένη εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας .....	114
7.3.1 Απενεργοποίηση του LAB1 Συναρτήσεως του Χρόνου Επεξεργασίας.....	114
7.3.2 Απενεργοποίηση του LAB2 Συναρτήσεως του Χρόνου Επεξεργασίας.....	127
7.4 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απενεργοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων στο χυμό πορτοκαλιού .....	139
7.4.1 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου απενεργοποίησης των LAB1 και LAB2 .....	139
7.4.2 Ανάπτυξη μιας Υποθετικής περίπτωσης ύπαρξης ενός Μικροοργανισμού .....	144
7.5 Επεξεργασία της πηκτινομεθυλεστεράσης με συνδυασμένη εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας .....	151
7.5.1 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για σταθερή πίεση (ενέργεια ενεργοποίησης) .....	157

7.5.2 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση σε σταθερή θερμοκρασία (Όγκος ενεργοποίησης).....	159
7.6 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ πορτοκαλοχυμού Navel ως συνάρτηση της πίεσης και θερμοκρασίας. ....	161
7.7 Επιλογή της βέλτιστης συνθήκης. ....	166
7.8 Κόστος παραγωγής χυμού πορτοκαλιού ποικιλίας Navel επεξεργασμένου με ΥΠ.....	168
<b>8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>169</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>175</b>

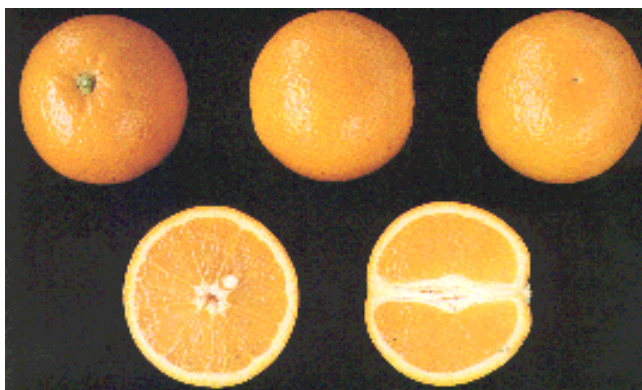
## 1. ΠΟΡΤΟΚΑΛΙ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΡΤΟΚΑΛΟΧΥΜΟΥ

### 1.1 Ποικιλίες πορτοκαλιών

Τα πορτοκάλια περιλαμβάνουν δύο μεγάλες κατηγορίες: τα πικρά πορτοκάλια και τα γλυκά πορτοκάλια που είναι και τα πιο σημαντικά. Οι ποικιλίες γλυκών πορτοκαλιών μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ευδιάκριτες ομάδες: κοινά πορτοκάλια, πορτοκάλια Navel, σαγκουίνια και πορτοκάλια φτωχά σε οξέα. Τα πορτοκάλια με τη μεγαλύτερη οικονομική σπουδαιότητα είναι τα πορτοκάλια Navel και τα κοινά πορτοκάλια. Σε αυτήν την δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται τα πορτοκάλια των ποικιλιών Hamlin, Pineapple, Valencia και πολλά άλλα.

#### 1.1.1. Κοινά πορτοκάλια

Τα πορτοκάλια αυτής της κατηγορίας συχνά αναφέρονται και ως «λευκά» ή «ξανθά» πορτοκάλια και περιλαμβάνουν τα 2/3 των γλυκών πορτοκαλιών. Χαρακτηρίζονται από μέτριο ως μικρό μέγεθος και έχουν λεπτή φλούδα. Είναι πολύσπερμα και έχουν χονδρές μεμβράνες. Η γεύση τους είναι υπόξινη. Τα πορτοκάλια Valencia είναι τα πλέον γνωστά αυτής της κατηγορίας, τα οποία μάλιστα αποτελούν το 50% της συνολικής παραγωγής πορτοκαλιών των Η.Π.Α.. Η κατηγορία αυτή έχει μακρά καλλιεργητική περίοδο και προσαρμόζεται σε οποιεσδήποτε καιρικές συνθήκες. Οι καρποί δεν πέφτουν εύκολα και αποθηκεύονται πάνω στα δέντρα μέχρι τη συγκομιδή. Επιπλέον, τα δέντρα από τα οποία προέρχονται είναι ανθεκτικά στην παγωνιά ακόμα και σε θερμοκρασίες κάτω των -5°C. Είναι η πλέον κατάλληλη ποικιλία για χυμοποιία, καθώς τα πορτοκάλια της είναι πολύ ζουμερά, έχουν μεγάλη απόδοση σε χυμό και περιέχουν λίγους σπόρους. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν επίσης οι ποικιλίες Hamlin, Parson Brown, Ambersweet, Pineapple



**Εικόνα 1.1: Πορτοκάλια ποικιλίας Valencia**

### **1.1.2 Πορτοκάλια Navel**

Ένα στοιχειώδες δευτερεύον φρούτο στην κορυφή του αρχικού, που μοιάζει με ανθρώπινο ομφαλό, χαρακτηρίζει αυτήν την ποικιλία. Τα πορτοκάλια Navel παράγονται πρωτίστως για φρέσκια κατανάλωση και είναι τα πιο γνωστά εδώδιμα πορτοκάλια στον κόσμο. Αυτό οφείλεται στο ότι είναι λιγότερο ζουμερά, έχουν πλούσια γεύση, δεν έχουν καθόλου κουκούτσια και είναι εύκολα στο ξεφλούδισμα. Όταν χρησιμοποιούνται για παραγωγή χυμού, αναπτύσσεται συχνά μια πικρή γεύση, που οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα σε λιμονίνη, καθιστώντας το χυμό δυσάρεστο εάν δεν καταναλώνεται μέσα σε σύντομο χρόνο. Μερικά από τα είδη της ποικιλίας Navel είναι τα Navelate, Navelina, Washington Navel, Navel lane late, Thompson και New Hall



**Εικόνα 1.2: Πορτοκάλια ποικιλίας Navel**



### 1.1.3. Σαγκουίνια

Τα πορτοκάλια με το χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα, των οποίων ο χυμός θεωρείται από πολλούς ο πιο νόστιμος στον κύκλο των εσπεριδοειδών. Αλλιώς γνωστά και ως αιματόσαρκα, οφείλουν το χρώμα τους σε μια κόκκινη χρωστική ουσία η οποία αποτελεί αποτέλεσμα της παρουσίας ανθοκυανών. Οι ανθοκυάνες έχουν την τάση να χάνουν το χρώμα τους κατά την επεξεργασία του πορτοκαλιού και την αποθήκευση του χυμού δίνοντας έτσι ένα θολό χρώμα στο χυμό, που οργανοληπτικά δεν είναι αρεστό. Όμως η απομάκρυνση των ανθοκυανών θα απομάκρυνε βιταμίνη C και λιμονίνη, κάτι που επίσης δεν είναι επιθυμητό. Σε αυτή την ποικιλία ανήκουν τρεις τύποι πορτοκαλιών Tarocco (μεγάλοι καρποί καλής ποιότητας ,χωρίς σπέρματα), τα Sanguinelli (μέτριο μέγεθος καρπού, γλυκός και εύχυμος με ρόδινες αποχρώσεις, άσπερμος ή ολιγόσπερμος που διατηρείται καλά πάνω στο δένδρο.) και τα Moro (βαθύχρωμη σάρκα).

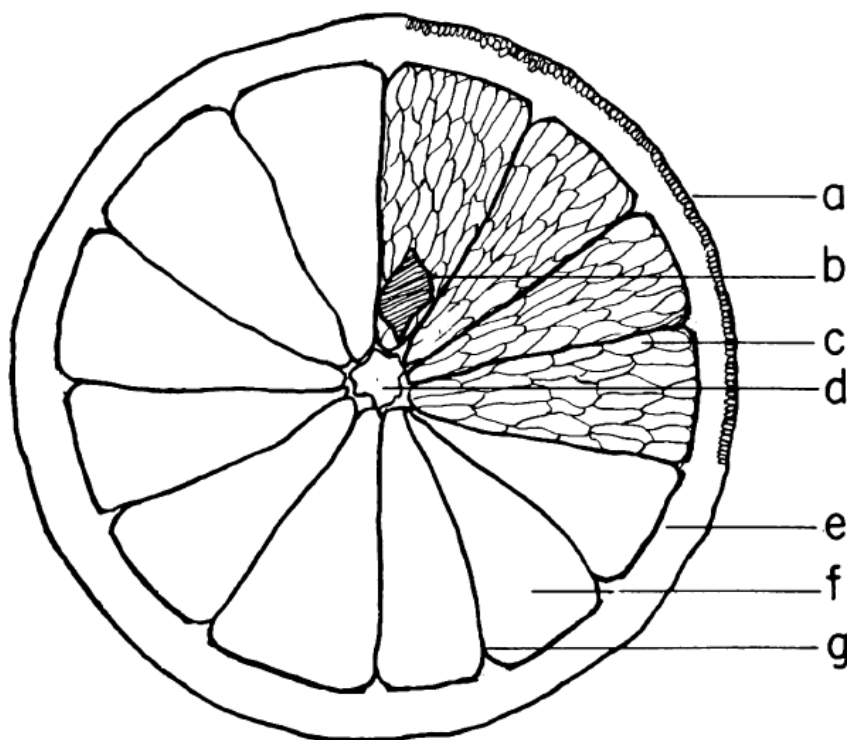


Εικόνα 1.3: Σαγκουίνια

### 1.1.4. Πορτοκάλια φτωγά σε οξέα (Πορτοκάλια ζάχαρη).

Αυτό το είδος πορτοκαλιών χαρακτηρίζεται από τη μικρή έως ανύπαρκτη περιεκτικότητα σε οξέα. Είναι πιο πεπλατυσμένα από τα κοινά πορτοκάλια και έχουν λιγότερη βιταμίνη C. Ο φλοιός αποχωρίζεται δύσκολα, έχουν σχετικά μαλακή σάρκα και είναι πολύσπερμα. Εξαιτίας, της χαμηλής τους οξύτητας, η επεξεργασία τους ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών.

## 1.2 Δομή του πορτοκαλιού



**Εικόνα 1.4:** Σχηματική τομή πορτοκαλιού ( a=ελαιοθύλακες εξωκαρπίου , b= σπόροι , c= θύλακες χυμού , d= κεντρικός πυρήνας, e=μεσοκάρπιο, f=τμήμα ενδοκαρπίου, g=μεμβράνη τμήματος)

Μορφολογικά το πορτοκάλι αποτελείται από δύο διακριτά μέρη: το *περικάρπιο* (φλούδα) και το *ενδοκάρπιο*, το οποίο είναι το εδώδιμο μέρος του. Το περικάρπιο χωρίζεται περαιτέρω στο *εξωκάρπιο* (*flavedo*) και το *μεσοκάρπιο* (*albedo*) (Iglesias et al., 2007). Στο εξωκάρπιο βρίσκονται οι χρωμοπλάστες και οι ελαιοθύλακες. Στους χρωμοπλάστες περιέχονται ευδιάλυτες χρωστικές ουσίες, όπως τα καροτενοειδή, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χρώμα του φρούτου. Οι ελαιοθύλακες περιέχουν έλαια τα οποία προστατεύουν το φρούτο από έντομα και μικροοργανισμούς. Το μεσοκάρπιο βρίσκεται κάτω από το εξωκάρπιο και έχει λευκό χρώμα και σπογγώδη υφή. Σε αυτό υπάρχουν ουσίες, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ποιότητα του χυμού, πολλές φορές και αρνητικά εάν αναμειχθούν με αυτόν. Τέτοιες ουσίες είναι τα φλαβονοειδή, τα λιμονοειδή και η πηκτίνη. Το τμήμα του μεσοκαρπίου αντιπροσωπεύει το 20-60 % του συνολικού φρούτου, ενώ το πάχος του ποικίλει ανάλογα με το είδος του εσπεριδοειδούς και την ποικιλία. Το ενδοκάρπιο

είναι το εσωτερικό τμήμα του πορτοκαλιού και αποτελείται από επιμέρους τμήματα, τα οποία χωρίζονται από μεμβράνες. Μέσα σε αυτά περιέχονται οι θύλακες του χυμού, τα υπόλοιπα οργανίδια του φρούτου, όπως τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας και οι σπόροι.

### **1.3 Χημική σύσταση πορτοκαλιού**

#### ***Υδατάνθρακες***

Οι υδατάνθρακες είναι το κύριο συστατικό των φρούτων και αντιπροσωπεύουν περισσότερο από 90% της ξηρής βάσης τους. Όσον αφορά στους περιεχόμενους στον πορτοκαλοχυμό πολυσακχαρίτες, το 19-28 % των αδιάλυτων σε αλκοόλη στερεών είναι πρωτεϊνικής φύσεως, ενώ στο φλοιό το αντίστοιχο ποσοστό είναι μόνο 5%. Περιέχονται επίσης πηκτινικές ουσίες που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο μεσοκάρπιο. Η παρουσία τους είναι αυτή που καθορίζει την σταθερότητα της παρατηρούμενης στο χυμό θολότητας.

Όσον αφορά στα περιεχόμενα στον πορτοκαλοχυμό σάκχαρα, τα κυριότερα από αυτά είναι η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη, και δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 76% των διαλυτών στερεών.

#### ***Αζωτούχες ενώσεις***

Η συνολική περιεκτικότητα του πορτοκαλιού σε άζωτο κυμαίνεται μεταξύ 0,1 και 0,2% επί της ξηρής βάσης. Ωστόσο, οι αζωτούχες ενώσεις αποτελούν περίπου το 1 τοις εκατό των συστατικών του χυμού και περιλαμβάνουν πρωτεΐνες, απλά πεπτίδια, ελεύθερα αμινοξέα, φωσφατίδια, νιτρικά άλατα κλπ.. Αυτές οι κατηγορίες συστατικών είναι φυσιολογικοί μεταβολίτες των φυτικών ιστών και συμβάλλουν στην θρεπτική αξία των φυτικών προϊόντων. Η περιεκτικότητα των αζωτούχων ενώσεων εξαρτάται από την ποικιλία του πορτοκαλιού, το βαθμό ωρίμανσης και τις συνθήκες καλλιέργειας.

### Οργανικά οξέα

Η οξύτητα του πορτοκαλοχυμού οφείλεται κατά κύριο λόγο στην παρουσία του κιτρικού και του μηλικού οξέος. Το κιτρικό οξύ βρίσκεται στον χυμό σε ποσοστό περίπου 1% και είναι το δεύτερο κύριο συστατικό του χυμού μετά τα σάκχαρα.

**Πίνακας 1.1: Οργανικά οξέα στο πορτοκάλι (πηγή: Sandhu & Minhas 2006),**

Fruit	Juice (g/100 ml)		Peel (meq/g Dry Weight)			
	Malic	Citric	Malic	Citric	Oxalic	Malonic
<i>Orange</i>						
Washington Navel I	0.06	0.56	0.02	0.01	0.11	0.02
Washington Navel II	0.20	0.93	0.02	0.01	0.10	0.03
Valencia	0.16	0.98	0.02	Trace	0.13	0.03
<i>Tangerine</i>						
Dancy I	0.18	1.22	0.06	0.02	0.15	0.01
Dancy II	0.21	0.86	0.09	0.02	0.20	0.02

### Βιταμίνες

Είναι οργανικές ενώσεις απαραίτητες για τη σωστή διατροφή και την υγεία του ανθρώπου. Η κυριότερη βιταμίνη που περιέχεται στο πορτοκάλι είναι το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), το οποίο αποτελεί σημαντική παράμετρο για την αποδοχή του φρούτου από τους καταναλωτές. Πρόκειται όμως για μια πολύ ασταθή βιταμίνη, η περιεκτικότητα της οποίας ποικίλλει ανάλογα με τη διεργασία που έχει υποστεί ο χυμός. Έτσι, έκθεση στο ατμοσφαιρικό οξυγόνο ή θέρμανση του χυμού μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές απώλειες της βιταμίνης C. Τα υψηλά πρότυπα στα οποία λειτουργεί η βιομηχανία, εξασφαλίζουν κανονικά ότι ο επεξεργασμένος φυσικός χυμός περιέχει περίπου 350mg/L βιταμίνης C. Επίσης, το πορτοκάλι περιέχει μικρές, αλλά σημαντικές ποσότητες βιταμινών A και B.

### Ανόργανα συστατικά,

Τα πιο συνήθη ανόργανα στοιχεία που περιέχονται στον πορτοκαλοχυμό είναι το κάλιο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο φώσφορος με το κάλιο (K) να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση και να αποτελεί το 70% αυτών. Τέλος, στοιχεία όπως ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός και το ιώδιο, που περιέχονται στο πορτοκάλι σχετίζονται με ενζυμικά συστήματα που αφορούν το μεταβολισμό του ανθρώπου.

### **Λιπίδια**

Είναι οργανικές ενώσεις διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες. Τα λιπίδια που περιέχονται στο πορτοκάλι είναι κυρίως στεροειδή και αλειφατικά συστατικά. Εκτός από αυτά τα σπορέλαια, τα οποία είναι απλά λιπίδια, υπάρχουν ποσότητες λιπιδίων και σε άλλα μέρη των καρπών. Έτσι, όταν ο χυμός εξάγεται, αυτά τα λιπίδια βρίσκονται σε εναιώρημα και συνδέονται με κυτταρικά θραύσματα. Για το λόγο αυτό η άμεση εκχύλιση των λιπιδίων με διαλύτες είναι ανέφικτη λόγω των ανεπιθύμητων γαλακτωμάτων και τη συλλογής των αιωρούμενων σωματιδίων.

### **Φαινολικές ενώσεις**

Συμβάλουν στο χρώμα και τη γεύση του πορτοκαλιού. Στο πορτοκάλι οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις είναι οι φλαβονόνες. Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι και το κρασί καθώς επίσης και σε όλα τα φυτά. Είναι ενώσεις με φαινολική δομή. Είναι υπεύθυνες για το χρώμα και την γεύση πολλών φρούτων και λαχανικών και συμμετέχουν στο αμυντικό σύστημα των φυτών ενάντια σε παράσιτα, μύκητες και διάφορα έντομα.

Οι διαιτητικές φαινολικές ενώσεις έχουν θεωρηθεί γενικά μη-θρεπτικά συστατικά και τα πιθανά οφέλη που μπορεί να έχουν στην υγεία του ανθρώπου μόλις τώρα έχουν αρχίσει να φαίνονται. Σήμερα, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τις βιολογικές επιδράσεις των φαινολικών ενώσεων καθώς μελέτες έχουν αποδείξει ότι δίαιτες πλούσιες σε φρούτα και λαχανικά φαίνεται να προστατεύουν έναντι καρδιαγγειακών παθήσεων και κάποιων μορφών καρκίνου.

### **Αρωματικές ενώσεις,**

οι οποίες είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό και ευχάριστο άρωμα του πορτοκαλιού και του χυμού του. Οι κυριότερες πτητικές αρωματικές ενώσεις που έχουν βρεθεί στο πορτοκάλι είναι αλδεΐδες, αλκοόλες, εστέρες, κετόνες και τερπένια (*Niesperos et al., 1990*)

## **Ένζυμα**

Γενικά, οι χυμοί των εσπεριδοειδών είναι πλούσιοι σε πηκτινολυτικά ένζυμα που παίζουν σπουδαίο ρόλο στην ποιότητά τους. Για παράδειγμα, ο χυμός πορτοκαλιού περιέχει σε αιώρηση διάφορα στερεά συστατικά, τα οποία, αν ο χυμός αφηθεί σε ηρεμία, μετά από σύντομο χρονικό διάστημα καθιζάνουν αλλοιώνοντας την εμφάνισή του ( μείωση θολότητας-διαχωρισμός του χυμού). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη δράση ενός πηκτινολυτικού ενζύμου, της πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ).

## **1.4 Παραγωγή του χυμού**

### **1.4.1 Συγκομιδή**

Οι κατάλληλης ποιότητας καρποί μπορούν να διαλεχτούν χειρωνακτικά χρησιμοποιώντας μηχανές, ή μηχανικά, ανάλογα με τις διαθέσιμες εγκαταστάσεις. Η χειρωνακτική συγκομιδή προτιμάται στις χώρες όπου είναι διαθέσιμο φθηνό εργατικό δυναμικό και οι εκτάσεις των οπωρώνων είναι σχετικά μικρές. Στις ανεπτυγμένες χώρες εφαρμόζεται η μηχανική συγκομιδή και χρησιμοποιείται μια σειρά από χημικές ουσίες αποκοπής για να διευκολύνουν την αποκόλληση των φρούτων από το δέντρο. Κατά το χειρισμό πρέπει να ληφθεί μέριμνα για την αποφυγή τυχόν τραυματισμού των φρούτων. Οι καρποί συσκευάζονται σε σάκους ή κάδους και μεταφέρονται στο εργοστάσιο επεξεργασίας.

### **1.4.2 Διαλογή**

Ο καρπός πηγαίνει μέσω των γραμμών ελέγχου για την αφαίρεση των τραυματισμένων ή κατεστραμμένων φρούτων. Οι διαλεγμένοι καρποί μεταφέρονται σε δοχεία αποθήκευσης όπου πρέπει να είναι συσσωρευμένη επαρκής ποσότητα για τη συνεχή λειτουργία του εργοστασίου επεξεργασίας. Το εργαστήριο επιλέγει ένα μικρό μέρος των φρούτων στο στάδιο αυτό για τον έλεγχο της οξύτητας, του αριθμού °Brix, και της απόδοσης σε χυμό. Ο έλεγχος αυτός των μεμονωμένων παρτίδων πραγματοποιείται για να αποφασιστεί ποιό κάδοι πρέπει να αναμιγνύονται για την παραγωγή προϊόντος σταθερής ποιότητας.

### 1.4.3 Πλύσιμο

Τα φρούτα από τους κάδους μεταφέρονται σε ένα μηχάνημα πλύσης. Τα φρούτα πρώτα εμποτίζονται γρήγορα σε νερό που περιέχει απορρυπαντικό, καθαρίζονται με περιστρεφόμενες βούρτσες, ξεπλένονται με καθαρό νερό, και επιθεωρούνται ξανά για απομάκρυνση των κατεστραμμένων καρπών. Η απολύμανση είναι απαραίτητη για τον έλεγχο των αλλοιογόνων μικροβίων, τα οποία μπορεί να μολύνουν τον εξοπλισμό μεταφοράς και τούς αποχυμωτές, και να επηρεάσουν την ποιότητα χυμού. Σε όλα τα στάδια της επεξεργασίας πρέπει να εφαρμόζονται οι απαιτήσεις υγιεινής των φυτών εσπεριδοειδών(Winniczuk, 1994). Ένα σχέδιο HACCP πρέπει να ακολουθείται για την πλήρη απολύμανση των φρούτων κατά τη διάρκεια της πλύσης(Schmidt et al.,1997).

### 1.4.4 Εξαγωγή του χυμού

Η ανάπτυξη αυτόματων αποχυμωτών πορτοκαλιού ήταν μια σημαντική εξέλιξη στην πορεία της βιομηχανίας χυμών φρούτων. Ο αποχυμωτής και ο finisher είναι πολύ σημαντικοί για τη φύση, την απόδοση, την ποιότητα, και τα χαρακτηριστικά του χυμού πορτοκαλιού και μπορούν να προσαρμοστούν για τον έλεγχο του ποσοστού της πούλπας και του ελαίου στα τελικά προϊόντα. Η τελική διαδικασία αφαιρεί την περίσσεια της πούλπας, τα κομμάτια του φλοιού και τους σπόρους. Η απόδοση είναι σημαντική τόσο για τον καλλιεργητή που θέλει την υψηλότερη απόδοση των καρπών του, όσο και για τον επεξεργαστή ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ποιότητα του τελικού προϊόντος.

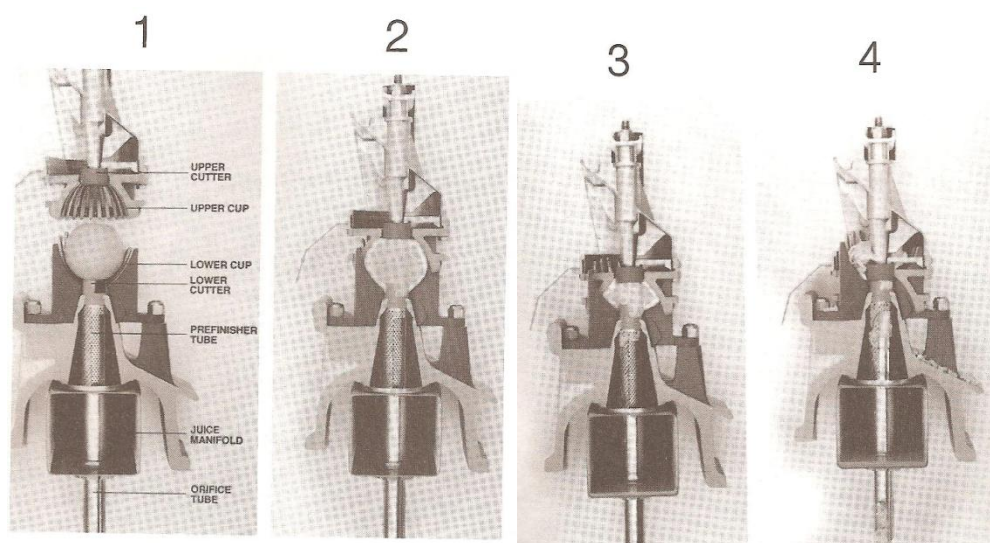
Υπάρχουν 2 κύριοι τύποι εκχυμωτών:

#### 1) FMC Citrus Juice Extractor

Αυτή η γραμμή μηχανημάτων είναι η πιο κοινή σε όλον τον κόσμο. Ο FMC εκχυμωτής είναι εξοπλισμένος με ένα τροφοδοτικό, που παρέχει φρούτα στις κεφαλές του εκχυμωτή. Μηχανήματα με 8 κεφαλές χρησιμοποιούνται για μικρά φρούτα, όπως είναι τα λεμόνια, λάιμς και μανταρίνια, ενώ για μεγαλύτερα φρούτα, όπως πορτοκάλια και γκρέιπφρουτ χρησιμοποιούνται μηχανήματα με 3 κεφαλές. Οι εκχυμωτές παρατάσσονται κατά μήκος ενός ιμάντα τροφοδοσίας. Ο μέγιστος αριθμός

παραταγμένων μηχανημάτων είναι 8-10. Ένας FMC εκχυμοτής με 5 κεφαλές, μπορεί να χειριστεί 450 φρούτα το λεπτό.

Το βασικό χαρακτηριστικό αυτής της γραμμής είναι η εξαγωγή του χυμού από ολόκληρο τον καρπό, χωρίς προηγουμένως να κοπεί στη μέση. Όταν το φρούτο εκχυμώνεται, χωρίζεται αμέσως σε 4 σειρές: Εκτός από το χυμό, προκύπτουν ο φλοιός και το κεντρικό τμήμα που περιέχει τα υπολείμματα, τη σάρκα και τους σπόρους και το ελαιώδες γαλάκτωμα. Το φρούτο τοποθετείται ανάμεσα σε 2 θήκες φτιαγμένες από μεταλλικές λωρίδες. Στο κάτω μέρος της κατώτερης θήκης υπάρχει ένας σωληνοειδής κόφτης. Κατά τη λειτουργία, η πάνω θήκη κατεβαίνει προς το φρούτο και, καθώς κλείνει, ο κόφτης δημιουργεί μια τρύπα στο κάτω μέρος του πορτοκαλιού. Το πάνω μέρος συνεχίζει να κατεβαίνει, οπότε ο χυμός πιέζεται εσωτερικά, κάτι που προκαλεί την εξαγωγή του χυμού και ενός ποσοστού σάρκας. Επίσης, καθώς τα δύο μισά της κεφαλής του μηχανήματος έρχονται σε επαφή, τα κύτταρα της επιδερμίδας, που φέρουν έλαια, συνθλίβονται και προκαλείται εξαγωγή του ελαίου από αυτά. Στη συνέχεια, με ψέκασμα με νερό, το γαλάκτωμα ελαίου-νερού διαφεύγει προς διαφορετική κατεύθυνση. Ταυτόχρονα, οι φλούδες του φρούτου διοχετεύονται προς διαφορετική κατεύθυνση, με προορισμό την παραγωγή πηκτικής ή ζωοτροφές.

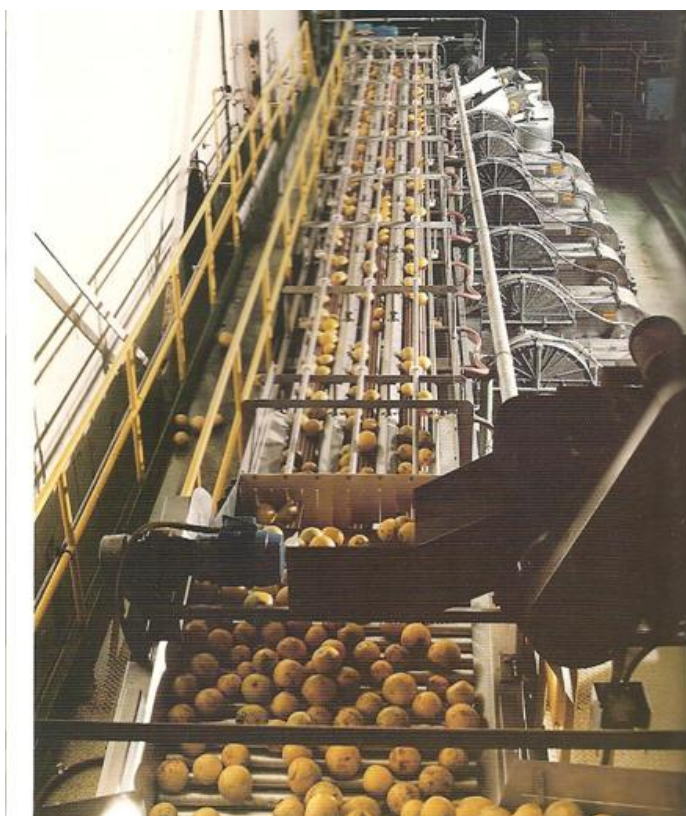


**Εικόνα 1.5:** Σχηματική αναπαράσταση και τρόπος λειτουργίας ενός FMC εξαγωγέα χυμού.



## 2) Brown Citrus Juice Extractors

Αυτό το μηχάνημα λειτουργεί κόβοντας τα φρούτα στη μέση και, με περιστροφή των ημίσεων, περιορίζει το χώρο τους, κάτι που προκαλεί την εξαγωγή του χυμού, στην προσπάθειά τους να χωρέσουν. Κατά την εκχύμωση, απομακρύνονται ο φλοιός, οι μεμβράνες και οι σπόροι, καθώς και τα αιθέρια έλαια του φλοιού (cold-pressed oil). Με τους εξαγωγείς Brown, είναι σύνηθες να βρεθούν υπολείμματα φλούδας στο χυμό πριν από την τελική επεξεργασία, ενώ ο χυμός έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να έρθει σε επαφή με το εξωτερικό τμήμα του φρούτου από ότι με τους FMC εξαγωγείς. Ένα ακόμη μειονέκτημα των εξαγωγέων Brown είναι το γεγονός ότι, ο χυμός έρχεται σε επαφή με τις κύστες που περιέχουν το χυμό για μεγάλο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα να μεταφέρονται στο χυμό τα πικρά συστατικά του και ο χυμός που παραλαμβάνεται από τον τύπο αυτό εξαγωγέων να είναι πιο πικρός.



**Εικόνα 1.6: Γραμμή εκχυμωτών Brown**

### 1.4.5 Ανάμειξη

Οι επεξεργαστές γνωρίζουν διακυμάνσεις στο χρώμα του χυμού από διαφορετικές ποικιλίες και διαφορετικές εποχές των φρούτων. Το χρώμα του χυμού που λαμβάνεται από τη συγκομιδή των καρπών στις αρχές της σεζόν είναι φτωχό. Το χρώμα του χυμού της πρώιμης εποχής μπορεί να βελτιωθεί αναμειγνύοντας τα με πορτοκάλια πλούσια σε χρώμα. Δίδεται ιδιαίτερη προσοχή στην ανάμειξη διαφορετικών παρτίδων για να επιτευχθεί ισορροπία σε στερεά, οξύτητα, χρώμα και γεύση. Μετά την ολοκλήρωση, ο χυμός ρέει σε μεγάλες δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα, όπου ελέγχεται για την οξύτητα και τα διαλυτά στερεά. Σε αυτό το σημείο μπορεί να προστεθεί και ζάχαρη αν χρειάζεται αύξηση της γλυκύτητας. (Hyounng & Coates, 2003).

### 1.4.6. Αποελαίωση και απαέρωση

Παλαιότερα, η ποσότητα του λαδιού σε χυμούς ελεγχόταν μόνο με την προσαρμογή των ρυθμίσεων του αποχυμωτή ή με επιλογή του τύπου του αποχυμωτή. Η περιεκτικότητα σε έλαιο θα μπορούσε να ελεγχθεί μαλακώνοντας τη φλούδα με εμβάπτιση των φρούτων για 1-2 λεπτά σε ζεστό νερό, αλλά το λάδι στο χυμό ποικίλει από παρτίδα σε παρτίδα και ο έλεγχος καθίσταται δύσκολος. Έχουν λοιπόν αναπτυχθεί αποελαιωτές για τον έλεγχο των επιπέδων σε έλαιο στους χυμούς εσπεριδοειδών. Επί του παρόντος, η αποελαίωση σε εμπορικό επίπεδο γίνεται με τη χρήση μικρών εξατμιστήρων κενού όπου ο χυμός θερμαίνεται σε περίπου 51.4°C και περίπου 3-6% του χυμού εξατμίζεται. Μετά οι ατμοί συμπυκνώνονται και το έλαιο διαχωρίζεται με φυγοκέντρωση ή απόχυση, και η υδατική στοιβάδα επιστρέφεται στον χυμό. Με την επεξεργασία αυτή, περίπου το 75 % του πτητικού ελαιίου του φλοιού μπορεί να αφαιρεθεί. Για τους περισσότερους εμπορικούς χυμούς πορτοκαλιού που παράγονται στις Ηνωμένες Πολιτείες, το περιεχόμενο έλαιο διατηρείται σε ποσοστό 0,015 - 0,025 vol %.

Οι χυμοί στη συνέχεια απαερώνονται, επειδή το διαλυμένο οξυγόνο μειώνει τα επίπεδα της βιταμίνης C και προκαλεί αλλοίωση της γεύσης. Η σημερινή τάση είναι τα επίπεδα του οξυγόνου να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα σε όλους τους μεταποιημένους χυμούς εσπεριδοειδών. Το διαλυμένο οξυγόνο εξαφανίζεται ταχέως σε κονσέρβοποιημένους χυμούς, ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες. Ένα σαφές

όφελος από την εξαέρωση είναι η μείωση της δημιουργίας αφρού στο δοχείο πλήρωσης. Οι αποελαιωτές κενού ταυτόχρονα απαερώνουν το χυμό και ως εκ τούτου σύγχρονες βιομηχανίες χυμού δεν έχουν ξεχωριστό απαερωτή.

#### 1.4.7 Παστερίωση

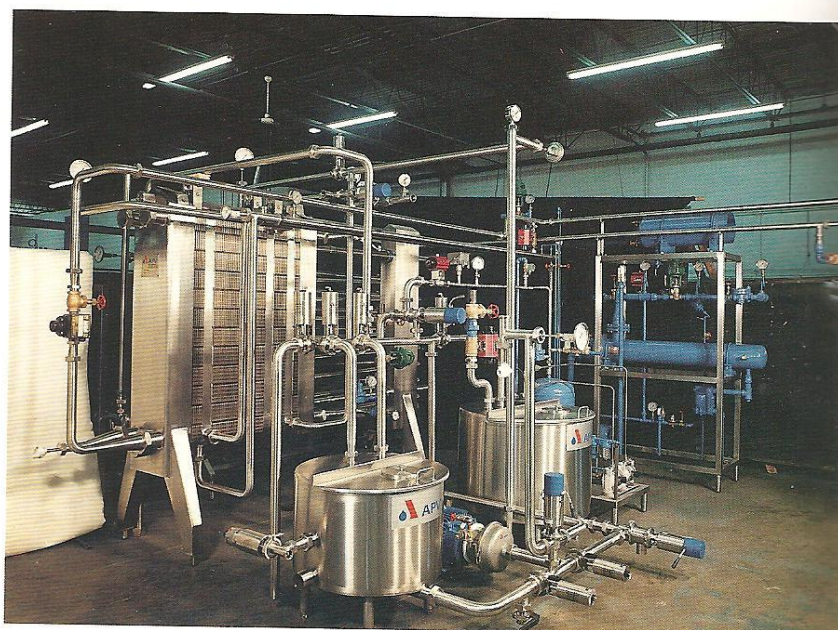
Ο χυμός των εσπεριδοειδών μπορεί να υποστεί ποιοτική υποβάθμιση σε θερμοκρασία δωματίου, λόγω μικροβιολογικών, ενζυματικών και χημικών αντιδράσεων. Προβλήματα απαστερίωτων χυμών είναι η απώλεια θολερότητας και ο διαχωρισμός του χυμού, η ζελατινοποίηση του συμπυκνώματος και η μικροβιακή ζύμωση και αλλοίωση. Τα προβλήματα αυτά προλαμβάνονται συνήθως με θερμική παστερίωση.

Η παστερίωση των φρέσκων, νωπών χυμών πορτοκαλιού απαιτεί την απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης (ΠΜΕ). Για την επίτευξη εμπορικής σταθερότητας, είναι ικανοποιητικός ο συνδυασμός 90°C για 1 min. Οι τυπικές θερμικές επεξεργασίες είναι 95-90° C για 60-15sec. Γίνεται με εναλλάκτες θερμότητας, που μπορούν να χειριστούν τόσο τη σάρκα, όσο και το χυμό.

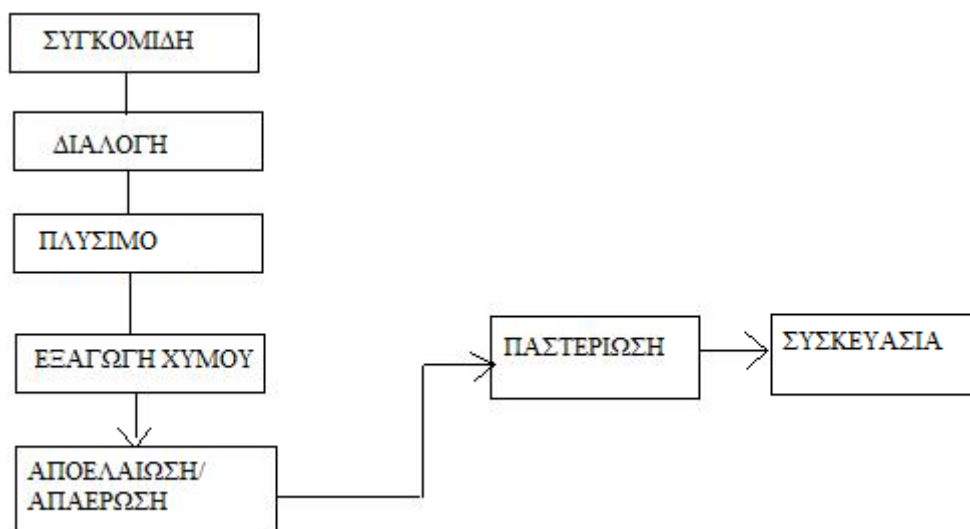
Οι τιμές pH του εμπορικού χυμού πορτοκαλιού είναι 2,6 - 4,4. Με pH χαμηλότερο από 4,5 χαρακτηρίζονται τα όξινα τρόφιμα, στα οποία δεν υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Μικροοργανισμοί που μπορούν να αναπτυχθούν στο χυμό πορτοκαλιού είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες και μύκητες, ανάλογα με το περιβάλλον. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση και απόκλιση της γεύσης. Τα κυριότερα αλλοιογόνα γένη είναι είναι τα *Leuconostoc* και *Lactobacillus*, τα οποία προκαλούν το σχηματισμό μιας ανεπιθύμητης βουτυρώδους γεύσης, λόγω της παραγωγής διακετυλίου σαν τελικό μεταβολικό προϊόν. Πρόσφατα, βακτήρια του γένους *Alicyclobacillus* έχουν βρεθεί σε φρέσκο παστεριωμένο χυμό πορτοκαλιού. Πρόκειται για μη παθογόνα βακτήρια τα οποία προκαλούν μια έντονη μυρωδιά, μια χημική γεύση και άσπρο ίζημα. Ζύμες του γένους *Saccharomyces* και *Candida* είναι οι πιο κοινές, σε αλλοιωμένα προϊόντα εσπεριδοειδών. Η θερμική αντοχή των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ζυμών, όμως, είναι χαμηλότερη από αυτή της πηκτινεστεράσης. Έτσι, η παστερίωση με θέρμανση για την αδρανοποίηση των ενζύμων είναι επαρκής και για τη μικροβιακή αδρανοποίηση. Ο κατάλληλος έλεγχος της θερμοκρασίας και η

διατήρηση των συνθηκών υγιεινής είναι αναγκαίοι παράγοντες στις εγκαταστάσεις και στον εξοπλισμό του εργοστασίου.

Οι πορτοκαλοχυμοί όμως είναι ευαίσθητοι στη θέρμανση. Η περιεκτικότητά τους σε βιταμίνες και το εύθραυστο φρέσκο άρωμά τους και η γεύση τους μπορεί να χαθούν ή να υποστούν ζημιά κατά την έκθεσή τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Έτσι, συνήθως παστεριώνονται όσο πιο γρήγορα γίνεται. Το pH παίζει επίσης σημαντικό ρόλο για την παστερίωση. Στην πράξη, ο χυμός παστεριώνεται ταχύτατα στους 92-95° C (η ακριβής θερμοκρασία εξαρτάται από τον τύπο του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για 15-60 sec.



**Εικόνα 1.7: Εγκατάσταση παστερίωσης με εναλλάκτες θερμότητας.**



Εικόνα 1.8 : Διάγραμμα ροής παραγωγής χυμού.

## 1.5 Τύποι πορτοκαλοχυμών

Φυσικός χυμός μη συμπυκνωμένος (NFC, Not From Concentrate): είναι οι χυμοί που προέρχονται από την εκχύμωση του πορτοκαλιού και υποβάλλονται σε διήθηση, απαέρωση και παστερίωση.

Συμπυκνωμένος φυσικός χυμός: είναι προϊόντα συμπύκνωσης των έτοιμων φυσικών χυμών. Η συμπύκνωση πραγματοποιείται σε χαμηλή πίεση και ήπια θερμοκρασία (45oC). Είναι οι χυμοί που κατά κόρον χρησιμοποιούνται από τις βιομηχανίες παραγωγής χυμών για έτοιμα προϊόντα με αναδιάλυση των συμπυκνωμάτων σε νερό.

Χυμοί πλήρους σύνθλιψης: είναι οι πολτοί που προέρχονται από τη χρησιμοποίηση ολόκληρου του καρπού και θερμαίνονται σε ειδικούς κλιβάνους.

Σακχαρούχος φυσικός χυμός: είναι ο έτοιμος φυσικός χυμός στον οποίο έχει προστεθεί ζάχαρη.

Συμπυκνωμένος σακχαρούχος χυμός: είναι ο συμπυκνωμένος φυσικός χυμός στον οποίο έχει προστεθεί ζάχαρη.

## 1.6 Πικρή γεύση στο χυμό

Η εμφάνιση πικρής γεύσης στον πορτοκαλοχυμό, αλλά και όλους τους χυμούς εσπεριδοειδών είναι κοινό πρόβλημα, γι' αυτό και δε χρησιμοποιούνται όλες οι ποικιλίες για χυμοποιία. Περίπου το 10-20% των navel πορτοκαλιών που συγκομίζονται συγκεκριμένη χρονική περίοδο, δε χρησιμοποιούνται άμεσα αλλά παράγουν χυμό ο οποίος είναι πικρός και απαιτεί επεξεργασία ή ανάμιξη με άλλον, πιο γλυκό χυμό. Η πικρή γεύση του πορτοκαλοχυμού προκύπτει από ένα τριτερπένιο που ονομάζεται λιμονίνη. Παράγεται από το λιμονικό οξύ, που βρίσκεται στους σπόρους και τις μεμβράνες των περισσότερων εσπεριδοειδών. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας της λιμονίνης, η θέρμανση ή η παρατεταμένη αποθήκευση αυξάνει τη συγκέντρωσή της στο χυμό. Συγκέντρωση 2 ppm λιμονίνης δίνει πικρή γεύση στο χυμό. (Kefford, 1959)

### 1.6.1 Λιμονοειδή

Η πρόδρομη ουσία της λιμονίνης στα εσπεριδοειδή είναι η λιμονική μονολακτόνη (λιμονικό οξύ), η οποία δεν είναι πικρή και, με όξινη κατάλυση δίνει το λιμονένιο. Το οξύ είναι σταθερό στους ιστούς του φρούτου, που δεν είναι πικροί, διότι δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το όξινο περιβάλλον. Η ουσία αυτή μετατρέπεται αργά σε λιμονίνη, όταν οι ιστοί του φρούτου έρχονται σε επαφή με το οξύ του χυμού, κατά την εκχύμωση. Η περιεκτικότητα σε λιμονίνη των ποικιλιών Valencia είναι 2-3 ppm μετά την εκχύμωση και 11-12 ppm μετά την παστερίωση, αλλά ελάχιστα μεταβάλλεται κατά την αποθήκευση. (Tariq et al., 1974) Στα πορτοκάλια navel η περιεκτικότητα ποικίλλει από 15,37 έως 25,02 ppm. (Navarro et al., 1983)

### 1.6.2 Φλαβονοειδή

Τα κύρια φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών είναι οι ανθοκυάνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι φλαβανόνες. Συγκεκριμένα φλαβονοειδή, όπως είναι η εσπεριδίνη, χρησιμοποιούνται για ανίχνευση νοθείας του πορτοκαλοχυμού με χυμούς άλλων εσπεριδοειδών. Στα πικρά πορτοκάλια, στη θέση της εσπεριδίνης, βρίσκεται η πικρή ουσία ναρινγίνη.

Η ναρινγίνη και η νεοεσπεριδίνη είναι φλαβονοειδή που εντοπίζονται μόνο σε ορισμένα είδη εσπεριδοειδών (πικρά πορτοκάλια, grapefruit, λεμόνι). Τα γλυκά πορτοκάλια δεν περιέχουν αυτές τις ουσίες και η παρουσία τους στον πορτοκαλοχυμό υποδεικνύει νοθεία με χυμούς άλλων εσπεριδοειδών, όπως είναι το grapefruit. Η παρουσία του χυμού grapefruit στον πορτοκαλοχυμό γίνεται αντιληπτή με την ύπαρξη 10 ppm ναρινγίνης και 2 ppm νεοεσπεριδίνης. (Widmer, 2000)

### 1.6.3 Διαδικασίες αποπίκρασης

Έχουν γίνει προσπάθειες μείωσης της συγκέντρωσης πικρών ουσιών κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση του πορτοκαλιού, μέσω χημικών spray, αγρονομικών πρακτικών και μετασυλλεκτικής μεταχείρισης των φρούτων. Πολλές τεχνολογίες αποπίκρασης βασίζονται σε χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές διεργασίες:

Μεταχείριση δένδρων: Η μεταχείριση των πορτοκαλιών Washington Navel μετά την άνθιση με 200 ή 300 ppm 2-τριαιθυλαμίνης, έχει αναφερθεί ότι μειώνει τη συγκέντρωση της λιμονίνης στον πορτοκαλοχυμό, στην αρχή της ωριμότητας, ταυτόχρονα εμφανίζοντας μια αμελητέα μείωση στα διαλυτά στερεά και στην οξύτητα.

Μικροβιακή αποπίκραση: Έρευνες έχουν δείξει ότι χρήση 200 units λιμονικής δεϋδρογενάσης του βακτηρίου *Pseudomonas sp.* σε χυμό πορτοκαλιών navel μειώνει τη συγκέντρωση της λιμονίνης, από 21 σε 3 ppm. Ακόμα, κάπως μικρότερες μειώσεις έχουν σημειωθεί με δράση του ενζύμου από το μικρόβιο *Arthrobacter globiformis*. Η ναρινγινάση που παράγεται από τη ζύμωση σόγιας από το βακτήριο *Aspergillus niger* ZG86 (2%) στους 32° C για 4 ημέρες μειώνει τα επίπεδα πικρής γεύσης σε χυμούς εσπεριδοειδών που περιέχουν ναρινγίνη.

Προσρόφηση σε ρητίνες: Είναι μία τεχνική αποπίκρασης, αφαιρώντας τη λιμονίνη, χρησιμοποιώντας μία εκλεκτική διαδικασία προσρόφησης. Εστέρες κυτταρίνης στη μορφή gel σφαιριδίων (gel beads) με 2-4 mm διάμετρο, επιλεκτικά αφαιρούν τη λιμονίνη, χωρίς ιδιαίτερη επίδραση των ουσιών γεύσεως και χρώματος ή την περιεκτικότητα σε ασκορβικό οξύ. Με υπερδιήθηση διαχωρίζεται η σάρκα από το χυμό και ο χυμός ρέει μέσα από μια στήλη αποπίκρασης, που περιέχει ένα ουδέτερο ρητινώδες πολυμερές. Ο αποπικραμένος χυμός και η σάρκα, στη συνέχεια, ξαναενώνονται. Θα έπρεπε να παστεριώνεται για άριστα αποτελέσματα, αλλά μπορεί

επίσης και να μην παστεριωθεί. Περίπου 10 μέρη όγκου του χυμού πρέπει να περάσουν μέσα από τη στήλη, για να επιτευχθεί απομάκρυνση 40-60% του λιμονενίου. Στη συνέχεια η στήλη χρειάζεται επανενεργοποίηση.

## 1.7 Παραπροϊόντα και χρήση τους

Τμήματα του ενδοκαρπίου: Το προϊόν αυτό είναι αποφλοιωμένα φρούτα, κομμένα σε τμήματα. Έχει μειωθεί πολύ η παραγωγή του. Τα προϊόντα αυτά είναι διαθέσιμα ως κονσερβοποιημένα και παστεριωμένα, για αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου ή ως κονσερβοποιημένα κατεψυγμένα, για χρήση σε φρουτοσαλάτες.

Πηκτίνη: Πολλά από τα μέρη των εσπεριδοειδών, όπως το flavedo, το albedo, οι μεμβράνες, οι ασκοί του χυμού και ο πυρήνας περιέχουν διάφορες ποσότητες πηκτίνης. Μετά την εκχύμωση, περίπου το 50% του φρούτου παραμένει ως φλοιός και πολτός. Ο φλοιός των φρούτων είναι το κύριο νωπό υλικό για παραγωγή πηκτίνης εσπεριδοειδών. Η μέγιστη ποσότητα πηκτίνης που μπορεί να αποκτηθεί σε άριστες συνθήκες είναι περίπου 150-250 από φλοιό πορτοκαλιών, που είναι πολύ χαμηλότερο σε σχέση με την ποσότητα από τα grapefruits και τα λεμόνια.

Τα πηκτινικά ένζυμα του φλοιού πρέπει να απενεργοποιηθούν, για να αποφευχθεί η αποσύνθεση της πηκτίνης, κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση. Ο φλοιός περνά από πολλά στάδια, που συμπεριλαμβάνονται η απομάκρυνση των ελαίων του φλοιού, τεμαχισμό του φλοιού για διευκόλυνση του πλυσίματος, περιέλιξη του φλοιού για να αφαιρεθούν οι σπόροι και έκπλυση του φλοιού με νερό, ώστε να απομακρυνθούν τα διαλυτά σάκχαρα και άλλα ανεπιθύμητα υλικά. Εάν ο φλοιός δε χρησιμοποιηθεί άμεσα για εξαγωγή πηκτίνης, πρέπει να θερμανθεί σε 95-98° C για 10 λεπτά, ώστε να αδρανοποιηθούν τα πηκτινολυτικά ένζυμα. Οι συνθήκες εξαγωγής, όπως είναι το pH, ο χρόνος και η θερμοκρασία, πρέπει να ελέγχονται προσεκτικά, για να έχουμε μέγιστες αποδόσεις στην παραγωγή πηκτίνης. Οργανικά και ανόργανα οξέα χρησιμοποιούνται για υδρόλυση της πρωτοπηκτίνης σε διαλυτή πηκτίνη.

Μετά το διαχωρισμό της πηκτίνης, γίνονται διαδοχικές πλύσεις σε 50-70% διαλύτη και η τελική αφυδάτωση γίνεται σε 80-90% διαλύτη. Τελικά, η πηκτίνη ξηραίνεται σε 6-10% υγρασία, με θερμό αέρα ή σε θερμαινόμενα τύμπανα.



Εσπεριδίνη: Η εσπεριδίνη μπορεί να ανακτηθεί από τα απόνερα της επεξεργασίας του πορτοκαλοχυμού, συγκεντρώνοντας τα διαλυμένα εκχυλίσματα σε ρητίνες. Το θολό νωπό υλικό που ρέει από τη φυγόκεντρο κατά την ανάκτηση των αιθέριων ελαίων, περιέχει σημαντική ποσότητα εσπεριδίνης (περίπου 1g/l), που προέρχεται κυρίως από τα στερεά σωματίδια. Στα απόνερα εφαρμόζεται υδροξείδιο του ασβεστίου μέχρι αποκτήσεως pH 12, ώστε να διαλυτοποιηθεί η εσπεριδίνη πριν να διηθηθεί, να ουδετεροποιηθεί σε pH 6 και να φορτωθεί σε στήλη με ρητίνες, μέχρι το σημείο κορεσμού.

Αντιστροφή της διαδικασίας προσρόφησης με 10% υδατικά διαλύματα αιθανόλης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaOH γίνεται για να ενισχυθούν οι υψηλές συγκεντρώσεις της εσπεριδίνης, ώστε να έχουμε υψηλές αποδόσεις και υψηλή καθαρότητα.

Αιθέρια έλαια του φλοιού: Τα έλαια του φλοιού εξάγονται από εκκριτικούς αδένες που εντοπίζονται στο εξωτερικό μεσοκάρπιο ή flavedo του φρούτου. Τα κύτταρα που φέρουν τα έλαια σπάνε με πίεση ή με τριβή και το έλαιο ξεπλένεται σαν ένα γαλάκτωμα. Τα έλαια ανακτώνται, υπόκεινται σε επεξεργασία, όπως αναφέρθηκε και χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, σε αναψυκτικά, φαρμακευτικά προϊόντα, αρώματα και βιομηχανίες σαπουνιών. Το αιθέριο έλαιο του μανταρινιού, που εξάγεται από το φλοιό χρησιμοποιείται επίσης σαν γευστική ουσία σε αριθμό τροφίμων και αναψυκτικών. Το αιθέριο έλαιο των πράσινων ή των ώριμων πικρών πορτοκαλιών θεωρούνται πολύ υψηλής ποιότητας.

Αρώματα: Πτητικά συστατικά ανακτώνται κατά τη συμπύκνωση με εξάτμιση, με απόσταξη και υγροποίηση. Περιέχουν τόσο τα έλαια, όσο και τις υδατικές τους φάσεις. Το αιθέριο έλαιο επιπλέει στην κορυφή και η υδατική φάση μεταγγίζεται σε ένα βαρέλι. Περιέχει γεύση και άρωμα, που μπορούν να προστεθούν ως ενίσχυση στο συμπύκνωμα του χυμού. Τα αιθέρια έλαια έχουν αρωμα και γεύση χαρακτηριστικά του φρέσκου χυμού και είναι διαφορετικά από τα έλαια του φλοιού.

Ξηρές ζωοτροφές: Η ξηρή σάρκα των εσπεριδοειδών φτιάχνεται από τις φλούδες, τη σάρκα και τους σπόρους που απομακρύνθηκαν κατά την εκχύμωση και που ξηράνθηκαν, μέχρι να αποκτήσουν υγρασία 8-10%. Χρησιμοποιούνται σαν εναλλακτική τροφή ή σαν συμπληρωματική προς το καλαμπόκι, σαν πηγή

συμπυκνωμένων θρεπτικών συστατικών για γαλακτοπαραγωγή ζώα και βοοειδή, καθώς και για πρόβατα.

## 1.8 Μικροβιολογία πορτοκαλοχυμού

Οι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται στα προϊόντα των εσπεριδοειδών είναι γενικά μη παθογόνοι. Οι τιμές του pH του πορτοκαλοχυμού κυμαίνονται από 2,6 έως 4,4, έτσι λόγω του όξινου περιβάλλοντος του χυμού δεν υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Παρ' όλα αυτά, ζύμες, μύκητες, γαλακτικά και οξικά βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν στο χυμό, προκαλώντας την αλλοίωση του με τον σχηματισμό ενώσεων με δυσάρεστη γεύση.

Όσον αφορά τις ζύμες, οι πιο κοινές για την αλλοίωση του πορτοκαλοχυμού είναι διάφορα είδη του γένους *Saccharomyces* με την πιο προεξέχουσα να είναι ίσως η ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* καθώς και διάφορα είδη του γένους *Candida* και *Rhodotoroula*.

Τα κυριότερα αλλοιογόνα γένη γαλακτικών βακτηρίων είναι τα *Leuconostoc* και *Lactobacillus*, τα οποία προκαλούν το σχηματισμό μιας ανεπιθύμητης βουτυρώδους γεύσης, λόγω της παραγωγής διακετυλίου σαν μεταβολικό τελικό προϊόν. Πρόσφατα, βακτήρια του γένους *Alicyclobacillus* έχουν βρεθεί σε φρέσκο παστεριωμένο χυμό πορτοκαλιού. Πρόκειται για μη παθογόνα βακτήρια τα οποία προκαλούν μια έντονη μυρωδιά, μια χημική γεύση και άσπρο ίζημα.

Οι μύκητες είναι γενικά πιο ευαίσθητοι στις συνθήκες θερμοκρασίας και το pH του χυμού και η παρουσία τους στο χυμό οφείλεται κυρίως σε επιμόλυνση μετά την παστερίωση. Αναπτύσσονται στην επιφάνεια χαρτονένιων κουτιών των εμπορικών χυμών ειδικότερα όταν ο χώρος πάνω από το χυμό περιέχει αρκετή ποσότητα οξυγόνου που ευνοεί την ανάπτυξή τους.

## 2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ – ΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

### 2.1 Γενικές αρχές

Τα τρόφιμα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας μόλυνσέως και ρυπάνσεώς τους, είναι πάντοτε φορείς μικροοργανισμών. Τα μικρόβια αυτά συμμετέχουν στις φυσικοχημικές και βιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στα τρόφιμα. Αυτό αποτελεί και το αντικείμενο της επιστήμης της μικροβιολογίας των τροφίμων.

Ο όρος "μικρόβιο" ή "μικροοργανισμός" είναι όρος της τεχνολογίας και αφορά ένα σύνολο εμβίων όντων από διάφορες ταξινομικές ομάδες με ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Οι μικροοργανισμοί είναι αόρατοι με γυμνό οφθαλμό, με μικροσκοπικές διαστάσεις μεγαλύτερες από τη διακριτική ικανότητα του μικροσκοπίου (0.16 μ). Γενικά, πρόκειται για μονοκύτταρους οργανισμούς ή κοινοκυτταρικούς χωρίς εγκάρσια τοιχώματα ή και πολυκυτταρικούς χωρίς όμως διαφοροποίηση των κυττάρων για σχηματισμό οργάνων ή ιστών.

Σύμφωνα με τον Haeckel, οι μικροοργανισμοί κατατάσσονται στα **πρώτιστα**, τα οποία διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα **ευκαρυωτικά** (φύκη, πρωτόζωα, μύκητες, μυξομύκητες) και τα **προκαρυωτικά** (βακτήρια, κυανοπράσινα φύκη, μυκοπλάσματα).

Ανάλογα με την πηγή άνθρακα, αζώτου και ενέργειας, τα μικρόβια διαιρούνται σε τέσσερις ομάδες:

α) τα φωτοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα το CO<sub>2</sub>,

β) τα φωτοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας την ηλιακή ακτινοβολία και ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις,

γ) τα χημειοαυτότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν το CO<sub>2</sub> ως μοναδική πηγή άνθρακα και αντλούν ενέργεια από τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις ανοργάνων ουσιών, και

δ) τα χημειοετερότροφα, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ουσίες και αντλούν ενέργεια από οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις οργανικών πάντα ουσιών.

Τα μικρόβια της τελευταίας ομάδας, τα χημειοτερότροφα, είναι αυτά που ενδιαφέρουν κυρίως τη μικροβιολογία τροφίμων και διαιρούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη σχέση τους προς το υπόστρωμα ή τον ξενιστή πάνω στον οποίο αναπτύσσονται. Έτσι, διακρίνονται σε:

α) **παθογόνα μικρόβια**, τα οποία αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς και δημιουργούν με την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους παθολογικές καταστάσεις. Στην περίπτωση μας ενδιαφέρον παρουσιάζουν μόνο όσα μικρόβια μεταφέρονται με τα τρόφιμα και το πόσιμο νερό, φθάνουν ως τον άνθρωπο και τα ανώτερα ζώα, τον μολύνουν και δημιουργούν παθολογικές καταστάσεις.

β) **παράσιτα μικρόβια**, που αναπτύσσονται πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς χωρίς να δημιουργούν νοσηρές ή παθολογικές καταστάσεις, τουλάχιστον υπό ομαλές συνθήκες. Αν όμως μειωθεί η αντοχή του οργανισμού (π.χ. λοιμώξεις), τότε εξελίσσονται σε ισχυρά παθογόνα και προξενούν σοβαρές παθολογικές καταστάσεις.

γ) **σαπρόφυτα μικρόβια**, που αναπτύσσονται πάνω σε νεκρή οργανική ουσία (όπως είναι πολλά τρόφιμα) και όχι πάνω σε ζωντανούς οργανισμούς. Αναπτυσσόμενα όμως πάνω στα τρόφιμα προξενούν αλλοιώσεις, οπότε είναι ανεπιθύμητα, ή διασπάσεις προς ενδιάμεσα προϊόντα που είναι πολύτιμα για τον άνθρωπο, οπότε είναι ωφέλιμα.

Στο ταξινομικό σύστημα των μικροβίων αναγνωρίζονται οι ακόλουθες ταξινομικές κατηγορίες: **τάξη, γένος (genus), είδος (species), στέλεχος (strain)**.

Το είδος παρουσιάζει μια υψηλή βαθμίδα φαινοτυπικής ομοιότητας και σημαντικής ανομοιότητας ως προς άλλα αθροίσματα συγγενών πληθυσμών. Τα διάφορα στελέχη έχουν μεγάλη σημασία για την Μικροβιολογία Τροφίμων. Γένος και είδος συμβολίζονται με μια διώνυμη λατινική ονομασία (σε πλάγια γραφή). Για παράδειγμα στο *Saccharomyces cerevisiae*, ο όρος *Saccharomyces* αντιπροσωπεύει το γένος, ο όρος *cerevisiae* το είδος, ενώ χρησιμοποιούνται περισσότερα από 1000 διαφορετικά στελέχη της ζύμης *S. cerevisiae* ως μαγιές ψωμιού, κρασιού ή μύρας.

Μια κατηγοριοποίηση των μικροοργανισμών, η οποία είναι πρακτική για τα τρόφιμα, είναι η εξής:

A. Βακτήρια,

B. Ζυμομύκητες,

Γ. Ευρωτομύκητες.

## 2.2 Μικροβιολογική μόλυνση των τροφίμων

### 2.2.1 Πηγές Μολύνσεων

Τα τρόφιμα λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε θρεπτικά συστατικά και της ευκολίας μολύνσεως και ρυπάνσεώς τους είναι πάντοτε φορείς μικροοργανισμών. Τα τρόφιμα φέρουν κατά κανόνα μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο απ'ότι άλλες μορφές οργανικής και πολύ περισσότερο ανόργανης ύλης. Οι διάφορες πηγές μόλυνσης των τροφίμων είναι οι εξής:

1. Ο άνθρωπος
2. Το πεπτικό σύστημα αγροτικών ζώων
3. Τα έντομα (μύγες, κολεόπτερα)
4. Τα τρωκτικά
5. Τα σπλάχνα και τα βράγχια θαλασσινών
6. Τα αστικά λύματα
7. Η κοπριά των ζώων
8. Η σκόνη
9. Το έδαφος
10. Το νερό

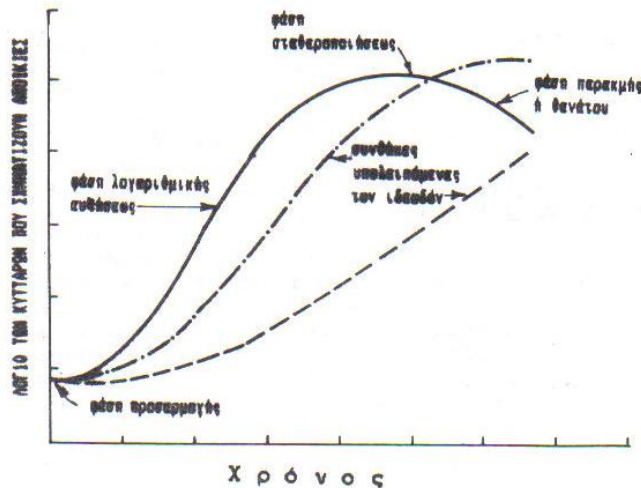
(James M. Jay,2000)

### 2.2.2 Καμπύλη ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών κάτω και από τις πιο ιδανικές συνθήκες ακολουθεί ένα συγκεκριμένο πρότυπο, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα. Έτσι, στις καμπύλες ανάπτυξης των μικροβίων, υπό ιδεώδεις ή μη συνθήκες, διακρίνονται τέσσερα στάδια :

- Στάδιο *καθυστέρησης* ή *προσαρμογής* ή *λανθάνουσα φάση*

- Στάδιο *λογαριθμικής αύξησης*
- Στάδιο *σταθεροποίησης του πληθυσμού* ή *φάση στασιμότητας*
- Στάδιο *παρακμής* ή *θανάτου*



Εικόνα 2.1\_: Καμπύλες ανάπτυξης των μικροβίων, υπό ιδανικές και μη ιδανικές συνθήκες.

Η *λανθάνουσα φάση* είναι μια χρονική περίοδος, κατά την οποία τα κύτταρα προσαρμόζουν τη φυσιολογία και τη βιοχημεία τους στο καινούργιο περιβάλλον που βρίσκονται. Κατά τη διάρκεια της *λογαριθμικής φάσης*, τα κύτταρα αναπτύσσονται όσο πιο γρήγορα μπορούν στο περιβάλλον όπου βρίσκονται. Κατά τη φάση αυτή, όλα τα συστατικά των κυττάρων βρίσκονται σε σταθερές αναλογίες και τα κύτταρα θεωρούνται, για πρακτικούς λόγους, φυσιολογικά ταυτόσημα. Καθώς ο πληθυσμός συνεχίζει να αυξάνεται, η συσσώρευση των μεταβολιτών μέσα στο περιβάλλον γίνεται όλο και πιο απαγορευτική (παρεμποδιστική), ώστε να προκαλεί μείωση στο ρυθμό αύξησης του αριθμού των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, οι συνθήκες μπορεί να γίνουν τόσο απαγορευτικές ώστε να οδηγήσουν στο θάνατο και τη λύση των κυττάρων, οπότε ο καθαρός αριθμός αύξησης των κυττάρων μειώνεται συνεχώς μέχρι την τιμή μηδέν (*φάση στασιμότητας*). Καθώς όλα και περισσότερες τοξίνες συσσωρεύονται, ο ρυθμός θανάτου των κυττάρων γίνεται μεγαλύτερος από την ικανότητα του περιβάλλοντος να υποστηρίξει την κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα τη μείωση τους μεγέθους της μικροβιακής πυκνότητας και την είσοδο των μικροβίων σε μια νέα φάση, τη *φάση θανάτου* των μικροοργανισμών.

### 2.2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Η μόλυνση του τροφίμου με μικροοργανισμούς δε συνεπάγεται αναγκαστικά και την αλλοίωσή του. Για να αλλοιώσουν το τρόφιμο που έχουν μολύνει, θα πρέπει τα μικρόβια να αυξηθούν σε αριθμό (να πολλαπλασιαστούν). Για να είναι εφικτός ο πολλαπλασιασμός τους όμως, πρέπει να συντρέξουν ορισμένες προϋποθέσεις και να εξασφαλιστούν ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Θρεπτικά Συστατικά του Υποστρώματος Τα μικρόβια που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα είναι ετερότροφοι οργανισμοί και έχουν ανάγκη από έτοιμη τροφή. Έτσι, θα πρέπει να βρουν στο υπόστρωμα όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξή τους. Τα θρεπτικά συστατικά που θα πρέπει να περιέχονται στο υπόστρωμα ανάπτυξης των μικροβίων είναι :

- Μία ή περισσότερες πηγές άνθρακα
- Μία πηγή αζώτου
- Επιβοηθητικούς τροφικούς παράγοντες ( βιταμίνες )
- Ανόργανα άλατα και ανόργανα συστατικά

Υγρασία του Υποστρώματος & Ενεργότητα του Νερού Οι διάφοροι μικροοργανισμοί μπορούν να παραμείνουν ζωντανοί υπό συνθήκες αφυδάτωσης, είναι όμως ανίκανοι για μεταβολισμό και πολλαπλασιασμό. Η ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ) διαδραματίζει κριτικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό και γενικά στην ανάπτυξη των μικροβίων στα τρόφιμα. Επομένως, αν η ενεργότητα του νερού διαμορφωθεί σε μια τιμή που είναι η κατώτερη που επιτρέπει την ανάπτυξη ενός ορισμένου είδους μικροβίου, είναι αρκετή αυτή και μόνη να τροχοπεδήσει πλήρως την ανάπτυξή του.

Κατά βάση, οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων και των παθογόνων, αναπτύσσονται σε τιμές ενεργότητας νερού μεγαλύτερες από 0,65-0,70 και συνήθως αναπτύσσονται γρηγορότερα σε τιμές μεταξύ 0,995 και 0,998. Πιο συγκεκριμένα, για ορισμένα από τα είδη των μικροοργανισμών ισχύουν τα εξής :

Θερμοκρασία: Για κάθε είδος μικροβίου υπάρχει ελάχιστη (minimal), άριστη (optimal) και μέγιστη (maximal) θερμοκρασία ανάπτυξης. Σε όλο το εύρος της διακύμανσης μεταξύ της ελάχιστης και της μέγιστης θερμοκρασίας, λαμβάνει χώρα κανονική σύνθεση πρωτοπλάσματος, αύξηση του μικροβιακού κυττάρου και πολλαπλασιασμός, με διαφορετικό όμως ρυθμό. Σε θερμοκρασίας κατώτερης της ελάχιστης για ανάπτυξη του μικροβίου και ανώτερης της μέγιστης, ο πολλαπλασιασμός διακόπτεται, ενώ σε μεγαλύτερες της μέγιστης θερμοκρασίες επέρχεται ο θάνατος του κυττάρου. Οι μικροοργανισμοί ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία μπορούν να αναπτυχθούν διακρίνονται σε:

- **Ψυχρόφιλος :** αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ  $-5$  και  $20$  °C,
- **Ψυχρότροφος :** αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ  $0$  και  $30$  °C,
- **Μεσόφιλος :** αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ  $5$  και  $40$  °C,
- **Θερμόφιλοι :** αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ  $35$  και  $60$  °C.

Η τιμή pH: Η περιοχή τιμών pH στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν τα μικρόβια είναι 4-8, ενώ υπάρχουν και ιδιαιτέρως ανθεκτικά μικρόβια, όπως οι ζύμες και οι μύκητες, ορισμένα των οποίων αναπτύσσονται και σε τιμές pH κατώτερες του 4,0.

Το Δυναμικό Οξειδοαναγωγής (rH) Το δυναμικό οξειδοαναγωγής είναι μέτρο της τάσεως του οξυγόνου στο χώρο του τροφίμου ή του υποστρώματος, όπου αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί. Με βάση τις απαιτήσεις σε τιμές rH, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε: **Αερόβιοι, Προαιρετικά αερόβιοι ή αναερόβιοι, Αυστηρώς αναερόβιοι, Μικροαερόφιλοι**

Παρεμποδιστές : Πρόκειται για ουσίες που περιέχονται στα υποστρώματα ανάπτυξης των μικροβίων και παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό τους, όπως π.χ. λυσοζύμη (ασπράδι αυγού), παρεμποδιστές ενζύμων (ασπράδι αυγού), νισίνη (νωπό γάλα), πολυπεπτίδια από ζωικούς ιστούς (διάφορες ορμόνες), παρεμποδιστές από φυτικούς ιστούς (χυμοί και εκχυλίσματα πολλών φυτικών ιστών), αντιβιοτικά κ.λ.π..

Άλλοι Παράγοντες : Εκτός από τους προαναφερθέντες, υπάρχει και μια σειρά άλλων παραγόντων που επηρεάζουν την μικροβιακή ανάπτυξη, μερικοί από τους οποίους είναι οι ακόλουθοι :



- Η αεριώδης ατμόσφαιρα στο χώρο ανάπτυξης του μικροοργανισμού, και ειδικότερα η περιεκτικότητα σε οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα.
- Η πίεση στο χώρο ανάπτυξης.
- Ο ανταγωνισμός στην περίπτωση της μεικτής μικροχλωρίδας, οπότε επικρατούν αυτά που ευνοούνται έναντι των άλλων από τις συνθήκες που επικρατούν.
- Τα προϊόντα μεταβολισμού των ίδιων των μικροβίων, τα οποία επηρεάζουν την τιμή του pH ή είναι τοξικά για τα ίδια τα κύτταρα, και
- Η προσβολή των μικροβίων από φάγους που παρεμποδίζει ή μηδενίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων

### 2.3 Κινητική απενεργοποίησης μικροοργανισμών

Όταν ένα αιώρημα μικροοργανισμών θερμανθεί υπό σταθερή θερμοκρασία, η καταστροφή των μικροοργανισμών ακολουθεί κινητική α' τάξεως, δηλαδή ο ρυθμός καταστροφής είναι ανάλογος της συγκέντρωσης των ζώντων μικροοργανισμών. Έτσι προκύπτει :

$$\frac{dc}{dt} = k * C \quad (\text{εξίσωση 2.1})$$

Όπου - dc/dt : η ταχύτητα μείωσης της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών

c : η συγκέντρωση των επιζώντων μικροοργανισμών (L<sup>-1</sup>)

k : η σταθερά του ρυθμού δράσης (s<sup>-1</sup>)

ολοκληρώνοντας την παραπάνω εξίσωση μεταξύ των ορίων C<sub>0</sub> σε χρόνο t<sub>0</sub>=0 και C σε χρόνο t προκύπτει:

$$\ln C = \ln C_0 - kt \quad (\text{εξίσωση 2.2})$$

ή

$$\log C = \log C_0 - (k / 2,303) t \quad (\text{εξίσωση 2.3})$$

Αντί της συγκέντρωσης συχνά χρησιμοποιείται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών ανά περιέκτη (N), οπότε η εξίσωση γράφεται:

$$\log N = \log N_0 - kt/2,303 \quad (\text{εξίσωση 2.4})$$

## 2.4 Χρόνος Θερμικού Θανάτου

Ο χρόνος θερμικού θανάτου είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη θανάτωση ορισμένου αριθμού μικροοργανισμών σε μια καθορισμένη θερμοκρασία. Μικρότερης σημασίας είναι ο όρος σημείο θερμικού θανάτου, που είναι η θερμοκρασία που απαιτείται για τη θανάτωση ορισμένου αριθμού μικροοργανισμών για καθορισμένο χρονικό διάστημα, συνήθως 10min.

## 2.5 Τιμή D

Η εξίσωση 2.4 ορίζει το μέγεθος D το οποίο καλείται χρόνος υποδεκαπλασιασμού. Πρόκειται για το χρόνο υποδεκαπλασιασμού ή αλλιώς το χρόνο που απαιτείται για τη θανάτωση του 90% των μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο.

Η τιμή του χρόνου υποδεκαπλασιασμού είναι αριθμητικά ίση με τον αριθμό των λεπτών που απαιτούνται ώστε η καμπύλη των επιζώντων μικροοργανισμών να διαγράψει ένα λογαριθμικό κύκλο. Μαθηματικά η τιμή του χρόνου υποδεκαπλασιασμού είναι ίση με την κλίση της καμπύλης των επιζώντων μικροοργανισμών και αποτελεί μέτρο του ρυθμού θανάτωσης ενός μικροοργανισμού.

## 2.6 Τιμή z

Πρόκειται για τη σταθερά θερμικής αντίστασης, η οποία υποδηλώνει τους βαθμούς Κελσίου (Kelvin ή Fahrenheit) που απαιτούνται ώστε η καμπύλη θερμικής θανάτωσης να διαγράψει ένα λογαριθμικό κύκλο.

Μαθηματικά, η τιμή αυτή είναι ίση με την κλίση της καμπύλης του χρόνου θερμικού θανάτου, ενώ αποτελεί μέτρο της σχετικής αντίστασης ενός μικροοργανισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η τιμή του Z εκφράζει λοιπόν την επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό καταστροφής κάθε συγκεκριμένου μικροοργανισμού και είναι προφανές ότι χαμηλή τιμή σημαίνει μεγάλη μεταβολή του ρυθμού με τη θερμοκρασία και αντιστρόφως.

## 2.7 Καμπύλη του Χρόνου Θερμικού Θανάτου

Για να αναπαρασταθεί μια καμπύλη του χρόνου θερμικού θανάτου, ο χρόνος θέρμανσης σε λεπτά σχεδιάζεται στο γραμμικό άξονα ενός ημιλογαριθμικού διαγράμματος, ενώ ο αριθμός των επιζώντων μικροοργανισμών σχεδιάζεται στο λογαριθμικό άξονά του.

Η καμπύλη είναι σχεδόν γραμμική, υποδηλώνοντας ότι η θανάτωση των βακτηρίων με θέρμανση είναι λογαριθμική και υπακούει σε κινητική πρώτης τάξης. Για να αναπαρασταθεί μια καμπύλη του χρόνου θερμικού θανάτου, ο χρόνος θέρμανσης σε λεπτά σχεδιάζεται στο γραμμικό άξονα ενός ημιλογαριθμικού διαγράμματος, ενώ ο αριθμός των επιζώντων μικροοργανισμών σχεδιάζεται στο λογαριθμικό άξονά του.

Προκειμένου να υπολογιστεί η σταθερά θερμικής αντίστασης, η θερμοκρασία μετρούμενη στη εκάστοτε μονάδα (Κελσίου ή Kelvin ή Fahrenheit) σχεδιάζεται στο γραμμικό άξονα ενός ημιλογαριθμικού διαγράμματος, ενώ οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού, D, σχεδιάζεται στο λογαριθμικό άξονά του (Ταούκης,2001).

## 2.8 Βακτήρια

Πρόκειται για μικροσκοπικούς μονοκύτταρους οργανισμούς, που πολλαπλασιάζονται κατά κανόνα με διαίρεση. Είναι ετερότροφοι, χωρίς διακριτό κυτταρικό πυρήνα, χωρίς χλωροφύλλη και με σφαιρικό (κοκκώδες), ραβδόμορφο ή σπειροειδές σχήμα. Τα σφαιρικά διαιρούνται προς κάθε επίπεδο και διακρίνονται σε διπλόκοκκους, τετράκοκκους, σαρκίνες, στρεπτόκοκκους και σταφυλόκοκκους. Τα ραβδόμορφα διαιρούνται εγκάρσια και διακρίνονται σε λεπτοτριχοειδή κλωστρίδια (διόγκωση στο μέσο) κεφαλοσπόρια (διόγκωση στο άκρο). Τα σπειροειδή είναι σαν τα ραβδόμορφα παρουσιάζουν όμως απολήξεις ή ελικοειδή περιστροφή και διακρίνονται σε δονάκια και σπειρύλια. Τα βακτήρια που παρουσιάζουν σπορίωση ονομάζονται βάκιλοι.

Τα βακτήρια, ανάλογα με τη χρώση τους κατά Gram, διακρίνονται σε θετικά (+) αν η τελική χρώση τους είναι κυανοϊώδης και σε αρνητικά (-) αν είναι κόκκινη. Η χρώση κατά Gram είναι μια διαδικασία προσθήκης διαλυμάτων A (κρυσταλλοϊώδες σε οινόπνευμα) και B (Lugol: υδατικό διάλυμα I<sub>2</sub> και KI) και τέλος φουξίνης. Η χρώση

κατά Gram εξαρτάται από τη σύσταση και τη στρωμάτωση του βακτηριακού τοιχώματος και είναι θεμελιακή ιδιότητα που συνδέεται με διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την παθογένεια, την αντοχή στα αντιβιοτικά και άλλους παράγοντες.

Η κυτταρική οργάνωση των βακτηρίων παρουσιάζει ορισμένες ιδιαιτερότητες:

-Δύσκαμπτο κυτταρικό τοίχωμα με κύριο συστατικό την πεπτιδογλυκάνη (με επιπλέον πολυσακχαρίτες για τα Gram (+) και πρωτεΐνες και λιποπρωτεΐνες για τα Gram (-)).

-Διαχωρισμός περιεχομένου σε κυτόπλασμα και πυρηνόπλασμα (κυκλικό διπλής περιελίξεως

DNA, χωρίς μεμβράνη και οργανίδια).

-Πλασμίδια

-Έλλειψη γένους και μείξη κληρονομικής ουσίας μέσω συζευκτικών μηχανισμών.

-Έλυτρο: πηκτώδης περιβάλλουσα πολυσακχαρική μάζα με γλοιώδη υφή (χαρακτηριστική στα χαλασμένα από βακτήρια τρόφιμα).

-Βλεφαρίδες (ή μαστίγια): Εκφύσεις χαρακτηριστικές του βακτηρίου

-Σπόρια: συμπύκνωση κυτταρικού υλικού, που αποτελεί ένα μέσο άμυνας των κυττάρων. Τα σπόρια αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες, ενώ κάτω από ευνοϊκές συνθήκες δίδουν εκ νέου βλαστικά βακτήρια (germination).

Τα βακτήρια είναι η κυριότερη πηγή μόλυνσεως και αλλοίωσης των τροφίμων. Η “υπεροχή” τους αυτή έναντι των άλλων μικροβίων οφείλεται:

I. Στη μεγάλη παραλλακτικότητα των διαφόρων ειδών τους ως προς τις απαιτήσεις σε pH, θρεπτικά συστατικά, θερμοκρασία, ERH.

II. Στη δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων

III. Στη δυνατότητα αναερόβιας ανάπτυξης

IV. Στην έκκριση τοξινών

### 2.8.1 Παθογόνα βακτήρια

Τα Gram ( - ) βακτήρια εκδηλώνουν παθογένεια δια προσβολής του δέκτη (ανθρώπου). Η εκδήλωση των συμπτωμάτων συμβαίνει μετά από τουλάχιστον 24h. Τα συμπτώματα διαρκούν και καταπονούν αλλά είναι σπανίως θανατηφόρα. π.χ. *Salmonella* spp. Εξάιρεση: Τα *Escherichia coli* είναι Gram ( - ) βακτήρια αλλά παράγουν τοξίνη. Τα Gram (+) βακτήρια εκδηλώνουν παθογένεια μέσω τοξίνης. Η εκδήλωση των συμπτωμάτων συμβαίνει εντός 1- 6 ωρών. Τα συμπτώματα διαρκούν 24-48 h και καταπονούν αλλά δέν είναι επικίνδυνα π.χ. *Staphylococcus aureus*. Σημαντική εξάιρεση στον κανόνα αυτό είναι το Gram (+)*Clostridium botulinum* που παράγει μια ισχυρότατη θανατηφόρο νευροτοξίνη.

Παθογόνα G (-) βακτήρια: *Salmonella, spp., Shigella spp., Escherichia coli, Campylobacter jejuni, Vibrio parahaemolyticus*

Βρίσκονται: σε έντερα, κόπρανα, έδαφος, γάλα, κρέας (πουλερικά), θαλασσινά.

Είναι δείκτες μη τήρησης ορθής βιομηχανικής πρακτικής και καλής υγιεινής πρακτικής-Good Manufacturing Practices (GMP) και Good Hygiene Practices (GHP).

Παθογόνα G (+) βακτήρια: *Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Bacillus subtilis.*

Emerging pathogens:(“αναδυόμενα” παθογόνα: βακτήρια και των δύο παραπάνωκατηγοριών η επικινδυνότητα και η επιδημιολογική σημασία των οποίων καθώς και η ανάγκη λήψεως ειδικών μέτρων κατά την παραγωγή των σχετικών τροφίμων αναγνωρίστηκε πρόσφατα): *Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides, Vibrio vulnificus, Escherichia coli O157 H7*

### 2.8.2 Μη παθογόνα βακτήρια

Τα βακτήρια δεν είναι πάντοτε παθογόνα για τον ανθρώπινο οργανισμό και μπορούν να εμφανίζονται ως **παράγοντες αλλοιώσεων** όπου επιφέρουν ανεπιθύμητες αλλαγές οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, μη παθογόνες, ή ως **παράγοντες ωφελιμιστικής χρήσης** για την παραγωγή χρήσιμων για τον άνθρωπο προϊόντων του μεταβολισμού τους όπως γαλακτικό οξύ (σε τρόφιμα όπως γιαούρτια, τυριά, βουτυρόγαλα, ελιές, τουρσιά, πίκλες, σαλάμι αέρος), προπιονικό οξύ (σε τυριά ελβετικού τύπου Emmenthaler), οξεικό οξύ (παραγωγή ξυδιού) κτλ

## 2.9 Γαλακτικά Βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια (ή βακτήρια του γαλακτικού οξέος) αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων που το χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι ο σχηματισμός του γαλακτικού οξέος, ως κύριο προϊόν του μεταβολισμού τους. Παρουσιάζουν όμοια μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά, και είναι επίσης σχετικά κοντά φυλογενετικά. Τα είδη που ανήκουν σε αυτή την ομάδα είναι gram-θετικά, μη-σποριογόνα, χωρίς αυτόνομη κίνηση, τα οποία έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα σάκχαρα (εξόζες και πεντόζες) σε γαλακτικό οξύ και ενέργεια. Το σχήμα τους ποικίλει από σφαιρικό έως ραβδόμορφο και βρίσκονται σε τρόφιμα (γαλακτοκομικά, ζυμωμένα κρέατα και λαχανικά, ποτά κ.α), φυτά, την εντερική μικροχλωρίδα ανθρώπου και των ζώων, αλλά και στη στοματική κοιλότητα και τον γυναικείο κόλπο. Τα ζυμούμενα τρόφιμα υπήρχαν από την αρχαιότητα, αλλά η διαπίστωση ότι οι μικροοργανισμοί είναι υπεύθυνοι για τη ζύμωση έγινε στα τέλη του περασμένου αιώνα. Πρόσφατες έρευνες επιβεβαίωσαν ότι η καλή συντήρηση των ζυμούμενων τροφίμων οφείλεται στην οξύνισή τους λόγω μετατροπής των σακχάρων σε οργανικά οξέα.

Ο πυρήνας των γαλακτικών βακτηρίων αποτελείται από τα τέσσερα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus* ενώ οι πρόσφατες αναθεωρήσεις στην ταξινόμηση έχουν προτείνει διάφορα νέα γένη και τώρα στην ομάδα έχουν προστεθεί και τα εξής: *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella*. Οι *Lactobacilli*, τα *Carnobacteria* και μερικά βακτήρια του γένους *Weissella* έχουν ραβδόμορφο σχήμα, ενώ όλα τα υπόλοιπα γένη έχουν σχήμα κόκκου (Orla Jensen, 1919; Jin et al., 2009). Για την αναγνώριση των LAB, χρησιμοποιούνται συχνότερα φαινοτυπικές μέθοδοι (Corsetti et. al., 2001). Βέβαια πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί γενετικές τεχνικές, όπως ο προσδιορισμός της αλληλουχίας 16S στο rDNA, που επιτρέπουν μια πιο συνεπή και ακριβή ταυτοποίηση των μεμονωμένων στελεχών (Buddhiman et al., 2008).

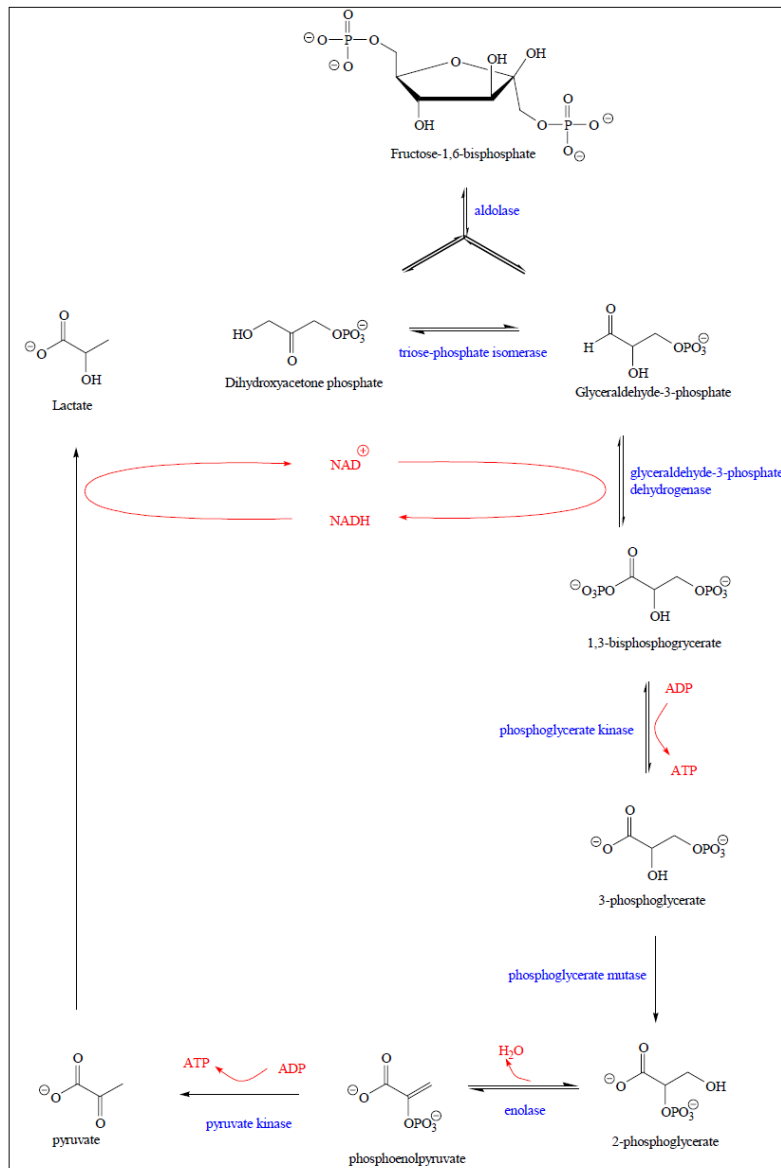
### 2.9.1 Κατάταξη των γαλακτικών βακτηρίων

Η βάση για την κατάταξη των γαλακτικών βακτηρίων δόθηκε από τον Orla Jensen το 1919. Η κατάταξη λοιπόν των γενών των γαλακτικών βακτηρίων γίνεται με βάση τα μορφολογικά και φυσιολογικά τους χαρακτηριστικά, σε **βάκιλους** (*Lactobacillus* και *Carnobacterium*) και σε **κόκκους** (όλα τα υπόλοιπα γένη). Τα γαλακτικά βακτήρια μπορούν επίσης να διαχωριστούν με βάση τον τρόπο με τον οποίο μεταβολίζουν τη γλυκόζη σε δύο κατηγορίες: (1) τα **ομοζυγωτικά**, που μετατρέπουν τις εξόζες σχεδόν στοιχειομετρικά προς γαλακτικό οξύ και (2) τα **ετεροζυγωτικά**, που μετατρέπουν τις εξόζες προς γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

### 2.9.2 Μεταβολισμός των γαλακτικών βακτηρίων

#### 2.9.1.i Ομοζυγωτικός μεταβολισμός

Τα ομοζυγωτικά βακτήρια μετατρέπουν σχεδόν το σύνολο των σακχάρων που χρησιμοποιούν, και ιδίως τη γλυκόζη, σε γαλακτικό οξύ. Το ομοζυγωτικό μεταβολικό μονοπάτι περιλαμβάνει ένα στάδιο αντιδράσεων γλυκόλυσης των εξοζών. Χαρακτηρίζεται από τη διάσπαση της 1,6-διφωφο-φρουκτόζης σε δύο ίσο-τριόζες, την 3-φωφογλυκεριναλδεΐδη και την 3-φωφο-διυδροξυακετόνη. Από την 3-φωφογλυκεριναλδεΐδη σχηματίζεται το πυροσταφιλικό οξύ το οποίο τελικά ανάγεται σε γαλακτικό οξύ (βλ. Εικόνα 2.2 ) (Khalid 2011)



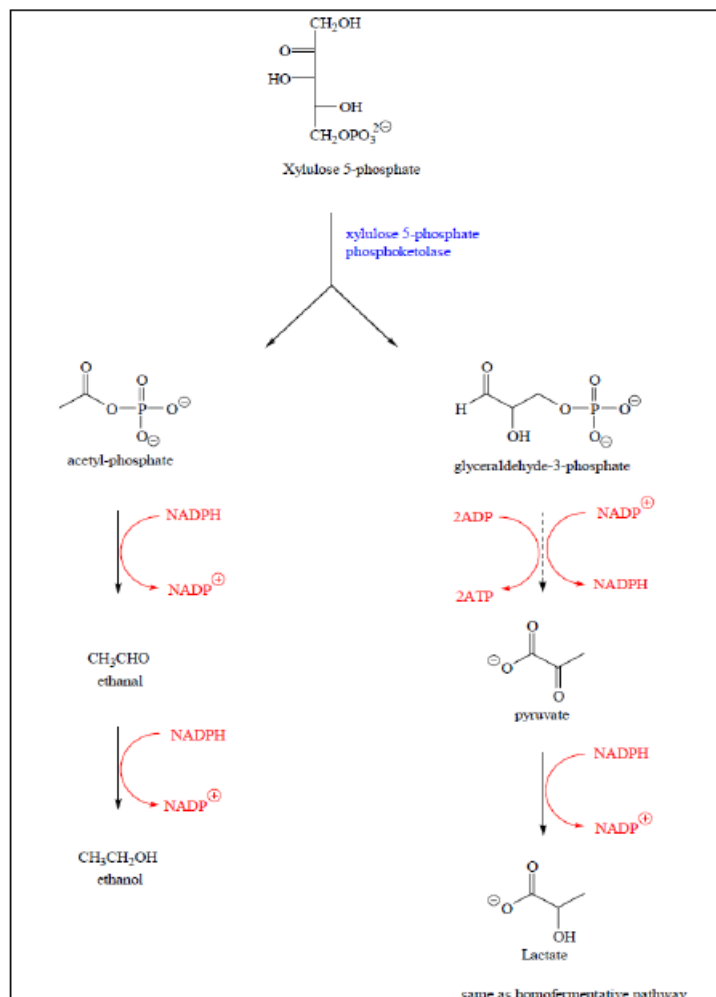
Εικόνα 2.2 :Ομοζυγωτική διάσπαση (Khalid 2011)

### 2.9.1.ii Ετεροζυγωτικός μεταβολισμός

Ο ετεροζυγωτικός τρόπος χαρακτηρίζεται από την οξείδωση της γλυκόζης προς 6-φωσφορογλυκονικό οξύ το οποίο στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται παράγοντας CO<sub>2</sub> και μία πεντόζη. Η πεντόζη στη συνέχεια διασπάται σε 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεύδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ με τη δράση μια φωσφοκετολάσης. Η 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεύδη μεταβολίζεται σε γαλακτικό οξύ χρησιμοποιώντας το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι με την ομοζυγωτική ζύμωση. Το ακετυλο-φωσφορικό οξύ μετατρέπεται σε αιθανόλη. Έτσι, με αυτό τον τρόπο ζύμωσης παράγεται CO<sub>2</sub>, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ σε ίσες ποσότητες (βλέπε εικόνα 2.3). Εδώ ανήκουν τα

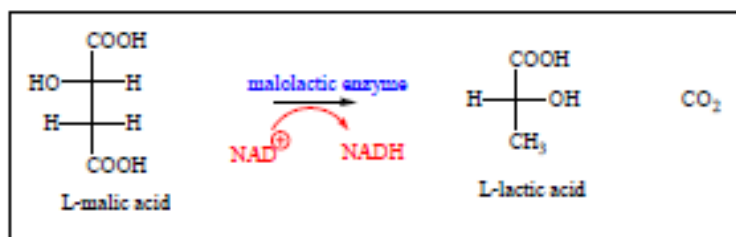


στελέχη του γένους *Leuconostoc* και μερικά στελέχη του γένους *Lactobacillus spp.* (Khalid 2011)



Εικόνα 2.3 Ετεροζυγωτική διάσπαση (Khalid 2011)

Κάποια βακτήρια όπως το *Leuconostoc oenos* που χρησιμοποιούνται στην οινοποίηση μεταβολίζουν και οργανικά οξέα όπως το μαλικό οξύ και παράγουν γαλακτικό οξύ.



Εικόνα 2.4 Διάσπαση του μαλικού οξέος (Khalid 2011)

## 2.10 Γένη γαλακτικών βακτηρίων

Όπως αναφέρεται και παραπάνω, ο πυρήνας των γαλακτικών βακτηρίων αποτελείται από τα τέσσερα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus* ενώ πρόσφατα έχουν προστεθεί και τα γένη *Aerococcus*, *Alloioococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella*. Παρακάτω περιγράφονται τα βασικότερα γένη της ομάδας των γαλακτικών οξέων.

### 2.10.1 Γένος *Lactobacillus*

Οι Λακτοβάκιλλοι είναι Gram-θετικοί, μη-σποριογόνιοι μικροοργανισμοί. Όσον αφορά το κυτταρικό τους σχήμα, μπορούν να εμφανίζονται ως ράβδοι ή ως κοκκοβάκιλλοι. Κατά κανόνα δεν εμφανίζουν κίνηση, με εξαίρεση κάποια είδη που φέρουν περίτριχες βλεφαρίδες. Είναι, μικροαερόφιλοι, απαιτώντας πλούσια μέσα για να αναπτυχθούν και όξινο περιβάλλον (pH 5.5-6.5), ενώ αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασίες 30-40°C. Είναι αρνητικοί στην καταλάση, παρ' όλο που δραστηριότητα ψευδοκαταλάσης μπορεί μερικές φορές να είναι παρούσα σε ορισμένα στελέχη. Σε αυτό το γένος περιλαμβάνονται είδη ομοζυγωτικής ζύμωσης αλλά και ετεροζυγωτικής ζύμωσης.

Όσον αφορά τη σύνθεση βάσεων DNA του γονιδιώματος, παρουσιάζουν συνήθως ένα ποσοστό βάσεων GC χαμηλότερο από 54%. Είναι σχεδόν πανταχού παρόντες: βρίσκονται σε περιβάλλοντα όπου οι υδατάνθρακες είναι διαθέσιμοι, όπως τα τρόφιμα (γαλακτοκομικά προϊόντα, λαχανικά, φρούτα, ποτά), το αναπνευστικό και το γαστρεντερικό σύστημα καθώς και στον γυναικείο κόλπο. Το γένος *Lactobacillus* περιλαμβάνει πάνω από 100 είδη και ανήκει στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Οι κοντινότεροι συγγενείς του είναι τα γένη *Paralactobacillus* και *Pediococcus*, που ανήκουν και αυτά στην ίδια οικογένεια. Η φυλογενετικά κοντινότερη οικογένεια φαίνεται να είναι η οικογένεια *Leuconostocaceae*, η οποία περιλαμβάνει τα γένη *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Weissella* (Giraffa et al., 2010)

Κάποια από τα είδη που ενδιαφέρουν τη βιομηχανία τροφίμων είναι τα εξής: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Lactobacillus*

*delbrueckii subsp. Lactis* , *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus curvatus*,  
*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*

### 2.10.2 Γένος *Leuconostoc*

Τα στελέχη αυτού του γένους είναι θετικά κατά Gram και μη σποριογόνα. Κατά κανόνα είναι ακίνητα, έχουν σφαιρικό ή φακοειδές σχήμα, και συνήθως απαντούν σε ζεύγη ή αλυσίδες μικρού μήκους. Όλα τα είδη είναι ετεροζυγωτικά και διασπούν τις εξόζες κατά το ήμισυ προς D- γαλακτικό οξύ, και κατά το υπόλοιπο προς διοξείδιο του άνθρακα και αιθανόλη, ή διοξείδιο του άνθρακα και οξικό οξύ. Είναι προαιρετικά αναερόβια και χαρακτηρίζονται ως μεσόφιλα καθώς αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 5 – 30°C και επιτυγχάνουν optimum αναπτύξεως μεταξύ 20 -30°C. Είναι αρνητικά ως προς την καταλάση και την υδρολάση της αργινίνης και δεν έχουν κυττοχρώματα.

Μελέτες στη φυσιολογία των κυττάρων του γένους *Leuconostoc* έδειξαν ότι συνδέονται στενά με τους ετεροζυμωτικούς λακτοβάκιλλους. Ίσως να διαφοροποιούνται από αυτούς λόγω της μορφολογίας τους και της αποκλειστικής παραγωγής του D-γαλακτικού οξέος. (Hemme, Foucaud & Scheunemann , 2004).

**Πίνακας 2.1: Χαρακτηριστικά του γένους *Leuconostoc***

Γενικά χαρακτηριστικά	Πρόσθετα χαρακτηριστικά
Θετικά κατά Gram	Μεσόφιλα (ανάπτυξη 5-30°C)
Κόκοι (ωοειδές σχήμα), μη- κινητικά, μη- σποριογόνα	Δεν αναπτύσσονται σε pH <4.8
Προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά στην καταλάση	ετεροζυγωτικά
Παραγωγή D-γαλακτικού οξέος	Ανθεκτικά στη Βανκομυκίνη
Όχι διάσπαση της Αργινίνης	

### 2.10.3 Γένος *Streptococcus*

Τα στελέχη του γένους *Streptococcus* περιγράφονται με βάση μορφολογικά, φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά. Τα κύτταρα είναι σφαιρικά ως ωοειδή με διάμετρο από 2μm που απαντούν σε ζεύγη ή αλυσίδες. Για κίνηση είναι κατά κανόνα ανίκανα εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις και είναι θετικά κατά Gram. Είναι ομοζυγωτικά και σχηματίζουν D(+) γαλακτικό οξύ. Μερικά είδη ζυμώνουν οργανικά οξέα όπως το μηλικό και το κιτρικό. Περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, όπως τα ισχυρά παθογόνα βακτήρια *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* και *S. Agalactiae*, την εντερική ομάδα *S. Faecalis* και *S. Faecium* και τα βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης *S. Cremoris* και *S. Lactis*. Οι στρεπτόκοκκοι είναι προαιρετικώς αναερόβιοι και έχουν πολύπλοκες τροφικές απαιτήσεις και ευδοκούν σε περιβάλλοντα με επαρκείς πηγές πρωτεϊνών και υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων των ιστών του εντερικού σωλήνα, του γάλατος και των γαλακτοκομικών, των λαχανικών κ.α. Η ευνοϊκότερη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37°C.

Το *S. thermophilus* είναι το είδος που ενδιαφέρει ιδιαίτερα την βιομηχανία τροφίμων και είναι το μοναδικό στέλεχος των στρεπτόκοκκων που χρησιμοποιείται ως καλλιέργεια εκκίνησης, όντας βασικό στοιχείο στην παραγωγή γιαουρτιού και τυριού. Τα κύτταρα του έχουν σφαιρική ή ωοειδή μορφή με διάμετρο μικρότερη από 1μm και σχηματίζουν ζεύγη ή αλυσίδες. (Schleifer & Kilper-Balz, 1987). Ζυμώνει τα απλά σάκχαρα καθώς και τους δισακχαρίτες σακχαρόζη και λακτόζη μέχρι να διαμορφωθεί τιμή pH 4-4,5. Η θερμοανθεκτικότητα του είναι σχετικά υψηλή και μπορεί να επιζήσει σε θερμοκρασία 65°C για 30 λεπτά.

### 2.10.4 Γένος *Pediococcus*

Τα κύτταρα των ειδών του γένους είναι σφαιρικά και απαντούν σε ζεύγη ή σε τετράδες, ενώ σπανίως απαντώνται απλά κύτταρα και ποτέ σε αλυσίδες. Είναι ασποριογόνα και θετικά κατά Gram. Επίσης, είναι ομοζυμοτικά και σχηματίζουν DL ή L(+) γαλακτικό οξύ. Όπως όλα τα γαλακτικά βακτήρια, είναι και αυτά αρνητικά ως προς την καταλάση, μη πρωτεολυτικά και μη παθογόνα. Για την ανάπτυξή τους απαιτούν βιοτίνη, νικοτινικό και παντοθενικό οξύ, και αναπτύσσονται καλύτερα εάν στο χώρο των τρυβλίων υπάρχει διοξείδιο του άνθρακα σε μικροποσότητες.

Τα είδη του γένους αυτού απαντούν σε φυτικά προϊόντα που υφίστανται γαλακτική ζύμωση ή στην αλλοιωμένη μύρα και σπανίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Έχουν αναγνωρισθεί οκτώ είδη του γένους, αυτά δε που ενδιαφέρουν τη Μικροβιολογία τροφίμων είναι τα *Pediococcus dextranicum* και *Pediococcus acidilactici*

**Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά κάποιων γενών Γαλακτικών Βακτηρίων**

Γένος	Σχήμα κυττάρων και διάταξη	Τύπος ζύμωσης	Στερεοισομέρια Γαλακτικού οξέος
<i>Lactobacillus</i>	Ραβδία, σφαιρικά σε αλυσίδες	Ομοζυγωτική - ετεροζυγωτική	D,L,DL
<i>Leuconostoc</i>	Σφαιρικά σε ζευγάρια ή αλυσίδες	ετεροζυγωτική	D
<i>Pediococcus</i>	Σφαιρικά σε ζευγάρια ή τετράδες	ομοζυγωτική	DL,L
<i>Streptococcus</i>	Σφαιρικά σε αλυσίδες	ομοζυγωτική	L
<i>Oenococcus</i>	Σφαιρικά ή φακοειδή σε ζευγάρια ή αλυσίδες	ετεροζυγωτική	D
<i>Weissela</i>	Σφαιρικό ή φακοειδές σχήμα	ετεροζυγωτική	D,DL

Τα γαλακτικά βακτήρια λοιπόν δρουν ως παράγοντες αλλοιώσεων και επιφέρουν ανεπιθύμητες αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του χυμού υποβαθμίζοντας την ποιότητα του. Βέβαια αποτελούν τον έναν από τους δύο σημαντικότερους παράγοντες αλλοίωσης των χυμών πορτοκαλιού καθώς η δράση των πηκτινολυτικών ενζύμων (κεφάλαιο 3) και συγκεκριμένα της ΠΜΕ προκαλεί επίσης σημαντική υποβάθμιση της ποιότητας.



### 3. ΠΗΚΤΙΝΟΛΥΤΙΚΑ ENZYMA

#### 3.1 Ένζυμα

##### 3.1.1 Γενικά

Τα ένζυμα είναι συνήθως πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, που κυμαίνεται από 15.000 Da έως και αρκετά δισεκατομμύρια και τα οποία δρουν ως καταλύτες. Έχει αποδειχτεί, επίσης ότι και κάποια RNA μόρια έχουν καταλυτική δράση, αλλά η πλειονότητα των κυτταρικών δράσεων καταλύεται από πρωτεΐνες. Τα RNA μόρια με καταλυτικές ιδιότητες ονομάζονται ριβοένζυμα (*riboenzymes*). Τα ένζυμα είναι εξειδικευμένοι, πολύπλευρης χρήσης και πολύ αποτελεσματικοί βιολογικοί καταλύτες, οι οποίοι μάλιστα σε συνθήκες περιβάλλοντος αποδίδουν πολύ μεγαλύτερους ρυθμούς αντίδρασης σε σχέση με τις χημικά καταλυόμενες αντιδράσεις.

Όσον αφορά τη δομή τους, μερικά ένζυμα έχουν απλή δομή, όπως μια διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, ενώ πολλά ένζυμα έχουν περισσότερες από μία υπομονάδες. Ορισμένα πρωτεϊνικά ένζυμα για να είναι ενεργά χρειάζονται μια μη πρωτεϊνική ομάδα. Η ομάδα αυτή μπορεί να είναι είτε ένας συμπαράγοντας, για παράδειγμα κάποιο μεταλλικό ιόν, Mg, Zn, Mn, Fe, είτε κάποιο συνένζυμο, όπως ένα σύνθετο οργανικό μόριο NAD, FAD, CoA, είτε κάποιες βιταμίνες. Το ένζυμο που περιέχει μια μη πρωτεϊνική ομάδα ονομάζεται ολοένζυμο (*holoenzyme*). Το πρωτεϊνικό του μέρος είναι το αποένζυμο (*apoenzyme*). Τα ένζυμα, τα οποία απαντώνται σε αρκετές διαφορετικές μοριακές μορφές, αλλά καταλύουν την ίδια αντίδραση, ονομάζονται ισοένζυμα (*isoenzymes*). Μερικά ένζυμα ομαδοποιούνται και συνθέτουν ενζυμικά σύμπλοκα. Τέλος, τα ένζυμα παρουσιάζουν εξειδίκευση στο υπόστρωμα και ταξινομούνται ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύουν. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι σημαντικότερες ομάδες ενζύμων και οι ιδιότητές τους. (.Schuler and Kargi 2005).

Πίνακας 3.1: Διεθνής ταξινόμηση των ενζύμων (Shuler and Kargi, 2005)

1. Οξειδοαναγωγάσες (οξειδοοξειδοουκτάσες) (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις)	3. Υδρολάσες (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις)
1.1 Δρουν σε $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-OH} \\ \diagdown \end{array}$	3.1 Εστέρες
1.2 Δρουν σε $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=O} \\ \diagdown \end{array}$	3.2 Γλυκοζιδικοί Δεσμοί
1.3 Δρουν σε $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C=CH-} \\ \diagdown \end{array}$	3.3 Πεπτιδικοί Δεσμοί
1.4 Δρουν σε $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-NH}_2 \\ \diagdown \end{array}$	3.4 Άλλοι C-N δεσμοί
1.5 Δρουν σε $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{CH-NH-} \\ \diagdown \end{array}$	3.5 Όξινοι Ανυδρίτες
1.6 Δρουν σε NADH, NADPH	4. Λυάσες (προσθήκη σε διπλούς δεσμούς)
2. Τρανσφεράσες (Μεταγωγάσες) (Μεταφορά ενεργών ομάδων)	4.1 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \end{array}$
2.1 Ομάδες ενός Άνθρακα	4.2 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \end{array}$
2.2 Αλδεϋδομάδες και Κετονομάδες	4.3 $\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{N-} \\ \diagdown \end{array}$
2.3 Ακυλομάδες	5. Ισομεράσες (αντιδράσεις ισομερισμού)
2.4 Γλυκοζυλομάδες	5.1 Ρακεμάσες
2.5 Φωσφορικές Ομάδες	6. Λιγάσες (σχηματισμός δεσμών με διάσπαση ATP)
2.6 Ομάδες που περιέχουν Θείο	6.1 C-O
	6.2 C-S
	6.3 C-N
	6.4 C-C

### 3.1.2 Ένζυμα και τρόφιμα

Ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα όπως σε όλους τους οργανισμούς, έτσι και σε πολλά τρόφιμα και με αυτό τον τρόπο βελτιώνουν ή υποβαθμίζουν την ποιότητα των τροφίμων. Σχετικά με αυτό το φαινόμενο είναι η ωρίμανση των φρούτων και των λαχανικών, το σίτεμα του κρέατος και η ωρίμανση των γαλακτοκομικών προϊόντων, και τα στάδια επεξεργασίας που περιλαμβάνονται στην παρασκευή ζυμαριού από άλευρα σιταριού ή σίκαλης και η παραγωγή αλκοολούχων ποτών με την τεχνολογία της ζύμωσης.

Ενζυμική αδρανοποίηση ή μεταβολές στον τρόπο κατανομής των ενζύμων στα υποκυτταρικά σωματίδια ενός ιστού μπορούν να λάβουν χώρα κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης ή της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων. Οι ενζυμικές ιδιότητες



είναι ενδιαφέρουσες για τον χημικό τροφίμων δεδομένου ότι τα ένζυμα είναι διαθέσιμα σε μεγάλους αριθμούς για ενζυμική ανάλυση ή για χρήση στη βιομηχανική επεξεργασία των τροφίμων.

### 3.1.3 Κινητική των ενζύμων

Η κινητική μιας απλής ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης συχνά αναφέρεται ως κινητική Michaelis-Menten ή κινητική κορεσμού (*saturation kinetics*). Η γενική εξίσωση της δράσης των ελεύθερων ενζύμων είναι:



όπου: S: υπόστρωμα ενζύμου,

E: ένζυμο,

P: προϊόν ενζυμικής δράσης.

Οι κύριες υποθέσεις είναι:

- i. Υπάρχει μόνο ένα υπόστρωμα,
- ii. Το ένζυμο είναι απαλλαγμένο από κάθε άλλη μορφή δραστικότητας,
- iii. Δεχόμαστε ότι η «συμπληρωματικότητα» της γεωμετρίας ενζύμου και υποστρώματος οδηγεί στο σχηματισμό του ενδιάμεσου συμπλόκου ES με την «πρόσφυση» του υποστρώματος στην αντίστοιχη ενεργό περιοχή του ενζύμου.
- iv. Υπάρχει η παραδοχή ότι η διάσπαση του ES οδηγεί στο σχηματισμό του προϊόντος, χωρίς τη δυνατότητα επανασηματισμού του ES, γεγονός που εξασφαλίζεται όταν  $[P] \ll [S]$ .
- v. Δεχόμαστε ότι  $[E] \ll [S]$ , οπότε και  $[ES] \ll [S]$ . Δηλαδή, ο σχηματισμός του ES δεν αλλοιώνει σημαντικά τη συγκέντρωση του υποστρώματος S.
- vi. Υπόθεση Briggs-Haldane: Η ταχύτητα σχηματισμού του συμπλόκου ES ισούται με την ταχύτητα εξαφάνισής του. Οπότε, Η εξίσωση Michaelis-Menten γράφεται ως εξής:

$$U = \frac{Um * [S]}{Km + [S]} \quad (\text{εξίσωση 3.1})$$

Όπου : U = ταχύτητα παραγωγής προϊόντος

Um = μέγιστη ταχύτητα

[S] = ολική συγκέντρωση υποστρώματος

Km = σταθερά Michaelis - Menten

## 3.2 Πηκτινικές ουσίες

### 3.2.1 Εισαγωγή

Οι πηκτινικές ουσίες είναι όξινοι ετεροπολυσακχαρίτες με μοριακό βάρος μεταξύ 30.000 - 300.000 και αποτελούνται κυρίως από πηκτίνη, ένα πολυμερές του D-γαλακτουρονικού οξέος. Τουλάχιστον το 75% των μονομερών του D-γαλακτουρονικού οξέος είναι εστεροποιημένο με μεθανόλη ή με ραμνογαλακτουρονάνες, γαλακτουρονάνες, γαλακτάνες, αραβινογαλακτάνες και αραβινάνες. Για την καλύτερη μελέτη τους οι πηκτινικές ουσίες διακρίνονται σε πηκτικά οξέα, πηκτινικά οξέα και πηκτίνες. Τα πηκτικά οξέα είναι πολυγαλακτουρανικά οξέα που περιέχουν αμελητέα ποσά μεθοξύ ομάδων ενώ τα πηκτινικά οξέα είναι πολυγαλακτουρανικά οξέα που περιέχουν σημαντικό ποσοστό μεθυλεστέρων. Τέλος ο γενικός όρος πηκτίνη περιλαμβάνει ένα μίγμα πηκτινικών οξέων με κυμαινόμενη περιεκτικότητα σε μεθοξύ ομάδες και βαθμό εστεροποίησης. (Wong, 1995).

Οι πηκτινικές ουσίες αποτελούν συστατικό των τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων καθώς και του μεταξύ των κυττάρων χώρου, όπου χρησιμεύουν ως υλικό συνδέσεως και συγκρατήσεως των κυττάρων (Θωμόπουλος 1986).

### 3.2.2 Πηκτινικά υποστρώματα

Μέχρι σήμερα, η πηκτίνη απεικονίζεται ως ένα μίγμα που περιλαμβάνει την τριάδα των συστατικών ομογαλακτουρονάνη (HG) , ραμνογαλακτουρονάνη-I (RGI), και ραμνογαλακτουρονάνη-II (RGII). Εκτός της RGII, οι γαλακτουρονάνες δεν έχουν μια σταθερή καθορισμένη δομή. Σε γενικές γραμμές, η ραχοκοκαλιά της πηκτίνης θεωρείται να αποτελείται κυρίως από ομογαλακτουρονάνη καθώς και ραμνογαλακτουρονάνη-I, με την τελευταία να είναι διακλαδισμένη με πλευρικές αλυσίδες σακχάρων (αραβινάνης και αραβινογαλακτάνης) (Schols & Voragen., 1996; Coenen et al., 2007). Ένα εναλλακτικό μοντέλο υποδεικνύει την ραμνογαλακτουρονάνη-I να συνθέτει την κύρια αλυσίδα, ενώ η HG και η RGII αποτελούν τις πλευρικές αλυσίδες (Vincken et al., 2003). Αποδεικτικά στοιχεία για την τεκμίρωση του ενός ή του άλλου μοντέλου αναζητούνται συνεχώς.

Η **ομογαλακτουρονάνη** είναι ένα πολυμερές μη υποκατεστημένων μορίων γαλακτουρονικού οξέος ενωμένα με  $\beta$ -(1→4) γλυκοζιτικό δεσμό και με ελάχιστο μήκος κατά προσέγγιση 72-100 μονάδων γαλακτουρονικού οξέος (Thibault et al 1993). Οι καρβοξυλικές ομάδες των μονομερών εστεροποιούνται σε διαφορετικό βαθμό από μεθανόλη. Η εστεροποίηση των ελεύθερων γαλακτουρονικών οξέων με μεθανόλη δημιουργεί την πηκτίνη. Ο βαθμός εστεροποίησης ποικίλλει από φρούτο σε φρούτο και ελαττώνεται καθώς το φρούτο ωριμάζει. Παρατηρείται συχνά επίσης ακετυλίωση στο O-2 και O-3 (Mohnen 1999 ;Vincken et al., 2003). Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως σε περιβλήματα σπόρων μπιζελιού, σε μήλο, καρπούζι και καρότο, τα μονομερή του γαλακτουρονικού οξέος της HG είναι υποκατεστημένα στον C-3, με ξυλόζη (Renard et al., 1997), ενώ έχει βρεθεί υποκατάσταση με απιόζη στον C-2 ή C-3 (Longland et al 1989).

Αυτά τα δομικά χαρακτηριστικά, και οι σχετικές διαφοροποιήσεις, καθορίζουν τις λειτουργικές ιδιότητες της HG με τρόπο που δεν είναι ακριβώς γνωστός. Η HG είναι η καλύτερα μελετημένη και η πιο εμπορικά αξιοποιημένη πηκτίνη. Κατά συνέπεια, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή της έχουν μελετηθεί εκτενώς.

Η **ραμνογαλακτουρονάνη-I** περιλαμβάνει ένα εξαιρετικά ποικιλόμορφο πληθυσμό πολυμερών. Δομικά χαρακτηρίζεται από μια μακρά ακολουθία εναλλασσόμενων δομικών μονάδων L-ραμνόζης και D-γαλακτουρονικού οξέος

(Voragen et al., 1995). Τα μόρια του γαλακτουρανικού οξέος της RGI μπορεί να είναι ακετυλιωμένα σε ποσοστό που ποικίλλει ανάλογα με την προέλευση της πηκτίνης (Morra et al 2004). Μερικά από τα μόρια ραμνόζης δύναται να είναι συνδεδεμένα με πλευρικές αλυσίδες αραβινάνης ή / και γαλακτάνης.

**Η ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II)** αποτελείται από μία κύρια αλυσίδα περίπου 9 μονάδων γαλακτουρονικού οξέος τα οποία φέρουν τέσσερις πλευρικές αλυσίδες που αποτελούνται από σπάνια σάκχαρα (π.χ. απιόζη, ακερικό οξύ). Η δομή αυτή χρησιμοποιείται στην σύνδεση δύο μορίων πηκτίνης με το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα.

### 3.3 Πηκτινολυτικά ένζυμα

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα ή πηκτινάσες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την αποικοδόμηση της πηκτίνης στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών. Η πηκτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες του φυτικού ιστού (Waldron et al., 2003) και των επεξεργασμένων φυτικών τροφών. Σχεδόν όλες οι πηκτινάσες συντίθενται από μικροοργανισμούς (βακτήρια και μύκητες), ενώ στα φυτά έχει αναφερθεί η παρουσία μόνο ενός μικρού αριθμού αυτών. Η πρόσφατη ανακάλυψη των σχετικών αλληλουχιών γονιδίων μπορεί να δείξει την παρουσία αλληλουχιών που κωδικοποιούν πηκτινάσες στο γονιδίωμα διαφόρων φυτών. Υδρολύοντας την πηκτίνη, οι πηκτινάσες παίζουν πολλαπλό ρόλο στη φυσιολογία των κυττάρων, την ανάπτυξη τους, την ενδοκυτταρική συγκόλληση και το διαχωρισμό, καθώς και στην ωρίμανση και είναι υπεύθυνα για τις μεταβολές που παρατηρούνται κατά την αποθήκευση των φρούτων και λαχανικών μετά τη συγκομιδή τους. Τα πηκτινολυτικά ένζυμα, μαζί με άλλα ένζυμα αποικοδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, έχουν βρει εφαρμογές σε βιομηχανίες τροφίμων καθώς και σε φαρμακευτικές βιομηχανίες. Στη βιομηχανία τροφίμων, οι πηκτινάσες χρησιμοποιούνται στην εκχύλιση χυμών φρούτων και λαχανικών και την αύξηση της απόδοσης της, τον έλεγχο της σταθερότητας του αιωρήματος σε χυμούς, την ενζυματική αποφλοιώση των φρούτων, τον έλεγχο των ρεολογικών ιδιοτήτων σε πουρέ και πάστες, την επεξεργασία της υφής φρούτων και λαχανικών, την παραγωγή κρασιού, την εκχύλιση χρωστικών ουσιών κλπ.

Λόγω της εκλεκτικότητας του υποστρώματος και του μηχανισμού δράσης, υπάρχουν πολλές διαφορετικές ταξινομήσεις των πηκτινολυτικών ενζύμων. Σε γενικές γραμμές μπορούν να χωριστούν ανάλογα με το είδος του πηκτινικού πολυμερούς που ενεργούν: ομογαλακτουρονάνη, ραμνογαλακτουρονάνη ή πλευρικές αλυσίδες αραβινάνης και (αραβινο)γαλακτάνης. (πίνακας 3.2)

**Πίνακας 3.2: Πηκτινάσες που δρουν σε υπόστρωμα ομογαλακτουρονάνης ή ραμνογαλακτουρονάνης)**

Enzyme	EC No.	Cazy Family	Substrate	Mechanism	Products
Homogalacturonan Pectinmethylesterase	3.1.1.11	8	pectin	hydrolysis	pectic acid + methanol
Polygalacturonase (PG)					
Endo-PG	3.2.1.15	28	pectic acid	hydrolysis	oligogalacturonides
Exo-PG	3.2.1.67	28	pectic acid	hydrolysis	monogalacturonides
Pectin lyase	4.2.2.10	1	pectin	$\beta$ -elimination	unsaturated galacturonides
Pectate lyase (PL)					
Endo-PL	4.2.2.2	1,9,10	pectic acid	$\beta$ -elimination	unsaturated galacturonides
Exo-PL	4.2.2.9	1,9	pectic acid	$\beta$ -elimination	unsaturated galacturonides
Rhamnogalacturonan					
Rhamnogalacturonase	3.2.1.-	28	pectin	hydrolysis	$\alpha$ -(1,2)linked L-Rha, $\alpha$ -(1,4) linked D-Gal
Rhamnogalacturonan acetyl esterase	3.1.1.-	12	pectin	hydrolysis	pectin + acetic acid
Arabinanase					
$\alpha$ -L-arabino-furanosidase	3.2.1.55	54	arabinans	hydrolysis	$\alpha$ -L-arabinose
Endo arabinanase	3.2.1.99	43	(1,5)- $\alpha$ -arabinans	hydrolysis	arabinose+higher oligosaccharides
$\beta$ -D-galactanase	3.2.1.89	53	galactans	hydrolysis	$\beta$ -D-galactose

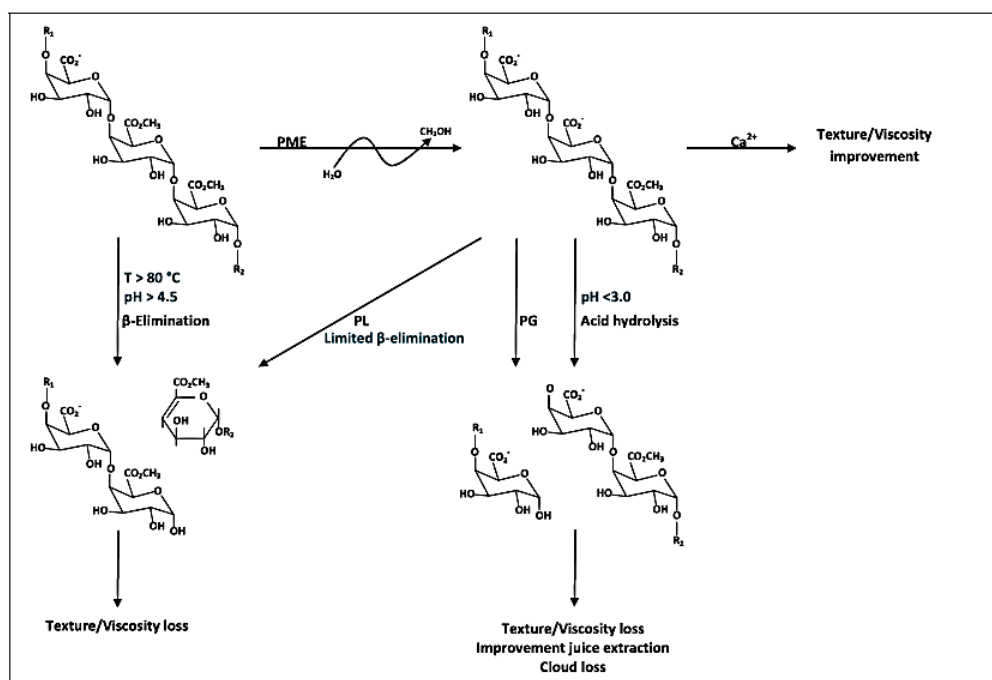
(Duvetter et al., 2009)

### 3.3.1 Κατηγορίες πηκτινολυτικών ενζύμων

Όσον αφορά τον τύπο του δεσμού που διασπούν, τα πηκτινολυτικά ένζυμα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- 1. Εστεράσες:** οι εστεράσες υδρολύουν τις εστερομάδες της κύριας αλυσίδας της πηκτίνης. Έχουν περιγραφεί τρία είδη εστερασών: οι πηκτινομεθυλεστεράσες (ΠΜΕ) οι οποίες υδρολύουν τους μεθυλεστερικούς δεσμούς από το Ο6 των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος στο τμήμα ομογαλακτουρονάνης, οι πηκτινακετυλεστεράσες (ΡΑΕ) και οι ακετυλεστεράσες της ραμνογαλακτουρονάνης, οι οποίες υδρολύουν τον εστερικό δεσμό των ακετυλομάδων στα Ο3 και Ο4 των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος είτε στο τμήμα ομογαλακτουρονάνης είτε ραμνογαλακτουρονάνης αντίστοιχα.

2. **Υδρολάσες:** Τα ένζυμα αυτά διασπούν με υδρόλυση τους γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ μονάδων μονοσακχαριτών, είναι δηλαδή ένζυμα αποπολυμερισμού των πολυσακχαριτών. Το κυριότερο ένζυμο της κατηγορίας αυτής είναι η πολυγαλακτουρονάση (PG) η οποία υδρολύει  $\alpha$ -(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ μονάδων γαλακτουρονικού οξέος. Η πολυγαλακτουρονάση διακρίνεται σε ενδο- και εξω-πολυγαλακτουρονάση, όπου η μεν πρώτη υδρολύει την πολυγαλακτουρονάνη σε τυχαίες θέσεις, η δε δεύτερη δρα στο μη αναγωγικό άκρο του πολυσακχαρίτη απελευθερώνοντας μονομερή γαλακτουρονικού οξέος.
3. **Λυάσες:** οι λυάσες είναι και αυτές ένζυμα αποπολυμερισμού των πολυσακχαριτών όπως και οι υδρολάσες. Αποπολυμερίζουν την κύρια αλυσίδα πολυγαλακτουρονάνης απελευθερώνοντας 4,5-ακόρεστες ολιγογαλακτουρονάνες. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις πηκτικές λυάσες, οι οποίες δρουν σε πολυμερείς αλυσίδες γαλακτουρονικού οξέος απελευθερώνοντας ακόρεστες ολιγογαλακτουρονάνες, και τις πηκτινικές λυάσες οι οποίες δρουν σε πολυμερείς αλυσίδες γαλακτουρονικού οξέος εστεροποιημένων με μεθανόλη και απελευθερώνουν μεθυλιωμένες 4,5-ακόρεστες ολιγογαλακτουρονάνες. (Benen et al., 2003 ; Voragen et al., 2003)



**Εικόνα 3.1:** Σχηματική παρουσίαση πιθανής μετατροπής της ομογαλακτουρονάνης σε τρόφιμα φυτικής βάσης. PME = pectinmethyl esterase, PG = polygalacturonase, PL = pectate lyase, OMe = methoxy-esters.

### 3.3.2 Εφαρμογές πηκτινολυτικών ενζύμων

Τα πηκτινολυτικά ένζυμα βρίσκουν σήμερα ποικίλες εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων. Μερικές από αυτές συνοψίζονται παρακάτω.

**1. Χρήση σε χυμούς φρούτων:** Όξινα πηκτινολυτικά ένζυμα που προέρχονται κατά βάση από μύκητες, ιδίως από *Aspergillus niger*, χρησιμοποιούνται συχνά στις βιομηχανίες χυμών φρούτων. Οι χυμοί που παράγονται από αυτές τις βιομηχανίες στο εμπόριο περιλαμβάνουν: (Α) διαυγείς ανθρακούχους χυμούς, (μήλο, αχλάδι και σταφύλι) και (Β) χυμούς με αιώρημα (χυμοί εσπεριδοειδών, δαμάσκηνου, ντομάτας και νέκταρ). Ο σκοπός της προσθήκης ενζύμων σε αυτές τις δύο περιπτώσεις χυμών φρούτων και λαχανικών διαφέρει.

Στην περίπτωση των διαυγών χυμών (π.χ μήλου και σταφυλιού) η προσθήκη των πηκτινολυτικών ενζύμων γίνεται με σκοπό να αυξηθεί η απόδοση κατά τη συμπίεση και να απομακρυνθούν τα αιωρούμενα συστατικά που προκαλούν τη θολότητα ώστε να προκύψουν διαυγείς χυμοί (χωρίς αιώρημα). Κατά την επεξεργασία του χυμού μήλου τα κυριότερα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι πηκτινάσες που αποπολυμερίζουν πηκτίνες υψηλού βαθμού εστεροποίησης. Η διαύγαση επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH, το χρόνο επεξεργασίας και τη συγκέντρωση ενζύμου. Ένας χυμός με χαμηλό pH θα διαυγαστεί πιο εύκολα από έναν με ένα υψηλότερο pH, και καθώς η θερμοκρασία αυξάνει και ο ρυθμός της διαύγασης, όσο βέβαια η θερμοκρασία παραμένει κάτω από την θερμοκρασία μετουσίωσης του ενζύμου (40 - 60 ° C). Μελέτες έχουν δείξει ότι η διαύγαση του χυμού μήλου μπορεί να επιτευχθεί με ένα μίγμα πολυγαλακτουρονάσης και πηκτινομεθυλεστεραάσης. Επίσης σε χυμούς που περιέχουν πηκτίνη υψηλού βαθμού εστεροποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί πηκτινική λύαση (PL).

Στην περίπτωση χυμών εσπεριδοειδών, ο σκοπός της προσθήκης των ενζύμων είναι η διατήρηση της θολότητας τους καθώς αυτή αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο ποιότητας για τους καταναλωτές. (Kashyap et al.,2001)

**2. Χρήση στην οينوποιία:** Τα πηκτινολυτικά ένζυμα βρίσκουν εφαρμογή και στην οينوποιία. Χρησιμοποιούνται κυρίως για να μειώσουν τη θολότητα ή τη ζελατινοποίηση του χυμού σταφυλιού σε διάφορα στάδια της παραγωγής κρασιού. Τα ένζυμα αυτά μπορούν να προστεθούν είτε στο αρχικό στάδιο όπου τα σταφύλια συνθλίβονται, είτε στο ενδιάμεσο στάδιο πριν ή μετά τη ζύμωση του μούστου ή και

κατά το τελικό στάδιο που η ζύμωση του γλεύκους έχει ολοκληρωθεί και το κρασί είναι έτοιμο για μεταφορά και εμφιάλωση. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης των ενζύμων αυτών στην οινοποιία συνοψίζονται ως εξής: καλύτερη εξαγωγή του χυμού, γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη διαύγαση του χυμού και ευκολότερη διήθηση του τελικού προϊόντος. Επιπλέον η χρήση πηκτινολυτικών ενζύμων επιταχύνουν τη διαδικασία παλαίωσης του. ( Nagodawithana & Reed, 1996)

**3. Χρήση στη ζύμωση καφέ και τσαγιού:** Τα πηκτινολυτικά ένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ζύμωση καφέ και τσαγιού. Στη διαδικασία ζύμωσης του καφέ τα πηκτινολυτικά ένζυμα χρησιμοποιούνται για την αφαίρεση της γλοιώδους πούλπας από τους κόκκους του καφέ σε συνδυασμό με άλλα ένζυμα. Η πούλπα αυτή αποτελείται από πηκτινικά υποστρώματα και η απομάκρυνσή της καθιστά δυνατό το διαχωρισμό των κόκκων.

Στη περίπτωση του τσαγιού πηκτινάσες από μύκητες χρησιμοποιούνται για να επιταχύνουν τη ζύμωση του, αν και η δόση ενζύμου πρέπει να ρυθμίζεται προσεκτικά για να μην προκληθεί ζημιά στα φύλλα τσαγιού. Επίσης, η προσθήκη πηκτινάσης βελτιώνει την ιδιότητα σχηματισμού αφρού του στιγμιαίου τσαγιού σε σκόνη, αφού καταστρέφει τις πηκτίνες του τσαγιού. (Kashyap et al., 2001)

**4. Χρήση στην εκχύλιση ελαίων:** Τα έλαια από σπόρους ελαιοκράμβης, καρύδα, ηλιόσπορους, φοίνικα και ελιές παράγονται με εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Ο συνηθέστερος διαλύτης που χρησιμοποιείται είναι το εξάνιο, το οποίο είναι ένα δυνητικά καρκινογόνο. Ένζυμα αποδόμησης του κυτταρικού τοιχώματος, συμπεριλαμβανομένων και πηκτινασών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή φυτικού ελαίου σε μια διαδικασία ρευστοποίησης των δομικών συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος του ελαιούχου σπόρου. Πρόσφατα, η μέθοδος αυτή έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται στην παρασκευή ελαιολάδου. Τα ένζυμα προστίθενται κατά την άλεση των ελιών, έτσι το έλαιο απελευθερώνεται εύκολα στις επακόλουθες τεχνικές διαχωρισμού. Η χρήση του ενζύμου ως εκ τούτου, προκαλεί μια αύξηση στην απόδοση του ελαιολάδου, η οποία εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, και τη δοσολογία του χρησιμοποιούμενου ενζύμου.

**5. Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί η εφαρμογή των πηκτινολυτικών ενζύμων στο χαλάρωμα υφάνσιμων ινών, στην κατεργασία για την αφαίρεση μαλλιού ορισμένων δερμάτων και στην παραγωγή χαρτιού.** (Kashyap et al., 2001)



### 3.4 Πηκτινομεθυλεστεράση (ΠΜΕ)

Οι πηκτινομεθυλεστεράσες καταλύουν την υδρόλυση των μεθυλεστερικών ομάδων, προκαλώντας έτσι την αποεστεροποίηση της πηκτίνης, δίνοντας ως προϊόντα όξινη πηκτίνη μικρότερου βαθμού εστεροποίησης και μεθανόλη. Συναντώνται σε διάφορους ιστούς και ανήκουν στα ένζυμα του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Αν και ο ακριβής ρόλος τους δεν είναι ξεκάθαρος, το γεγονός ότι απομεθοξυλιώνουν την πηκτίνη οδηγεί στο συμπέρασμα ότι λαμβάνουν μέρος στις τροποποιήσεις της πηκτίνης. (Benen et al., 2003)

Η αντίδραση που καταλύεται από την ΠΜΕ παρουσιάζεται παρακάτω:



Η ΠΜΕ έχει ήδη απομονωθεί και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της έχουν ερευνηθεί σε διάφορα φυτά όπως το μήλο, η μπανάνα, το καρότο, η πράσινη πιπεριά, το λεμόνι, το πορτοκαλί, η παπάγια, το ροδάκινο, ο λωτός, τα δαμάσκηνα, η φράουλα, το κεράσι, και η ντομάτα μεταξύ άλλων. Ο έλεγχος της δράσης της ΠΜΕ είναι ιδιαίτερα σημαντικός διότι αποσταθεροποιεί της πηκτινικές ουσίες σε χυμούς φρούτων και τροποποιεί την υφή φρούτων και λαχανικών. Ακόμη η μερικά αποεστρεοποιημένη πηκτίνη μπορεί να αποπολυμεριστεί από την πολυγαλακτουρονάση (ΠΓ) και η δράση αυτή μειώνει τη συνοχή στα λαχανικά. (Van de Broeck et al., 2000)

Πέρα από τα φυτά, οι ΠΜΕ παράγονται και από διάφορα βακτήρια και μύκητες. Ειδικά τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στην τεχνολογία τροφίμων προέρχονται από τον *Aspergillus niger*. Οι μικροβιακές ΠΜΕ έχουν διαφορές από τις φυτικές στο ότι απομεθοξυλιώνουν την πηκτίνη με τυχαίο τρόπο και είναι πιο θερμοευαίσθητες (Benen et al., 2003). Τέλος έχει βρεθεί ΠΜΕ σε μερικές ζύμες καθώς και σε έντομα (π.χ. rice weevil και greenbug).

#### 3.4.1 Βιοφυσικές ιδιότητες της ΠΜΕ

Σε γενικές γραμμές, η μοριακή μάζα των πηκτινομεθυλεστερασών κυμαίνεται από 25 έως 54 kDa. Πολλές ΠΜΕ από ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι γλυκοπρωτεΐνες ενώ έχει αναφερθεί ότι η βακτηριακής προέλευσης ΠΜΕ από τον *Erwinia chrysanthemi* είναι λιποπρωτεΐνη. Τα ισοηλεκτρικά σημεία των ΠΜΕ

ποικίλλουν από 3.1 για ΠΜΕ μυκητικής προέλευσης έως 11 για ΠΜΕ τομάτας. Οι περισσότερες από τις απομονωμένες πηκτινομεθυλεστεράσες φυτών έχουν ουδέτερα ή αλκαλικά ισοηλεκτρικά σημεία, με εξαίρεση μερικά όξινα. Οι ΠΜΕ φαίνεται να είναι πολύ ευαίσθητες στο ιοντικό τους περιβάλλον. Οι περισσότερες ΠΜΕ φυτών παρουσιάζουν βέλτιστο pH μεταξύ 6 και 8, ενώ οι ΠΜΕ μικροβιακής προέλευσης μεταξύ 4 και 9. Η θερμοσταθερότητα είναι μέτρια (40-70°C) και είναι υψηλότερη για ΠΜΕ φυτικής προέλευσης. (Benen et al., 2003; Bordenave 1996)

Έχει βρεθεί ότι οι ΠΜΕ μπορεί να περιέχονται σε διάφορες μορφές (ισοένζυμα) ακόμη και στο ίδιο φυτό. Τα διάφορα ισοένζυμα μπορεί να διαφέρουν στη δραστικότητα, τη δομή, το μοριακό βάρος, το ισοηλεκτρικό σημείο καθώς και στην ανθεκτικότητα στη θερμική καταστροφή.

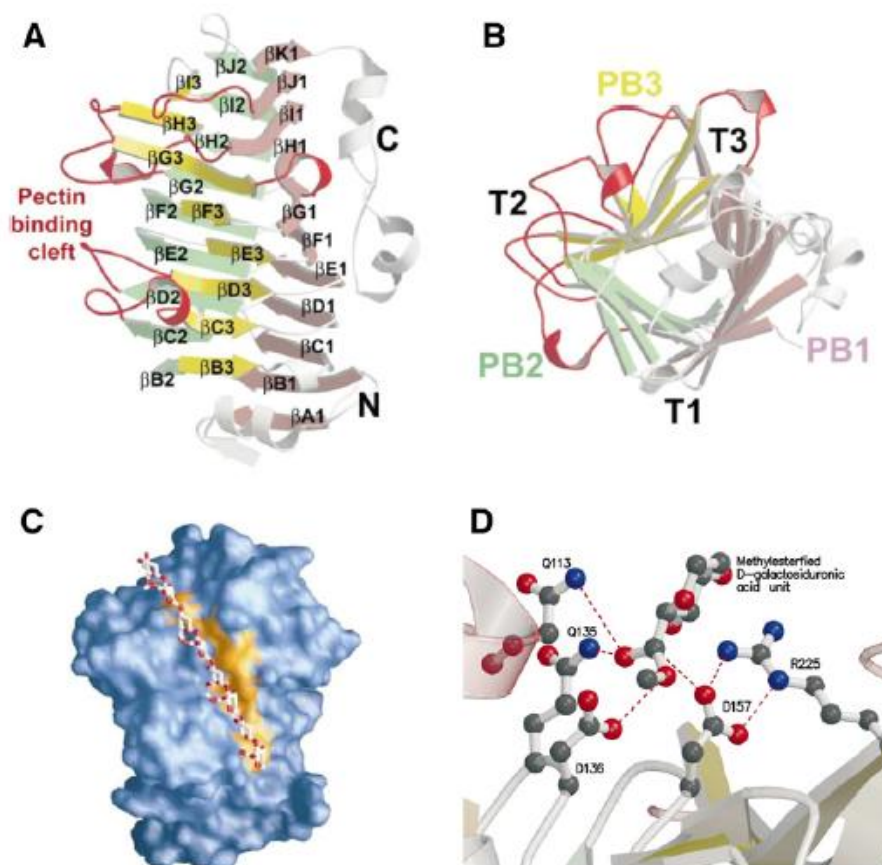
**Πίνακας 3.3: Βιοφυσικές ιδιότητες φυτικών ΠΜΕ (Duvetter et al., 2009)**

PME type	Molar mass (kDa)	pI	Optimum temp (°C)	Optimum pH	Reference
Banana	30.0	8.8 to 8.9	nd	6.0 to 7.0	Brady 1976
Banana	38.0, 45.0	8.9, 8.2, 7.0	55 to 75	6.0 to 8.0	Ly Nguyen and others 2002a
Banana	38.1, 41.1	8.9, 8.2, 7.0	63 to 64	6.9 to 7.0	Ly Nguyen and others 2003a
Carrot	34.5, 44.0	>9.0	48 to 50	7.3 to 7.4	Ly Nguyen and others 2003b
Carrot	25.0	>8.66	nd	7.4	Alonso and others 2003
Carrot	32.0	>9.3	50	8.0	Sila and others 2007
Orange	36.2	10.05	nd	7.6	Versteeg and others 1978
Lemon (peel)	35.0	>11	70	5 to 9	MacDonald and others 1993
Lemon (endocarp)	35.0	8.8	67	5 to 9	MacDonald and others 1993
Pepper	33.0, 37.0	6.0 to > 9.3	52.5 to 55	7.5	Castro and others 2004
Persimmon	51.0	8.4	nd	7.4	Alonso and others 1997
Persimmon	30.0	6.9	nd	6.9	Alonso and others 1997
Plums	31.0	6.8, 7.0	65	7.5	Nunes and others 2006
Strawberry	33.5, 43	>9.0	59 to 60	6.9 to 7.0	Ly Nguyen and others 2002c
Tomato	35.0	>9.3	-	5 to 10	Giovane and others 1994
Tomato	33.6	>9.3	55	8.0	Fachin and others 2002

### 3.4.2 Η δομή της ΠΜΕ

Μέχρι σήμερα, έχει προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή της ΠΜΕ του βακτηρίου *Erwinia chrysanthemi*, του καρότου και της ντομάτας. Και τα τρία αυτά ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα στη συνολική αναδίπλωση, που χαρακτηρίζεται από μία δεξιόστροφη παράλληλη β-έλικα που αποτελείται από τρία παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα (PB1, PB2 και PB3), με βρόχους διασύνδεσης (T1, T2 και T3), που προεξέχουν από τον πυρήνα της έλικας (εικόνα 3.2.A και B). Ο χώρος στο εσωτερικό της δομής της β-έλικας είναι ουσιαστικά υδρόφοβος. Η θέση σύνδεσης με την πηκτίνη βρίσκεται σε μία μεγάλη ρηχή σχισμή κατά μήκος του μορίου που σχηματίζεται από τους εξωτερικούς βρόχους. Στο κεντρικό τμήμα της σχισμής αυτής

είναι συνδεδεμένες διάφορες αρωματικές ομάδες (Tyr, Phe, Trp), χαρακτηριστικές δομών που προσδένονται σε υδατάνθρακες. Το ενεργό κέντρο (που απεικονίζεται στο σχήμα.3.1.D) βρίσκεται στη σχισμή (για το φύλλο PB3) και αποτελείται από δύο ασπαρτικά (θέσεις D136, D157), δύο γλουταμίνες (Q113, Q135) και μία αργινίνη (R225).



Εικόνα 3.2: Τρισδιάστατη απεικόνιση ΠΜΕ καρότου ( Jolie et al., 2010)

### 3.4.3 Καταλυτική δράση

Με βάση τη δομή που εξετάστηκε προτείνεται ο μηχανισμός δράσης της ΠΜΕ. Το αρνητικά φορτισμένο καρβοξύλιο του ασπαρτικού οξέος (Asp) του δραστικού κέντρου, το οποίο σταθεροποιείται με ένα δεσμό υδρογόνου από την αργινίνη, εκτελεί μια πυρηνόφιλη επίθεση στον άνθρακα του καρβονυλίου του μεθυλ-εστέρα της ομογαλακτουράνης (HG). Έτσι, ένα τετραεδρικό, αρνητικά

φορτισμένο ενδιάμεσο σχηματίζεται, που σταθεροποιείται με μία ή δύο αλυσίδες γλουταμίνης. Στη συνέχεια, το δεύτερο ασπαρτικό ενεργεί ως δότης πρωτονίων και απελευθερώνεται μεθανόλη. Η ενεργός θέση αποκαθίσταται με το ασπαρτικό να αποσπά ένα πρωτόνιο από ένα μόριο νερού, ενώ διάσπεται ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του υποστρώματος και του πρώτου ασπαρτικού. Η αλυσίδα της ομογαλακτουρονάνης συγκρατείται στην σχισμή του ενζύμου μέσω αλληλεπιδράσεων με τις αρωματικές ομάδες, περιμένοντας το επόμενο βήμα απομεθοξυλίωσης.

#### 3.4.4 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα της ΠΜΕ

Σε ατμοσφαιρική πίεση, η θερμική σταθερότητα και η κινητική απενεργοποίησης της ΠΜΕ έχουν μελετηθεί εκτενώς. Κάθε τύπος ΠΜΕ, ανάλογα με τη βιολογική προέλευση και το ισοένζυμο χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη θερμοκρασιακή σταθερότητα. Για παράδειγμα, η ΠΜΕ μπανάνας είναι θερμικά σταθερότερη σε σύγκριση με ΠΜΕ από πορτοκάλι, τομάτα, καρότο, φράουλα, και μήλο (Ly Nguyen et al., 2002a, 2002b, 2002c). Σε γενικές γραμμές, οι περισσότεροι τύποι ΠΜΕ είναι μάλλον θερμο-ασταθείς, και αδρανοποιούνται εύκολα σε θερμοκρασίες κάτω των 70°C. Το θερμο-ευαίσθητο κλάσμα της ΠΜΕ του λωτού χάνει το 20% της αρχικής της ενεργότητας σε 70°C σε 5 min ενώ το θερμο-σταθερό κλάσμα χάνει την ίδια ενεργότητα σε 80°C σε 5 λεπτά (Alonso et al., 1997). Οποιαδήποτε απόκλιση από τις συνθήκες βέλτιστης σταθερότητας οδηγεί σε αυξημένη απενεργοποίηση. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει το ποσοστό της θερμικής αδρανοποίησης (Ly Nguyen et al., 2002; Balogh et al., 2004). Στα διάφορα συστήματα (ρυθμιστικό διάλυμα, χυμός) η αδρανοποίηση της ΠΜΕ ακολουθεί συχνά κινητική πρώτης τάξεως, ωστόσο, έχουν αναφερθεί και άλλα μοντέλα αδρανοποίησης. Το διφασικό μοντέλο σημαίνει την συνύπαρξη τουλάχιστον δύο ισοενζύμων ΠΜΕ, ένα θερμο-ανθεκτικό και ένα θερμο-ευαίσθητο. Στην περίπτωση των κλασματικών μοντέλων μετατροπής, εφαρμόζεται πρώτης τάξης αδρανοποίηση λαμβάνοντας υπόψη μια μη μηδενική υπολειμματική ενεργότητα μετά από παρατεταμένη θέρμανση. Η εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας είτε το μοντέλο Arrhenius (τιμές  $E_a$ ) ή την έννοια του χρόνου θερμικού θανάτου (τιμές  $Z$ ). Η προσθήκη

σακχάρων και πολυολών αυξάνει τη θερμική σταθερότητα της ΠΜΕ (Guiavarch et al 2003 ; Plaza et al 2008).

Σε μία έρευνα μελετήθηκε η κινητική απενεργοποίησης της ΠΜΕ σε αναψυκτικό με βάση τον πορτοκαλοχυμό και το γάλα που επεξεργάστηκε σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 65 έως 80°C. Με χρήση του κλασματικού μοντέλου, οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης (k) βρέθηκαν 0,0085 , 0,166 , 1,538 και 6,29min<sup>-1</sup> για απενεργοποίηση στους 65 , 70 , 72,5 και 80°C αντίστοιχα. Η ενέργεια ενεργοποίησης υπολογίστηκε ίση με 528.233 (kJ/mol) (Sampedro et al., 2008).

Σε παλαιότερη έρευνα μελετήθηκαν οι τιμές k για την απενεργοποίηση της ΠΜΕ σε λιγότερο πολύπλοκα συστήματα. Πραγματοποιήθηκε απενεργοποίηση της ΠΜΕ από πορτοκαλοχυμό Navel και οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης (k) στους 60°C βρέθηκαν 0,889 , 1,536 , 0,288 και 0,234min σε απιονισμένο νερό και σε κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 3.2 , 3.7 και 4.2 αντίστοιχα. Η τιμή της ενέργειας ενεργοποίησης E<sub>a</sub> κυμάνθηκε από 404.9 έως 292.6 kJ/mol (Van den Broeck et al., 1999).

Η μικροβιακής προέλευσης ΠΜΕ είναι πολύ πιο ευαίσθητη στη θέρμανση και εμφανίζει σημαντική μείωση της δραστηριότητας από τους 30°C, ενώ για χαμηλότερες θερμοκρασίες έχει περίπου το ίδιο Q<sub>10</sub> με την ΠΜΕ φυτικής προέλευσης. Γενικά μπορεί να απενεργοποιηθεί σε θερμοκρασίες που αφήνουν ανεπηρέαστες ΠΜΕ από τομάτα (Hulme et al., 1971).

### 3.5 Απώλεια θολότητας στους χυμούς

Οι χυμοί φρούτων και τα φρουτοποτά γενικά πωλούνται είτε διαυγασμένα (χυμός μήλου) ή ως θολά προϊόντα μεταβλητής πυκνότητας (χυμός πορτοκαλιού). Ο μηχανισμός που εξηγεί γιατί ορισμένα από αυτά τα εκχυλίσματα παραμένουν θολά, ενώ άλλα διαυγάζονται αυθόρμητα δεν είναι απόλυτα κατανοημένος. Η σταθερότητα του αιωρήματος είναι ένα βασικό οπτικό ποιοτικό χαρακτηριστικό που επηρεάζει σημαντικά την αποδοχή των καταναλωτών.(Cameron et al., 1998; Beveridge 2002). Τα σωματίδια του αιωρήματος προσδίδουν το χαρακτηριστικό άρωμα, το χρώμα, και την αίσθηση στο στόμα. Υποτίθεται ότι τα αιωρήματα περιέχουν ένα θετικά φορτισμένο πυρήνα πρωτεΐνης που περιβάλλεται από ένα κέλυφος υδατανθράκων

που αποτελείται μεταξύ άλλων και από αρνητικά φορτισμένη πηκτίνη (Endo 1965). Η αποπηκτινοποίηση εν μέρει μπορεί να υποβαθμίσει το πολυμερές αφήνοντας εκτεθειμένο τον εσωτερικό πυρήνα πρωτεΐνης που οδηγείται σε συσσωμάτωση μεταξύ πολυκατιόντων και πολυανιόντων με αποτέλεσμα την κολλοειδή κροκίδωση (Beveridge 1997).

Η απώλεια θολότητας είναι ένα σημαντικό ελάττωμα που σχετίζεται λοιπόν με την ενζυματική καθίζηση του αιωρήματος σε χυμούς, μια διαδοχική διαδικασία που ξεκινά με την απομεθυλίωση της πηκτίνης που περιβάλλει τα σωματίδια του αιωρήματος από την πηκτινομεθυλεστεράση (Cameron et al., 1998 ). Έτσι τα σωματίδια του αιωρήματος καθίστανται αρνητικά φορτισμένα. Οι καρβοξυλικές ομάδες που προκύπτουν είναι εκτεθειμένες σε δισθενή μεταλλικά κατιόντα, όπως  $Ca^{++}$ , τα οποία αντιδρούν με αυτές διασταυρώνοντας τα σωματίδια μεταξύ τους. Αυτό δημιουργεί συσσωματώματα μεγάλης μοριακής μάζας τα οποία δεν μπορούν να παραμείνουν εν αιωρήσει και καθιζάνουν. (Termote et al., 1977) .

### 3.5.1 Αντιμετώπιση της απώλειας θολότητας

Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί πέντε τεχνολογικές προσεγγίσεις για την αντιμετώπιση της απώλειας θολότητας:

(1) Αποικοδόμηση του υποστρώματος της ΠΜΕ με ένζυμα αποπολυμερισμού όπως πολυγαλακτουρονάση και η πηκτική λυάση με αποτέλεσμα να εμποδίζεται η επαγόμενη από την ΠΜΕ καθίζηση ( Kropps and Pilnik 1974) . Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η υπερβολική απώλεια ιξώδους σε υψηλού ιξώδους προϊόντα.

(2) Παρεμπόδιση της δράσης της ΠΜΕ με τη χρήση κατάλληλων ενώσεων που λειτουργούν ως αναστολείς. Για παράδειγμα τα υδρολυμένα πηκτικά οξέα (pectic acid hydrolysates) ανταγωνίζονται τα μόρια πηκτίνης ως υπόστρωμα για τη δράση ΠΜΕ ( Termote et al., 1977) . Επίσης έχει βρεθεί ένας πρωτεϊνικός παρεμποδιστής της ΠΜΕ, προερχόμενος από το ακτινίδιο , που επιτρέπει την εφαρμογή του για την σταθεροποίηση του αιωρήματος του χυμού πορτοκαλιού. Αυτός ο παρεμποδιστής χαρακτηρίζεται από μια μονή αλυσίδα γλυκοπρωτεΐνης, έχει εφαρμογή μόνο στην ΠΜΕ, ανεξάρτητα από την προέλευσή της αφού έχει βρεθεί ότι μπορεί να ασκεί

παρεμποδιστική δράση στην ΠΜΕ από διάφορες πηγές όπως πορτοκάλι, μήλο, μπανάνα, τομάτα και πατάτα (Balestrieri et al., 1990).

(3) Θερμική απενεργοποίηση της ΠΜΕ. Αυτή αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την απενεργοποίηση της πηκτινομεθυλεστεράσης αλλά έχει σημαντική επίδραση στα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου.

(4) Απενεργοποίηση της ΠΜΕ με εφαρμογή συνδυασμού υψηλής πίεσης -ήπιας θερμοκρασίας, έτσι ώστε οι θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες να επηρεάζονται ελάχιστα (Katsaros et al 2006, Katsaros et al., 2010,. Boulekou , Katsaros & Taoukis 2008). Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που αποδεικνύουν την δυνατότητα εφαρμογής της υπερυψηλής πίεσης για την απενεργοποίηση της ΠΜΕ και τη σταθεροποίηση του αιωρήματος του πορτοκαλοχυμού.

(5) Χρήση συνθετικών ή / και φυσικών παραγόντων θόλωσης, με τα τελευταία να προτιμώνται περισσότερο





## 4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

### 4.1 Θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας

Οι θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας είναι οι πιο διαδεδομένες στη βιομηχανία τροφίμων και πραγματοποιούνται με σκοπό την καταστροφή των μικροοργανισμών ή/και την αδρανοποίηση των ενζύμων που υπάρχουν στα τρόφιμα με απώτερο σκοπό την αύξηση ζωής του τροφίμου και την εμπορική του εκμετάλλευση. Ο σχεδιασμός τους είναι σχετικά απλός, χρησιμοποιούν απλό και ευρέως διαθέσιμο εξοπλισμό με χαμηλό πάγιο κόστος και τα αποτελέσματά τους είναι εγγυημένα. Επίσης, τα κινητικά μοντέλα καταστροφής μικροοργανισμών δεν είναι σύνθετα και ως αποτέλεσμα οι θερμικές διεργασίες μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν στην καταστροφή οποιουδήποτε επιθυμητού μικροοργανισμού. Βασικά τους μειονεκτήματα ωστόσο είναι η μεγάλη τους ενεργειακή κατανάλωση και σε αρκετές περιπτώσεις η αλλοίωση των οργανοληπτικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, ο ρυθμός της οποίας αυξάνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας. Έτσι είναι σημαντικό να επιλέγονται εκείνες οι συνθήκες που θα δίνουν ένα σταθερό προϊόν με τη μικρότερη δυνατή υποβάθμιση της ποιότητάς του

#### 4.1.1 Παστερίωση και αποστείρωση

Η παστερίωση είναι ίσως η πιο καλά μελετημένη και διαδεδομένη θερμική διεργασία επεξεργασίας τροφίμων. Εφαρμόζεται σε υγρά τρόφιμα, τα οποία θερμαίνονται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 100°C με σκοπό την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών (κυρίως σε τρόφιμα χαμηλής οξύτητας όπως το γάλα) και σε κάποιες περιπτώσεις για την καταστροφή αλλοιογόνων μικροοργανισμών (κυρίως σε όξινα τρόφιμα). Ο βασικός εξοπλισμός της παστερίωσης είναι ένας εναλλάκτης θερμότητας ο οποίος θερμαίνει το υγρό τρόφιμο χρησιμοποιώντας ως μέσο θέρμανσης νερό ή ατμό.

Όταν στο τελικό τρόφιμο δεν πρέπει να υπάρχει κανένας μικροοργανισμός ή σπόριο (μηδενική ανοχή) τότε χρησιμοποιείται η αποστείρωση, η οποία πραγματοποιείται σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία και για ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Έτσι τα αποστειρωμένα τρόφιμα έχουν διάρκεια ζωής πάνω από έξι μήνες

σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Κλασσική διεργασία αποστείρωσης είναι αυτή της αποστείρωσης κονσερβοποιημένων τροφίμων

#### 4.1.2 Μικροκύματα και ραδιοσυχνότητες

Η επεξεργασία με μικροκύματα και ραδιοσυχνότητες (Microwave and Radio Frequency Processing) ενός τροφίμου αναφέρεται στη χρήση ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων συγκεκριμένων συχνοτήτων για την παραγωγή θερμότητας στο τρόφιμο μέσω ενός διηλεκτρικού κι ενός ιοντικού μηχανισμού. Πρόκειται για δύο εναλλακτικές θερμικές μεθόδους, οι οποίες προτιμώνται από την συμβατική θέρμανση, επειδή απαιτείται λιγότερος χρόνος για την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας της διεργασίας. Η θερμική επίδραση είναι πιθανά ο μοναδικός μηχανισμός που προκαλεί τον θάνατο των μικροοργανισμών κατά την εφαρμογή μικροκυμάτων σ' ένα τρόφιμο. Ενώ τα τελευταία 30 χρόνια έχουν αναφερθεί βιομηχανικά συστήματα παστερίωσης και αποστείρωσης τροφίμων με τη χρήση μικροκυμάτων, δεν είναι γνωστή η χρήση εμπορικών συστημάτων θέρμανσης με ραδιοσυχνότητες.

#### 4.1.3 Ωμική θέρμανση

Τα τελευταία χρόνια οι βιομηχανίες έχουν υιοθετήσει τη μέθοδο της ωμικής θέρμανσης. Κατά την ωμική θέρμανση, ρεύμα διέρχεται μέσα από το τρόφιμο και λόγω της ηλεκτρικής του αντίστασης παράγεται εσωτερικά σε αυτό θερμότητα. Το ποσό της παραγόμενης θερμότητας εξαρτάται άμεσα από την ένταση του εισερχόμενου ρεύματος και την ηλεκτρική αγωγιμότητα του τροφίμου. Τα τρόφιμα που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό και άλατα είναι τα πιο κατάλληλα για να επεξεργαστούν με τη μέθοδο της ωμικής θέρμανσης (*Jakob et al, 2010*).

Η παστερίωση με ωμική θέρμανση υπερτερεί έναντι της συμβατικής, γιατί είναι πιο αποτελεσματική όσον αφορά την καταστροφή των μικροβίων και την απενεργοποίηση των ενζύμων και μάλιστα σε πολύ μικρότερο χρόνο. Επιπλέον, λόγω του μικρού χρόνου επεξεργασίας τα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων διατηρούνται σχεδόν αναλλοίωτα παράγοντας καλύτερης ποιότητας προϊόντα. Τέλος, επειδή η παροχή θερμότητας στο τρόφιμο είναι πολύ γρήγορη και ομοιόμορφη, υπάρχει

ενεργειακή οικονομία γεγονός που καθιστά την ωμική θέρμανση μια τεχνολογία αρκετά φιλική προς το περιβάλλον (Darvishi et al, 2012; Jakob et al, 2010).

## 4.2 Εναλλακτικές μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας

Εναλλακτικά των θερμικών επεξεργασιών μπορούν να χρησιμοποιηθούν μη θερμικές τεχνολογίες με σκοπό να αντιμετωπιστούν οι αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών για υψηλότερης ποιότητας επεξεργασμένα τρόφιμα με φρέσκια εμφάνιση, φυσικό άρωμα και γεύση, χωρίς πρόσθετα και συντηρητικά. Η ανάπτυξη λοιπόν νέων μη θερμικών μεθόδων επεξεργασίας που είναι απαλλαγμένες από τα μειονεκτήματα της θερμικής επεξεργασίας και ο συνδυασμός τους με ήδη υπάρχουσες είναι μια συνεχής επιδίωξη της βιομηχανίας με στόχο την παραγωγή υψηλής ποιότητας τροφίμων με χαμηλό κόστος. Δυστυχώς όμως οι νέες τεχνολογίες τείνουν να έχουν πολύ υψηλό κόστος επένδυσης

Οι μέθοδοι μη θερμικής επεξεργασίας τροφίμων μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:

1) Τις παλαιότερες τεχνολογίες οι οποίες ακόμη δεν έχουν βρει βιομηχανική εφαρμογή, παρόλα αυτά όμως παραμένουν στο επίκεντρο της επιστημονικής κοινότητας εξαιτίας λύσεων που μπορούν να δώσουν κατά το σχεδιασμό ή την επεξεργασία νέων τροφίμων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υπέρηχοι υψηλής συχνότητας, η υπεριώδης ακτινοβολία και η ακτινοβόληση.

2) Τις νεότερες τεχνολογίες οι οποίες δεν έχουν βρει μέχρι σήμερα εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων είτε εξαιτίας του επιστημονικού κενού που υπάρχει ακόμα στη διεθνή βιβλιογραφία για την εφαρμογή τους, είτε εξαιτίας της έλλειψης εξοπλισμού-μονάδων βιομηχανικής κλίμακας. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν το κρύο πλάσμα και η πυκνή φάση διοξειδίου του άνθρακα.

3) Τις νεότερες τεχνολογίες οι οποίες τα τελευταία χρόνια έχουν βρει εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων διεθνώς και συνεχώς φαίνεται να αυξάνεται το ενδιαφέρον εταιριών για υιοθέτησή τους στη γραμμή παραγωγής τους. Στη συγκεκριμένη κατηγορία ανήκουν η Υπερυψηλή Πίεση και τα Παλλόμενα Ηλεκτρικά πεδία.

### 4.2.1 Κατάψυξη

Τα κατεψυγμένα τρόφιμα διατηρούνται σε ακόμη χαμηλότερες θερμοκρασίες από ότι στην ψύξη. Κατά την κατάψυξη επιτυγχάνεται η μακροπρόθεσμη αποθήκευση των τροφίμων για αρκετούς μήνες ή ένα έτος. Κατά τη κατάψυξη, η δραστηριότητα των μικροοργανισμών και κατ' επέκταση η αλλοίωση του τροφίμου μειώνεται καθώς σχηματίζεται πάγος στο τρόφιμο με αποτέλεσμα να μειώνεται το διαθέσιμο νερό. Κατά συνέπεια δεν υπάρχει κανένας κίνδυνος για πολλαπλασιασμό και δραστηριοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών.

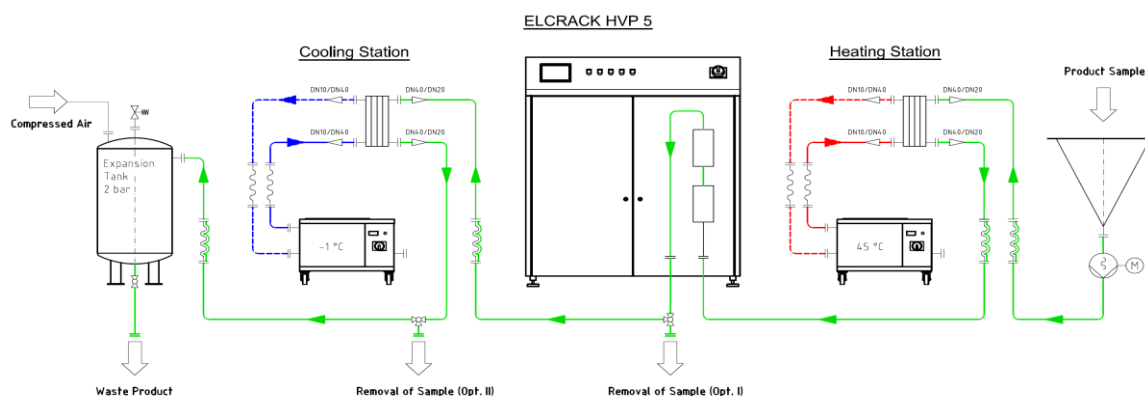
### 4.2.2 Οσμωτική αφυδάτωση

Η οσμωτική αφυδάτωση είναι μία από τις πιο σημαντικές τεχνικές επεξεργασίας για την διατήρηση αφυδατωμένων προϊόντων. Περιλαμβάνει την εμφύσηση των τροφίμων (ψάρια, λαχανικά, φρούτα και κρέας) σε ένα οσμωτικό διάλυμα όπως είναι τα διαλύματα αλάτων, αλκοολών, αμύλου και συμπυκνωμένων σακχάρων, το οποίο αφυδατώνει το τρόφιμο. Σαν οσμωτικοί παράγοντες μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες διαλυμένες ουσίες όπως η φρουκτόζη, το σιρόπι καλαμποκιού, η γλυκόζη, το χλωριούχο νάτριο και η σακχαρόζη. Οι διάφοροι τύποι των οσμωτικών παραγόντων χρησιμοποιούνται ανάλογα με το τελικό προϊόν. Ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και συνδυασμός των διαφόρων διαλυμένων ουσιών. (Azura & Beristai, 2002).

### 4.2.3 Παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία

Η τεχνολογία εφαρμογής παλλόμενων ηλεκτρικών πεδίων (Pulsed electric fields) είναι μια αναδυόμενη μη θερμική τεχνολογία για την συντήρηση των τροφίμων. Περιλαμβάνει την εφαρμογή παλμών ηλεκτρικής τάσης μικρής διάρκειας (1-100  $\mu$ s) και υψηλής τάσης (20-80 kV / cm) σε τρόφιμα που τοποθετούνται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Τα μικροβιακά κύτταρα που εκτίθενται σε τέτοια πεδία οδηγούνται σε διάτρηση της μεμβράνης (ηλεκτροδιάτρηση) και, στην μη αναστρέψιμη περίπτωση, σε αδρανοποίηση ή θάνατο του μικροοργανισμού. Αν και η επεξεργασία του τροφίμου από ένα ηλεκτρικό πεδίο οδηγεί σε αύξηση της θερμοκρασίας που

οφείλεται στην ωμική θέρμανση, η θερμοκρασία της διαδικασίας είναι συνήθως αρκετά χαμηλή για να εκμεταλλεύονται τα πλεονεκτήματα μιας μη-θερμικής τεχνολογίας. Έτσι δεν παρατηρούνται σημαντικές απώλειες στο χρώμα, το άρωμα, τη γεύση και τα θρεπτικά συστατικά των τροφίμων. Βέβαια, η μέθοδος αυτή περιορίζεται σε υγρά τρόφιμα ανθεκτικά σε υψηλά ηλεκτρικά πεδία, με χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα και που δεν περιέχουν ή σχηματίζουν φυσαλίδες. (Toerfl et al., 2007). Η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει μελετηθεί πολύ τα τελευταία χρόνια και τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε βιομηχανίες τροφίμων, χωρίς όμως να έχει τα αναμενόμενα αποτελέσματα όπως η τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης. Στην αγορά υπάρχει πολύ μικρός αριθμός εταιριών που μπορούν να προσφέρουν βιομηχανικό εξοπλισμό Παλλόμενων πεδίων (παράγουν κυρίως εξοπλισμό εργαστηριακής κλίμακας).



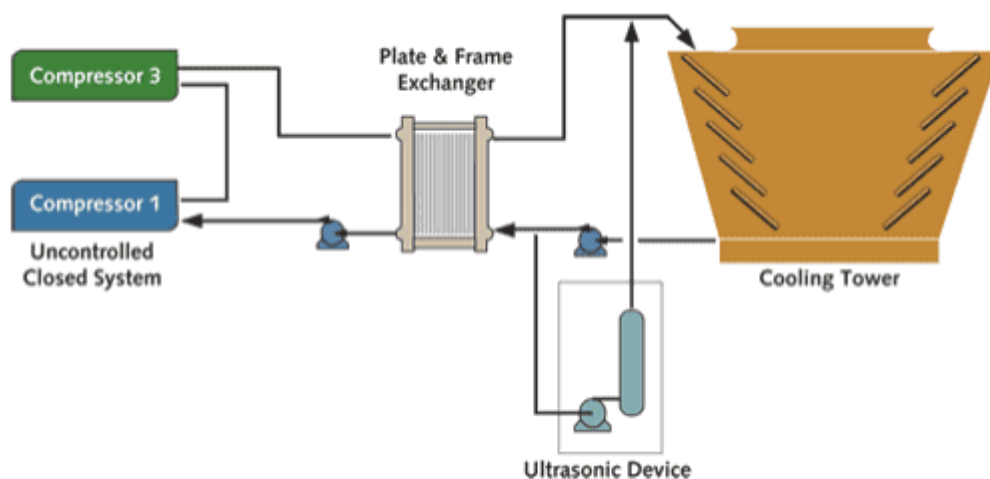
**Εικόνα 4.1** Γραμμή παραγωγής για επεξεργασία τροφίμων σε συνδυασμό με θερμική επεξεργασία όπως χυμοί φρούτων, φρουτοπαρασκευάσματα, μύζα, σάλτσες.

#### 4.2.4 Επεξεργασία με υπέρηχους

Στη βιομηχανία τροφίμων γίνεται χρήση της τεχνολογίας υπέρηχων χαμηλής ( $<1\text{ W/cm}^2$ ) συχνότητας για τη διασφάλιση της ποιότητας και τον προσδιορισμό των φυσικών ιδιοτήτων των τροφίμων. Με χρήση υπέρηχων υψηλής συχνότητας, η διέλευση των ηχητικών κυμάτων μέσω του τροφίμου δεν προκαλεί καμία φυσική ή χημική μεταβολή, ενώ η αλλαγή της κατανομής και η εξασθένηση του ηχητικού κύματος παρέχουν πληροφορίες για το τρόφιμο.

Έχει αρχίσει επίσης να διερευνάται η χρήση υπέρηχων υψηλής ( $100\text{-}1000\text{ W/cm}^2$ ) συχνότητας για την καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών επιβλαβών

μικροοργανισμών και την προώθηση χημικών αντιδράσεων. Ο κύριος μηχανισμός της δράσης των υπερήχων στηρίζεται στην αναγέννηση εκατοντάδων φυσαλίδων μέσα στην υγρή φάση ενός τροφίμου. Όταν τα ηχητικά κύματα περνούν μέσω του υγρού μέσου, δημιουργούνται μία σειρά κύκλων συμπίεσης και εκτόνωσης με επακόλουθη αναγέννηση φυσαλίδων. Οι φυσαλίδες αυτές δημιουργούν φαινόμενα εσωτερικών και εξωτερικών εκρήξεων με σφοδρές συγκρούσεις μεταξύ τους. Εξ' αιτίας των συγκρούσεων αυτών, προκαλείται σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας και της πίεσης σε διάφορα σημεία του μέσου με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση μικροοργανισμών και ενδογενών ενζύμων. Μια υποτιθέμενη διάταξη επεξεργασίας με υπερήχους απεικονίζεται στην Εικόνα .



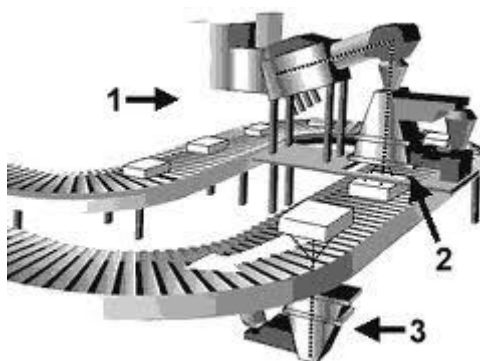
Εικόνα 4.2: Τυπική υποτιθέμενη διάταξη για την επεξεργασία τροφίμων με υπερήχους

#### 4.2.5 Επεξεργασία με ακτινοβολίες

Η τεχνολογία της ακτινοβόλησης χρησιμοποιείται εδώ και αρκετές δεκαετίες. Στο ξεκίνημα της εφαρμογής της υπήρξαν αρκετές διαμάχες μεταξύ των χωρών εξαιτίας της συσχέτισής της με την πυρηνική ενέργεια. Η πηγή της λέξης ‘ακτινοβόληση’ σε μερικές γλώσσες συνδέεται με ουσίες που προκαλούν μεταλλάξεις και καρκίνο. Σε μερικές χώρες η επεξεργασία με ακτινοβόληση είναι γνωστή ως ηλεκτρονιακή ή με ιονισμό παστερίωση. Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιείται αυτή τη στιγμή σε περισσότερες από 40 χώρες. Η ακτινοβολία αποτελεί είδος ενέργειας που

προκαλεί ιονισμό παράγοντας ελεύθερες ρίζες και μπορεί να παραχθεί από τρεις πηγές: ακτίνες- $\gamma$ , ακτίνες-X και από δέσμες ηλεκτρονίων.

Ανάλογα με την ένταση της δόσης η ακτινοβόληση χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες, με την πρώτη να εφαρμόζεται για την παστερίωση των προϊόντων, τη δεύτερη να χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων και την τρίτη για την αποστείρωσή τους.



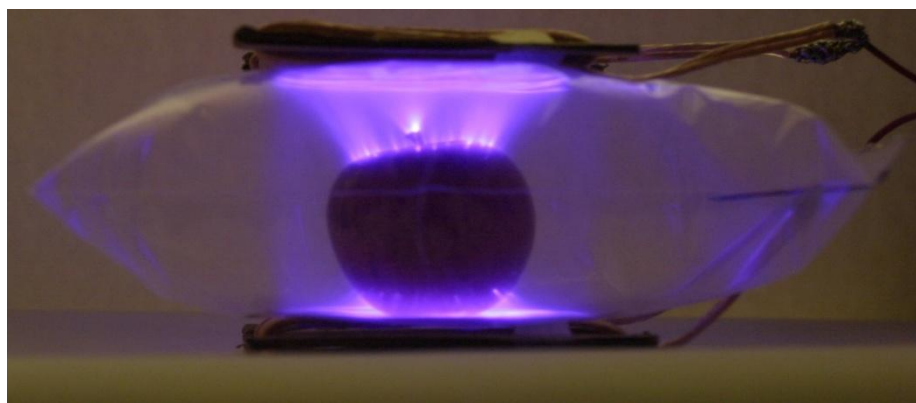
**Εικόνα 4.3** Γραμμή παραγωγής τροφίμων επεξεργασμένων με ακτινοβόληση, όπου 1. παραγωγή ηλεκτρονίων 2. η δέσμη ηλεκτρονίων χτυπάει από πάνω προς τα κάτω το τρόφιμο 3. δεύτερη αντίστοιχη συσκευή χτυπάει τα τρόφιμα από κάτω προς τα επάνω με δέσμη ηλεκτρονίων.

#### 4.2.6 Τεχνολογία παλμικού φωτός

Η τεχνολογία παλμικού φωτός είναι μια μέθοδος για γρήγορη απενεργοποίηση μικροοργανισμών στις επιφάνειες των τροφίμων, τον εξοπλισμό και τα υλικά συσκευασίας. Περιλαμβάνει τη χρήση έντονων και μικρής διάρκειας παλμών του ευρέος φάσματος του "λευκού φωτός". Το φάσμα αυτό περιλαμβάνει μήκη κύματος στο υπεριώδες (UV) έως την εγγύς υπέρυθη περιοχή. Το υλικό προς κατεργασία εκτίθεται σε τουλάχιστον 1 παλμό φωτός που έχει ενεργειακή πυκνότητα από 0,01 έως περίπου 50 J/cm<sup>2</sup> στην επιφάνεια. Η κατανομή των μηκών κύματος είναι τέτοια ώστε τουλάχιστον το 70% της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας να είναι μέσα στην κλίμακα 170-2600nm. Το υλικό που πρόκειται να αποστειρωθεί εκτίθεται σε τουλάχιστον 1 παλμό φωτός) με ένα εύρος χρόνου από 1 μικροδευτερόλεπτο έως 0.1 s (Dunn et al., 1991). Στις περισσότερες εφαρμογές, μερικές λάμψεις παρέχουν ένα υψηλό επίπεδο μικροβιακής αδρανοποίησης.

#### 4.2.7 Κρύο πλάσμα

Το πλάσμα είναι ένα υψηλής ενέργειας αέριο που δημιουργείται όταν ηλεκτρικό ρεύμα διέρχεται μέσω αυτού. Μια γνωστή εφαρμογή αυτής της αρχής είναι οι λαμπτήρες φθορισμού. Μέχρι πρόσφατα, το πλάσμα μπορούσε να δημιουργηθεί μόνο σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες υπό κενό και η χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων ήταν ως εκ τούτου ανέφικτη. Οι τεχνολογικές εξελίξεις των τελευταίων ετών κατέστησαν δυνατή την παραγωγή ψυχρού πλάσματος υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες. Έτσι, είναι τώρα δυνατή η εφαρμογή της τεχνολογίας πλάσματος στη βιομηχανία τροφίμων για την αδρανοποίηση μικροοργανισμών σε κρέατα, πουλερικά, τα φρούτα, και τα λαχανικά. Η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών λαμβάνει χώρα μόνο στην επιφάνεια των τροφίμων. Αρκετά αέρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία του πλάσματος όπως τα ευγενή αέρια και το οξυγόνο. Οι βασικότεροι περιορισμοί για την εφαρμογή της τεχνολογίας ψυχρού πλάσματος είναι το σχετικά πρώιμο στάδιο ανάπτυξης της τεχνολογίας, η ποικιλία και η πολυπλοκότητα του απαραίτητου εξοπλισμού, καθώς και οι σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητες επιπτώσεις της ψυχρής επεξεργασίας πλάσματος στις γευστικές και θρεπτικές ιδιότητες των επεξεργασμένων τροφίμων. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει διαθέσιμος εμπορικός εξοπλισμός για την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας



**Εικόνα 4.4** Επεξεργασία τροφίμων με κρύο πλάσμα με χρήση μονάδας εργαστηριακής κλίμακας

#### 4.2.8 Πυκνή φάση διοξειδίου του άνθρακα

Μία ακόμη νέα τεχνολογία η οποία βρίσκεται υπό έρευνα είναι η χρήση πυκνής φάσης διοξειδίου του άνθρακα. Η τεχνολογία αυτή είναι κατάλληλη για



τρόφιμα υγρής μορφής. Με χρήση διοξειδίου του άνθρακα σε θερμοκρασία δωματίου και με συνδυασμό πιέσεων μεταξύ 7-34 MPa επιτυγχάνεται παστερίωση τροφίμων. Ο κύριος μηχανισμός της απενεργοποίησης των κυττάρων σχετίζεται με τη μείωση του pH στο κυτόπλασμα, τη διάρρηξη των κυττάρων και των μεμβρανών, την απενεργοποίηση μερικών σημαντικών ενζύμων για το μεταβολισμό των κυττάρων, καθώς και με μεταβολές κάποιων ενδοκυτταρικών συστατικών.



**Εικόνα 4.5:** Γραμμή παραγωγής τροφίμων με πυκνή φάση διοξειδίου του άνθρακα συνεχούς ροής (βιομηχανικής κλίμακας μονάδα που δεν έχει προς το παρόν διατεθεί σε βιομηχανίες τροφίμων)

#### 4.2.9 Υπερυψηλή Πίεση

Η σημαντικότερη από τις μη θερμικές τεχνολογίες με ευρύ πεδίο εφαρμογών σε τρόφιμα είναι η Υπερυψηλή Πίεση. Η δυνατότητα απενεργοποίησης μικροοργανισμών και ενζύμων και τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την ενσωμάτωσή της στη διαδικασία παραγωγής διαφόρων προϊόντων, έχει αποτελέσει πεδίο τρέχουσας έρευνας σε σημαντικό αριθμό εργαστηρίων και βιομηχανιών. Η αρχή λειτουργίας της συγκεκριμένης τεχνολογίας έγκειται στη διάρρηξη των εξωτερικών τοιχωμάτων μικροοργανισμών εξαιτίας της πολύ μεγάλης πίεσης (πιέσεις από 1000-10000 bar, ανάλογα με την ένταση της επεξεργασίας). Η πίεση που ασκείται στα τρόφιμα είναι υδροστατική με αποτέλεσμα να μην αλλοιώνεται η εμφάνιση του τροφίμου εξαιτίας μηχανικής πίεσης. Για την επίτευξη τέτοιων πιέσεων απαιτείται κατάλληλος εξοπλισμός που περιλαμβάνει την μονάδα παραγωγής της

πίεσης και ένα θάλαμο υπερυψηλής πίεσης στον οποίο εισάγονται τα προς επεξεργασία τρόφιμα. Συνήθως το μέσο μεταφοράς της πίεσης στο τρόφιμο (μέσω της πλήρωσης του δοχείου με υγρό χαμηλής συμπιεστότητας) είναι το νερό.

Την τελευταία δεκαετία έχει ξεκινήσει μια έντονη ερευνητική δραστηριότητα γύρω από τις δυνατότητες εφαρμογής της ΥΠ για την επεξεργασία και την συντήρηση των τροφίμων, τόσο από την επιστημονική κοινότητα, όσο και από τις βιομηχανίες τροφίμων παγκοσμίως. Πρόσφατες ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει τη δυνατότητα που παρέχει η τεχνολογία της ΥΠ για την παραγωγή νέων προϊόντων απαλλαγμένων από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς και ένζυμα, με υψηλή διατροφική αξία, βελτιωμένα ποιοτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά και αυξημένη διατηρησιμότητα. Παράλληλα, μεγάλες προσπάθειες γίνονται από τις διάφορες κατασκευαστικές εταιρίες που ασχολούνται με την τεχνολογία της ΥΠ για την συνεχή βελτίωση του εξοπλισμού και των συστημάτων παραγωγής πίεσης. Σκοπός είναι η κάλυψη όσο το δυνατό περισσότερων από τις απαιτήσεις εφαρμογής της ΥΠ στις βιομηχανίες διαφόρων τροφίμων και η καλύτερη εκμετάλλευση των δυνατοτήτων που προσφέρει η νέα τεχνολογία. Σήμερα, συστήματα ΥΠ χρησιμοποιούνται σε αρκετές βιομηχανίες, ενώ αρκετές μονάδες ΥΠ λειτουργούν σε εργαστήρια και ερευνητικά κέντρα παγκοσμίως

**Πίνακας 4.1: Γενικά χαρακτηριστικά μη θερμικών τεχνολογιών**

Μη θερμική τεχνολογία	Πλεονεκτήματα εφαρμογής της	Μειονεκτήματα εφαρμογής της	Προϊόντα που δύναται να επεξεργασθούν με τη συγκεκριμένη τεχνολογία	Προϊόντα που ήδη κυκλοφορούν στην αγορά παγκοσμίως στα οποία έχει εφαρμοστεί η τεχνολογία
<b>Υπέρηχοι υψηλής συχνότητας</b>	-Απενεργοποίηση μικροοργανισμών και ενζύμων τροφίμων  -Ομογενοποίηση υγρών τροφίμων	-Αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εφαρμογή υπέρηχων με καταστροφή βιταμινών και αλλοίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών  -Εφαρμογή μόνο σε υγρά τρόφιμα πριν τη	Τα περισσότερα υγρά τρόφιμα, κυρίως γάλα και χυμοί φρούτων για την ομογενοποίησή τους	Ομογενοποίηση χυμού αλόης και σπάσιμο της γέλης για την απελευθέρωση του χυμού

		συσκευασία		
<b>Παλλόμενα ηλεκτρικά πεδία</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Απενεργοποίηση μικροοργανισμών και ενζύμων τροφίμων</li> <li>-Ομογενοποίηση υγρών τροφίμων</li> <li>-Παστερίωση υγρών τροφίμων</li> <li>-Αύξηση της απόδοσης κατά την παραλαβή χυμών από φρούτα, αλλά και λαδιού από τις ελιές</li> </ul>	Εφαρμογή μόνο σε υγρά τρόφιμα, αν και ερευνάται η χρήση κατάλληλου εξοπλισμού για την εφαρμογή σε όλων των ειδών τα τρόφιμα	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Χυμοί φρούτων και λαχανικών</li> <li>-Γάλα</li> <li>-Κρασιά</li> </ul>	Χυμοί φρούτων και λαχανικών παστεριωμένων με Παλλόμενα Ηλεκτρικά Πεδία
<b>Υπεριώδης ακτινοβολία</b>	Απενεργοποίηση μικροοργανισμών,	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Αλλοίωση των διατροφικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών</li> <li>-Αυστηρή νομοθεσία για την ευρεία εφαρμογή της</li> </ul> <p>Απενεργοποίηση μικροοργανισμών μόνο σε σημεία του τροφίμου που χτυπάει η ακτινοβολία (εξαρτάται από το σχήμα του τροφίμου)</p>	Μπορεί να εφαρμοστεί για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών που βρίσκονται κυρίως στην επιφάνεια τροφίμων όπως κρέας, πουλερικά, θαλασσινά, μπαχαρικά και ξηροί καρποί.	Εξαιτίας της αυστηρής νομοθεσίας στην ΕΕ, η συγκεκριμένη τεχνολογία βρίσκει εφαρμογές μόνο στην παστερίωση μπαχαρικών
<b>Πυκνή φάση διοξειδίου του άνθρακα</b>	Απενεργοποίηση μικροοργανισμών	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Αλλοίωση των διατροφικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών</li> <li>-Εφαρμογή μόνο σε υγρά τρόφιμα</li> </ul>	<p>Εφαρμογή σε γάλα για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών</p> <p>Εφαρμογή σε χυμούς φρούτων για την απενεργοποίηση ζυμών και μυκήτων</p>	Δεν υπάρχουν
<b>Κρύο πλάσμα</b>	Απενεργοποίηση μικροοργανισμών  Εφαρμογή σε στερεά τρόφιμα, ανεξάρτητα από το σχήμα τους	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Αλλοίωση των διατροφικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών</li> <li>-Υποσχόμενη τεχνολογία όσον αφορά την επιφανειακή παστερίωση τροφίμων όπως κρέας, λαχανικά, και θαλασσινά</li> </ul>	Μπορεί να εφαρμοστεί σε κρέας, λαχανικά και θαλασσινά για την επιφανειακή καταστροφή των μικροοργανισμών	Δεν υπάρχουν

<p><b>Υπερυψηλή πίεση</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Απενεργοποίηση μικροοργανισμών και ενζύμων με ταυτόχρονη διατήρηση βιταμινών, υφής και συστατικών γεύσης και αρώματος</li> <li>- Στιγμαία και ομοιόμορφη μεταφορά της πίεσης</li> <li>- Η μεταφορά της πίεσης δεν ελέγχεται από το σχήμα και το μέγεθος του προς επεξεργασία προϊόντος</li> <li>- Τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε νερό δεν παραμορφώνονται μετά την εφαρμογή ΥΠ</li> <li>- Παστερίωση τροφίμων εντός της συσκευασίας τους προσφέροντας σημαντική αύξηση του χρόνου ζωής</li> <li>- Εφαρμογή σε όλων των ειδών τα τρόφιμα</li> <li>- Σημαντική ερευνητική δραστηριότητα με πλήθος αποτελεσμάτων για την άμεση εφαρμογή της τεχνολογίας</li> <li>- Μείωση χρόνου ωρίμανσης τυριών</li> <li>- Επιλεκτική αύξηση δραστηριότητας επιθυμητών ενζύμων</li> <li>- Επιλεκτική μεταβολή των ρεολογικών ιδιοτήτων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Εξειδίκευση ανά προϊόν</li> <li>- Υψηλό πάγιο κόστος (υπολογίζεται το κόστος επεξεργασίας σε 0,05 euro/kg περιλαμβανομένου του κόστους απόσβεσης)</li> <li>- Διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για το κάθε τρόφιμο</li> <li>- Batch και όχι συνεχής διεργασία</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Φρούτα και χυμούς φρούτων για την παστερίωσή τους</li> <li>- Γάλα και προϊόντα γάλακτος για την παστερίωσή τους</li> <li>- Κρέας και προϊόντα κρέατος για την παστερίωσή τους</li> <li>- Τυριά για την ωρίμανση και τη παστερίωσή τους</li> <li>- Ψάρια για την παστερίωσή τους</li> <li>- Θαλασσινά για την παστερίωσή τους</li> <li>- Οστρακοειδή για τον εύκολο διαχωρισμό της σάρκας από το κέλυφος</li> <li>- Φρουτοπαρασκευάσματα και μαρμελάδες για την παστερίωσή τους</li> <li>- Κρασιά και μύτρες για διαύγαση και για παστερίωση</li> <li>- Σαλάτες, σάλτσες και έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα για την παστερίωσή τους</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Παγκοσμίως κυκλοφορούν πολλά τρόφιμα επεξεργασμένα με την τεχνολογία της ΥΠ όπως χυμοί φρούτων, γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος, οστρακοειδή, φρουτοπαρασκευάσματα και σαλάτες (wet salads).</li> <li><b>Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η συγκεκριμένη τεχνολογία μιας και είναι η μοναδική που έχει βρεί εφαρμογή στην Ελληνική βιομηχανία τροφίμων για την παστερίωση και αύξηση της διάρκειας ζωής αλλαντικών (οι τρεις μεγαλύτερες εταιρίες του χώρου χρησιμοποιούν τη συγκεκριμένη τεχνολογία στη γραμμή παραγωγής τους)</b></li> </ul>
-------------------------------	--	--	--	--

	τροφίμων -Χαμηλή απαίτηση ενέργειας και φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία			
--	--	--	--	--

Παρά τη συνεχή ερευνητική δραστηριότητα γύρω από τις μη θερμικές τεχνολογίες επεξεργασίας, παραμένουν προς επίλυση βασικά επιστημονικά, τεχνολογικά και τεχνικά προβλήματα. Το υπάρχον κενό γνώσης αφορά κυρίως τη συστηματοποιημένη προσέγγιση των τεχνικών παραμέτρων της επεξεργασίας με μη οποιαδήποτε μη θερμική τεχνολογία, που θα επιτρέπει τη μεταφορά των ερευνητικών επιτευγμάτων σε συνθήκες μιας αποτελεσματικής και ελεγχόμενης βιομηχανικής διεργασίας. Μια τέτοια προσέγγιση βασίζεται στην κινητική θεώρηση των αντιδράσεων καταστροφής των παραγόντων αλλοίωσης ή υποβάθμισης των ποιοτικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των προϊόντων κατά τη διάρκεια των διεργασιών. Η βελτιστοποίηση των συνθηκών της διεργασίας με παραμέτρους την ασφάλεια, τη βελτίωση της ποιότητας, τη διατήρηση της διατροφικής αξίας και την ικανοποίηση των καταναλωτών, καθώς και ο ακριβής σχεδιασμός και έλεγχος της διεργασίας είναι αναγκαίος



## 5. .Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

### 5.1 Εισαγωγή

Οι καταναλωτές σε όλο τον κόσμο απαιτούν όλο και περισσότερο τρόφιμα υψηλής ποιότητας με φυσικό άρωμα και γεύση και δείχνουν ιδιαίτερη προτίμηση σε προϊόντα με σχετικά φρέσκια εμφάνιση που έχουν επεξεργαστεί ελάχιστα. Εκτός αυτού, ψάχνουν για ασφαλή και φυσικά προϊόντα χωρίς προσθήκη συντηρητικών. Προκειμένου λοιπόν να αντιμετωπιστεί αυτή η αυξανόμενη απαίτηση για ελάχιστα επεξεργασμένα προϊόντα που να προσομοιάζουν τα φρέσκα χωρίς να διακυβεύεται η ασφάλεια των προϊόντων, είναι αναγκαία η εφαρμογή των νεώτερων μη θερμικών τεχνολογιών επεξεργασίας στη βιομηχανία τροφίμων, όπως η τεχνολογία της Υπερυψηλής Πίεσης που έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα πολύτιμη.

Η τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης είναι μια νέα μέθοδος συντήρησης τροφίμων, κατά την οποία εφαρμόζονται πιέσεις από 100 έως 900 MPa σε υγρά ή στερεά, συσκευασμένα ή μη συσκευασμένα τρόφιμα έτσι ώστε να επιτευχθεί μείωση του μικροβιακού φορτίου. Παρ' ότι είναι γνωστό ήδη από το 1899 ότι η υπερυψηλή πίεση καταστρέφει μικροοργανισμούς και συμβάλει στη συντήρηση των τροφίμων, για πολλά χρόνια χρησιμοποιούταν με επιτυχία μόνο σε βιομηχανίες χημικών, κεραμικών ,αλουμινίου, σύνθετων υλικών και πλαστικών και μόλις στα τέλη του 1980 τα εμπορικά της οφέλη τέθηκαν στη διάθεση των βιομηχανιών επεξεργασίας τροφίμων.

Συγκεκριμένα Ο Hite το 1899 ερεύνησε την εφαρμογή υψηλών πιέσεων σαν ένα τρόπο για τη διατήρηση του γάλακτος, και αργότερα επέκτεινε τη μελέτη του στη διατήρηση φρούτων και λαχανικών (Hite et al., 1914). Παρ' όλα αυτά χρειάστηκε να περάσουν πάνω από ογδόντα χρόνια για να ξεκινήσει στην Ιαπωνία η εφαρμογή της υψηλής πίεσεως στην επεξεργασία τροφίμων. Η ικανότητα της υψηλής πίεσης στην αδρανοποίηση μικροοργανισμών και απενεργοποίηση ενζύμων, διατηρώντας παράλληλα τα άλλα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ενθάρρυνε σε μεγάλο βαθμό Ιαπωνικές και Αμερικανικές εταιρείες τροφίμων να εισάγουν στην αγορά επεξεργασμένα με υπερυψηλή πίεση τρόφιμα. Τα πρώτα τέτοια τρόφιμα εισήχθησαν στην Ιαπωνική αγορά το 1990 από την εταιρία Meidi-ya, η οποία ξεκίνησε να εμπορεύεται μια σειρά από μαρμελάδες, ζελέ και σάλτσες ,συσκευασμένα και επεξεργασμένα χωρίς εφαρμογή θερμότητας (Thakur και Nelson,

1998). Στην Ευρώπη, ο πορτοκαλοχυμός ήταν το πρώτο εμπορικά διαθέσιμο τέτοιο προϊόν στη Γαλλία, ενώ στην Ισπανία άρχισε να παράγεται επεξεργασμένο με υψηλή πίεση ζαμπόν. Άλλα προϊόντα περιλαμβάνουν παρασκευάσματα και χυμούς φρούτων, κέικ ρυζιού και καλαμάρια στην Ιαπωνία, χυμούς φρούτων (ειδικά χυμούς μήλου και πορτοκαλιού) στην Πορτογαλία καθώς και guacamole και στρείδια στις ΗΠΑ (Hugas, Garcia, και Monfort, 2002).

Επιπροσθέτως στη διατήρηση των τροφίμων η εφαρμογή υψηλής πίεσης μπορεί να συντελέσει σε νέα δομή και υφή, και ως εκ τούτου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων προϊόντων (Hayashi, 1990) ή να αυξήσει τη λειτουργικότητα ορισμένων συστατικών.

Ανάλογα με τις συνθήκες και τη κλίμακα της λειτουργίας, το κόστος της επεξεργασίας υψηλής πίεσης είναι συνήθως περίπου 0,05\$ έως 0,5 \$ ανά λίτρο ή χιλιόγραμμα, όπου η χαμηλότερη τιμή είναι συγκρίσιμη με το κόστος της θερμικής επεξεργασίας (Thakur & Nelson, 1998; Balasubramaniam, 2003). Ωστόσο, Η μη διαθεσιμότητα του κατάλληλου εξοπλισμού εμπόδισε τις πρώιμες εφαρμογές της υψηλής πίεσης, αλλά η πρόσφατη πρόοδος στον σχεδιασμό του εξοπλισμού έχει εξασφαλίσει την παγκόσμια αναγνώριση των δυνατοτήτων μιας τέτοιας τεχνολογίας στην επεξεργασία τροφίμων (Galazka & Ledward, 1995; Balci & Wilbey, 1999).

Σήμερα, η τεχνολογία υπερυψηλής πίεσης θεωρείται ότι είναι πολλά υποσχόμενη στην παραγωγή ενός ευρέος φάσματος προϊόντων, ενώ ταυτόχρονα δείχνει να έχει πολλές δυνατότητες στη δημιουργία μιας νέας γενιάς τροφίμων προστιθέμενης αξίας. Σε γενικές γραμμές, η τεχνολογία υψηλής πίεσης μπορεί να συμπληρώσει τη συμβατική θερμική επεξεργασία για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου, ή να αντικαταστήσει τη χρήση χημικών συντηρητικών. (Rastogi, Subramanian, και Raghavarao, 1994).



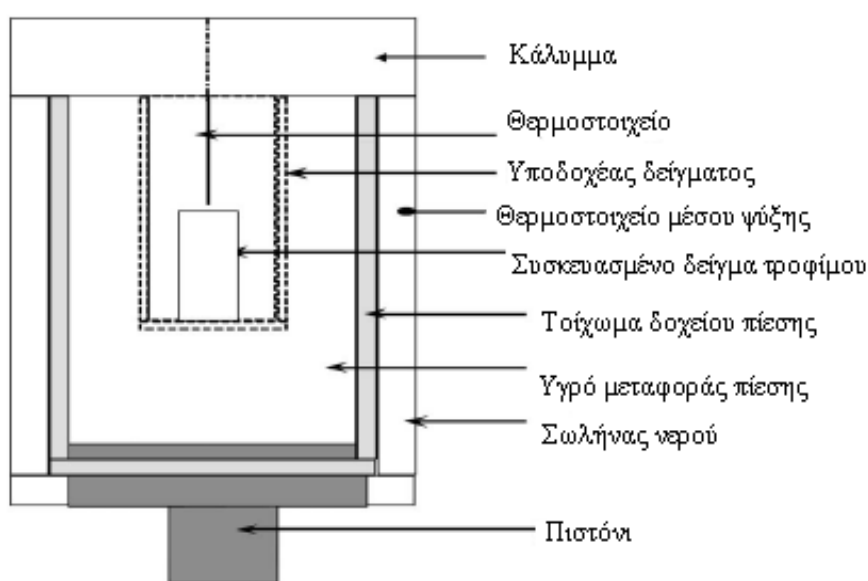
Πίνακας 5.1: Γενικά χαρακτηριστικά ΥΠ

Δυνατά Σημεία (Strengths)	Αδυναμίες (Weaknesses)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αύξηση του χρόνου ζωής των επεξεργασμένων με ήπιες μη θερμικές τεχνολογίες προϊόντων</li> <li>• Παραγωγή τροφίμων με οργανοληπτικά και διατροφικά χαρακτηριστικά παρόμοια με των ανεπεξέργαστων τροφίμων</li> <li>• Δυνατότητα ψυχρής παστερίωσης εντός της τελικής συσκευασίας των προϊόντων</li> <li>• Διάθεση των προϊόντων σε μεγαλύτερες αποστάσεις και για περισσότερο χρόνο</li> <li>• Μεγαλύτερη προστασία του καταναλωτή από τον κίνδυνο τροφικών δηλητηριάσεων.</li> <li>• Ενεργειακά λειτουργικά φιλικές προς το περιβάλλον</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Εξειδίκευση ανά προϊόν</li> <li>• Υψηλό πάγιο κόστος</li> <li>• Διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για το κάθε τρόφιμο</li> </ul>
Ευκαιρίες (Opportunities)	Απειλές (Threats)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αντιστάθμισμα για το κόστος εφαρμογής και την αύξηση του κόστους των παραγόμενων προϊόντων είναι η μεγαλύτερη διάρκεια εμπορικού χρόνου ζωής</li> <li>• Ανάπτυξη εταιριών παραγωγής μηχανολογικού εξοπλισμού απαραίτητου για την εφαρμογή των ήπιων μη θερμικών τεχνολογιών με απώτερο σκοπό το μειωμένο κόστος κτήσης του εξοπλισμού.</li> </ul>	<p>Η εφαρμογή των εν λόγω τεχνολογιών είναι συνάρτηση:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Του κόστους εγκατάστασης και του είδους του βιομηχανικού εξοπλισμού που απαιτείται για την εφαρμογή της συσκευασίας,</li> <li>• της οικονομικής επιβάρυνσης ανά μονάδα προϊόντος και</li> <li>• της αποδοχής από τον καταναλωτή.</li> <li>• Τα επεξεργασμένα παραγόμενα προϊόντα απαιτούν υψηλή εξειδίκευση ανά προϊόν σχετικά με την επίδραση των συνθηκών επεξεργασίας στα τελικά προϊόντα</li> </ul> <p>Η γενικευμένη εφαρμογή τους σε μεγάλο εύρος προϊόντων συνήθως προαπαιτεί έρευνα και κεφαλαιακή επένδυση πριν την εμπορευματοποίησή τους.</p>

## 5.2 Μηχανισμός της Υπερυψηλής Πίεσης

Σε μια χαρακτηριστική διαδικασία υπερυψηλής πίεσης, το προϊόν συσκευάζεται σε ένα εύκαμπτο περιέκτη (συνήθως σακούλα ή πλαστικό μπουκάλι) και τοποθετείται σε ένα δοχείο υψηλής πίεσης, το οποίο είναι γεμάτο με ένα ρευστό (υδραυλικό ρευστό) που διαβιβάζει την πίεση. Το υδραυλικό ρευστό (συνήθως

γλυκερόλη) στο δοχείο συμπιέζεται με μια αντλία, και η πίεση αυτή διαβιβάζεται μέσω της συσκευασίας στα ίδια τα τρόφιμα. Η πίεση εφαρμόζεται για έναν συγκεκριμένο χρόνο, συνήθως 3 έως 5 λεπτά. Το επεξεργασμένο προϊόν απομακρύνεται έπειτα και αποθηκεύεται ή διανέμεται με το συμβατικό τρόπο. Επειδή η πίεση διαβιβάζεται ομοιόμορφα (σε όλες τις κατευθύνσεις), τα τρόφιμα διατηρούν τη μορφή τους, ακόμη και σε ακραίες πιέσεις, ενώ επειδή δεν απαιτείται συνήθως εφαρμογή θερμότητας, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων διατηρούνται χωρίς να υποβιβάζεται όμως ούτε η μικροβιακή ασφάλεια του τροφίμου.



**Εικόνα 5.1 :** Σχηματική απεικόνιση δοχείου συμπίεσης.

Η συμπίεση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με ΥΠ αυξάνει τη θερμοκρασία του τροφίμου λόγω αδιαβατικής θέρμανσης περίπου  $3^{\circ}\text{C}$  ανά  $100\text{MPa}$ , ανάλογα με τη σύνθεση των τροφίμων. Τα τρόφιμα ψύχονται στην αρχική θερμοκρασία τους κατά την αποσυμπίεση, εάν και εφόσον θερμότητα δεν χάνεται ή προσδίδεται μέσω των τοιχωμάτων των δοχείων πίεσης κατά τη διάρκεια του χρόνου επεξεργασίας του τροφίμου στην εκάστοτε πίεση. Επιπλέον, σε ένα ομοιογενές σύστημα είναι απαραίτητο το τρόφιμο να βρίσκεται σε μια ομοιόμορφη αρχική θερμοκρασία, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ομοιόμορφη αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της συμπίεσης. Το δοχείο της πίεσης πρέπει να

κρατείται σε θερμοκρασία ίση με την τελική θερμοκρασία του τροφίμου (αυτής λόγω αύξησης από τη συμπίεση), ώστε να διατηρούνται οι ισόθερμες συνθήκες.

### 5.3 Μηχανολογικός εξοπλισμός της ΥΠ

Ο εξοπλισμός της ΥΠ αποτελείται από τα εξής βασικά μέρη:

Ένα θάλαμο πίεσης και το σύστημα σφράγισής του

Ένα σύστημα παραγωγής πίεσης

Ένα σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας

Ένα σύστημα διαχείρισης υλών

Οι περισσότεροι θάλαμοι κατασκευάζονται από υλικά με μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό, συνήθως μονομηματικά (monoblocs, κομμένα από ένα ενιαίο κομμάτι μετάλλου) κομμάτια κραμάτων του χάλυβα. Οι θάλαμοι αυτοί αντέχουν πιέσεις 400 με 600MPa. Για μεγαλύτερες πιέσεις οι θάλαμοι κατασκευάζονται από πολυστρωματικά, προτεταμένα υλικά. Τα συστήματα φραγής είναι συνήθως χαλύβδινα πάματα που φέρουν σπείρωμα ή, για μείωση του χρόνου ανοίγματος και κλεισίματος, σφραγισμένα πλαίσια που τοποθετούνται πάνω από τους θαλάμους.

Ο έλεγχος της θερμοκρασίας γίνεται με μανδύες γύρω από τους θαλάμους ΥΠ. Στους μανδύες κυκλοφορεί ψυκτικό/θερμαντικό μέσο, ανάλογα με τις ανάγκες. Σημαντικό μειονέκτημα ωστόσο σε μεγάλους θαλάμους είναι η αργή θερμοκρασιακή απόκριση, στην οποία περίπτωση χρησιμοποιούνται εσωτερικές σπείρες εναλλαγής θερμότητας (Ohlsson et al., 2002)

### 5.4 Τρόποι άσκησης πίεσης

Η πίεση σε ένα δοχείο ΥΠ μπορεί να ασκηθεί με διαφορετικούς τρόπους. Στην **άμεση συμπίεση**, ένα ρευστό τρόφιμο συμπιέζεται κατευθείαν από την μικρότερη πλευρά ενός εμβόλου. Η μεγαλύτερη πλευρά του εμβόλου είναι συνδεδεμένη με μια αντλία χαμηλής πίεσης, επιτρέποντας έτσι τον πολλαπλασιασμό της πίεσης. Η άμεση

συμπίεση επιτρέπει πολύ γρήγορη συμπίεση αλλά δε μπορεί να εφαρμοστεί σε δοχεία μεγάλης κλίμακας λόγω ενδεχόμενης ανεπάρκειας της στεγανότητας του εμβόλου.

Κατά την **έμμεση συμπίεση**, ένα ρευστό άσκησης πίεσης (νερό ή γλυκερόλη) αντλείται σε έναν ερμητικά κλειστό θάλαμο από έναν ενισχυτή πίεσης. Τα περισσότερα συστήματα ισοστατικής συμπίεσης χρησιμοποιούν την έμμεση συμπίεση.

Τέλος, συμπίεση μπορεί να επιτευχθεί με θέρμανση του ρευστού πίεσης το οποίο διαστέλλεται. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου απαιτείται συνδυασμός πίεσης και υψηλής θερμοκρασίας και απαιτεί πολύ ακριβή θερμοκρασιακό έλεγχο.

## 5.5 Συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας

Τα συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: συστήματα επεξεργασίας συσκευασμένων τροφίμων και συστήματα επεξεργασίας «χύμα» (bulk) τροφίμων. Η επεξεργασία συσκευασμένων τροφίμων περιορίζει την επιλογή συσκευασίας αφού πρέπει να χρησιμοποιούνται ευέλικτες πλαστικές συσκευασίες που να είναι ανθεκτικές σε μικρές μεταβολές του όγκου. Επίσης, τα συστήματα διαχείρισης υλών (φόρτωση/εκφόρτωση θαλάμων) είναι παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται σε δοχεία διαλείποντος έργου. Αντίθετα, η χύμα επεξεργασία δεν απαιτεί τέτοια συστήματα αλλά βασική προϋπόθεση είναι τα τρόφιμα να είναι αντλήσιμα (Ohlsson et al., 2002).

Οι παραπάνω τρόποι δημιουργίας υπερυψηλής πίεσης εφαρμόζονται σε συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας, όπου τα τρόφιμα επεξεργάζονται σε παρτίδες (batches). Έτσι, σε αντίθεση με τα συστήματα συνεχούς λειτουργίας, μειώνεται σημαντικά η πιθανότητα μεγάλη ποσότητα τροφίμου να έρθει σε επαφή με λιπαντικά ή σωματίδια από τη φθορά του εξοπλισμού. Επίσης, ο σχεδιασμός του εξοπλισμού είναι απλούστερος. Μέχρι στιγμής στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται μόνο συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας (Barbosa-Canovas, 1998).<sup>4</sup>

Τυπικά, ένα σύστημα ασυνεχούς λειτουργίας επεξεργασίας συσκευασμένων τροφίμων αποτελείται από μεμονωμένους θαλάμους πίεσης. Συσκευασμένα τρόφιμα τοποθετούνται στους θαλάμους, οι οποίοι σφραγίζονται και πληρώνονται με το υγρό

πίεσης που είναι συνήθως νερό αναμεμειγμένο με μικρή ποσότητα ελαίου για λόγους προστασίας από τη διάβρωση. Η πίεση ασκείται στα τρόφιμα αυξάνοντας την πίεση του υγρού και είναι ομοιόμορφη (ισοστατική συμπίεση). Το τρόφιμο παραμένει υπό πίεση για συγκεκριμένο χρόνο. Μετά την πάροδο του χρόνου επεξεργασίας, ο θάλαμος εκτονώνεται, αδειάζεται και επαναπληρώνεται με την επόμενη παρτίδα.

Τα περισσότερα βιομηχανικά συστήματα ΥΠ είναι ημισυνεχούς λειτουργίας, περιλαμβάνοντας συστοιχίες από θαλάμους ασυνεχούς λειτουργίας. Οι θάλαμοι λειτουργούν εναλλάξ και οι γραμμές φόρτωσης και εκφόρτωσής τους είναι πλήρως αυτοματοποιημένες. (Ohlsson et al., 2002)

Πρόκληση για τους κατασκευαστές του εξοπλισμού αποτελεί η κατασκευή μηχανημάτων ανθεκτικών σε υψηλές πιέσεις αλλά και σε συνεχείς κύκλους συμπίεσης-εκτόνωσης. Οι κύκλοι πρέπει να είναι σύντομοι ώστε να μην δημιουργούνται καθυστερήσεις μεταξύ παρτίδων, και να είναι πλήρως ελέγξιμοι. Τέλος οι θάλαμοι πίεσης πρέπει να είναι εύκολοι στον καθαρισμό και τη σφράγιση. Η βιομηχανία τροφίμων απαιτεί αντοχή σε πιέσεις μεγαλύτερες από 400MPa και χρόνους παραμονής από 5 έως και 20 λεπτά.

## 5.6 Κόστος του εξοπλισμού

Συλλογή δεδομένων από κατασκευαστές εξοπλισμού ΥΠ εκτιμά ότι το αρχικό κόστος επένδυσης για ένα βιομηχανικό σύστημα ΥΠ κυμαίνεται μεταξύ 0.5 και 2 εκατ. € με κόστος επεξεργασίας στα 400MPa 0.1-0.2€/kg. Ένα σύστημα παστερίωσης χυμών με ΥΠ κοστίζει περίπου 20 φορές περισσότερο από το συμβατικό σύστημα θερμικής παστερίωσης με εναλλάκτες.

Το κόστος επηρεάζεται από παράγοντες όπως τον όγκο των θαλάμων, τη μέγιστη επιθυμητή πίεση, το χρόνο και τη θερμοκρασία επεξεργασίας και το βαθμό αξιοποίησης της γραμμής. Πλήρωση των θαλάμων στο 50% του όγκου τους έχει διπλάσιο κόστος από ότι η πλήρωση στο 85%, γεγονός που καταδεικνύει τη σημασία της μέγιστης αξιοποίησης μιας γραμμής μεγάλης κλίμακας. (Ohlsson et al., 2002)

## 5.7 Εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης σε συγκεκριμένες κατηγορίες τροφίμων.

### Φρούτα και λαχανικά

Η υψηλή πίεση χρησιμοποιείται κυρίως σε βιομηχανίες επεξεργασίας φρούτων και λαχανικών για την αδρανοποίηση ενζύμων και μικροοργανισμών και για την παράταση της διάρκειας ζωής, διατηρώντας παράλληλα καλές οργανοληπτικές, αισθητικές, και θρεπτικές ιδιότητες. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται μερικά από τα σημαντικότερα ευρήματα σε αυτήν την κατηγορία τροφίμων.

**Πίνακας 5.2: Σημαντικά ευρήματα στην κατηγορία φρούτων και λαχανικών**

ΠΡΟΪΟΝ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΠΗΓΗ
Χυμός πορτοκαλιού	350Mpa, 1min σε 30°C	Υψηλής ποιότητας χυμός με πάνω από 2 μήνες διάρκεια ζωής υπό ψύξη.	Donsi, Ferrari & Matteo (1996)
	500MPa ,5 min σε 35°C	Λιγότερη απώλεια ασκορβικού οξέος σε σχέση με συμβατικά παστεριωμένους χυμούς στους 80 °C για 30s	Πολύδερα ,Στοφόρος και Ταούκης (2003)
	400Mpa, 10min	Αποδεκτή ποιότητα μετά από αποθήκευση 150 ημερών σε θερμ/σία δωματίου.	Strolham et al. (2000)
	700Mpa, 1min	Σταθεροποίηση του αιωρήματος σε φρεσκοστιμένο χυμό και διάρκεια ζωής 90 μέρες υπό ψύξη.	Goodner, Braddock, Parish & Sims (1999)
Χυμός λεμονιού	450Mpa για 2 , 5 ή 10min	Καθόλου ανάπτυξη μυκητών μετά από 10 μέρες στο συμπιεσμένο δείγμα. Στο ανεπεξεργαστο ανιχνεύθηκαν ζύμες και μύκητες. Ελάχιστη επίδραση στα συστατικά και τις φυσικοχημικές ιδιότητες.	Donsi, Ferrari, Matteo, & Bruno (1998)
Υφή φρούτων και λαχανικών	200–500Mpa, 15min σε 20-60°C	Επεξεργασία με πίεση και έγχυση CaCl <sub>2</sub> σε καρότο βελτίωσε την υφή κατά τη θερμική επεξεργασία	Sila, Smout, Vu & Hendrickx (2004)

		μειώνοντας το ρυθμό του θερμικού μαλακώματος	
<b>Πουρέ τομάτας</b>	700Μρα	Η φυσική χλωρίδα της τομάτας μειώθηκε κάτω από ανιχνεύσιμα όρια. Αποτελεσματικότερη καταστροφή σπορίων του <i>Bacillus stearothermophilus</i> σε σχέση με τη συμβατική αποστείρωση.	Krebbbers, Matser, Hoogerwerf, Moezelaar, Tomassen, and Berg (2003)

### Γαλακτοκομικά προϊόντα

Η έρευνα σχετικά με την εφαρμογή της υψηλής πίεσης στο γάλα ξεκίνησαν με σκοπό να αναπτυχθεί μια εναλλακτική μέθοδος παστερίωσης. Ένας αριθμός ερευνητών έχουν μελετήσει την αδρανοποίηση με υψηλή πίεση διαφόρων μικροοργανισμών (όπως *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*) που είτε υπάρχουν φυσικώς στο γάλα είτε εμβολιάστηκαν σε αυτό (Styles et al., 1991; Erkman & Karatas, 1997). Η επεξεργασία με ΥΠ του γάλακτος επηρεάζει έμμεσα τη διαδικασία πήξης του και τις ιδιότητες τυροκομίας μέσω ενός αριθμού επιδράσεων στις πρωτεΐνες του γάλακτος, όπως η μείωση του μεγέθους των μικκυλίων καζεΐνης και η μετουσίωση της β-γαλακτοσφαιρίνης. Έχει βρεθεί ότι η υψηλή πίεση προκαλεί διάσπαση των μικκυλίων καζεΐνης και μετουσίωση των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος. Επίσης η Υψηλή πίεση αυξάνει το pH του γάλακτος, μειώνει το χρόνο πήξης του και αυξάνει την απόδοση σε τυρί, δείχνοντας έτσι τη δυνατότητα εφαρμογής της στην τεχνολογία τυροκομίας (O'Reilly et al., 2001).

### Ζωικά προϊόντα

Η Υψηλή πίεση προκαλεί την πρωτεόλυση του κρέατος και επιφέρει αλλαγές στα μυϊκά ένζυμα και τις μυοϊνδικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα να παρατηρούνται αλλαγές στη δομή και την υφή του κρέατος. Περαιτέρω, η υψηλή πίεση επηρεάζει το σίτεμα, το χρώμα του προϊόντος καθώς και το βαθμό οξειδωσης των λιπιδίων.

Η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών στο κρέας εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως τον τύπο του μικροοργανισμού, το επίπεδο πίεσης, τη

θερμοκρασία επεξεργασίας, το χρόνο, το pH και τη σύνθεση του τροφίμου. Σε γενικές γραμμές, τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητα στην πίεση από ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια, αλλά παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στην αντοχή στην πίεση μεταξύ των διαφόρων στελεχών του ίδιου είδους. Τα βακτηριακά σπόρια είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στην πίεση (εκτός αν η επεξεργασία διεξάγεται σε θερμοκρασίες κοντά στους 100°C). Ο συνδυασμός πίεσης και θερμότητας κάνει το κρέας τρυφερό και μαλακό, αλλά τα τελικά προϊόντα έχουν ένα εμφάνιση μαγειρεμένου, επομένως δεν μπορούν να πωληθούν ως νωπά κρέατα. Μια τέτοια επεξεργασία συνεπώς, θα πρέπει να ανταγωνιστεί με άλλες διαδικασίες σιτέματος που χρησιμοποιούνται για μαγειρεμένα ή επεξεργασμένα κρέατα. Η μεταβολή στο χρώμα του κρέατος που προκαλείται από την εφαρμογή πίεσης πάνω από 300 MPa, ακόμη και σε χαμηλή θερμοκρασία, συνεπάγεται ότι τα προϊόντα αυτά δεν μπορούν να πωλούνται ως φρέσκα. Επιπλέον, σε αυτό το εύρος πιέσεων, τα πρακτικά οφέλη για την υφή του κρέατος πρέπει να αποδειχθούν, παρά τις πολυάριθμες έμμεσες αποδείξεις σιτέματος.

## 5.8 Επίδραση Υπερυψηλής πίεσης στους μικροοργανισμούς

Τόσο για την παστερίωση όσο και την αποστείρωση, η συνδυασμένη εφαρμογή υψηλής πίεσης και θερμοκρασίας θεωρείται συχνά ως η πιο κατάλληλη. Τα βλαστικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ζυμομυκήτων και μούχλων είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην πίεση, δηλαδή μπορούν να αδρανοποιηθούν σε πιέσεις 300-600 MPa (Knorr, 1995; Patterson et al., 1995). Σε υψηλές πιέσεις, ο μικροβιακός θάνατος θεωρείται ότι οφείλεται στην διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι στην περίπτωση του *Saccharomyces cerevasiae*, σε πιέσεις περίπου 400 MPa, η δομή και τα κυτοπλασμικά οργανίδια είχαν παραμορφωθεί σε μεγάλο βαθμό και μεγάλες ποσότητες ενδοκυτταρικού υλικού είχαν διαρρεύσει έξω, ενώ σε 500MPa ο πυρήνας δεν μπορούσε πλέον να αναγνωριστεί και η απώλεια του ενδοκυτταρικού υλικού ήταν σχεδόν πλήρης (Farr, 1990). Οι αλλαγές που προκύπτουν στην μορφολογία των κυττάρων των μικροοργανισμών είναι αντιστρεπτές σε χαμηλές πιέσεις, αλλά μη αναστρέψιμες σε υψηλότερες πιέσεις όπου ο μικροβιακός θάνατος οφείλεται στην διαρηξη της κυτταρικής μεμβράνης.



Η αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος, και σε μικρότερο βαθμό μια μείωση κάτω της θερμοκρασίας περιβάλλοντος, αυξάνει τα ποσοστά αδρανοποίησης των μικροοργανισμών κατά την επεξεργασία με εφαρμογή υψηλής πίεσης. Στη θερμοκρασιακή περιοχή 45 έως 50 °C φαίνεται να αυξάνεται ο ρυθμός απενεργοποιήσεως των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Επομένως, η πιο προφανής εφαρμογή της ΥΠ βρίσκεται στην διατήρηση των όξινων τροφίμων ( $\text{pH} < 4,6$ ). Στα χαμηλού pH τρόφιμα, οι ζύμες και τα γαλακτικά βακτήρια είναι οι αρχικοί στόχοι των συντηρητικών μεθόδων. Δεν είναι τυχαίο ότι τα πρώτα εμπορικά επεξεργασμένα με πίεση προϊόντα στην αγορά ήταν προϊόντα φρούτων. Επιπλέον, η παστερίωση μπορεί να εκτελεστεί ακόμα και υπό ψυχρές συνθήκες όταν πρόκειται για θερμοευαίσθητα προϊόντα. Η επεξεργασία σε χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να βοηθήσει στη διατήρηση της διατροφικής ποιότητας και της λειτουργικότητας των πρώτων υλών που κατεργάζονται και επιτρέπει τη συντήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας μετά τη συγκομιδή, την αποθήκευση, τη μεταφορά, και την περίοδο διανομής του κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής του συστήματος διατροφής (Knorr, 1995).

### 5.8.1 Επίδραση της ΥΠ στα βακτήρια

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για την επίδραση της ΥΠ σε βακτήρια. Σε μία έρευνα μελετήθηκε η κινητική απενεργοποίησης των αερόβιων βακτηρίων (AB) και της *Listeria Monocytogenes* (τιμές D, Z και τιμές k) σε θρεπτικό υλικό BHIB καθώς και σε διάφορα τρόφιμα. Οι τιμές D και k της *L. monocytogenes* στο θρεπτικό υλικό κυμάνθηκαν από 12,1 ως 1,14 min και από 0,1907 έως 2,0202  $\text{min}^{-1}$  αντίστοιχα σε ένα εύρος πίεσης 200-700MPa. Οι τιμές D σε πίεση 600MPa ήταν περίπου 2,43 min στο γάλα, 1,52 min σε χυμό ροδάκινου, και 0,87 min σε χυμό πορτοκαλιού. Οι τιμές D για τα AB σε πίεση 600MPa ήταν περίπου 3,04 min στο γάλα, 2,13 min σε χυμό ροδάκινου, και 1,24 min σε χυμό πορτοκαλιού. Οι τιμές k για τη *Listeria monocytogenes* σε χυμό πορτοκαλιού (που κυμάνθηκαν από 0,8024 - 2,6471  $\text{min}^{-1}$ ) ήταν μεγαλύτερες από ότι στο θρεπτικό υλικό (κυμάνθηκαν από 0,1907 - 2,0202  $\text{min}^{-1}$ ), το χυμό ροδάκινου (που κυμάνθηκαν από 0,3733 - 1,5151  $\text{min}^{-1}$ ) και το γάλα (που κυμάνθηκαν από 0,2096 σε 0.0.9477  $\text{min}^{-1}$ ) στη ίδια πίεση. Οι τιμές Z

της *L. monocytogenes* ήταν 578, 480, 506 και 576 στο γάλα, στο θρεπτικό υλικό, στο χυμό ροδάκινο και στο χυμό πορτοκαλιού, αντίστοιχα. Υπήρξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών της κινητικής απενεργοποίησης των AB και της *L. Monocytogenes* μεταξύ του θρεπτικού υλικού και των διαφόρων τροφίμων.

Ο σκοπός μιας άλλης μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της υψηλής πίεσης με μια ήπια θερμική κατεργασία στο *Staphylococcus aureus* 485, στην *Escherichia coli* O157: H7 933 και στη *Salmonella Enteritidis* FDA σε χυμούς μήλου, πορτοκαλιού, βερίκοκου και βύσσινου. Η αποτελεσματικότητα της στην ενεργότητα της πολυφαινολικής οξειδάσης στο χυμό μήλου και στην ενεργότητα της πηκτινестεράσης στο χυμό πορτοκαλιού προσδιορίστηκαν επίσης. Ένα εμβόλιο των μικροοργανισμών βρέθηκε να απενεργοποιείται πλήρως σε πίεση 350MPa, στους 40 C για 5 λεπτά.

Η κινητική απενεργοποίησης της *Escherichia coli* με ΥΠ σε ζωμό, γάλα, χυμό ροδάκινο και το χυμό πορτοκαλιού αξιολογήθηκαν σε ένα εύρος πίεσης 300 - 700MPa. Η αδρανοποίηση της *E. Coli* ακολούθησε κινητική πρώτης τάξεως. Ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού (τιμή D) για το *E. coli* ήταν 3,94 και 1,35 στα 400 και 600 MPa, αντίστοιχως, σε ζωμό. Οι τιμές D ήταν 3,19 και 1,66 λεπτά για τα αερόβια βακτηρίδια (AB) και *E. coli*, αντίστοιχα, στο γάλα σε 600 MPa και 0,83 και 0,68 λεπτά, αντίστοιχα, στο χυμό πορτοκαλιού. Οι τιμές K ήταν 0,7219 και 1,3904 min<sup>-1</sup> για τα AB και *E. coli*, αντίστοιχα, σε 600MPa στο γάλα. Η ανάλυση των τιμών z έδειξε ότι η ευαισθησία των βακτηρίων στις διάφορες πιέσεις ήταν διαφορετική μεταξύ των διάφορων μέσων. (Erkmen & Doğan 2004)

Ο στόχος άλλης μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η επίδραση της υψηλής πίεσης που ακολουθείται από ήπια θέρμανση για την αδρανοποίηση των *Vibrio parahaemolyticus* και *Vibrio vulnificus* σε ζώντα στρείδια. Τα εμβολιασμένα με τους μικροοργανισμούς στρείδια υποβλήθηκαν σε: α) συμπίεση στους 200-300 MPa για 2 λεπτά σε 21 ° C, β) ήπια θερμική κατεργασία σε 40, 45 ή 50 ° C μέχρι 20 λεπτά και γ) συμπίεση στα 200-300 MPa για 2 λεπτά σε 21 ° C ακολουθούμενη από θερμική επεξεργασία στους 40-50 ° C. Η αρίθμηση των *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* στη συνέχεια έγινε με την μέθοδο MPN (Most Probable Number). Η συμπίεση στους 200-300MPa για 2 λεπτά οδήγησε σε διάφορους βαθμούς αδρανοποίησης, από 1,2 έως > 7 log MPN / g μειώσεις. Η Θερμική επεξεργασία στους 40 και 45 ° C για 20 λεπτά οδήγησε σε μείωση των *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* από 0,7-2,5 log MPN / g, ενώ στους 50° C για 15 λεπτά επιτυγχάνεται μείωση > 7 log MPN / g. Η

ΥΠ και η ήπια θέρμανση είχε συνεργιστικά αποτελέσματα. Ο συνδυασμός πίεσης στα 250MPa για 2 λεπτά που ακολουθείται από θερμική επεξεργασία στους 45°C για 15 λεπτά και στα 200MPa για 2 λεπτά που ακολουθείται από θερμική επεξεργασία στους 50 ° C για 5 λεπτά μείωσε τους *V. parahaemolyticus* και *V. vulnificus* προς μη ανιχνεύσιμα επίπεδα με τη μέθοδο MPN (<3 MPN / g). Η εφαρμογή πίεσης 275MPa για 2 λεπτά που ακολουθείται από θερμική επεξεργασία στους 45 ° C για 20 λεπτά και πίεσης στα 200MPa για 2 λεπτά που ακολουθείται από θερμική επεξεργασία στους 50 ° C για 15 λεπτά οδηγεί στην πλήρη εξόντωση των δύο παθογόνων. Αυτή η μελέτη λοιπόν κατέδειξε την αποτελεσματικότητα του συνδυασμού πίεσης και ήπιας θερμικής επεξεργασίας για την αδρανοποίηση των *V.parahaemolyticus*. και *V. Vulnificus* σε στρείδια. (Mu Ye et a., 2012)

Τέσσερα παθογόνα στελέχη του *Yersinia enterocolitica* (ορότυποι O: 1, O: 3, O: 8, και O: 9) εμβολιάστηκαν (7-8 log CFU / ml) σε αποβουτυρωμένο γάλα UHT και υποβλήθηκαν σε πίεση 300, 400, και 500 MPa για 10 λεπτά στους 20 ° C, και κατόπιν διατηρήθηκαν στους 8 ° C για να αξιολογηθεί η εξέλιξή τους για 15 ημέρες. Οι επεξεργασίες σε 400 και 500 MPa προκάλεσαν την υψηλότερη θνησιμότητα των μικροοργανισμών, γενικά φθάνοντας σε μικροβιακό φορτίο κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης (1 CFU / ml) στο μέσο καλλιέργειας. Στα 300MPa, οι πιο πιεζοάντοχοι ορότυποι βρέθηκαν οι O: 3 και O: 8. Μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης στους 8 ° C, *Y. enterocolitica* παρουσίασαν αύξηση πάνω από 8 log (CFU / ml) σε όλες τις πιέσεις. Η κινητική μελέτη της μικροβιακής αδρανοποίησης στο αποβουτυρωμένο γάλα που εκτελέστηκε με τον ορότυπο O: 8 στα 300 MPa, δείχνει ένα tailing μετά από 35 λεπτά επεξεργασίας. (De Lamo-Castellví et al., 2005)

**Πίνακας 5.3: Επίδραση της ΥΠ σε διάφορα βακτήρια**

	Substrate	P (MPa)	Time (min)	T (°C)	Inactivation	Reference
<i>Campylobacter jejuni</i>	Pork slurry	300 MPa	10 min	25 °C	6 log CFU	(Shigehisa et al., 1991)
<i>Salmonella</i> Senftenberg 775W	Strained baby food	340 MPa	10 min	23 °C	<2 log CFU	(Metrick, Hoover, & Farkas, 1989)
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Broth	345 MPa	10 min	35 °C	8,22 log CFU	(Alpas et al., 2000)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Poultry meat	600 MPa	15 min	20 °C	3 log CFU	(Patterson et al., 1995)
<i>E. coli</i> O157:H7	Broth	345 MPa	10 min	35 °C	8.14 log CFU	(Alpas et al., 2000)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Poultry meat	600 MPa	15 min	20 °C	3 log CFU	(Patterson et al., 1995)
<i>S. aureus</i> 765	Broth	345 MPa	10 min	35 °C	4 log CFU	(Alpas et al., 2000)
<i>Listeria monocytogenes</i> CA	Poultry meat	375 MPa	15 min	20 °C	2 log CFU	(Patterson et al., 1995)
<i>L. monocytogenes</i>	Broth	345 MPa	10 min	35 °C	5 log CFU	(Alpas et al., 2000)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6	Oysters	300 MPa	3 min	10 °C	5 log CFU	(Cook, 2003)
Hepatitis A virus	Oysters	400 MPa	1 min	10 °C	>3 log PFU	(Calci et al., 2005)
Norovirus	Oysters	400 MPa	5 min	5 °C	4 log PFU	(Kingsley et al., 2007)

(Rendueles et al., 2011)

### Επίδραση στα σπόρια

Τα βακτηριακά σπόρια είναι ιδιαίτερος ανθεκτικά στη πίεση, και μπορεί να χρειαστούν πιέσεις άνω των 1200MPa για την αδρανοποίηση τους (Knorr, 1995). Η έναρξη της βλάστησης ή αναστολής των βακτηριακών σπορίων μπορεί να επιτευχθεί σε συνδυασμό με μέτρια θέρμανση ή άλλες προκατεργασίες όπως είναι οι υπέρηχοι. Θερμοκρασία στο εύρος 90-121°C σε συνδυασμό με πιέσεις από 500 έως 800MPa έχουν χρησιμοποιηθεί για την απενεργοποίηση σπόριογόνων βακτηρίων όπως το *Clostridium botulinum*. Έτσι, η αποστείρωση των τροφίμων χαμηλής οξύτητας (pH > 4.6), πιθανότατα θα βασίζονται σε έναν συνδυασμό υψηλής πίεσης με άλλες σχετικά ήπιες μορφές επεξεργασίας.

### 5.9 Επίδραση της υψηλής πίεσης στα ένζυμα

Τα ένζυμα αποτελούν μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών όπου η βιολογική τους ενεργότητα οφείλεται στην ύπαρξη ενεργών θέσεων καθώς και στην τρισδιάστατη διαμόρφωση του μορίου. Ο μηχανισμός απενεργοποίησης των ενζύμων με ΥΠ βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη, αλλά πρέπει να σχετίζεται με αντιστρεπτές ή αναντιστρεπτές αλλαγές στην πρωτεϊνική δομή. Οι αλλαγές στην δραστική θέση ή η μετουσίωση των πρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια της δραστηριότητας, ή να αλλάξει τη λειτουργικότητα του ενζύμου (Tsou, 1986)

Στη βιβλιογραφία, τα αποτελέσματα που έχουν βρεθεί είναι αντιφατικά καθώς η ανθεκτικότητα των ενζύμων στην πίεση εξαρτάται από διάφορους ενδογενείς (π.χ τύπος του ενζύμου, προέλευση του ενζύμου, σύσταση του τροφίμου) και εξωγενείς (π.χ θερμοκρασία, κύκλος πιέσεων, χρόνος επεξεργασίας) παράγοντες. Πολλές φορές τα συστατικά του τροφίμου εμφανίζουν προστατευτικό ρόλο απέναντι στην απενεργοποίηση των ενζύμων με πίεση. Η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης οδηγεί σε αποτελεσματική μείωση της δραστηριότητας των ενζύμων που σχετίζονται με την υποβάθμιση του τροφίμου (οξειδάσες), εξασφαλίζοντας έτσι υψηλής ποιότητας σταθερά τρόφιμα.

Η πίεση βέβαια σε κάποιες περιπτώσεις προκαλεί βλάβη στις μεμβράνες και διευκολύνει την επαφή του ενζύμου με το υπόστρωμα. Η προκύπτουσα αντίδραση μπορεί είτε να επιταχυνθεί ή να επιβραδυνθεί από την εφαρμογή πίεσης. (Butz et al., 1994; Gomes & Ledward, 1996).

### 5.9.1 Επίδραση στην Πηκτινομεθυλεστεράση

Η ΠΜΕ είναι ένα ένζυμο, το οποίο συνήθως τείνει να μειώνει το ιξώδες των προϊόντων φρούτων και να επηρεάζει αρνητικά την υφή τους. Ως εκ τούτου, η απενεργοποίηση του είναι απαραίτητη για τη διατήρηση τέτοιων προϊόντων. Εμπορικά, τα προϊόντα φρούτων που περιέχουν ΠΜΕ (π.χ. χυμός πορτοκαλιού και τα προϊόντα τομάτας) παστεριώνονται θερμικά για την αδρανοποίηση της ΠΜΕ και την αύξηση της διάρκειας ζωής τους. Ωστόσο, η θέρμανση μπορεί να υποβαθμίσει την αισθητική και τη διατροφική ποιότητα των προϊόντων. Πηκτινομεθυλεστεράσες από διάφορα φρούτα έχει αναφερθεί να είναι αρκετά ανθεκτικές στη θερμότητα: Συγκεκριμένα απαιτούνται θερμοκρασίες μεταξύ 80 και 95 ° C για να προκληθεί σημαντική αδρανοποίηση ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται σημαντικό ποσοστό εναπομένουσας δραστηριότητας (έως 50%), η οποία αποδίδεται στην παρουσία θερμοσταθερών ισοενζύμων ΠΜΕ (Van den Broeck, 2000). Από την άλλη πλευρά η ΠΜΕ τομάτας εμφανίζει μικρότερη θερμική σταθερότητα και δεν έχει παρατηρηθεί κανένα θερμοσταθερό κλάσμα (Van den Broeck et al., 2000a).

Η σταθερότητα της ΠΜΕ στην πίεση έχει κυρίως ερευνηθεί για το πορτοκαλί και σε μικρότερο βαθμό για τα γκρέιπ φρουτ, γκουάβα και την τομάτα . Οι πιέσεις που απαιτούνται για την αδρανοποίηση αυτών των ΠΜΕ σε θερμοκρασία δωματίου κυμαίνονται από περίπου 150 έως 1200MPa, ανάλογα με την προέλευση και το μέσο στο εκτελείται η απενεργοποίηση (Van den Broeck, 2000). Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν μόνο μερική αδρανοποίηση της ΠΜΕ, η οποία αποδίδεται στην παρουσία δύο ισοενζύμων με διαφορετική αντίσταση στην πίεση. Έτσι υπάρχει ένα πιεζοευαίσθητο και ένα πιεζοανθεκτικό κλάσμα στο οποίο οφείλεται η εναπομένουσα δραστηριότητα ακόμη και μετά από επεξεργασία σε υψηλή πίεση για μεγάλους χρόνους.

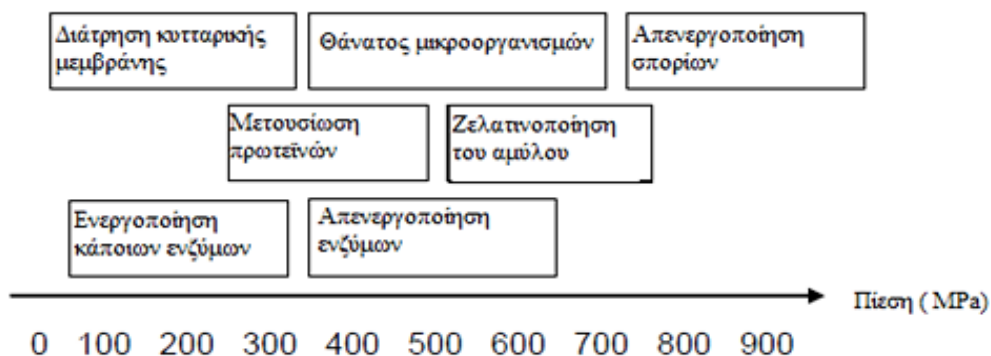
Σε μία έρευνα μελετήθηκε η απενεργοποίηση της ΠΜΕ σε χυμό πορτοκαλιού ποικιλίας Valencia. Συγκεκριμένα εξετάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί πίεσης (100-500MPa) και θερμοκρασίας (20-40°C) και η απενεργοποίηση περιγράφηκε με ένα κινηματικό μοντέλο πρώτης τάξης, όπως και στην περίπτωση της θερμικής απενεργοποίησής, με υπολειμματική δραστηριότητα περίπου 15% της αρχικής σε όλες τις συνθήκες για παρατεταμένο χρονικό διάστημα επεξεργασίας. Έτσι βάσει των αποτελεσμάτων προκύπτει η ύπαρξη δύο ισοενζύμων. Ο ρυθμός απενεργοποίησης της ΠΜΕ αυξήθηκε με αύξηση της πίεσης σε όλες τις θερμοκρασίες που

δοκιμάστηκαν ενώ παρατηρήθηκε συνεργική επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης. ( Katsaros et al., 2010)

Η κινητική απενεργοποίησης της ενδογενούς ΠΜΕ πολτού ροδάκινου με ΥΠ (100-800 MPa) σε συνδυασμό με μέτρια θερμοκρασία (30-70°C) ήταν το αντικείμενο μιας άλλης μελέτης. Εξετάστηκε επίσης η θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου σε ατμοσφαιρική πίεση. Σε όλες τις υψηλές πιέσεις (εκτός δηλαδή από την ατμοσφαιρική), η αδρανοποίηση της ΠΜΕ αυξήθηκε με την αύξηση της εφαρμοζόμενης πίεσης. Για την ίδια θερμοκρασία η αδρανοποίηση που παρατηρείται μέχρι μια ορισμένη τιμή πίεσης ήταν πιο αργή σε σύγκριση με την θερμική απενεργοποίηση. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι δομικές μεταβολές που προκαλούνται από την υψηλή πίεση φαίνεται να έδρασαν προστατευτικά (ανταγωνιστική δράση) και να ενίσχυαν τη θερμική σταθερότητα. Αυτό παρατηρήθηκε στο θερμοκρασιακό εύρος 50-60°C μόνο στο χαμηλό εύρος των πιέσεων (100 MPa), όπου ο ρυθμός απενεργοποίησης ήταν μικρότερος σε σύγκριση με το ρυθμό που παρατηρήθηκε στις ίδιες θερμοκρασίες και ατμοσφαιρική πίεση. Στην υψηλότερη θερμοκρασία που εξετάστηκε (70°C), η ανταγωνιστική δράση παρατηρήθηκε σε πιέσεις μέχρι 600MPa πάνω από την οποία η συνδυασμένη επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης καταλήγει σε ταχύτερη αδρανοποίηση από τη θερμική. (Boulekou, Katsaros & Taoukis, 2008)

Σε αντίθεση με το τι συμβαίνει κατά τη θερμική απενεργοποίηση, κατά την απενεργοποίηση με εφαρμογή πίεσης η ΠΜΕ τομάτας εμφανίζεται πολύ πιο ανθεκτική από ότι η ΠΜΕ πορτοκαλιού. Σε αυτή την περίπτωση έχει παρατηρηθεί μια ακραία ανταγωνιστική επίδραση μεταξύ υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης. Στους 60°C, όπου σε ατμοσφαιρική πίεση λαμβάνει χώρα σημαντική αδρανοποίηση, σε πίεση μέχρι 700 MPa η αδρανοποίηση αναστέλλεται εντελώς. Σε υψηλότερες πιέσεις, πραγματοποιείται αδρανοποίηση αλλά ο ρυθμός αδρανοποίησης στα 900 MPa ήταν πιο αργός σε σχέση με την ατμοσφαιρική πίεση (Crelrier et al, 1995; Van den Broeck et al, 2000a). Σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η ΠΜΕ τομάτας δεν χάνει καθόλου δραστηρότητα σε πιέσεις πάνω από 800 MPa στους 30°C, ακόμα και μετά την εφαρμογή αρκετών κύκλων πίεσης (Crelrier et al., 1995). Λόγω λοιπόν της εξαιρετικής πιεζοανθεκτικότητας της ΠΜΕ τομάτας, έχει μελετηθεί και η καταλυτική δράση της κάτω από συνθήκες αυξημένης πίεσης. Σε ατμοσφαιρική πίεση, η βέλτιστη δραστηρότητα βρέθηκε στους 55°C. Εφαρμογή χαμηλής πίεσης αύξησε την

δραστικότητα της PME, η οποία έγινε μέγιστη σε πίεση 100-200 MPa και σε θερμοκρασία 60- 65°C (Van den Broeck et al., 2000a).



Εικόνα 5.2: Ενδεικτική επίδραση της ΥΠ στα συστατικά τροφίμων

### 5.10. Επίδραση της ΥΠ στα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Η υψηλή πίεση επηρεάζει μόνον μη-ομοιοπολικούς δεσμούς (δεσμούς υδρογόνου, ιοντικούς, και υδρόφοβους δεσμούς), προκαλεί ξεδίπλωμα των πρωτεϊνικών αλυσίδων, και έχει μικρή επίδραση στα χημικά συστατικά που συνδέονται με τις επιθυμητές ιδιότητες των τροφίμων όπως είναι η γεύση, το χρώμα, ή το θρεπτικό περιεχόμενο. Έτσι, σε αντίθεση με τη θερμική επεξεργασία, η εφαρμογή της υψηλής πίεσης προκαλεί αμελητέα βλάβη στην διατροφική αξία, γεύση, άρωμα, χρώμα, ή την περιεχόμενη βιταμίνη (Hayashi, 1990). Μικρά μόρια όπως αμινοξέα, βιταμίνες, και αρωματικές ενώσεις παραμένουν ανεπηρέαστα από την υψηλή πίεση, ενώ η δομή μεγάλων μορίων όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, πολυσακχαρίτες, και νουκλεϊκά οξέα μπορεί να μεταβληθούν (Balci & Wilbey, 1999).

Σύμφωνα με έρευνες λοιπόν, η υπερυψηλή πίεση έχει μικρή επίδραση στις βιταμίνες που περιέχονται στο τρόφιμο. Οι περισσότεροι ερευνητές αναφέρουν ότι το ασκορβικό οξύ επηρεάζεται ελάχιστα από την επεξεργασία με ΥΠ. Για παράδειγμα μετά από επεξεργασία αρακά στα 900 MPa/ 20°C για 5–10 min , το 82% του ασκορβικού οξέος παρέμεινε ανεπηρέαστο (Quaglia et al., 1996). Σύμφωνα με μία άλλη έρευνα, επεξεργασμένος πορτοκαλοχυμός στα 500MPa/ 35°C για 5 λεπτά

εμφάνισε λιγότερη απώλεια ασκορβικού οξέος σε σχέση με συμβατικά παστεριωμένους χυμούς στους 80°C για 30 λεπτά (Polydera, Stoforos & Taoukis, 2003). Επίσης καμία σημαντική μείωση του περιεχόμενου ασκορβικού οξέος δεν παρατηρήθηκε σε κρόκο αυγού, πουρέ γκουάβα και μαρμελάδες φρούτων μετά από επεξεργασία μεταξύ 400 και 600MPa για 10 – 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (Kimura et al., 1994; Yen and Lin, 1996; Sancho et al., 1999). Παρ' όλα αυτά, σε συνθήκες πολύ υψηλής πίεσης (πάνω από 850 MPa) και υψηλής θερμοκρασίας (πάνω από 80°C) για μεγάλους χρόνους προκαλείται σημαντική απώλεια ασκορβικού οξέος. Τα ίδια έχουν βρεθεί και για τις βιταμίνες A,B,E και K και την καροτίνη. ( Butz and Tauscher, 1997)

Όσον αφορά τα λιπίδια, δυστυχώς κατά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση κάποιων τροφίμων προκαλείται οξειδωση και υδρόλυση των λιπιδίων. Για παράδειγμα η πίεση προκαλεί οξειδωση του έξτρα παρθένου ελαιόλαδου καθώς και του σπορέλαιου (Severini et al., 1997). Επίσης έχει βρεθεί ότι αυξάνεται η παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων σε κρέας ψαριού όταν επεξεργαστεί στα 200MPa σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά (Wada, 1992). Τέλος, αυξημένη οξειδωση λιπιδίων έχει βρεθεί σε συμπιεσμένο (800MPa/ 19°C/ 20min ) κρέας καθώς και σε συμπιεσμένο (100-500MPa/ 10°C/ 10 -30min) κρέας γαλοπούλας (Dissing et al., 1997). Παρ' όλα αυτά ο Krebbers et al. (2001) ανέφεραν ότι η παλμική εφαρμογή υψηλής πίεσης 700MPa ( 2 παλμοί με διαφορά ενός λεπτού) σε θερμοκρασία περίπου 65°C μπορεί να διατηρήσει την κατάλληλη περιεκτικότητα λαδιού στο βασιλικό. Η επαγόμενη οξειδωση των λιπιδίων ίσως θέτει όρια στις εφαρμογές της ΥΠ σε προϊόντα κρέατος και ψαριού εκτός και αν χρησιμοποιηθεί ειδική αντιοξειδωτική συσκευασία.

Τέλος όσον αφορά το χρώμα, η επεξεργασία με ΥΠ φαίνεται να μην επηρεάζει το φρέσκο χρώμα φρούτων και λαχανικών όπως η φράουλα, το ροδάκινο και ο πουρές γκουάβα (Yen and Lin, 1996). Μερικοί συγγραφείς αναφέρουν σημαντική διατήρηση της τιμής L για το χρώμα γάλακτος μετά από επεξεργασία σε 300MPa για 1 ώρα. Βέβαια, σε προϊόντα κρέατος μπορεί να προκληθεί σημαντική αλλοίωση χρώματος σε πίεση 200-350MPa και απώλεια του κόκκινου χρώματος. Αυτή η αλλοίωση εξαρτάται μάλλον από την εφαρμοζόμενη πίεση παρά από το χρόνο επεξεργασίας.



### 5.11 Επεξεργασία πορτοκαλοχυμού ποικιλίας Navel με ΥΠ

Η ποιότητα του φρέσκου χυμού πορτοκαλιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία των πηκτινολυτικών ενζύμων καθώς και την ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση του πορτοκαλοχυμού περιλαμβάνουν βακτήρια (κυρίως γαλακτικά βακτήρια), ζύμες και μύκητες με τα γαλακτικά βακτήρια να είναι τα πιο ανθεκτικά κατά την επεξεργασία με ΥΠ. Από τα πηκτινολυτικά ένζυμα, το σημαντικότερο για την περίπτωση του πορτοκαλοχυμού είναι η πηκτινομεθυλεστεράση (ΠΜΕ) στη δράση της οποίας οφείλεται η διαύγαση των χυμών πορτοκαλιού υποβαθμίζοντας την ποιότητά τους. Η πιο διαδεδομένη μέθοδος απενεργοποίησης των δύο αυτών παραγόντων αλλοίωσης είναι η θερμική παστερίωση, με μειονέκτημα όμως την παράλληλη υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και των θρεπτικών συστατικών κατά την επεξεργασία. Βέβαια τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική αύξηση της ερευνητικής δραστηριότητας σχετικά με την επίδραση της επεξεργασίας με ΥΠ σε τρόφιμα, συστατικά τροφίμων και τους παράγοντες αλλοίωσης τους. Τέτοιες μελέτες έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια και για την επεξεργασία με ΥΠ χυμών πορτοκαλιού (π.χ Valencia) (Katsaros et al.,2010) και γενικότερα χυμών εσπεριδοειδών. Παρ' όλα αυτά, διαφορετικοί μικροοργανισμοί εμφανίζουν διαφορετική ανθεκτικότητα σε κάθε συνδυασμό συνθηκών πίεσης και θερμοκρασίας ενώ η συμπεριφορά τους διαφέρει ανάλογα με το τρόφιμο-μέσο που αναπτύσσονται. Ομοίως, για την απενεργοποίηση της ΠΜΕ οι πιέσεις που απαιτούνται κυμαίνονται σε ένα μεγάλο εύρος ανάλογα με την προέλευση και το μέσο στο οποίο εκτελείται η απενεργοποίηση (Van den Broeck, 2000). Έτσι, για την παραγωγή ασφαλών και υψηλής ποιότητας προϊόντων απαιτείται η γνώση των κινητικών μοντέλων απενεργοποίησης των αλλοιογόνων παραγόντων στο εκάστοτε τρόφιμο.

Με βάση τα παραπάνω κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων καθώς και της ενδογενούς ΠΜΕ σε χυμό πορτοκαλιού ποικιλίας Navel. Απώτερος σκοπός ήταν να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας που οδηγούν στην επιθυμητή μείωση του μικροβιακού φορτίου και της ενεργότητας της ΠΜΕ με σκοπό την παραγωγή ασφαλούς και υψηλής ποιότητας NFC πορτοκαλοχυμού Navel.



## 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών που οδηγούν στην απενεργοποίηση των παραγόντων που προκαλούν αλλοίωση σε χυμό πορτοκαλιού ποικιλίας Navel (ένζυμα και μικροοργανισμοί). Μελετήθηκε η κινητική απενεργοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων και του ενζύμου πηκτινομεθυλεστεράση (ΠΜΕ) σε χυμό πορτοκαλιού με την τεχνολογία της Υπερυψηλής Πίεσης. Σκοπός ήταν να μελετηθεί ένα μεγάλο εύρος γαλακτικών βακτηρίων που υπάρχουν ως ενδογενής χλωρίδα μέσα στο χυμό, να προσδιοριστούν τα πιο ανθεκτικά στην πίεση από αυτά και να μελετηθεί η κινητική απενεργοποίησης τους. Παράλληλα μελετήθηκε η κινητική απενεργοποίησης του άλλου σημαντικού αλλοιογόνου παράγοντα, της πηκτινομεθυλεστεράσης. Έτσι μπορούν να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας που θα οδηγήσουν στην επιθυμητή μείωση του μικροβιακού φορτίου και της ενεργότητας της ΠΜΕ. Η επιλογή του είδους αυτού των μικροοργανισμών βασίστηκε στο γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν το πιο ανθεκτικό είδος από αυτά που αναπτύσσονται σε επεξεργασμένο με ΥΠ χυμό, σε σχέση με τις ζύμες και τους μύκητες.

### 6.2 Προελευση του χυμου

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ελληνικός, φυσικός χυμός πορτοκαλιού, ποικιλίας Navel. Η δειγματοληψία του χυμού πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της παραγωγικής περιόδου 2011-2012 σε συνεργασία με την βιομηχανία Ασπίς στο Άργος. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα σε 14 διαφορετικές ημερομηνίες (από 6/12/11-3/4/12) και τα δείγματα μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π. όπου και αποθηκεύτηκαν υπό κατάψυξη (-40 °C) μέχρι την εκτέλεση των πειραμάτων.

Ποσότητα χυμού αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για περίπου 3 εβδομάδες, ώστε να αλλοιωθεί και να απομονωθούν οι μικροοργανισμοί που προκαλούν την αλλοίωση του χυμού.

### 6.3 Απομόνωση των μικροοργανισμών

Ο χυμός αφήνεται να αλλοιωθεί για χρονικό διάστημα περίπου τριών εβδομάδων και στη συνέχεια ένα δείγμα αυτού επεξεργάζεται σε πίεση 300Μρα για 5min. Στο επεξεργασμένο δείγμα πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις και κατόπιν τα αραιωμένα δείγματα απλώνονται σε τρυβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα MRS agar υπό αναερόβιες συνθήκες. Τα δείγματα επωάζονται για 3 ημέρες στους 35°C ώστε να σχηματιστούν αποικίες μικροοργανισμών. Οι αποικίες αυτές λαμβάνονται με κρικοφόρο στυλέο και τοποθετούνται σε διάλυμα θρεπτικού υλικού MRS broth και επωάζονται για 24 ώρες στους 35°C. Από κάθε αποικία λαμβάνεται με στυλέο ποσότητα και τοποθετείται σε διαφορετικό διάλυμα θρεπτικού υλικού κάθε φορά.

### 6.4 Προετοιμασία των Εμβολίων των Μικροοργανισμών

Τα δοχεία στα οποία περιέχονται οι μικροοργανισμοί αφήνονται να αποψυχθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Παράλληλα παρασκευάζονται 100ml διαλύματος θρεπτικού υλικού (MRS broth), αποστειρώνεται στους 121°C για 30 λεπτά σε ειδική συσκευή αποστείρωσης και αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αφού το δείγμα του μικροοργανισμού αποψυχθεί, με αυτόματη πιπέτα που έχει αποστειρωμένο tip λαμβάνονται 100μL και μεταφέρονται στην κωνική φιάλη που περιέχει τα 100ml θρεπτικού υλικού. Η κωνική αυτή φιάλη τοποθετείται σε κλίβανο των 35°C και αφήνεται για επώαση για 20h. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, το δείγμα του μικροοργανισμού λαμβάνεται και υφίσταται για ακόμη μία φορά την παραπάνω διαδικασία (δεύτερο renewal). Τέλος 10ml από το τελικό δείγμα μεταφέρονται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα και μπορούν να αποθηκευτούν σε ψύξη στους 4°C για 20 ημέρες το πολύ. Πριν το πέρας 20 ημερών πρέπει να γίνεται ξανά renewal στο δείγμα.

Από το παραπάνω δείγμα που φυλάσσεται υπό ψύξη στους 4°C λαμβάνονται 100μL με αυτόματη πιπέτα που φέρει αποστειρωμένο tip και μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100mL θρεπτικού υλικού MRS broth. Το δείγμα αυτό τοποθετείται σε κλίβανο των 35°C και αφήνεται για επώαση για 18-20h. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, λαμβάνεται ποσότητα 10ml από το δείγμα, ανακινείται σε vortex και φυγοκεντρείται στις 2000στρ/min για 10 λεπτά.

Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό, προστίθενται 10mL αποστειρωμένου χυμού, ανακινείται σε vortex και επαναφυγοκεντρείται στις 2000στρ/min για ακόμη 10 λεπτά. Απομακρύνεται και πάλι το υπερκείμενο υγρό, και προστίθενται ξανά 10mL αποστειρωμένου χυμού και ανακινείται σε vortex. Στη συνέχεια λαμβάνονται με αποστειρωμένο σιφόνιο 90mL αποστειρωμένου χυμού και μεταφέρονται σε αποστειρωμένη κωνική φιάλη των 250mL. Στο δείγμα αυτό φέρονται τα 10mL του δείγματος του μικροοργανισμού που προέκυψε μετά τις φυγοκεντρήσεις και αναδεύεται καλά, ώστε να υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή του μικροοργανισμού στο χυμό. Το δείγμα που προκύπτει χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση τόσο των θερμικών πειραμάτων όσο και των πειραμάτων με ΥΠ.

## 6.5 Θερμική επεξεργασία των LAB στον πορτοκαλοχυμο

Η θερμική επεξεργασία των γαλακτικών βακτηρίων στο χυμό πορτοκαλιού αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας στην κινητική απενεργοποίησης των δύο πιο ανθεκτικών μικροοργανισμών και πραγματοποιήθηκε με θέρμανση των δειγμάτων σε τέσσερις θερμοκρασίες, 47.5, 50, 52.5 και 55°C.

Το τελικό δείγμα του χυμού-μικροοργανισμού που περιεχόταν σε κωνική φιάλη (βλέπε παράγραφο 6.4.) μοιράστηκε σε 6 σακουλάκια από πολυστρωματικό υλικό (PE, φύλλο αλουμινίου, PP) που είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί με ακτινοβολία UV για 15 λεπτά. Σε κάθε σακουλάκι μεταφέρθηκαν 4ml από το δείγμα του χυμού και σφραγίστηκαν με θερμοκόλληση. Κατόπιν τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα σε υδατόλουτρο με μηχανισμό ανάδευσης, το οποίο είχε ρυθμιστεί στην επιθυμητή κάθε φορά θερμοκρασία. Με το πέρας 30 δευτερόλεπτων (απαιτούμενο διάστημα για να γίνει μεταφορά της θερμοκρασίας από το υδατόλουτρο στο εσωτερικό των δειγμάτων) λήφθηκε το πρώτο σακουλάκι και η χρονική αυτή στιγμή θεωρήθηκε ως χρόνος έναρξης του πειράματος ( $t=0$ ). Στη συνέχεια, μετά από καθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν με τον ίδιο τρόπο και τα υπόλοιπα σακουλάκια και τοποθετούνταν αμέσως σε παγόλουτρο για τη διακοπή της θερμικής απενεργοποίησης των μικροοργανισμών. Κατόπιν τα σακουλάκια ανοίγονταν και το περιεχόμενο αραιωνόταν διαδοχικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν ορό Ringer και απλώνονταν σε τρυβλία petri με τη μέθοδο που θα περιγραφεί στη συνέχεια. Τα τρυβλία επωάζονταν σε θερμοκρασία 30°C για 3 ημέρες και στη συνέχεια

καταμετρούνταν οι αποικίες. Με τη διαδικασία αυτή προσδιορίζονταν το μικροβιακό φορτίο του δείγματος χυμού για διάφορους χρόνους επεξεργασίας.

## **6.6 Επεξεργασία των LAB και της ΠΜΕ του πορτοκαλοχυμού με ΥΠ**

### **6.6.1 Η Μονάδα της Υπερυψηλής Πίεσης**

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων επεξεργασίας των LAB με ΥΠ χρησιμοποιήθηκε η μονάδα Food Pressure Unit FPU 1.01, της Resato International BV (Roden, Holland), η οποία αποτελεί συνιδιοκτησία του Ε.Μ.Π. και του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικών Ερευνών (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.). Η συγκεκριμένη μονάδα είναι εγκατεστημένη και λειτουργεί σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.

Η μονάδα της υπερυψηλής πίεσης αποτελείται από δύο τύπους θαλάμων υπερυψηλής πίεσης. Ο πρώτος περιλαμβάνει μια συστοιχία 6 κυλινδρικών μικροθαλάμων (vessel) υπερυψηλής πίεσης όγκου 42mL ο καθένας, με δυνατότητα ανεξάρτητου χειρισμού καθενός από αυτούς. Το σύστημα αυτό χρησιμοποιείται για την συλλογή κινητικών δεδομένων των αντιδράσεων καταστροφής των παραγόντων αλλοίωσης ή υποβάθμισης των ποιοτικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών των τροφίμων κατά την επεξεργασία τους με υπερυψηλή πίεση. Ο δεύτερος τύπος περιλαμβάνει ένα θάλαμο υπερυψηλής πίεσης όγκου 1.5L, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παραγωγή και μελέτη μεγαλύτερων ποσοτήτων προϊόντων επεξεργασμένων με την τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης.

Στις ακόλουθες εικόνες παρουσιάζεται η μονάδα της ΥΠ



**Εικόνα 6.1 Γενική άποψη της μονάδας της ΥΠ.**



**Εικόνα 6.2 Λεπτομερής άποψη της μονάδας με τα 6 κελιά ΥΠ των 42ml το καθένα, που χρησιμοποιείται για κινητικές μελέτες.**

Η συσκευή ΥΠ μπορεί να δημιουργήσει πίεση μέχρι και 1000MPa και να λειτουργήσει σε θερμοκρασίες από  $-40^{\circ}\text{C}$  έως  $100^{\circ}\text{C}$ . Το μέσο μεταφοράς πίεσης του συστήματος είναι γλυκερόλη. Για να προστατευθούν τα δείγματα από τυχόν επιμόλυνσεις αλλά και για να αποφευχθεί διαρροή των δειγμάτων μέσα στους θαλάμους, είναι απαραίτητο τα δείγματα να συσκευάζονται με δύο υλικά συσκευασίας.

Ο έλεγχος της πίεσης του συστήματος γίνεται από πίνακα ελέγχου ενσωματωμένο στο σύστημα πίεσης, ενώ η πίεση στο συνολικό σύστημα και στον μεγάλο θάλαμο καταγράφεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλου λογισμικού παρεχόμενου από την εταιρεία κατασκευής του εξοπλισμού. Ο ρυθμός αύξησης της πίεσης είναι περίπου 100MPa/7s και ενώ ο χρόνος εκτόνωσης δεν ξεπερνά τα 3s.

Για τον έλεγχο της θερμοκρασίας των θαλάμων χρησιμοποιείται ανεξάρτητο κύκλωμα θερμού νερού, το οποίο θερμαίνεται σε υδατόλουτρο. Το νερό κυκλοφορεί μέσα σε μανδύες που περιβάλλουν κάθε θάλαμο με τη βοήθεια φυγόκεντρης αντλίας. Το πόμα κάθε θαλάμου φέρει θερμοστοιχείο το οποίο συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή και η καταγραφή της θερμοκρασίας γίνεται μέσω κατάλληλου λογισμικού παρεχόμενου από την εταιρεία κατασκευής του εξοπλισμού.

### **6.6.2 Επεξεργασία των LAB του Πορτοκαλοχυμού με ΥΠ**

Για την κινητική μελέτη απενεργοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων σε πορτοκαλοχυμό κατά την επεξεργασία με συνδυασμένη εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα που περιλαμβάνει τους 6 κυλινδρικούς μικροθαλάμους υπερυψηλής πίεσης. Πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων.

Η πρώτη από αυτές αφορά στην εύρεση των πιο πιεσοάντοχων από τους 11 μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν και πραγματοποιήθηκε με συνδυασμένη επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση στα 300MPa και θερμοκρασία των 30°C για 5 λεπτά. Η δεύτερη αφορά στην επίδραση της συνδυασμένης πίεσης και θερμοκρασίας στην κινητική απενεργοποίησης των δύο πιο πιεσοάντοχων μικροοργανισμών, η οποία πραγματοποιήθηκε με συμπίεση δειγμάτων χυμού-μικροοργανισμού, σε διάφορες πιέσεις από 150MPa έως 300MPa διατηρώντας σταθερή την θερμοκρασία σε επιθυμητό επίπεδο. Μελετήθηκαν τρία θερμοκρασιακά εύρη 25, 30 και 35°C. Ο χρόνος επεξεργασίας προσδιορίστηκε κατά τον σχεδιασμό των πειραμάτων και διαφοροποιήθηκε σε κάθε πείραμα ανάλογα με την εφαρμοζόμενη πίεση, τη θερμοκρασία και τον εξεταζόμενο μικροοργανισμό. Για την διεξαγωγή των πειραμάτων στις εκάστοτε επιλεγμένες συνθήκες ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Δείγματα όγκου 4mL του διαλύματος χυμού-μικροοργανισμού συσκευάστηκαν σε σακουλάκια από πολυστρωματικό υλικό (PE, φύλλο αλουμινίου,



PP), τα οποία σφραγίστηκαν σε μηχανήμα συσκευασίας υπό κενό, υπό αυστηρώς ασηπτικές συνθήκες. (Τα σακουλάκια είχαν αποστειρωθεί με ακτινοβόληση UV). Για την αποφυγή διαρροής του δείγματος από τα σακουλάκια στο υγρό μεταφοράς της πίεσης, τα σακουλάκια τοποθετήθηκαν σε δεύτερη συσκευασία. Οι θάλαμοι ρυθμίστηκαν στην κατάλληλη θερμοκρασία με χρήση συστήματος θέρμανσης-ψύξης (υδατόλουτρο).

Αρχικά, οι βαλβίδες εισαγωγής του υγρού πίεσης στα δοχεία ήταν ανοιχτές ώστε η επιθυμητή πίεση του συστήματος να μεταφερθεί σε κάθε ένα από αυτά. Εφόσον ρυθμίστηκε και επιτεύχθηκε η επιθυμητή πίεση, κλείστηκαν οι βαλβίδες, οπότε οι θάλαμοι πίεσης απομονώθηκαν και η πίεση διατηρήθηκε σταθερή σε κάθε έναν από αυτούς. Η χρονική αυτή στιγμή θεωρήθηκε ως ο χρόνος έναρξης των πειραμάτων ( $t=0$ ), οπότε και εξασφαλίστηκαν οι ισοθερμοκρασιακές και ισοβαρείς συνθήκες του πειράματος. Τη χρονική στιγμή μηδέν ανοίχθηκε η βαλβίδα του πρώτου θαλάμου, οπότε η πίεση εκτονώθηκε. Οι υπόλοιπες βαλβίδες ανοίχθηκαν ύστερα από καθορισμένα χρονικά διαστήματα που είχαν προσδιοριστεί κατά τον σχεδιασμό του πειράματος. Τα δείγματα κατόπιν αραιώνονταν διαδοχικά και απλώνονταν σε τρυβλία petri. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε όμοια και για τις δύο σειρές πειραμάτων, ενώ σε κάθε πείραμα εξετάζόταν και ένα ασυμπιεστο δείγμα (δείγμα control) για την εύρεση του αρχικού μικροβιακού φορτίου του χυμού.

### 6.6.3 Επεξεργασία της ΠΜΕ του Πορτοκαλοχυμού με ΥΠ

Για την κινητική μελέτη απενεργοποίησης της ΠΜΕ με ΥΠ έγιναν πειράματα σε 3 θερμοκρασίες και 3 πιέσεις για κάθε θερμοκρασία: 20°C, 30°C, 40°C και 200, 400 και 600Mpa. Δείγματα πορτοκαλοχυμού όγκου 5mL τοποθετήθηκαν σε σακουλάκια από πολυστρωματικό υλικό (PE, φύλλο αλουμινίου,PP) και σε εξωτερική συσκευασία και σφραγίστηκαν σε μηχανήμα συσκευασίας υπό κενό. Για κάθε συνθήκη τα δείγματα τοποθετούνταν στους μικρούς θαλάμους, που ήταν πληρωμένοι με το υγρό μεταφοράς πίεσης και επεξεργάστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στη παράγραφο 6.6.2. Μετά το πέρας της κατεργασίας, τα δείγματα αφαιρέθηκαν από τους θαλάμους και προστέθηκαν σε παγόλουτρο μέχρι την μεταφορά τους στο εργαστήριο και τη μέτρηση της ενεργότητάς τους.

#### 6.6.4 Μέτρηση ενεργότητας της ΠΜΕ με τιτλοδότηση

Η μέτρηση της ενεργότητας έγινε με αυτόματο τιτλοδότη (TIM 854, TitraLab, Radiometer Titrations Manager) και στηρίζεται στην μέτρηση παροχής διαλύματος NaOH 0.02N που απαιτείται ώστε να διατηρηθεί σταθερό το pH ενζυμικού διαλύματος και υποστρώματος πηκτίνης στο 7.5, το οποίο συνεχώς μειώνεται λόγω απελευθέρωσης πηκτινικών οξέων από τη δράση του ενζύμου



**Εικόνα 6.3:** ο αυτόματος τιτλοδότης που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της ενεργότητας ΠΜΕ. Διακρίνεται η κυψελίδα μέτρησης η οποία διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία 30°C μέσω κυκλοφορίας θερμού νερού καθώς και η φιάλη με το διάλυμα NaOH (δεξιά)

Για κάθε μέτρηση απαιτούνται 50mL διαλύματος πηκτίνης (πηκτίνη από μήλα Fluka Analytical περίπου 75% βαθμού εστεροποίησης, 1%w/v, 0.3M NaCl, διόρθωση σε pH=7.5 με NaOH 0.2N) και 2mL ενζυμικού διαλύματος. Συνδυάζοντας το ένζυμο και το υπόστρωμα, ο τιτλοδότης διοχετεύει για 5' διάλυμα NaOH ενώ καταγράφει την ογκομετρική παροχή του διαλύματος μετά το 3<sup>ο</sup> λεπτό, ώστε αυτή να είναι σταθερή. Η θερμοκρασία στην κυψελίδα του τιτλοδότη ήταν για όλες τις μετρήσεις σταθερή στους 30°C.

Από την ογκομετρική παροχή που λαμβάνεται στο τέλος της μέτρησης ως ένδειξη, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η δραστηκότητα του ενζυμικού διαλύματος. Ως 1 unit ΠΜΕ ορίζεται εκείνη η ποσότητα ενζύμου που απελευθερώνει 1 μmol πηκτινικών οξέων ανά min. Εξουδετέρωση 1 μmol πηκτινικών οξέων απαιτεί 1 μmol

NaOH. Έτσι η παροχή διαλύματος καυστικού νατρίου εύκολα ανάγεται σε ενεργότητα ενζύμου σύμφωνα με τα παρακάτω:

Αν  $Q$  (mL/min) είναι η παροχή NaOH του τιτλοδότη, και το διάλυμα έχει συγκέντρωση  $0.02M=20\mu\text{mol/mL}$ , τότε η δραστηριότητα του ενζύμου στα 2mL του δείγματος που μετράται θα είναι:

$$A\left(\frac{U}{\text{mL}}\right) = \frac{1}{2\text{mL}} Q\left(\frac{\text{mL}}{\text{min}}\right) \cdot 20\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right) \quad (6.1)$$

Αν τα 2 mL διαλύματος μέτρησης προέκυψαν από την αραιώση  $V_1$  mL ενζυμικού συμπκνώματος σε  $V_B$  mL ρυθμιστικού διαλύματος, τότε η ενεργότητα του ενζύμου στο ενζυμικό συμπύκνωμα θα είναι:

$$A\left(\frac{U}{\text{mL}}\right) = \frac{V_B + V_1}{2V_1} \cdot Q\left(\frac{\text{mL}}{\text{min}}\right) \cdot 20\left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}\right) \quad (6.2)$$

Η εξίσωση (6.2) είναι απαραίτητη μόνο για τον προσδιορισμό της απόλυτης ενεργότητας του ενζύμου κατά τον καθαρισμό. Στα κινητικά πειράματα, επειδή χρησιμοποιείται λόγος ενεργοτήτων για να εκφράσει τη μεταβολή της ενεργότητας, η εξίσωση ανάγεται απλά σε λόγο ογκομετρικών παροχών  $Q$  του τιτλοδότη.

### 6.6.5 Μέτρηση του πληθυσμού των LAB μετά την επεξεργασία

#### 6.6.1.i Τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων

Από το επεξεργασμένο δείγμα λαμβάνεται 1mL διαλύματος με χρήση αυτόματης πιπέτας και αποστειρωμένου tip και τοποθετείται σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9mL ορού Ringer, και αναδεύεται καλά ώστε το καινούργιο διάλυμα να είναι ομοιογενές. Το διάλυμα αυτό χαρακτηρίζεται ως  $10^{-1}$ . Στη συνέχεια, με χρήση καινούργιου tip λαμβάνεται 1mL από αυτό το διάλυμα και τοποθετείται σε επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει ίδια ποσότητα ορού Ringer και ανακινείται καλά. Το διάλυμα αυτό χαρακτηρίζεται ως  $10^{-2}$ . Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για ακόμη τόσες φορές όσες είναι οι επιθυμητές αραιώσεις. Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται υπό όσο το δυνατόν πιο ασηπτικές συνθήκες κοντά σε φλόγα.

### **6.6.1.ii Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος**

Για τον έλεγχο των γαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιείται το επιλεκτικό υπόστρωμα de Mann, Rogosa and Sharpe's (MRS Agar, Merck). Για την παρασκευή του, σε γυάλινη κωνική φιάλη διαλύονται σε απιονισμένο νερό τόσα γραμμάρια σκόνης θρεπτικού υποστρώματος απαιτούνται ώστε να παραχθεί η επιθυμητή ποσότητα υποστρώματος (66,2g σε 1000mL απιονισμένου νερού). Κατόπιν η φιάλη κλείνεται και τοποθετείται σε αυτόκλειστο όπου θα πραγματοποιηθεί αποστείρωση του στους 121°C για 30 λεπτά. Μετά την αποστείρωση, η κωνική φιάλη τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50-60°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί, ώστε να αποφευχθεί η στερεοποίησή του.

### **6.6.1.iii Ανάπτυξη αποικιών στο θρεπτικό υπόστρωμα**

Από κάθε αραιώση (ή από το αρχικό δείγμα αν επιζητείται μηδενική αραιώση) λαμβάνεται ποσότητα 1mL με χρήση αυτόματης πιπέτας και αποστειρωμένου tip και τοποθετείται σε άδειο αποστειρωμένο τρυβλίο. Το επιλεκτικό (για τα γαλακτικά βακτήρια) θρεπτικό υπόστρωμα MRS Agar ψύχεται ελαφρώς και διανέμεται στα τρυβλία που περιέχουν τις αραιώσεις του δείγματος, σε ποσότητα τέτοια ώστε να καλύπτεται η επιφάνεια του τρυβλίου και παράλληλα η στρώση να είναι αρκετά λεπτή. Στη συνέχεια τα τρυβλία ανακινούνται ελαφρώς, ώστε να εξασφαλίζεται ομοιόμορφη κατανομή του διαλύματος, και αφήνονται να κρυσώσουν και να στερεοποιηθεί το υλικό επίστρωσης. Ακολουθεί δεύτερη στρώση θρεπτικού υλικού σε ίδια ποσότητα ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια του τρυβλίου, διαδικασία με την οποία εξασφαλίζονται οι αναερόβιες συνθήκες ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων. Όταν στερεοποιηθεί και η δεύτερη στρώση του θρεπτικού υλικού, τα τρυβλία κλείνονται με τα καπάκια τους, γυρίζονται ανάποδα και τοποθετούνται σε σακούλες. Οι σακούλες αυτές τοποθετούνται σε κλίβανο θερμοκρασίας 30°C και αφήνονται για επώαση για 3 ημέρες.

### **6.6.1.iv Καταμέτρηση των αποικιών των LAB**

Μετά το πέρας των 3 ημερών, τα τρυβλία βγαίνουν από τον κλίβανο επώασης και φέρονται για καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών. Όσο πιο μικρή είναι η

αραίωση του δείγματος, τόσο πιο πυκνές και δυσδιάκριτες εμφανίζονται οι σχηματιζόμενες αποικίες. Η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιείται στην αραίωση εκείνη που υπάρχουν 50-200 αποικίες ανά τρυβλίο. Κάθε αποικία που μετριέται διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες με μια τελεία πάνω σε αυτήν με τη χρήση μαρκαδόρου. Στην περίπτωση που οι αραιώσεις που έχουν πραγματοποιηθεί είναι αρκετά μικρές και οι αποικίες αρκετά πυκνές και μικρές, τότε είναι δυνατόν ο πειραματιστής να χωρίσει το τρυβλίο σε μικρότερα μέρη σχηματίζοντας διαμέτρους στο τρυβλίο, να μετρήσει τις αποικίες σε ένα από αυτά και κατόπιν να ανάγει το αποτέλεσμα για όλο το τρυβλίο. Η τεχνική αυτή είναι αρκετά δύσκολη και απαιτεί έμπειρο πειραματιστή ώστε κάθε τμήμα του τρυβλίου που θα χωρίσει να περιέχει ισόποσες αποικίες, και χρησιμοποιείται σπάνια και σε περιπτώσεις όπου απαιτείται πολύ άμεσο αποτέλεσμα.

#### 6.6.1.v Υπολογισμός του μικροβιακού φορτίου

Ο αριθμός των αποικιών που μετρώνται σε ένα τρυβλίο πολλαπλασιαζόμενος με τον αντίστροφο της αραίωσης στην οποία μετρήθηκαν δίνει τις ικανές αποικίες να σχηματίσουν βιολογικές μονάδες ανά γραμμάριο ή mL δείγματος. Για παράδειγμα, αν σε ένα τρυβλίο αραίωσης  $10^{-5}$  μετρήθηκαν συνολικά 85 αποικίες γαλακτικών βακτηρίων, τότε το συνολικό φορτίο θα είναι :

$$\text{Μικροβιακό Φορτίο} = \frac{\text{Μετρούμενες Αποικίες}}{\text{Αραίωση}} \quad (\text{εξίσωση 6.3})$$

$$85 \cdot \frac{1}{10^{-5}} = 8500000 \text{ CFU} / \text{g ή mL}$$

Συνήθως όταν πρόκειται για την επεξεργασία αποτελεσμάτων, δεν χρησιμοποιούνται τόσο μεγάλοι αριθμοί αλλά αντί αυτών χρησιμοποιείται ο δεκαδικός τους λογάριθμος.

$$\text{Μικροβιακό Φορτίο} = \log \left( \frac{\text{Μετρούμενες Αποικίες}}{\text{Αραίωση}} \right) \quad (\text{εξίσωση 6.4})$$

$$\log(8500000) = 6,93 \text{ log CFU} / \text{g ή mL}$$

### 6.6.6 Μαθηματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

#### 6.6.1.vi Μοντέλο Baranyi

Σε μια καλλιέργεια κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες, η βακτηριακή ανάπτυξη μπορεί γενικά να χαρακτηριστεί από μια σιγμοειδή καμπύλη, όπου η εξαρτημένη μεταβλητή είναι ο λογάριθμος της κυτταρικής συγκέντρωσης. Σε μια δεδομένη χρονική στιγμή η κλίση αυτής της καμπύλης παρέχει τον στιγμιαίο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά ενός οργανισμού σε δεδομένο περιβάλλον είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης στο σημείο καμπής της σιγμοειδούς καμπύλης. Μια άλλη σημαντική παράμετρος είναι η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, η οποία συνήθως προσδιορίζεται από το σημείο όπου η εφαπτομένη στο σημείο καμπής τέμνει τη χαμηλότερη ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης.

Το μοντέλο Baranyi et al. (1993) αποτελεί ένα μοντέλο μικροβιακής ανάπτυξης, το οποίο αποσκοπεί πρώτα απ' όλα να δώσει έναν απλό αλλά περισσότερο μηχανιστικό ορισμό, για την διάρκεια της λανθάνουσας φάσης. Πρόκειται για ένα μοντέλο το οποίο περιγράφει τη λανθάνουσα φάση σαν μια διαδικασία προσαρμογής σε νέο περιβάλλον. Η προσέγγιση αυτή ήδη προϋποθέτει ένα μη αυτόνομο μοντέλο, αφού λαμβάνει υπόψη του μια ξαφνική εξωτερική επίδραση στο σύστημα. Σύμφωνα με την μαθηματική αυτή προσέγγιση, ένα δεδομένο περιβάλλον προσδιορίζει το δυνητικό ρυθμό ανάπτυξης της καλλιέργειας, ο οποίος είναι υψηλότερος από τον πραγματικό, σε χρονική στιγμή κοντά σε αυτήν του εμβολιασμού. Η αναλογία του πραγματικού προς τον δυνητικό ρυθμό ανάπτυξης χαρακτηρίζει τη διαδικασία προσαρμογής των κυττάρων στο νέο περιβάλλον.

## 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 7.1 Προσδιορισμός των πιο ανθεκτικών μικροοργανισμών στη θερμοκρασία και την υπερυψηλή πίεση

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα συνολικό πείραμα υψηλής πίεσης και για τους 11 μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν ώστε να προσδιοριστούν οι δύο πιο πιεζοάντοχοι από αυτούς. Μελετώντας αυτούς τους δύο μικροοργανισμούς και προσδιορίζοντας την κινητική απενεργοποίησή τους μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα για το σύνολο των γαλακτικών βακτηρίων που περιέχονται στο χυμό πορτοκαλιού. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή υψηλής πίεσης στα 300MPa και σε θερμοκρασία 25°C για 5 λεπτά και η μεταβολή του μικροβιακού φορτίου παρουσιάζεται στον πίνακα 7.1.

**Πίνακας 7.1 Μεταβολή του μικροβιακού φορτίου των δειγμάτων των 11 μικροοργανισμών μετά από 5min στα 300MPa και τους 25°C**

a/a Μικροοργανισμού	Log (N <sub>0</sub> )	Log (N <sub>5</sub> )	Log (N <sub>0</sub> ) - Log (N <sub>5</sub> )
<b>1</b>	7,82	2,02	<b>5,8</b>
<b>2</b>	7,91	2,21	<b>5,7</b>
<b>3</b>	8,14	1,13	7,01
<b>4</b>	8,18	1	7,18
<b>5</b>	8,08	M.A *	8,08
<b>6</b>	8,34	1,48	6,86
<b>7</b>	7,87	1,6	6,27
<b>8</b>	7,46	M.A	7,46
<b>9</b>	7,91	M.A	7,91
<b>10</b>	8,04	2	6,04
<b>11</b>	7,89	M.A	7,89

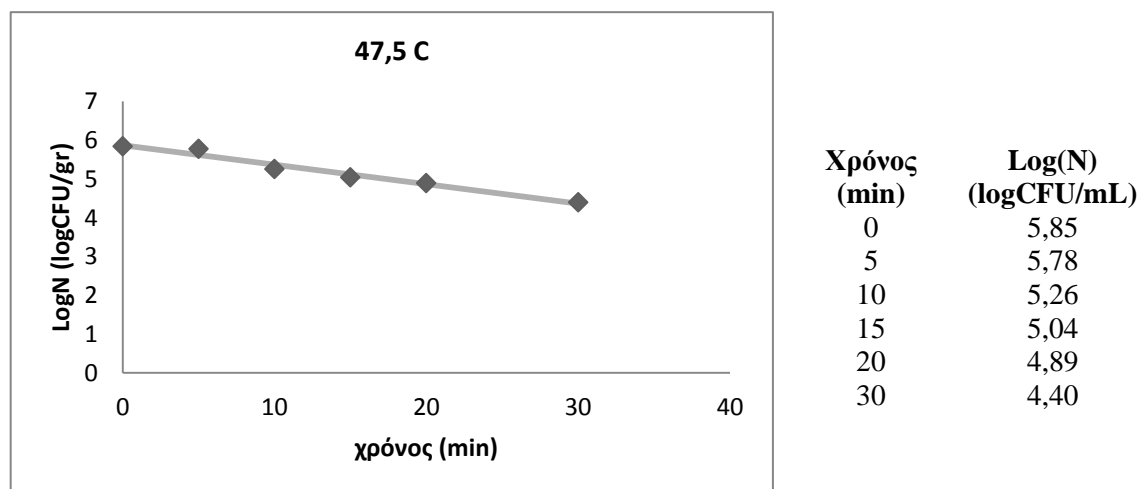
\* M.A = Μή Ανισνέυσιμο

Όπως φαίνεται από τις τιμές του παραπάνω πίνακα, τη μικρότερη μεταβολή του μικροβιακού φορτίου παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί με τα κωδικά ονόματα 1 και 2 Συγκεκριμένα, για το μικροοργανισμό 1 παρατηρήθηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά 5,8 λογαρίθμους ενώ για το μικροοργανισμό 2, παρατηρήθηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά 5,7 λογαρίθμους. Επομένως, οι δύο πιο πιεσοάντοχοι μικροοργανισμοί για τους οποίους θα μελετηθεί η κινητική απενεργοποίησής τους είναι οι μικροοργανισμοί 1 και 2.

## 7.2 Θερμική απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων

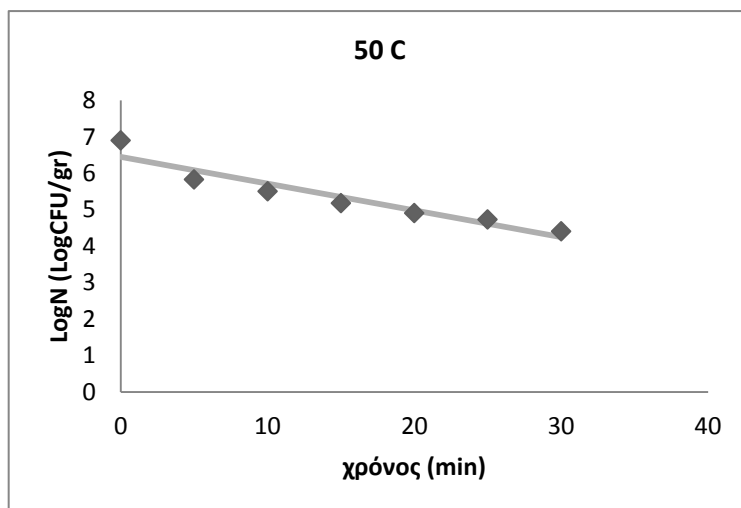
Κατά τη θερμική επεξεργασία προσδιορίστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων στον πορτοκαλοχυμό (LAB1 και LAB 2) ως συνάρτηση του χρόνου επεξεργασίας στις θερμοκρασίες των 47,5 , 50 , 52,5 και 55°C για διάφορους χρόνους, και υπολογίστηκε ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού των βακτηρίων αυτών. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων (LAB1 και LAB2) συναρτήσει του χρόνου για τις διάφορες θερμοκρασίες επεξεργασίας.

### 7.2.1 Θερμική απενεργοποίηση του LAB1



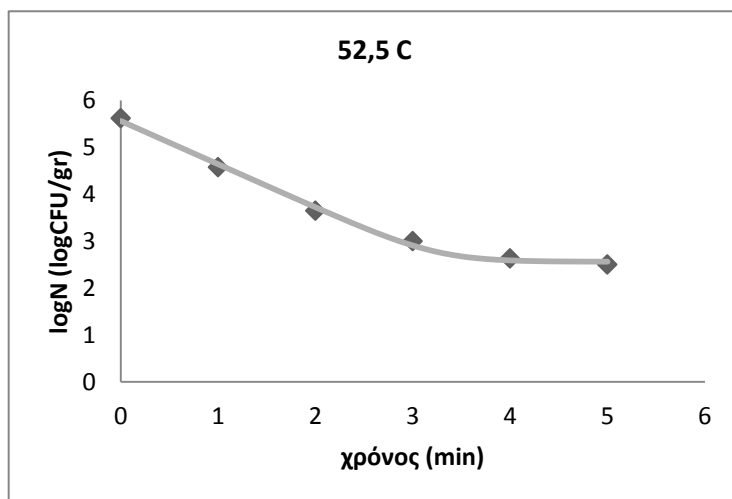
Διάγραμμα 7.1 Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στους 47,5°C.





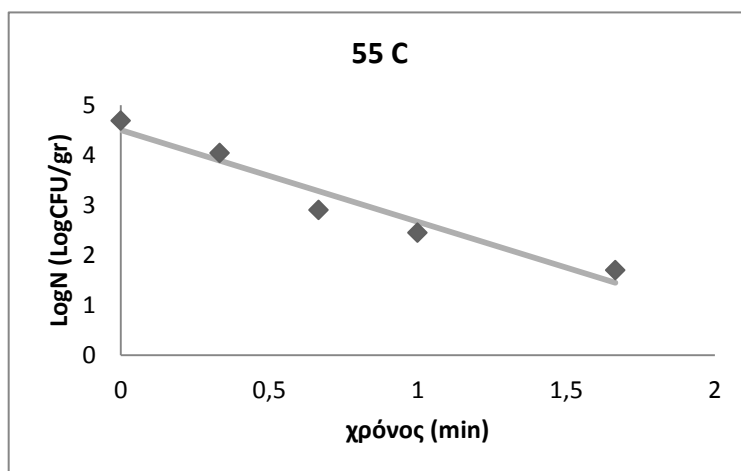
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,90
5	6,10
10	5,51
15	5,18
20	4,90
25	4,73
30	4,40

Διάγραμμα 7.2 Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στους 50°C.



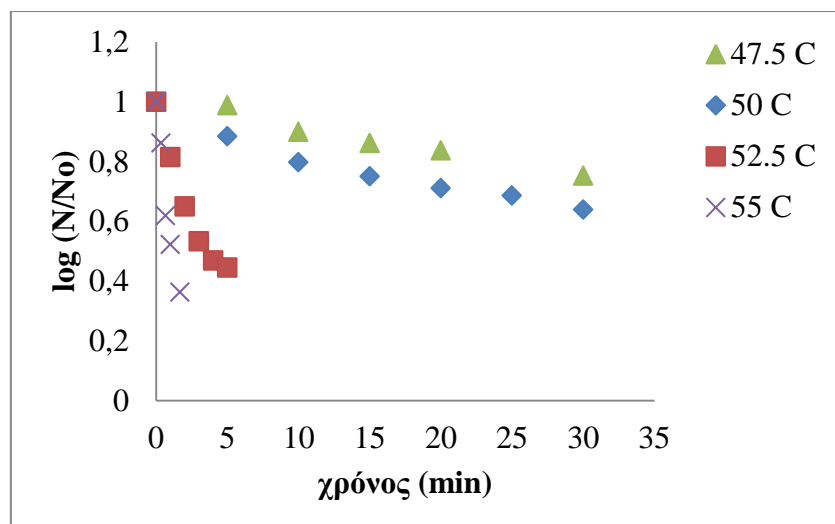
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	5,62
1	4,58
2	3,65
3	3,00
4	2,63
5	2,51

Διάγραμμα 7.3: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στους 52,5°C.



Χρόνος (min)	LogN (logCFU/gr)
0	4,69
0,3	4,04
0,7	2,90
1	2,45
1,7	1,70

Διάγραμμα 7.4: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στους 55°C.



**Διάγραμμα 7.5** Διάγραμμα Απενεργοποίησης του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε θερμοκρασία.

Τα παραπάνω διαγράμματα έγιναν με χρήση του μοντέλου Baranyi και προσδιορίστηκαν οι κλίσεις. Έτσι υπολογίζεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού για κάθε θερμοκρασία σύμφωνα με την εξίσωση:

$$D_T = -1 / \text{κλίση (min)} \quad (\text{εξίσωση 7.1})$$

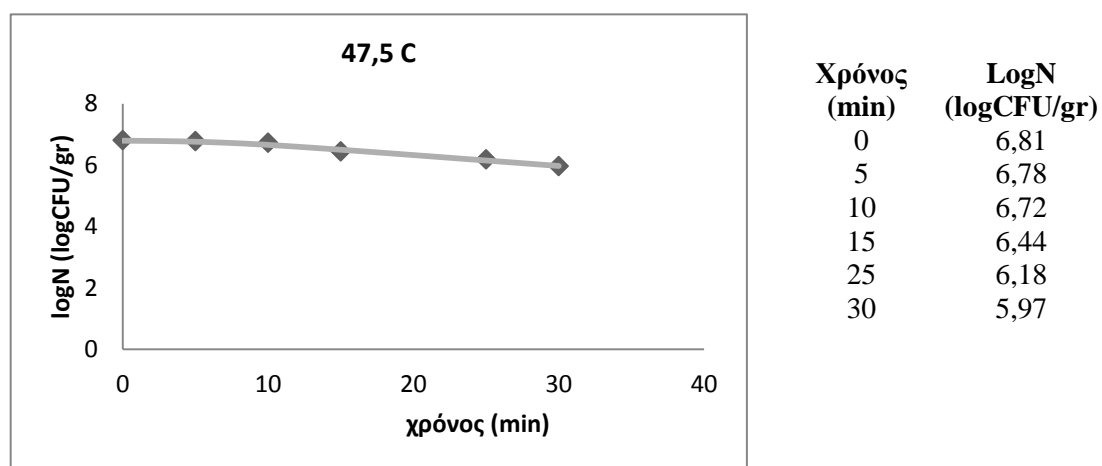
Βάση της εξίσωσης 7.1 υπολογίζεται ο ζητούμενος χρόνος υποδεκαπλασιασμού για κάθε θερμοκρασία. Στον πίνακα 7.2 παρουσιάζονται οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού του LAB1 για κάθε θερμοκρασία έτσι όπως υπολογίστηκαν μέσω του μοντέλου Baranyi.

**Πίνακας 7.2 :** Χρόνοι Υποδεκαπλασιασμού του LAB1 για Κάθε Θερμοκρασία

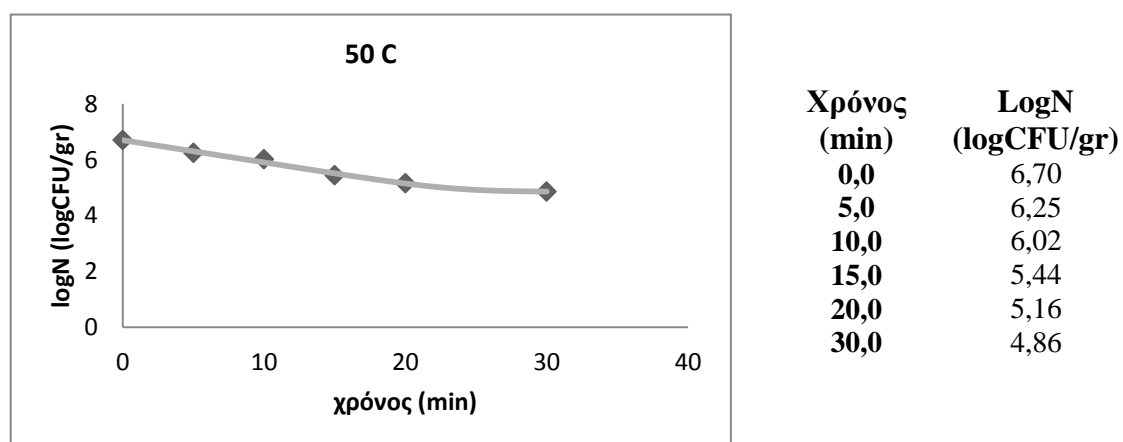
Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού $D_T$ (min) από μοντέλο Baranyi	$R^2$
47,5	19,92	0,9619
50	13,61	0,8897
52,5	1,08	0,9942
55	0,55	0,9284

Από τον πίνακα 7.2 φαίνεται ότι, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία επεξεργασίας του δείγματος του μικροοργανισμού τόσο μειώνεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μειώνεται η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στη θέρμανση και η απενεργοποίηση λαμβάνει χώρα με μεγαλύτερο ρυθμό. Συγκεκριμένα παρατηρείται ότι στους 47,5 και στους 50 οι τιμές του χρόνου υποδεκαπλασιασμού είναι πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες στους 52,5 και στους 55.

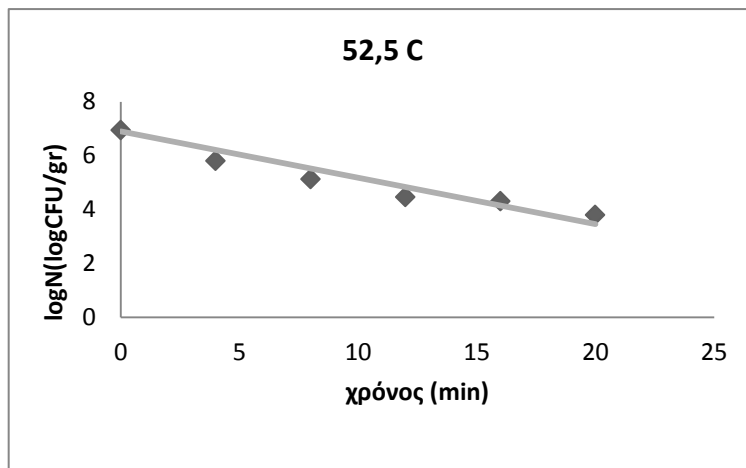
### 7.2.2 Θερμική απενεργοποίηση του LAB2



Διάγραμμα 7.6: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στους 47,5°C

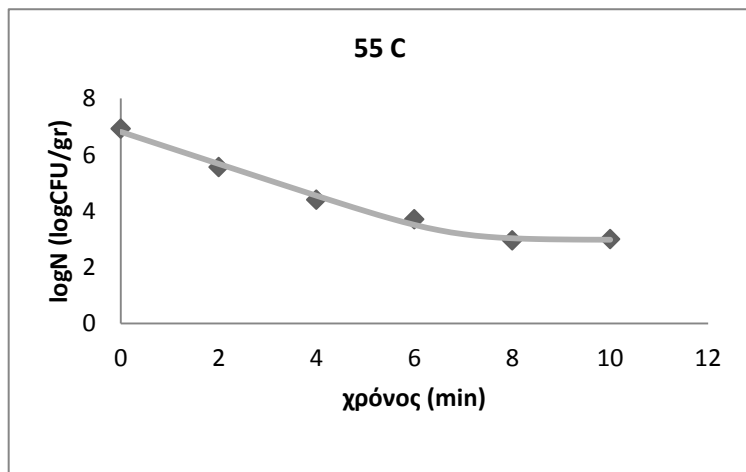


Διάγραμμα 7.7: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στους 50°C



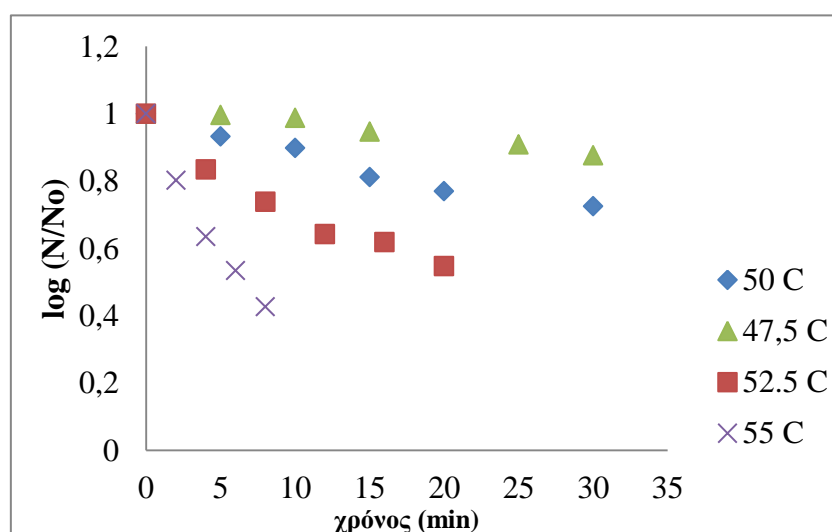
Χρόνος (min)	LogN (logCFU/gr)
0	6,95
4	5,80
8	5,13
12	4,46
16	4,30
20	3,80

Διάγραμμα 7.8: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στους 52,5°C



Χρόνος (min)	LogN (logCFU/gr)
0	6,93
2	5,57
4	4,40
6	3,70
8	2,95
10	3,00

Διάγραμμα 7.9: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στους 55°C



Διάγραμμα 7.10: Διάγραμμα Απενεργοποίησης του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε θερμοκρασία

Βάσει της εξίσωσης 7.1 υπολογίζεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού για κάθε θερμοκρασία με χρήση του μοντέλου Baranyi και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.3.

**Πίνακας 7.3 Χρόνοι υποδεκαπλασιασμού του LAB2 για κάθε θερμοκρασία**

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού $D_T$ (min) από μοντέλο Baranyi	$R^2$
47,5	28,22	0,9768
50	12,57	0,9856
52,5	5,81	0,9088
55	1,76	0,9876

Από τον πίνακα φαίνεται ότι, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία επεξεργασίας του δείγματος του μικροοργανισμού τόσο μειώνεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μειώνεται η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στη θέρμανση και η απενεργοποίηση λαμβάνει χώρα με μεγαλύτερο ρυθμό όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του LAB1.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των πινάκων 7.2 και 7.3 προκύπτει ότι ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά ένα λογαριθμικό κύκλο για τις θερμοκρασίες των 47,5 52,5 και 55°C είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση του LAB2 σε σχέση με αυτόν του LAB1. Αντίθετα, στην θερμοκρασία των 50°C η τιμή του D φαίνεται να είναι ελαφρά μεγαλύτερη στην περίπτωση του LAB1.

### 7.2.3 Προσδιορισμός της Σταθεράς Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία ( $Z_T$ ) των Εξεταζόμενων Μικροοργανισμών

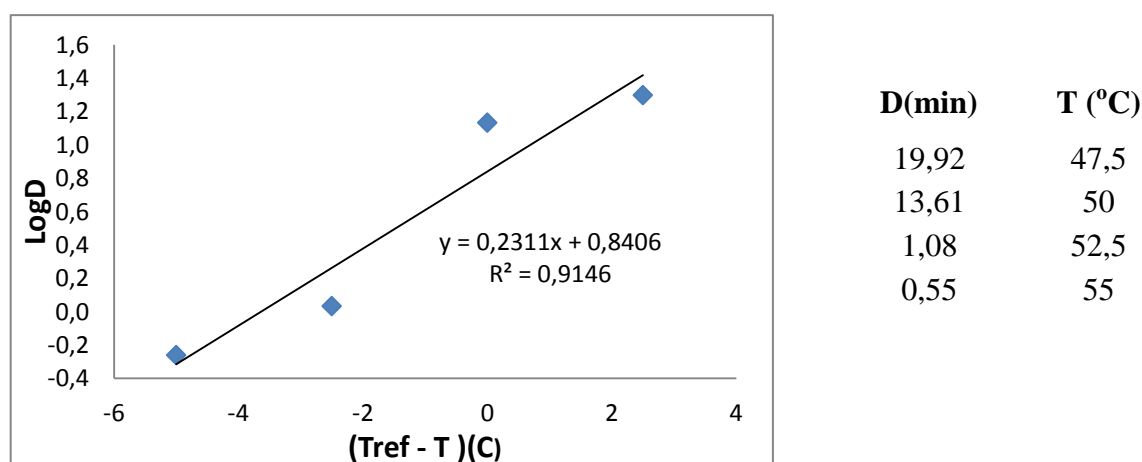
Η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου από τη θερμοκρασία περιγράφεται από την εξίσωση :

$$D = D_{T_{ref}} \cdot 10^{\left(\frac{T_{ref}-T}{Z_T}\right)} \Rightarrow \log D = \log D_{T_{ref}} + \frac{T_{ref}-T}{Z_T} \quad (\text{εξίσωση 7.2})$$

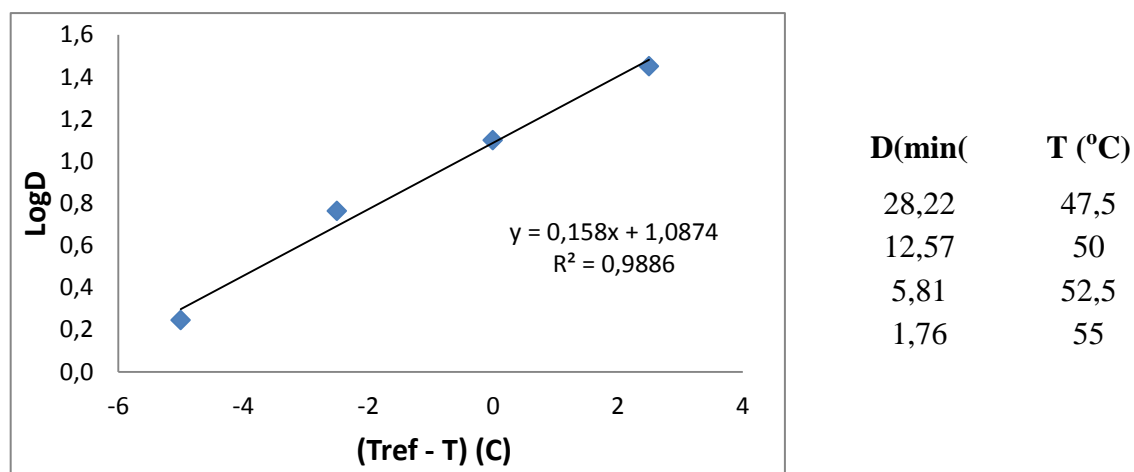
Βάσει της καμπύλης του χρόνου θερμικού θανάτου ενός μικροοργανισμού, η σταθερά εξάρτησης από τη θερμοκρασία του μικροοργανισμού ορίζεται ως το αντίστροφο της κλίσης της προκύπτουσας ευθείας και επομένως δίνεται από την εξίσωση :

$$Z_T = \frac{T_{ref}-T}{\log\left(\frac{D}{D_{ref}}\right)} \quad (\text{εξίσωση 7.3})$$

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες του χρόνου υποδεκαπλασιασμού για καθένα από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς, θεωρώντας ως  $T_{ref}$  τους 50°C. Επίσης, στον πίνακα 7.4 παρουσιάζονται οι υπολογιζόμενες τιμές της σταθεράς εξάρτησης από τη θερμοκρασία για καθένα από τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν.



Διάγραμμα 7.11: Καμπύλη χρόνου υποδεκαπλασιασμού του LAB1



Διάγραμμα 7.12: Καμπύλη χρόνου υποδεκαπλασιασμού του LAB2

Πίνακας 7.4: Σταθερές εξάρτησης από τη θερμοκρασία

Μικροοργανισμός	Σταθερά Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία $Z_T$ (°C)	$R^2$
LAB1	4,33	0,9146
LAB2	6,33	0,9886

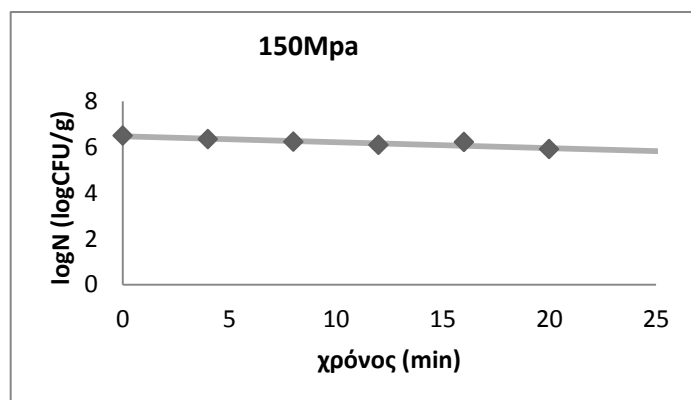
Από τα αποτελέσματα του πίνακα 7.4 φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός LAB2 εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή της σταθεράς εξάρτησης από τη θερμοκρασία, που σημαίνει ότι υπάρχει μικρότερη εξάρτηση της απενεργοποίησής του από τη θερμοκρασία και άρα είναι πιο θερμοάντοχος συγκριτικά με τον LAB1

### 7.3 Επεξεργασία των γαλακτικών βακτηρίων με συνδυασμένη εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας των γαλακτικών βακτηρίων στον πορτοκαλοχυμό με υπερυψηλή πίεση σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία, για διάφορους χρόνους επεξεργασίας. Εφαρμόστηκαν πιέσεις από 150 έως 300MPa και για θερμοκρασίες 25, 30 και 35°C. Η χρονική διάρκεια της επιβαλλόμενης πίεσης προσδιορίστηκε ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες επεξεργασίας. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων (LAB1 και LAB2) συναρτήσει του χρόνου για κάθε πίεση σε κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας.

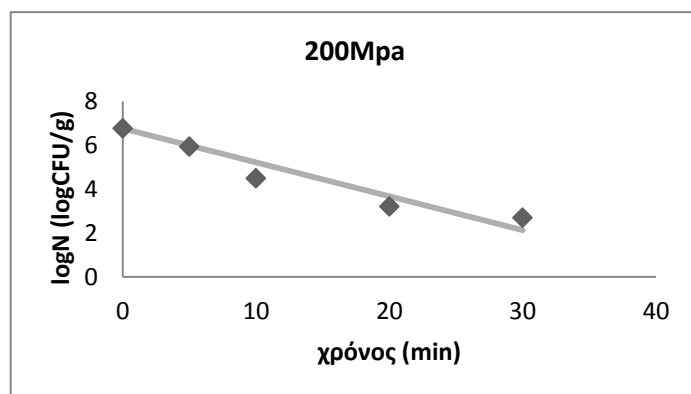
#### 7.3.1 Απενεργοποίηση του LAB1 Συναρτήσει του Χρόνου Επεξεργασίας

##### Απενεργοποίηση σε Θερμοκρασία 25°C



Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,00
4	5,85
8	5,74
12	5,60
16	5,72
20,0	5,41

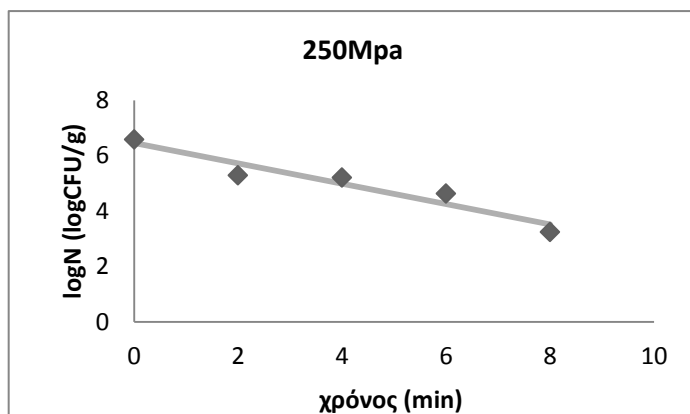
Διάγραμμα 7.13: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 150MPa



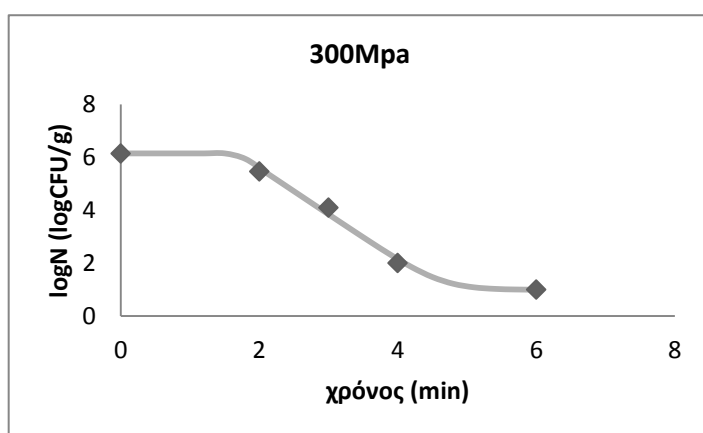
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,78
5	5,94
10	4,50
20	3,20
30	2,70

Διάγραμμα 7.14 : Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 200MPa

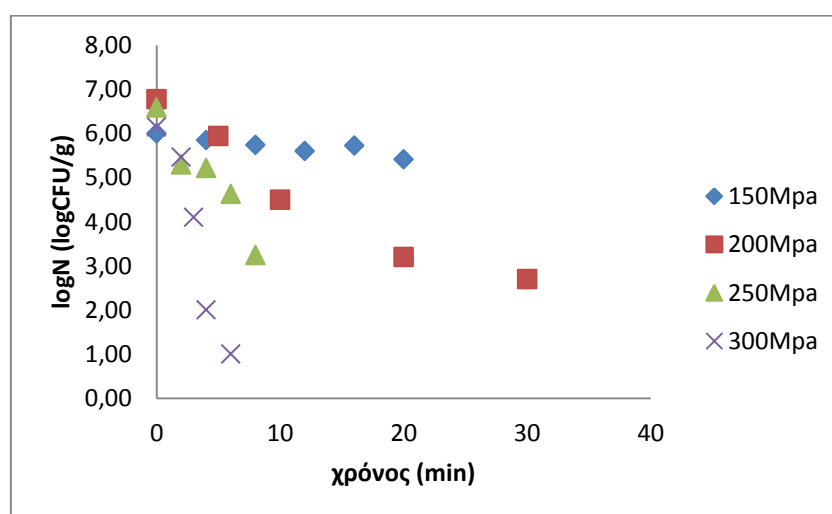




Διάγραμμα 7.15: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 250MPa



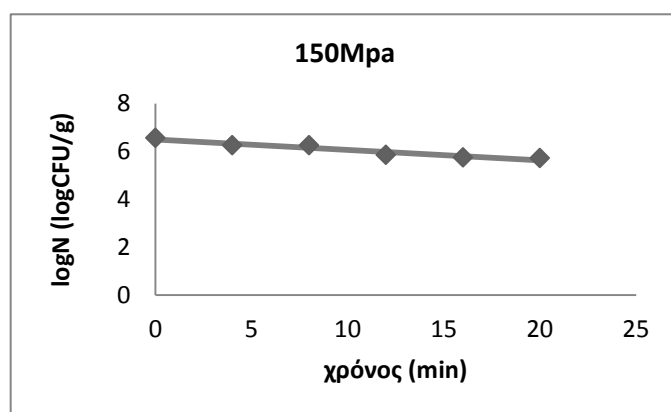
Διάγραμμα 7.16: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 300MPa



Διάγραμμα 7.17: Απενεργοποίησης του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε πίεση στους 25°C.

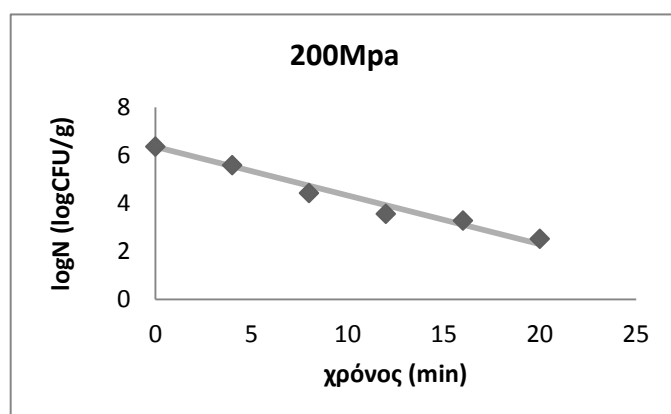
Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι με εφαρμογή πίεσης 150MPa, ο μικροοργανισμός απενεργοποιείται με πολύ αργό ρυθμό αφού μετά από χρόνο επεξεργασίας 20min η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου έχει μειωθεί λιγότερο από ένα λογάριθμο. Όσο όμως η πίεση αυξάνεται, παρατηρείται αισθητή αύξηση του ρυθμού θανάτωσης του μικροοργανισμού και σε πίεση 300MPa παρατηρείται μείωση κατά 5 λογάριθμους μετά από μόλις 6 min επεξεργασίας.

### Απενεργοποίηση σε Θερμοκρασία 30°C



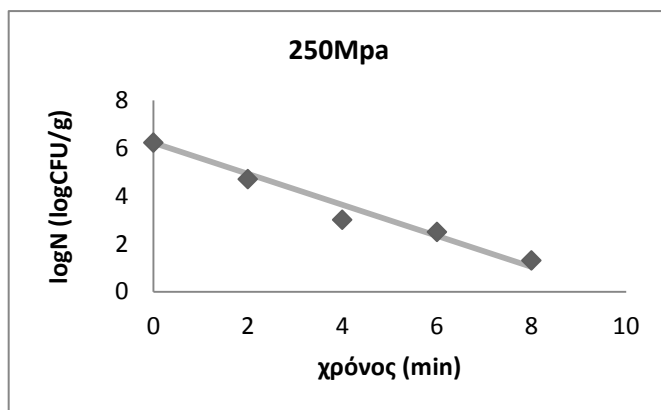
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,57
4	6,26
8	6,26
12	5,86
16	5,75
20	5,73

Διάγραμμα 7.18: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 150MPa

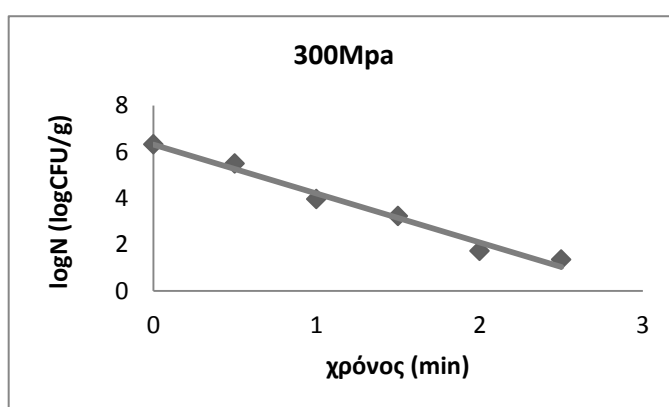


Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,35
4	5,58
8	4,41
12	3,54
16	3,27
20	2,50

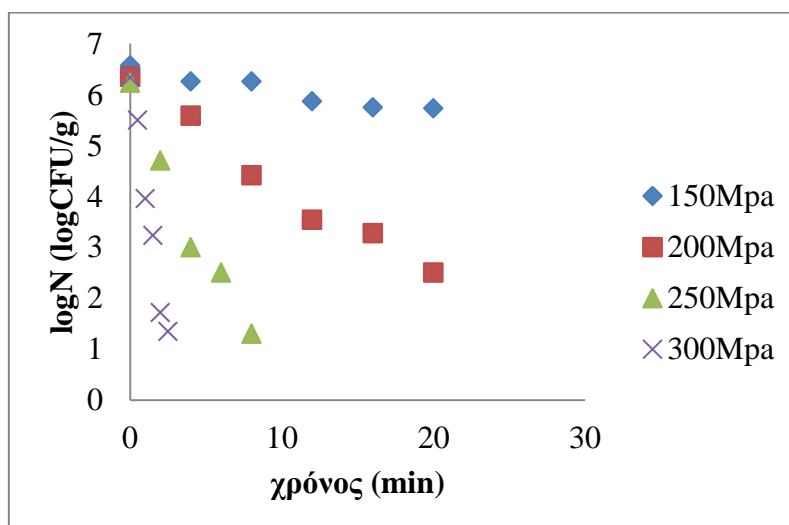
Διάγραμμα 7.19: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 200MPa



Διάγραμμα 7.20: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 250MPa



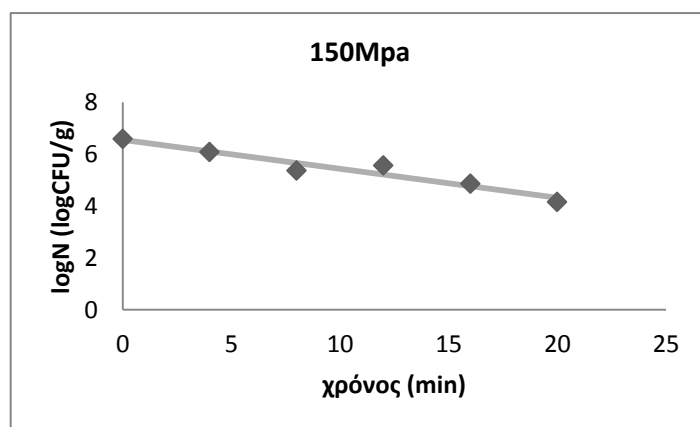
Διάγραμμα 7.21: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 300MPa



Διάγραμμα 7.22: Διάγραμμα Απενεργοποίησης του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε πίεση στους 30°C.

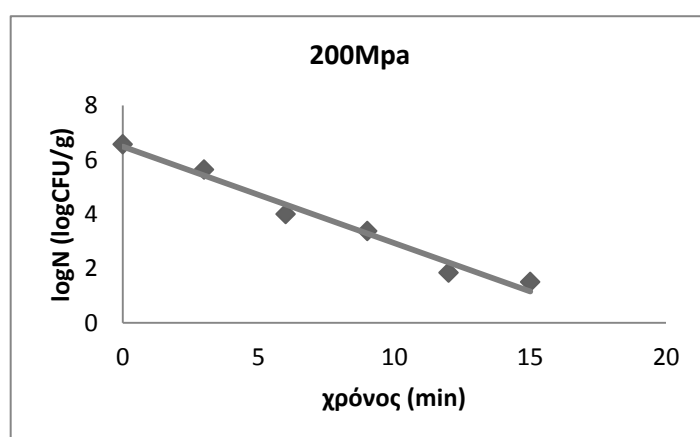
Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι σε όλες τις πιέσεις ο μικροοργανισμός απενεργοποιείται πιο γρήγορα σε θερμοκρασία 30°C από ότι σε 25°C. Σε πίεση 300MPa η απενεργοποίηση ήταν ταχύτερη καθώς επιτεύχθηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά 6 λογαριθμικούς κύκλους σε μόλις 2,5 λεπτά.

### Απενεργοποίηση σε Θερμοκρασία 35°C



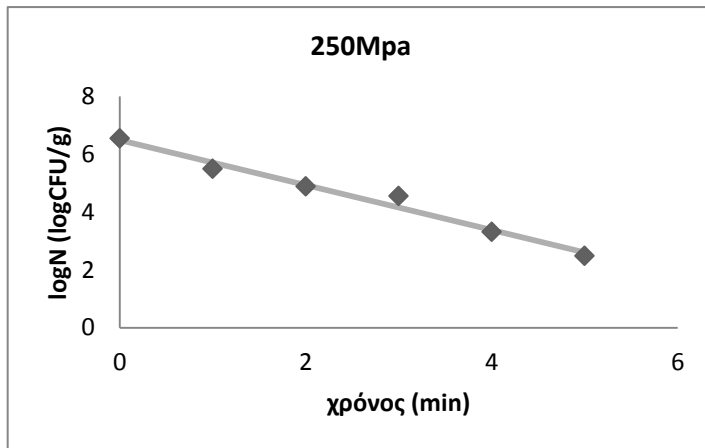
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,6
4	6,1
8	5,4
12	5,6
16	4,9
20	4,2

Διάγραμμα 7.23: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 150MPa

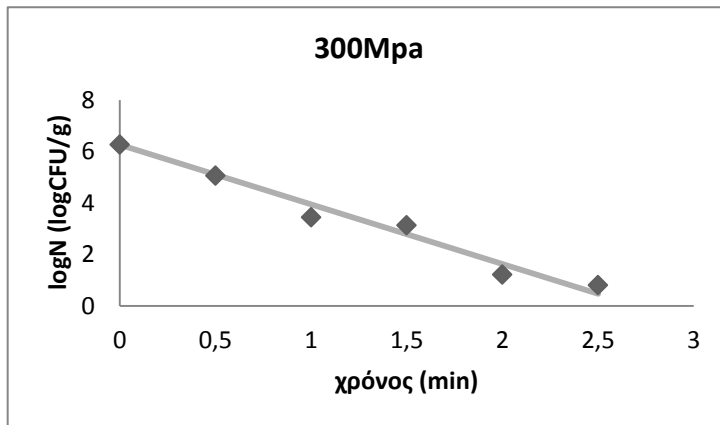


Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,57
3	5,64
6	4,01
9	3,37
12	1,84
15	1,51

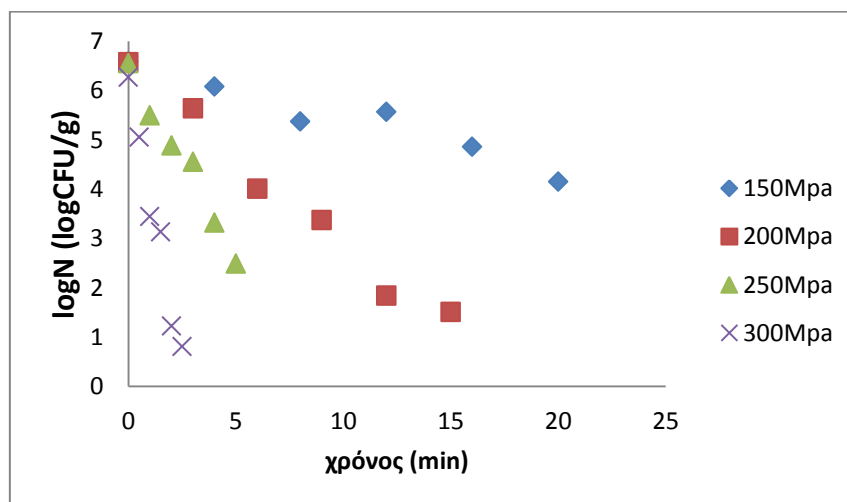
Διάγραμμα 7.24: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 200MPa



Διάγραμμα 7.25: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 250MPa



Διάγραμμα 7.26: Απενεργοποίηση του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας στα 300MPa



Διάγραμμα 7.27: Διάγραμμα Απενεργοποίησης του LAB1 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε πίεση στους 35°C.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι σε θερμοκρασία 35°C επιτεύχθηκε σημαντική απενεργοποίηση του LAB1 ήδη από τα 150MPa όπου υπήρξε μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά 2,4 λογαριθμικούς κύκλους σε 20 λεπτά. Καθώς η εφαρμοζόμενη πίεση αυξήθηκε, η απενεργοποίηση έγινε ταχύτερη. Η πιο γρήγορη απενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε σε πίεση 300MPa όπου το μικροβιακό φορτίο μειώθηκε κατά 5,4 λογάριθμους σε 2,5 λεπτά.

### 7.3.1.i Υπολογισμός του Χρόνου Υποδεκαπλασιασμού του LAB1

Για κάθε μία συνθήκη επεξεργασίας του μικροοργανισμού LAB1 υπολογίζεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού από την εξίσωση 7.1 και από τις κλίσεις των καμπύλων που προέκυψαν από το μοντέλο Baranyi. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

**Πίνακας 7.4: Χρόνοι Υποδεκαπλασιασμού του LAB1 για τους 25°C**

Πίεση (MPa)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού (min)	R <sup>2</sup>
150	38,67	0,9439
200	6,46	0,9111
250	2,72	0,8947
300	0,57	0,9892

**Πίνακας 7.5: Χρόνοι Υποδεκαπλασιασμού του LAB1 για τους 30°C**

Πίεση (MPa)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού (min)	R <sup>2</sup>
150	22,93	0,8997
200	4,93	0,9706
250	1,54	0,9631
300	0,47	0,9773

Πίνακας 7.6 Χρόνοι Υποδεκαπλασιασμού του LAB1 για τους 35°C

Πίεση (MPa)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού (min)	R <sup>2</sup>
150	8,95	0,9180
200	2,81	0,9722
250	1,28	0,9736
300	0,43	0,9708

Πίνακας 7.7 Συνοπτικός Πίνακας Χρόνων Υποδεκαπλασιασμού σε min

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	25°C	30°C	35°C
<b>150MPa</b>	38,67	22,93	8,95
<b>200MPa</b>	6,46	4,93	2,81
<b>250MPa</b>	2,72	1,54	1,28
<b>300MPa</b>	0,57	0,47	0,43

Από τα αποτελέσματα των παραπάνω πινάκων παρατηρήθηκε συνεργιστική επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού. Αύξηση της θερμοκρασίας υπό σταθερή πίεση καθώς και αύξηση της πίεσης υπό σταθερή θερμοκρασία είχαν ως αποτέλεσμα την μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του LAB1. Συγκεκριμένα παρατηρείται μια σημαντική μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού αυξανόμενης της εφαρμοζόμενης πίεσης. Ομαλή επίσης μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του μικροοργανισμού με αύξηση της θερμοκρασίας επεξεργασίας παρατηρείται σε όλες τις πιέσεις.

### 7.3.1.ii Προσδιορισμός της Σταθεράς Εξάρτησης από την Πίεση του LAB1 για Κάθε Θερμοκρασία

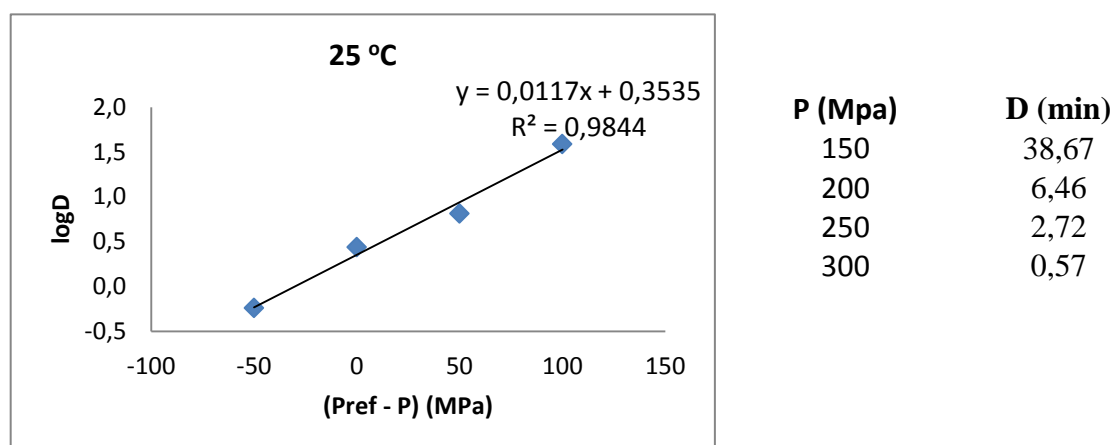
Η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου από την εφαρμοζόμενη πίεση περιγράφεται από την εξίσωση :

$$D = D_{P_{ref}} \cdot 10^{\left(\frac{P_{ref} - P}{Z_P}\right)} \Rightarrow \log D = \log D_{P_{ref}} + \frac{P_{ref} - P}{Z_P} \quad (\text{εξίσωση 7.4})$$

Βάσει της καμπύλης της συνάρτησης  $\text{Log}D = f(P - P_{ref})$  ενός μικροοργανισμού, η σταθερά εξάρτησης από την πίεση του μικροοργανισμού ορίζεται ως το αντίστροφο της κλίσης της προκύπτουσας ευθείας και επομένως δίνεται από την εξίσωση :

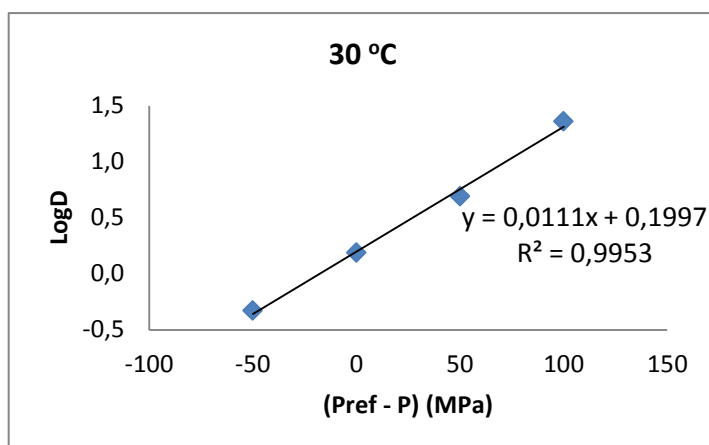
$$Z_P = \frac{P_{ref} - P}{\log\left(\frac{D}{D_{ref}}\right)} \quad (\text{εξίσωση 7.5})$$

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες της συνάρτησης  $\text{Log}D = f(P - P_{ref})$  για κάθε θερμοκρασία, θεωρώντας ως  $P_{ref}$  τα 250MPa. Επίσης, στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές της σταθεράς εξάρτησης από την πίεση για κάθε θερμοκρασία.



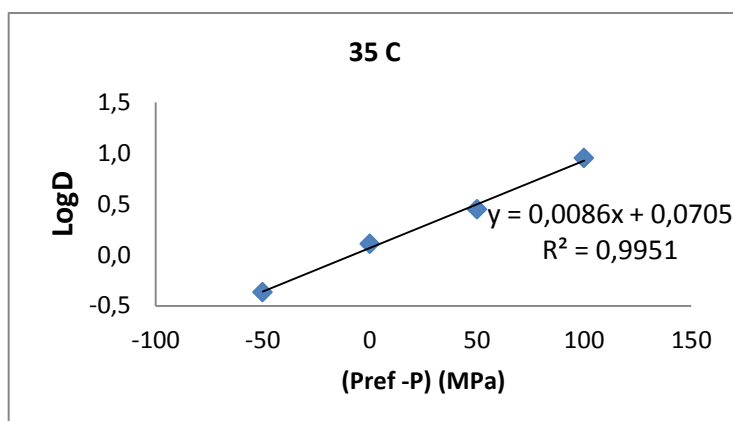
Διάγραμμα 7.28: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 25°C.





P (Mpa)	D (min)
150	22,93
200	4,93
250	1,54
300	0,47

Διάγραμμα 7.29: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 30°C.



P (Mpa)	D (min)
150	8,95
200	2,81
250	1,28
300	0,43

Διάγραμμα 7.30: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 35°C.

Πίνακας 7.8 Σταθερά Εξάρτησης από την Πίεση για Κάθε Θερμοκρασία

Θερμοκρασία (°C)	Σταθερά Εξάρτησης από την Πίεση $Z_P$ (MPa)	$R^2$
25	85,5	0,9844
30	90,1	0,9953
35	116,3	0,9951

Η σταθερά αντίστασης λόγω πίεσης εκφράζει την εξάρτηση της απενεργοποίησης του μικροοργανισμού από την πίεση με τον ίδιο τρόπο που η

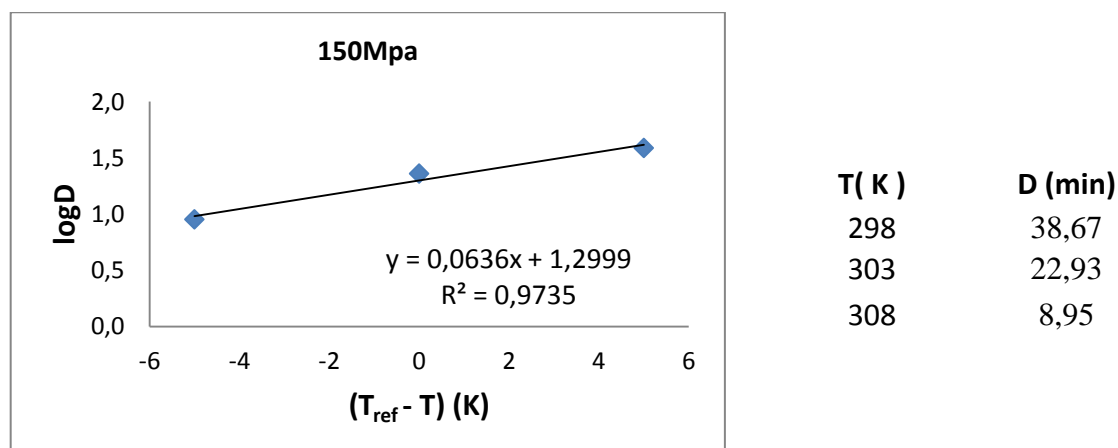
σταθερά θερμικής αντίστασης εκφράζει την εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία. Έτσι, όσο μειώνεται η τιμή του  $Z_p$  τόσο ισχυρότερη επίδραση έχει η πίεση στη δράση της απενεργοποίησης.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται ότι οι τιμές του είναι  $Z_p$  εμφανίζουν αυξανόμενη πορεία όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Έτσι, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία επεξεργασίας, η εξάρτηση της απενεργοποίησης του μικροοργανισμού από την πίεση γίνεται ασθενέστερη. Σε χαμηλές λοιπόν θερμοκρασίες η μεταβολή της πίεσης παίζει τον σημαντικότερο ρόλο στην μεταβολή του ρυθμού απενεργοποίησης.

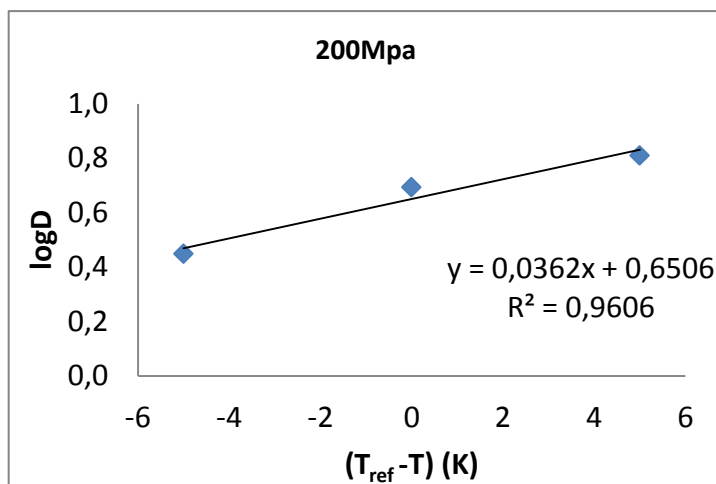
### 7.3.1.iii Προσδιορισμός της Σταθεράς Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία για Κάθε Πίεση του LAB1

Η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου από τη θερμοκρασία περιγράφεται από την εξίσωση 7.2. Βάσει της καμπύλης του χρόνου θερμικού θανάτου ενός μικροοργανισμού, η σταθερά της εξάρτησης από τη θερμοκρασία ορίζεται ως το αντίστροφο της κλίσης της προκύπτουσας ευθείας και επομένως δίνεται από την εξίσωση 7.3.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες του χρόνου θερμικού θανάτου για κάθε εφαρμοζόμενη πίεση θεωρώντας ως  $T_{ref}$  στους 30°C. Επίσης, στον πίνακα 7.10 φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές της σταθεράς θερμικής αντίστασης για κάθε πίεση.

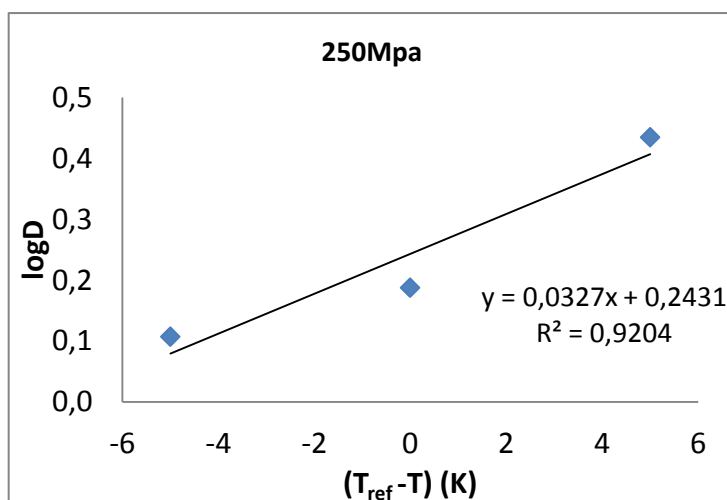


Διάγραμμα 7.31: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 150MPa.



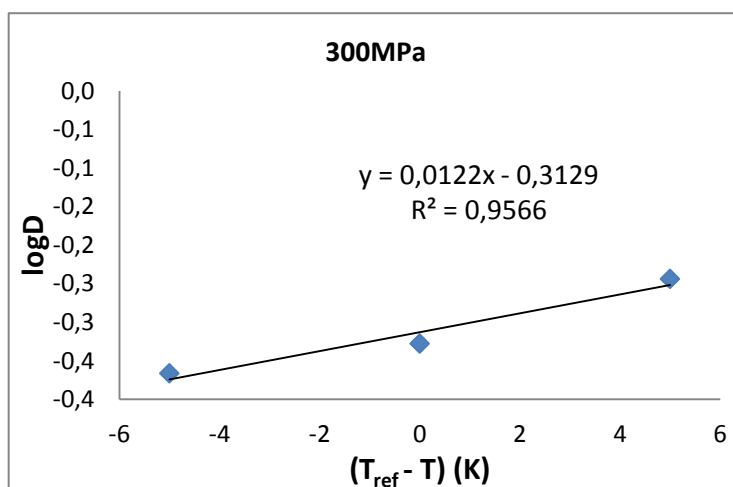
T ( K )	D (min)
298	6,46
303	4,93
308	2,81

Διάγραμμα 7.32: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 200MPa.



T ( K )	D (min)
298	2,72
303	1,54
308	1,28

Διάγραμμα 7.33: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 250MPa



T ( K )	D(min)
298	0,57
303	0,47
308	0,43

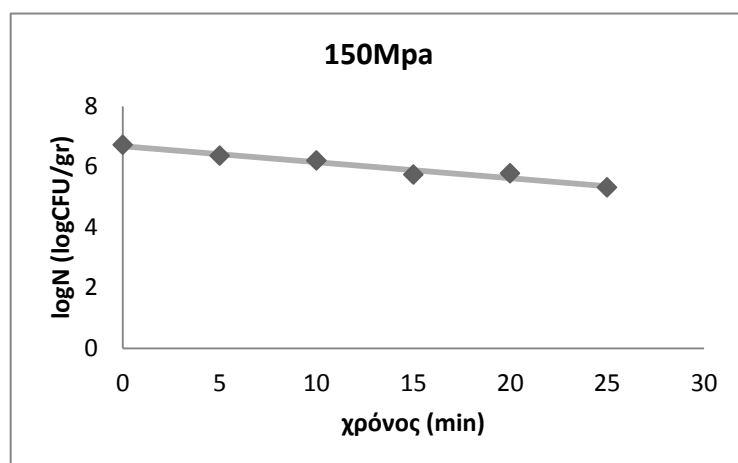
Διάγραμμα 7.34: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 300MPa.

**Πίνακας 7.9 Σταθερές Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία για Κάθε Πίεση**

Πίεση (MPa)	Σταθερά Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία $Z_T$ (°C)	$R^2$
150	15,72	0,9735
200	27,62	0,9606
250	30,58	0,9204
300	81,97	0,9566

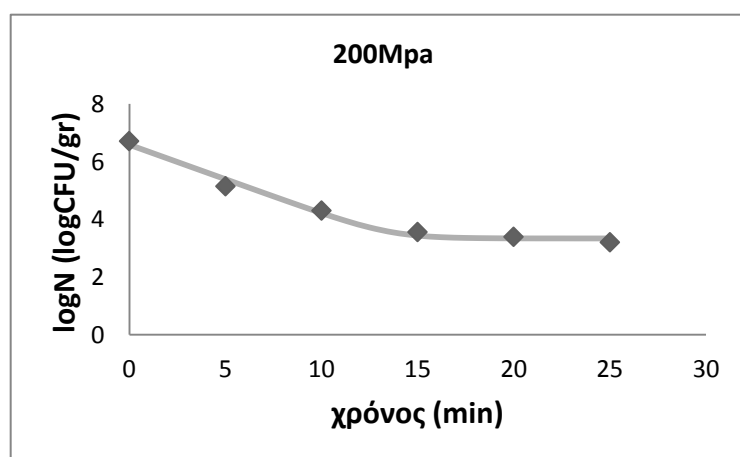
Με αύξηση της πίεσης επεξεργασίας, παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του  $Z_T$  και επομένως η επίδραση λόγω της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού ήταν μικρότερη σε μεγαλύτερες πιέσεις επεξεργασίας.

## 7.3.2 Απενεργοποίηση του LAB2 ΣυναρτήσεΙ του Χρόνου Επεξεργασίας

Απενεργοποίηση σε Θερμοκρασία 25°C

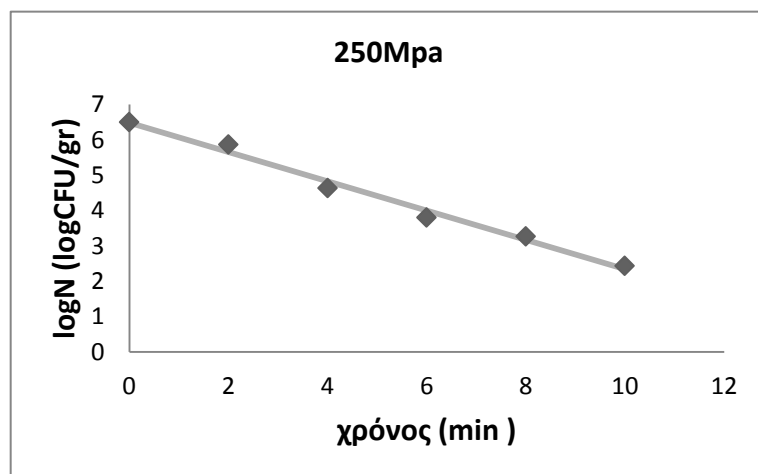
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,72
5	6,36
10	6,20
15	5,74
20	5,78
25	5,31

Διάγραμμα 7.35: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 150MPa.



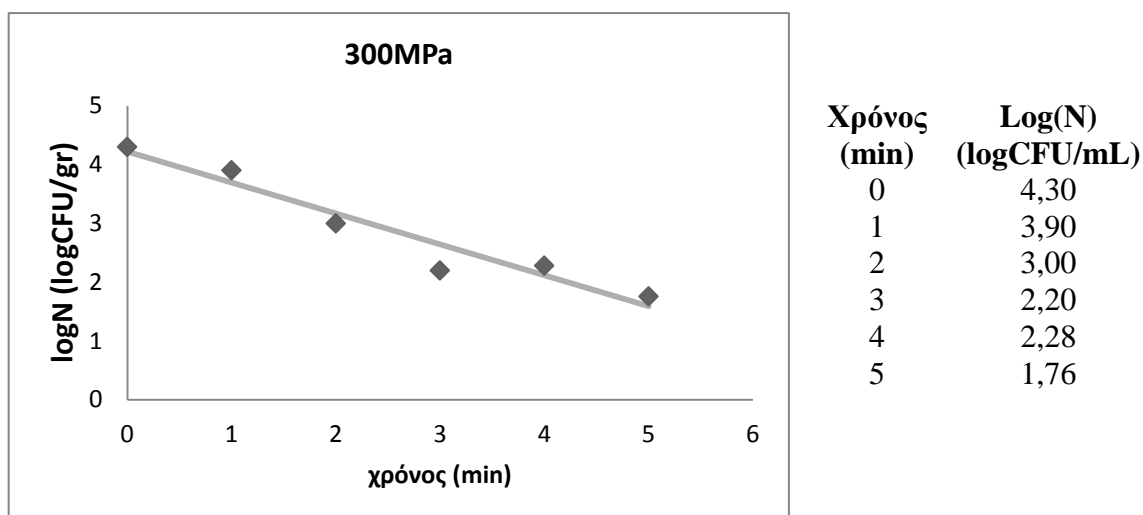
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,72
5	5,15
10	4,30
15	3,56
20	3,40
25	3,20

Διάγραμμα 7.36: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 200MPa.

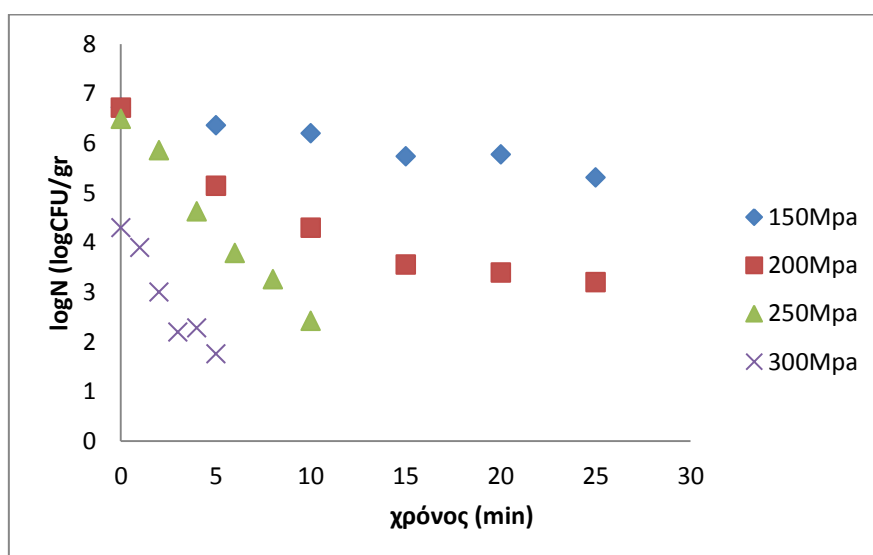


Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0,0	6,49
2,0	5,86
4,0	4,63
6,0	3,79
8,0	3,26
10,0	2,43

Διάγραμμα 7.37: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 250MPa.

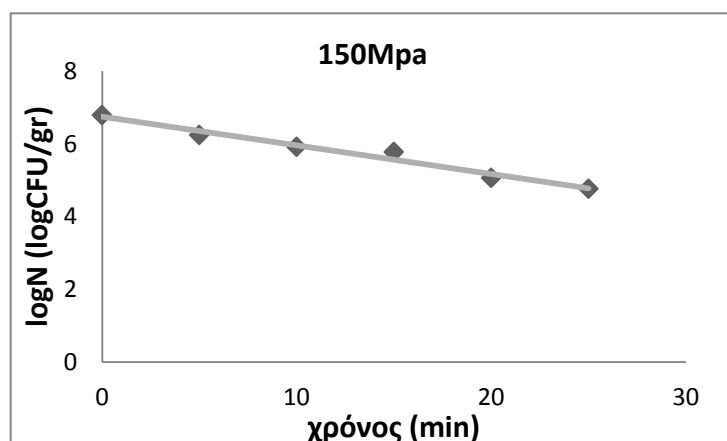


Διάγραμμα 7.38: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 300MPa.



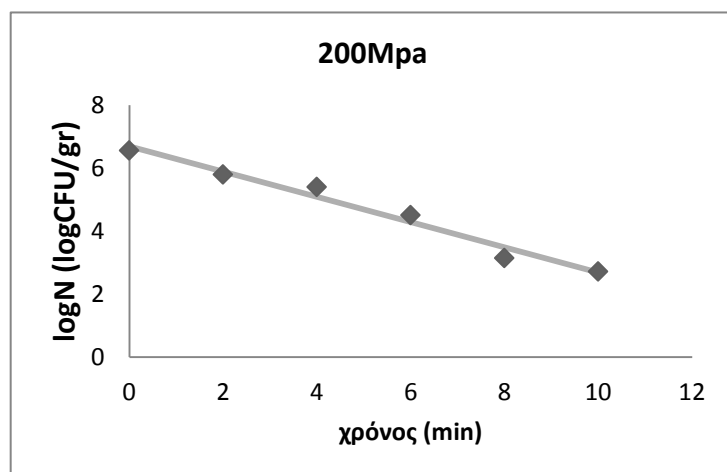
Διάγραμμα 7.39: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε πίεση στους 25°C.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι με εφαρμογή πίεσης 150MPa, ο μικροοργανισμός απενεργοποιείται με πολύ αργό ρυθμό αφού μετά από χρόνο επεξεργασίας 25min η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου έχει μειωθεί μόλις κατά 1,4 λογάριθμους. Όσο όμως η εφαρμοζόμενη πίεση αυξάνεται, παρατηρείται σημαντική μείωση του χρόνου που απαιτείται για την θανάτωση του μικροοργανισμού και σε πίεση 300MPa παρατηρείται μείωση κατά 2,6 λογάριθμους μετά από μόλις 5 min επεξεργασίας.

**Απενεργοποίηση σε θερμοκρασία 30°C**

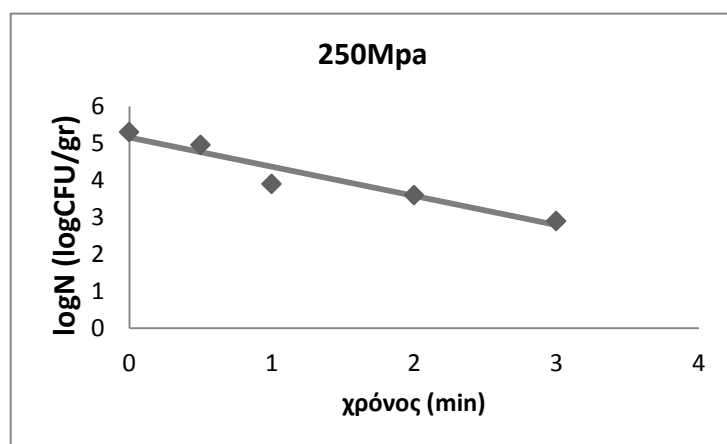
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,79
5	6,25
10	5,92
15	5,78
20	5,07
25	4,77

Διάγραμμα 7.40: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 150MPa.



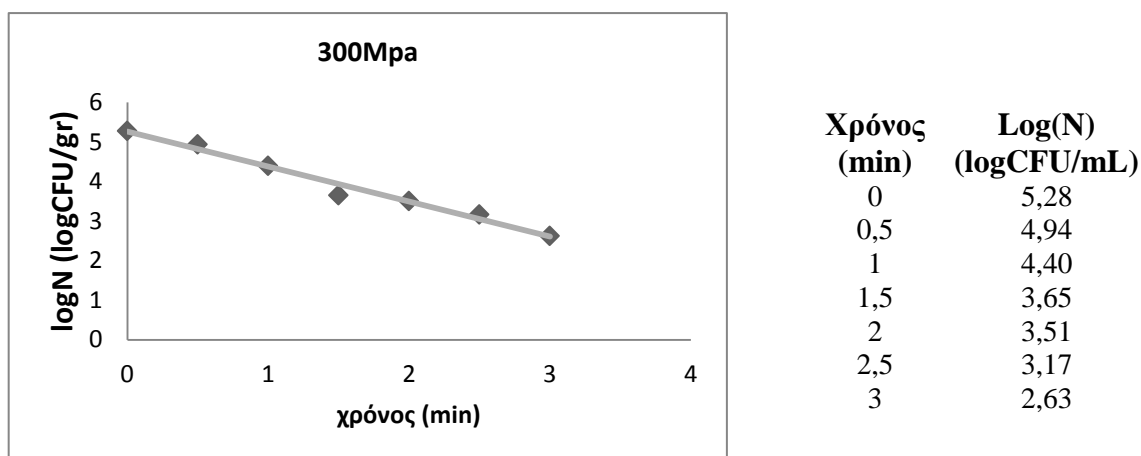
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,56
2	5,79
4	5,40
6	4,51
8	3,15
10	2,72

Διάγραμμα 7.41: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 200MPa

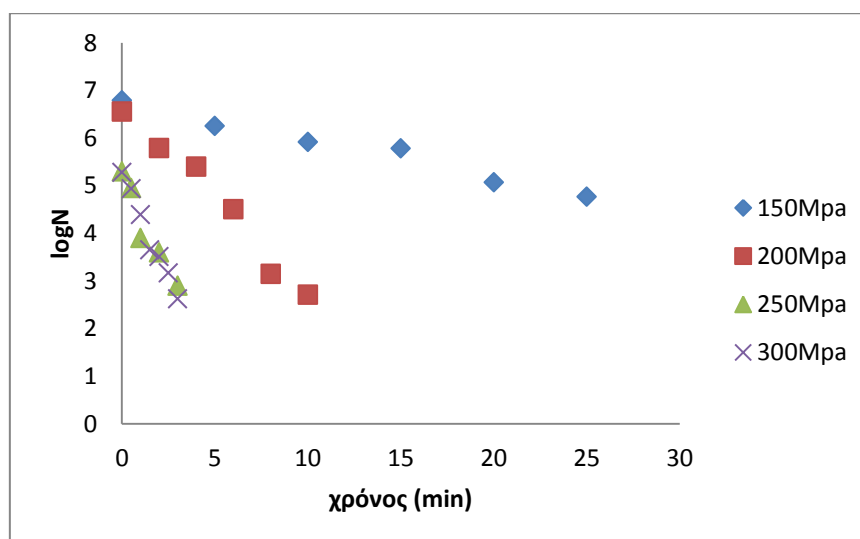


Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	5,30
0,5	4,95
1	3,90
2	3,60
3	2,90

Διάγραμμα 7.42: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 250MPa



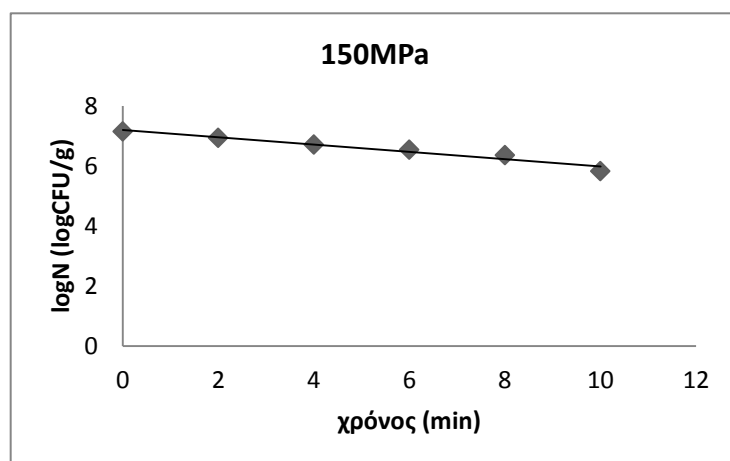
Διάγραμμα 7.43: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 300MPa



Διάγραμμα 7.44: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε πίεση στους 30°C.

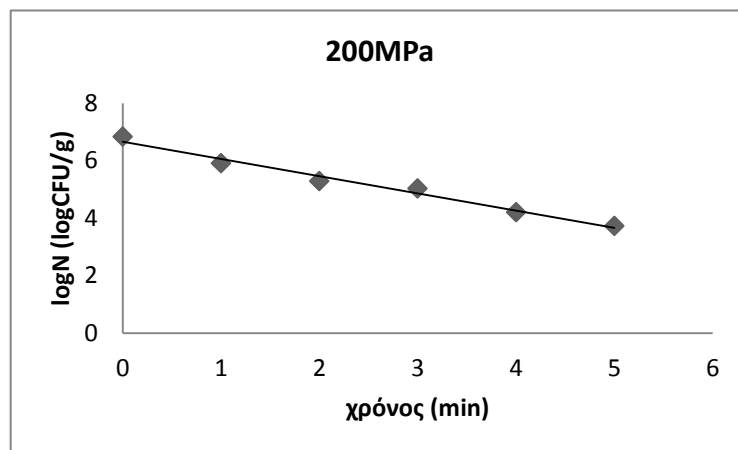
Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι με εφαρμογή πίεσης 150MPa, ο μικροοργανισμός απενεργοποιείται με αργό ρυθμό αφού μετά από χρόνο επεξεργασίας 25min η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου έχει μειωθεί κατά 2 λογάριθμους. Όσο όμως η εφαρμοζόμενη πίεση αυξάνεται, παρατηρείται σημαντική μείωση του χρόνου που απαιτείται για την θανάτωση του μικροοργανισμού και σε πίεση 300MPa παρατηρείται μείωση κατά 2,6 λογάριθμους μετά από μόλις 3 min επεξεργασίας.



**Επεξεργασία σε θερμοκρασία 35°C**

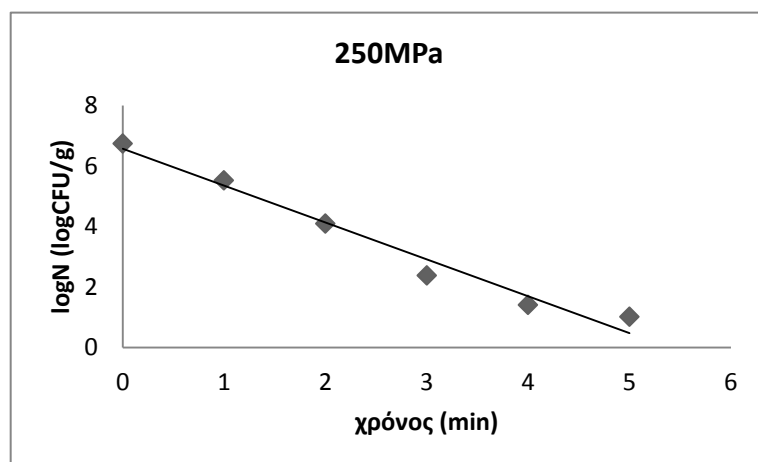
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	7,15
2	6,94
4	6,71
6	6,54
8	6,36
10	5,82

Διάγραμμα 7.45: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 150MPa



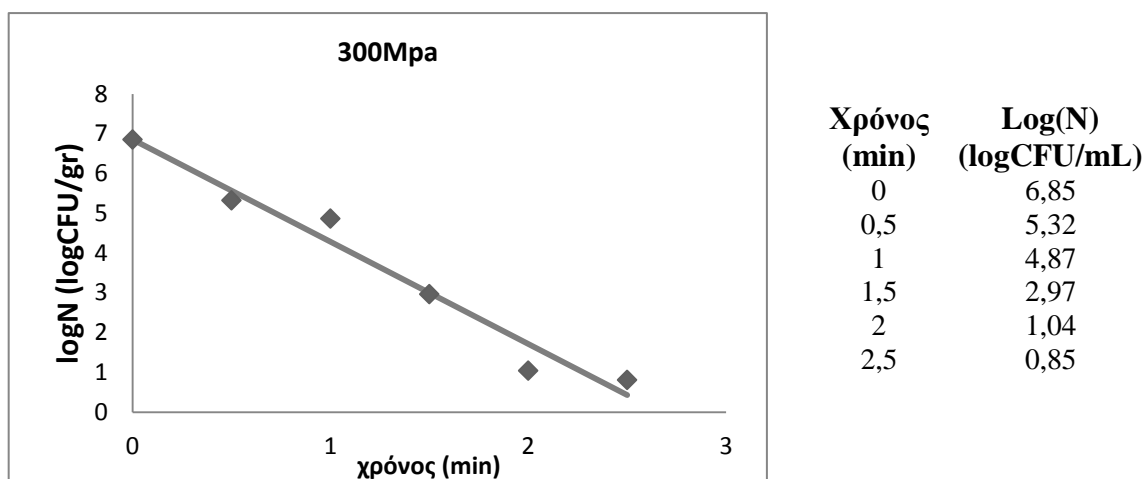
Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,83
1	5,91
2	5,28
3	5,03
4	4,20
5	3,72

Διάγραμμα 7.46: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 200MPa

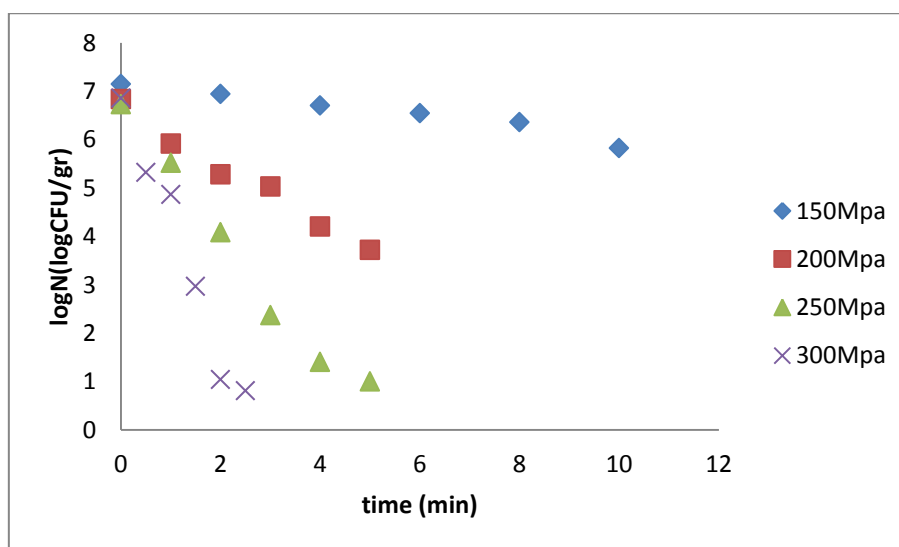


Χρόνος (min)	Log(N) (logCFU/mL)
0	6,73
1	5,52
2	4,09
3	2,37
4	1,40
5	1,00

Διάγραμμα 7.47: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 250MPa



Διάγραμμα 7.48: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας στα 300MPa



Διάγραμμα 7.49: Απενεργοποίηση του LAB2 με το χρόνο επεξεργασίας για κάθε πίεση στους 35°C.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι στους 35°C ακόμα και με εφαρμογή πίεσης 150MPa, λαμβάνει χώρα σημαντική απενεργοποίηση αφού μετά από χρόνο επεξεργασίας 10min η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου έχει μειωθεί κατά 2 λογάριθμους. Όσο η εφαρμοζόμενη πίεση αυξάνεται, παρατηρείται σημαντική μείωση του χρόνου που απαιτείται για την θανάτωση του μικροοργανισμού και σε πίεση 300MPa παρατηρείται μείωση κατά 6 λογάριθμους μετά από μόλις 2,5 min επεξεργασίας.

**7.3.1.iv Υπολογισμός του Χρόνου Υποδεκαπλασιασμού του LAB2**

Για κάθε μία συνθήκη επεξεργασίας του μικροοργανισμού LAB2 υπολογίζεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού από την εξίσωση 7.1 και από τις κλίσεις των καμπύλων που προέκυψαν από το μοντέλο Baranyi. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες

**Πίνακας 7.10 Χρόνοι Υποδεκαπλασιασμού του LAB2 για τους 25°C**

Πίεση (MPa)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού $D_T$ (min)	$R^2$
150	18,89	0,9465
200	4,19	0,9781
250	2,41	0,9856
300	1,90	0,9208

**Πίνακας 7.11 Χρόνοι Υποδεκαπλασιασμού του LAB2 για τους 30°C**

Πίεση (MPa)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού $D_T$ (min)	$R^2$
150	12,68	0,9684
200	2,49	0,9688
250	1,27	0,9014
300	1,12	0,9766

**Πίνακας 7.12 Χρόνοι Υποδεκαπλασιασμού του LAB2 για τους 35°C**

Πίεση (MPa)	Χρόνος Υποδεκαπλασιασμού $D_T$ (min)	$R^2$
150	8,21	0,9522
200	1,67	0,9812
250	0,82	0,9734
300	0,39	0,9582

Πίνακας 7.13 Συνοπτικός Πίνακας Χρόνων Υποδεκαπλασιασμού σε min

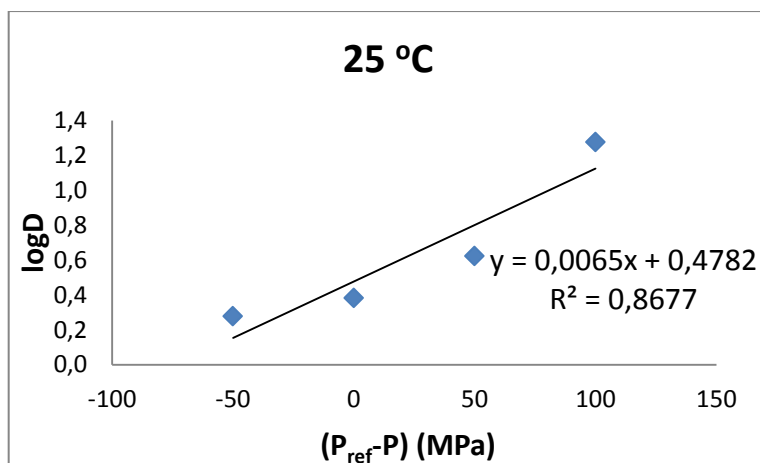
ΣΥΝΘΗΚΕΣ	25°C	30°C	35°C
150MPa	18,89	12,68	8,21
200MPa	4,19	2,49	1,67
250MPa	2,41	1,27	0,82
300MPa	1,90	1,12	0,39

Από τους παραπάνω πίνακες προκύπτει ότι για σταθερή θερμοκρασία, όσο αυξάνεται η εφαρμοζόμενη πίεση ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού μειώνεται. Ακόμη φαίνεται ότι για την ίδια πίεση, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία επεξεργασίας ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού μειώνεται. Παρατηρείται δηλαδή συνεργιστική δράση πίεσης και θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του εξεταζόμενου μικροοργανισμού.

### 7.3.1.v Προσδιορισμός της Σταθεράς Εξάρτησης από την Πίεση του LAB2 για Κάθε Θερμοκρασία

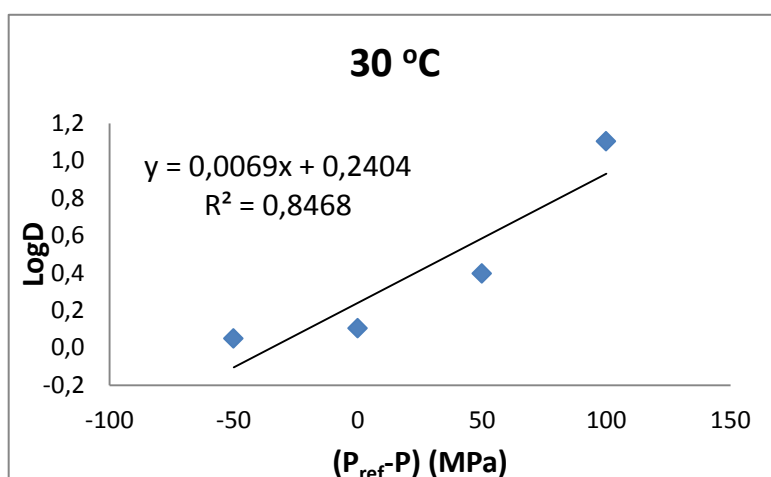
Βάσει της καμπύλης της τιμής  $\text{LogD}$  σε συνάρτηση με την ποσότητα P-Pref ενός μικροοργανισμού, μπορεί να προσδιοριστεί η σταθερά εξάρτησης από την πίεση του LAB2, όπως ακριβώς και στην περίπτωση του LAB1, ως το αντίστροφο της κλίσης της προκύπτουσας ευθείας και επομένως δίνεται από την εξίσωση 7.5 .

Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες της συνάρτησης  $\text{LogD} = f(\text{P-Pref})$  για κάθε θερμοκρασία, θεωρώντας ως  $P_{ref}$  τα 250MPa. Επίσης, στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές της σταθεράς εξάρτησης από την πίεση για κάθε θερμοκρασία.



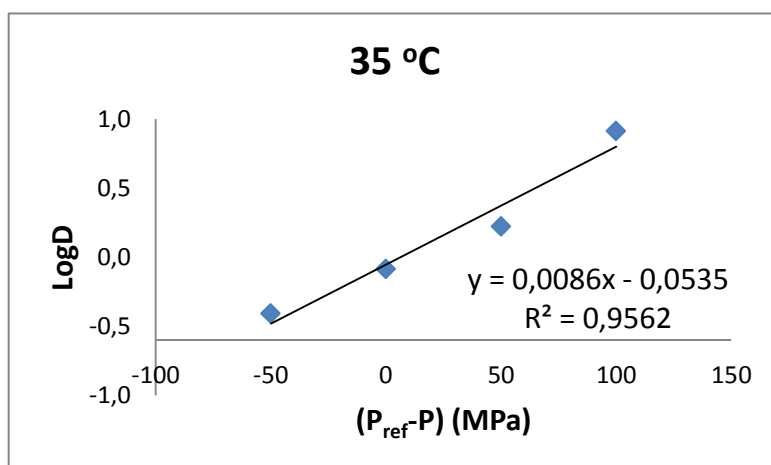
P (Mpa)	D (min)
150	18,89
200	4,19
250	2,41
300	1,90

Διάγραμμα 7.50: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 25°C.



P (Mpa)	D (min)
150	12,68
200	2,49
250	1,27
300	1,12

Διάγραμμα 7.51: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 30°C.



P (Mpa)	D (min)
150	8,21
200	1,67
250	0,82
300	0,39

Διάγραμμα 7.52: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 35°C.

**Πίνακας 7.14 Σταθερά Εξάρτησης από την Πίεση για Κάθε Θερμοκρασία**

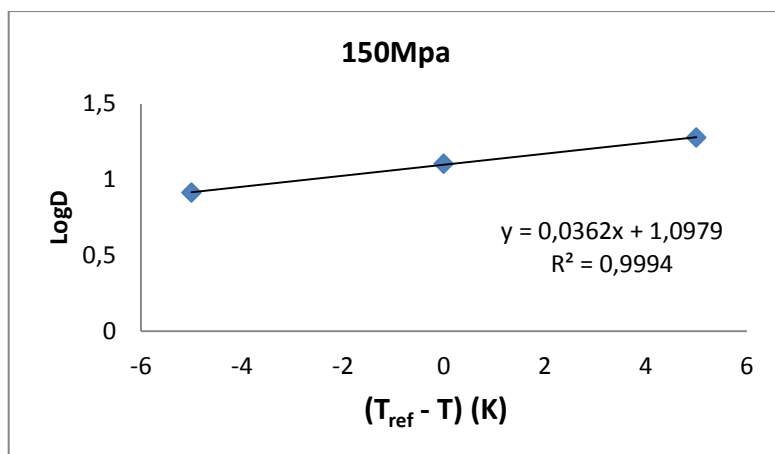
Θερμοκρασία (°C)	Σταθερά Εξάρτησης από την Πίεση $Z_P$ (MPa)	$R^2$
25	153,8	0,8677
30	144,9	0,8468
35	116,3	0,9562

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα, η σταθερά αντίστασης λόγω πίεσης του εξεταζόμενου γαλακτικού βακτηρίου μειώνεται αυξανόμενης της θερμοκρασίας. Μπορεί λοιπόν να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία επεξεργασίας, η εξάρτηση της απενεργοποίησης του μικροοργανισμού από την πίεση γίνεται ισχυρότερη.

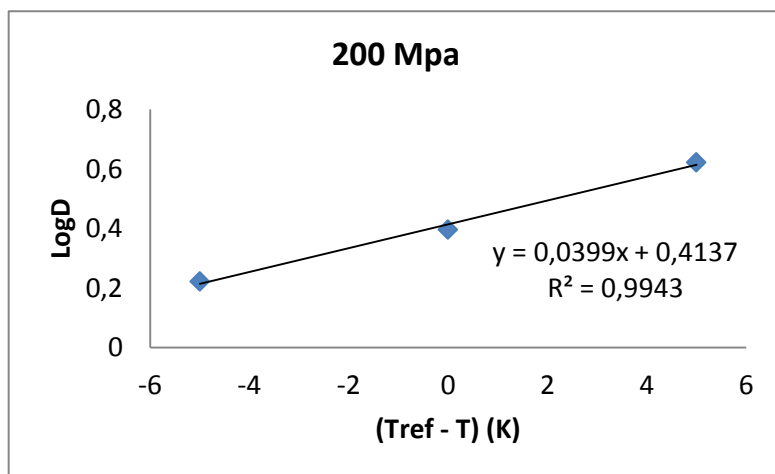
### **7.3.1.vi Προσδιορισμός της Σταθεράς Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία για Κάθε Πίεση του LAB2**

Η εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου από τη θερμοκρασία περιγράφεται από την εξίσωση 7.2. Βάσει της καμπύλης του χρόνου θερμικού θανάτου ενός μικροοργανισμού, η σταθερά της εξάρτησης από τη θερμοκρασία ορίζεται ως το αντίστροφο της κλίσης της προκύπτουσας ευθείας και επομένως δίνεται από την εξίσωση 7.3.

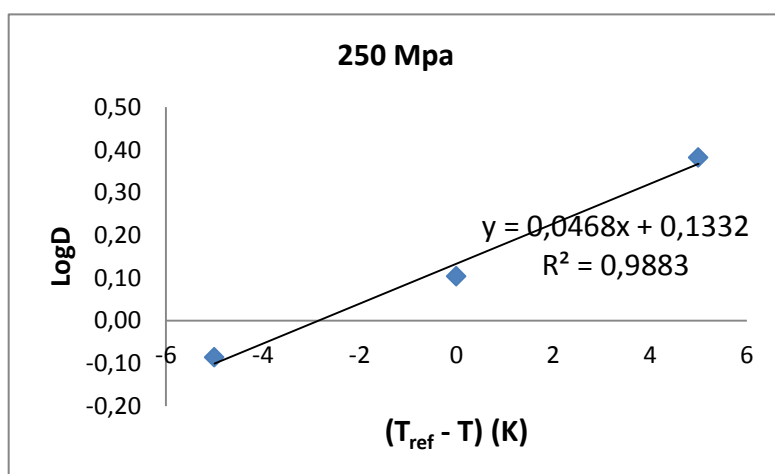
Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες του χρόνου θερμικού θανάτου του LAB2 για κάθε εφαρμοζόμενη πίεση θεωρώντας ως  $T_{ref}$  στους 30°C. Επίσης, στον πίνακα 7.16 φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές της σταθεράς θερμικής αντίστασης για κάθε πίεση.



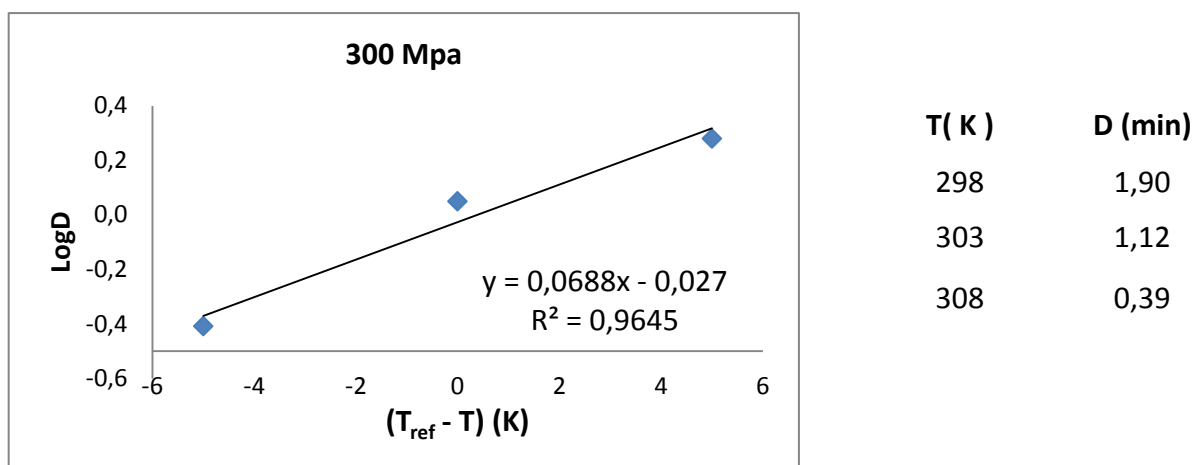
Διάγραμμα 7.53: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 150MPa.



Διάγραμμα 7.54: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 200MPa.



Διάγραμμα 7.55: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 250MPa.



Διάγραμμα 7.56: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 300MPa<sub>2</sub>

Πίνακας 7.15 Σταθερές Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία για Κάθε Πίεση

Πίεση (MPa)	Σταθερά Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία $Z_T$ (°C)	$R^2$
150	27,62	0,9994
200	25,06	0,9943
250	21,37	0,9883
300	14,53	0,9645

Με αύξηση της πίεσης επεξεργασίας, παρατηρήθηκε μείωση της τιμής του  $Z_T$  και επομένως η επίδραση λόγω της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού ήταν μεγαλύτερη σε μεγαλύτερες πιέσεις επεξεργασίας.



## 7.4 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου της απενεργοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων στο χυμό πορτοκαλιού

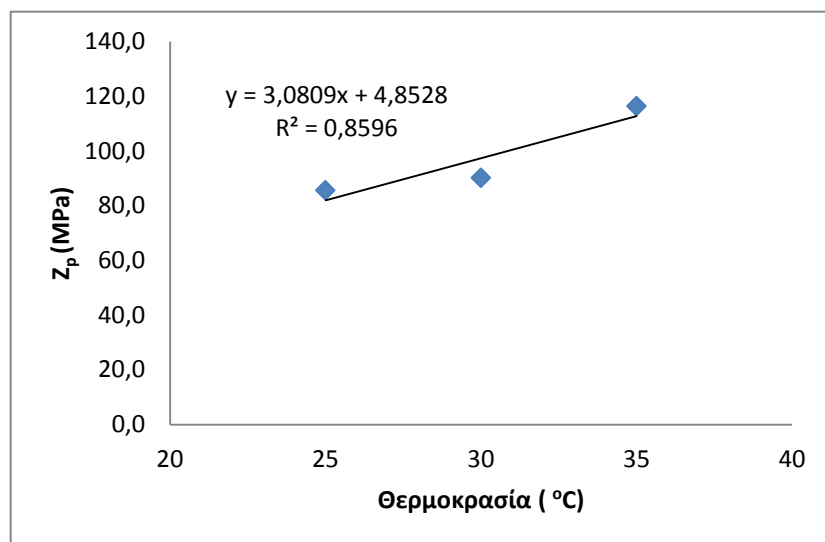
### 7.4.1 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου απενεργοποίησης των LAB1 και LAB2

Σε κάθε θερμοκρασία η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων εκφράστηκε μέσω της σταθεράς εξάρτησης από την πίεση ( $Z_p$ ) ;όπως αυτή εκφράζεται από την εξίσωση 7.4.

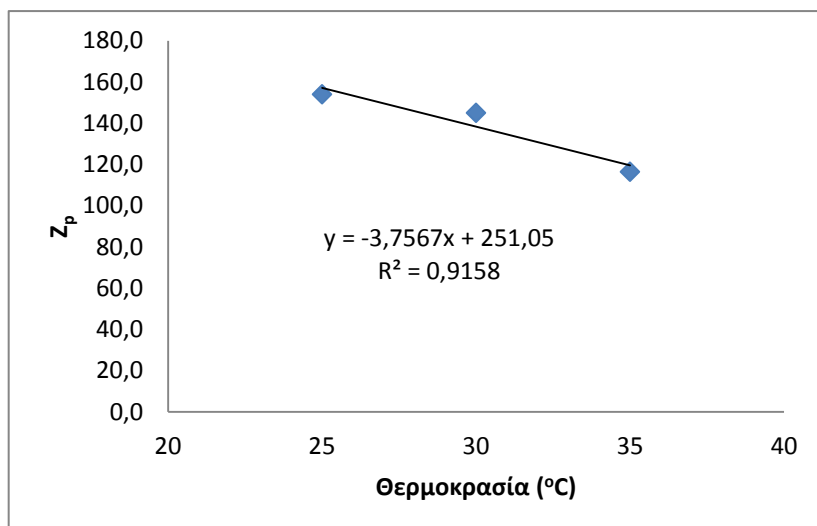
$$\log D = \log D_{Pref} + (P_{ref} - P) / Z_p$$

Οι σταθερές  $Z_p$  υπολογίστηκαν για όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες και για τους δύο μικροοργανισμούς και η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά  $Z_p$  εκφράστηκε από μία γραμμική συνάρτηση της μορφής:

$$Z_p = 2,303RT / B(T - T_{ref}) + Z_{Pref} \quad (\text{εξίσωση 7.11})$$



Διάγραμμα 7.57: Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά  $Z_p$  για τον LAB1



T	Z <sub>p</sub>
25	153,8
30	144,9
35	116,3

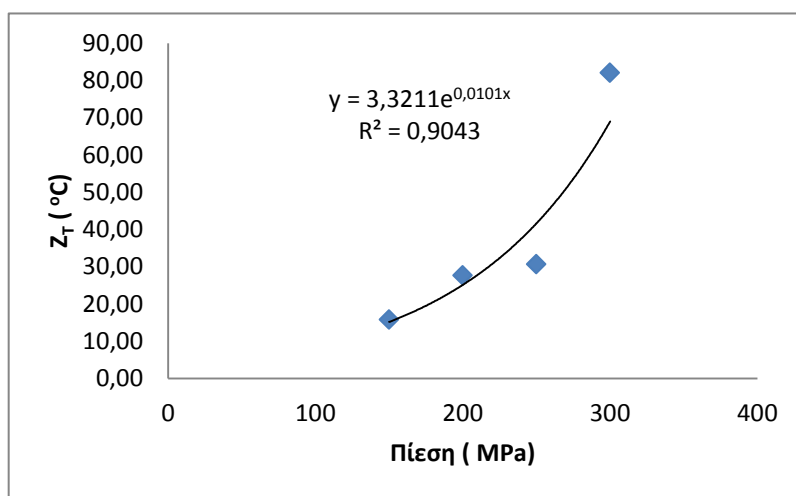
**Διάγραμμα 7.58: Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά Z<sub>p</sub> για τον LAB2**

Σε κάθε πίεση, η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης εκφράστηκε από την σταθερά θερμικής αντίστασης (Z<sub>T</sub>), που υπολογίζεται από την εξίσωση 7.2:

$$\log D = \log D_{T_{ref}} + (T_{ref} - T) / Z_T \quad (\text{εξίσωση 7.2})$$

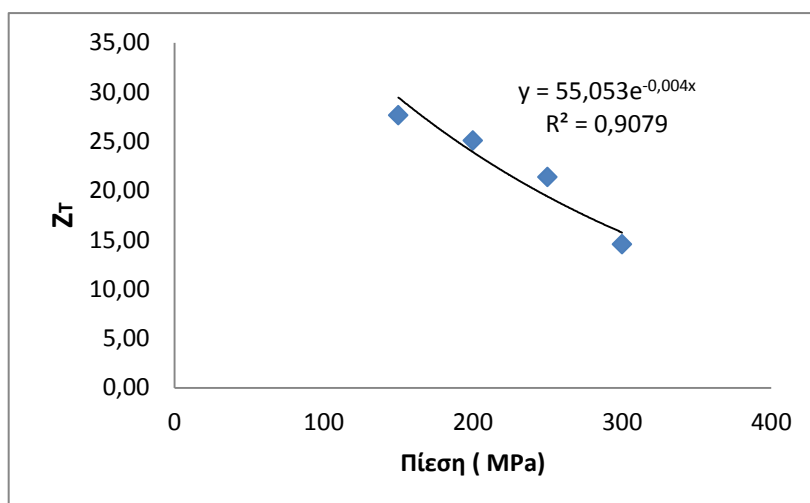
Οι σταθερές Z<sub>T</sub> υπολογίστηκαν για όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες και για τους δύο μικροοργανισμούς και η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά Z<sub>T</sub> εκφράστηκε από μία εκθετική συνάρτηση της μορφής

$$Z_T = Z_{T_{ref}} T / T_{ref} \exp[-A(P - P_{ref})] \quad (\text{εξίσωση 7.12})$$



P (MPa)	Z <sub>T</sub> (°C)
150	15,72
200	27,62
250	30,58
300	81,97

**Διάγραμμα 7.59: Επίδραση της πίεσης στη σταθερά Z<sub>T</sub> για τον LAB1**



Διάγραμμα 7.60 Επίδραση της πίεσης στη σταθερά  $Z_T$  για τον LAB2

Ο προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου που περιγράφει την εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού κατά την απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων με εφαρμογή ΥΠ και θερμοκρασίας, υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά  $Z_p$  και την επίδραση της πίεσης στη σταθερά  $Z_T$ . Συνδυάζοντας λοιπόν τις παραπάνω τέσσερις εξισώσεις (εξ. 7.4 7.11 7.2 και 7.12), η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης μπορεί να εκφραστεί από το παρακάτω κινητικό μοντέλο με δύο μεταβλητές (T,P) και πολλές παραμέτρους: (Τροποποιημένη εξίσωση από Katsaros et al., 2010)

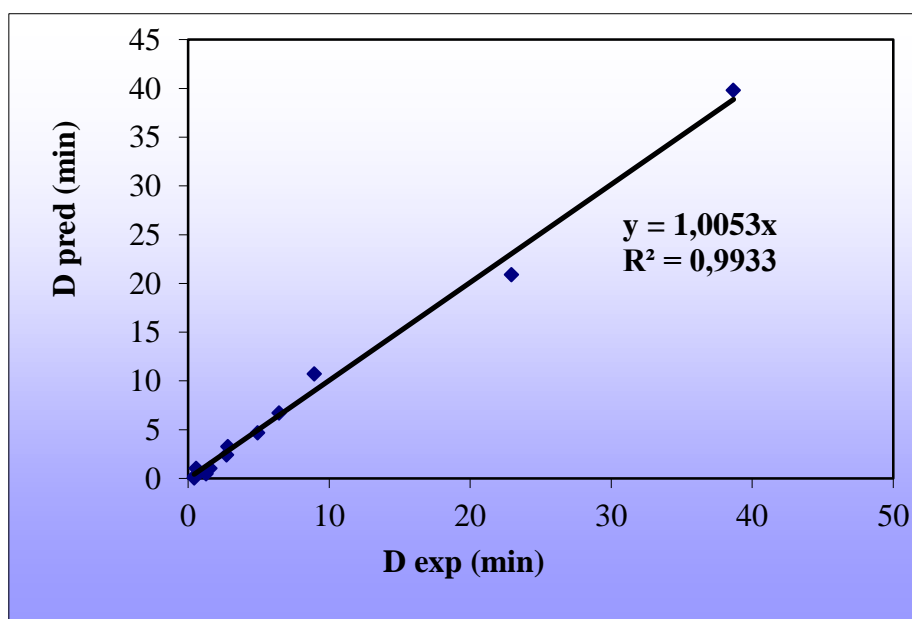
$$D = D_o \cdot \left[ \exp \left\{ - \frac{2,303 \cdot T \cdot T_{ref}}{Z_T} \cdot \exp[-A(P - P_{ref})] \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \left( \frac{B \cdot (T - T_{ref}) - \left( \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{Z_p} \right)}{R} \right) \cdot \frac{(P - P_{ref})}{T} \right\} \right]^{-1}$$

(εξίσωση 7.13)

Με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης (SYSTAT 10.2 Statistics, SPCC Inc., Chicago, III, USA) προσδιορίστηκαν οι παράμετροι της παραπάνω εξίσωσης για κάθε ένα από τους εξεταζόμενους μικροοργανισμούς LAB1 και LAB2 με συντελεστή συσχέτισης  $R^2 = 0.9933$  και  $R^2 = 0.9866$  αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στους πίνακες 7.16 και 7.17 αντίστοιχα.

**Πίνακας 7.16:** Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου απενεργοποίησης του LAB1 υπό την επίδραση συνδυασμένης πίεσης (150–300MPa) και θερμοκρασίας (25-35°C) (για  $P_{ref} = 200\text{MPa}$  και  $T_{ref} = 303\text{K}$ )

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή	L (-95%)	U (+95%)
$D_o$ (min)	4,686	3,056	6,315
$Z_T$ (°C)	32,189	-6,711	71,089
$Z_P$ (MPa)	77,028	58,306	95,751
$A$ (MPa <sup>-1</sup> )	0,027	-0,000	0,054
$B$ (ml/mol*K)	-7,291	-17,959	3,378



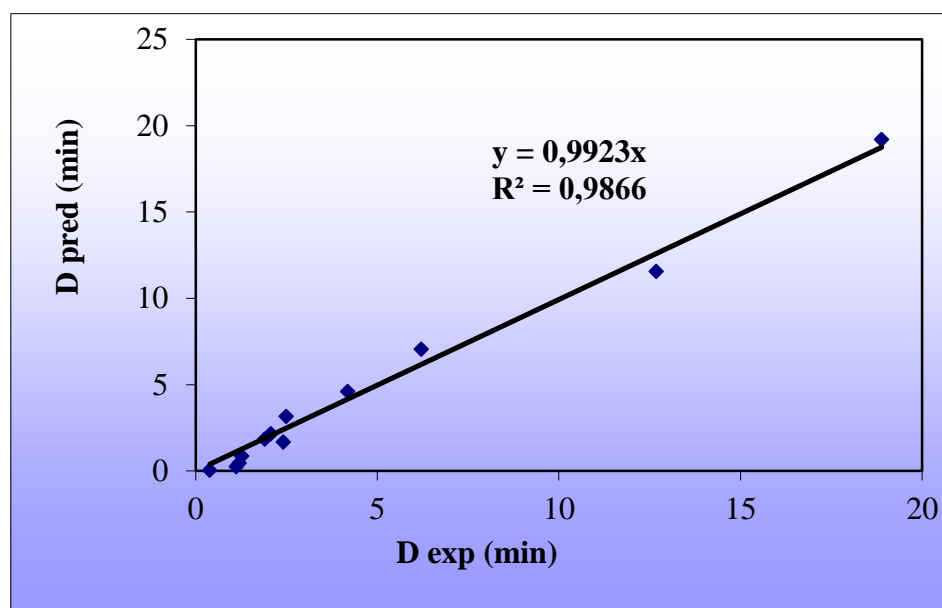
**Διάγραμμα 7.61:** Σύγκριση μεταξύ πειραματικών και προβλεπόμενων από το συνολικόμαθηματικό μοντέλο χρόνων υποδεκαπλασιασμού του LAB1.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα η συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων από το μαθηματικό μοντέλο χρόνων υποδεκαπλασιασμού του LAB 1 είναι πολύ καλή.

**Πίνακας 7.17** Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου απενεργοποίησης του LAB2 υπό την επίδραση συνδυασμένης πίεσης (150–300MPa) και θερμοκρασίας (25-35°C)

( για  $P_{ref} = 200\text{MPa}$  και  $T_{ref} = 303\text{K}$  )

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή	L (-95%)	U (+95%)
$D_0$ (min)	3,143	2,035	4,250
$Z_T$ (°C)	30,36	-2,308	63,029
$Z_P$ (MPa)	88,474	63,493	113,455
$A$ (MPa <sup>-1</sup> )	-0,02	-0,032	-0,009
$B$ (ml/mol*K)	3,648	1,088	6,208



**Διάγραμμα 7.62** : Σύγκριση μεταξύ πειραματικών και προβλεπόμενων από το συνολικόμαθηματικό μοντέλο χρόνων υποδεκαπλασιασμού του LAB2.

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω διάγραμμα η συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων από το μαθηματικό μοντέλο χρόνων υποδεκαπλασιασμού του LAB2 είναι πολύ καλή..

#### 7.4.2 Ανάπτυξη μιας Υποθετικής περίπτωσης ύπαρξης ενός Μικροοργανισμού

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τους δύο μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν, παρατηρείται ότι σε κάποιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας εμφανίστηκε ως πιο ανθεκτικός ο LAB1 ενώ σε άλλες ο LAB2. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη μιας υποθετικής περίπτωσης κατά την οποία εξετάστηκε ένας τρίτος μικροοργανισμός, υποθετικός, ο οποίος έφερε τα χαρακτηριστικά του πιο ανθεκτικού από τους δύο εξεταζόμενους μικροοργανισμούς σε κάθε συνθήκη.

Η υπόθεση αυτή μπορεί να θεωρηθεί βάσιμη αφού αν μελετηθεί η κινητική αυτού του υποθετικού μικροοργανισμού και βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για την απενεργοποίησή του, τότε εφαρμόζοντας τις συνθήκες αυτές επιτυγχάνεται η απενεργοποίηση όλων των γαλακτικών βακτηρίων που περιέχονται στο χυμό. Με αυτό το σκεπτικό, εξετάστηκε ο μικροοργανισμός ο οποίος παρουσίαζε τις πιο υψηλές τιμές D μεταξύ των δύο πραγματικών μικροοργανισμών. Οι τιμές αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 7.18:** Χρόνοι υποδεκαπλασιασμού του υποθετικού μικροοργανισμού.

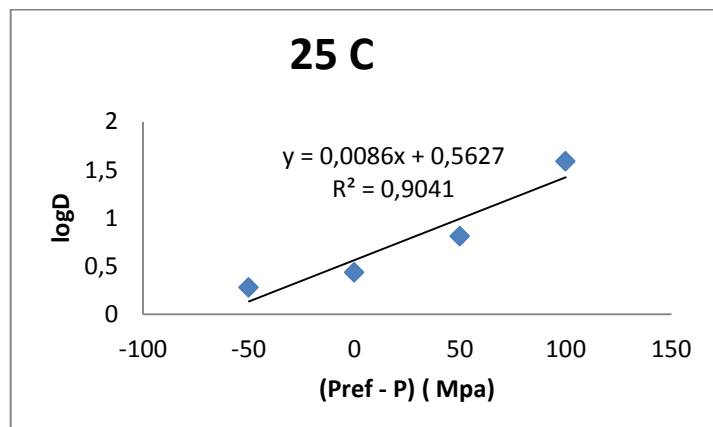
ΣΥΝΘΗΚΕΣ	25°C	30°C	35°C
<b>150MPa</b>	38,67	22,93	8,95
<b>200MPa</b>	6,46	4,93	2,81
<b>250MPa</b>	2,72	1,54	1,28
<b>300MPa</b>	1,90	1,12	0,43

Βάσει των τιμών αυτών υπολογίστηκαν οι σταθερές εξάρτησης από την πίεση και τη θερμοκρασία, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στις ακόλουθες παραγράφους (7.4.2.i και 7.4.2.ii).

##### 7.4.1.i. Εξάρτηση της απενεργοποίησης του υποθετικού μικροοργανισμού από την εφαρμοζόμενη πίεση

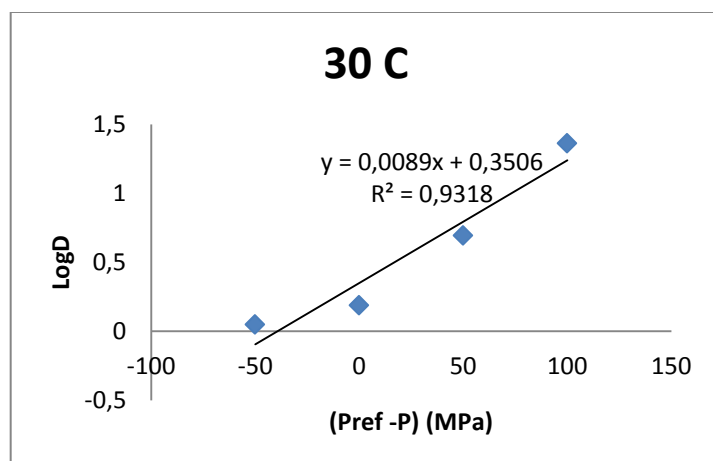
Στη συνέχεια παρουσιάζονται οι καμπύλες της συνάρτησης  $\text{LogD} = f(P - P_{\text{ref}})$  για κάθε θερμοκρασία, θεωρώντας ως  $P_{\text{ref}}$  τα 250MPa. Επίσης, στον πίνακα που

ακολουθεί φαίνονται οι υπολογιζόμενες τιμές της σταθεράς εξάρτησης από την πίεση για κάθε θερμοκρασία



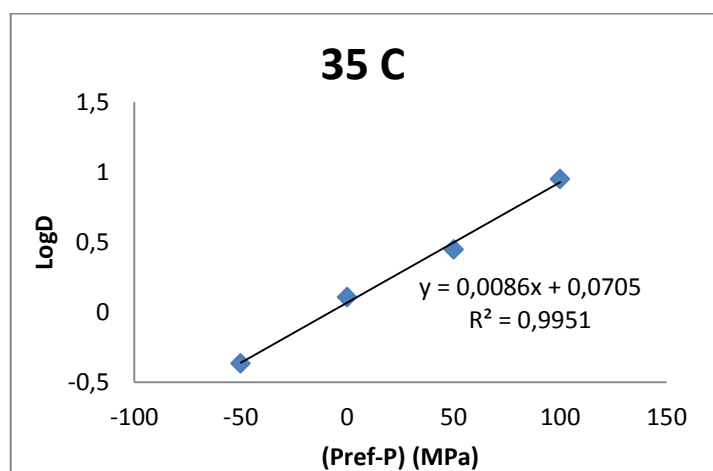
P (Mpa)	D (min)
150	38,67
200	6,46
250	2,72
300	1,90

Διάγραμμα 7.63: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 25°C.



P (Mpa)	D (min)
150	22,93
200	4,93
250	1,54
300	1,12

Διάγραμμα 7.64: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 30°C.



P (Mpa)	D (min)
150	8,95
200	2,81
250	1,28
300	0,43

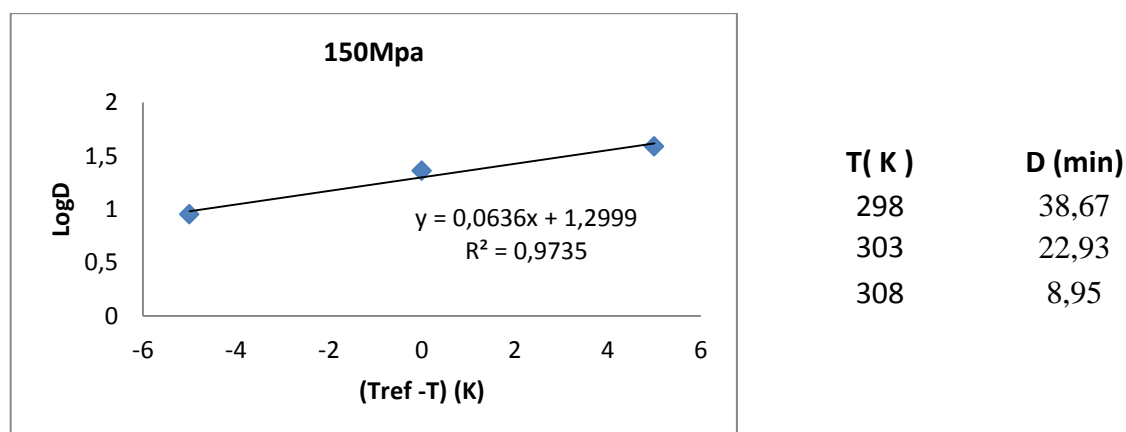
Διάγραμμα 7.65: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από την εφαρμοζόμενη πίεση για τους 35°C.

Πίνακας 7.19: Σταθερά Εξάρτησης από την Πίεση για Κάθε Θερμοκρασία

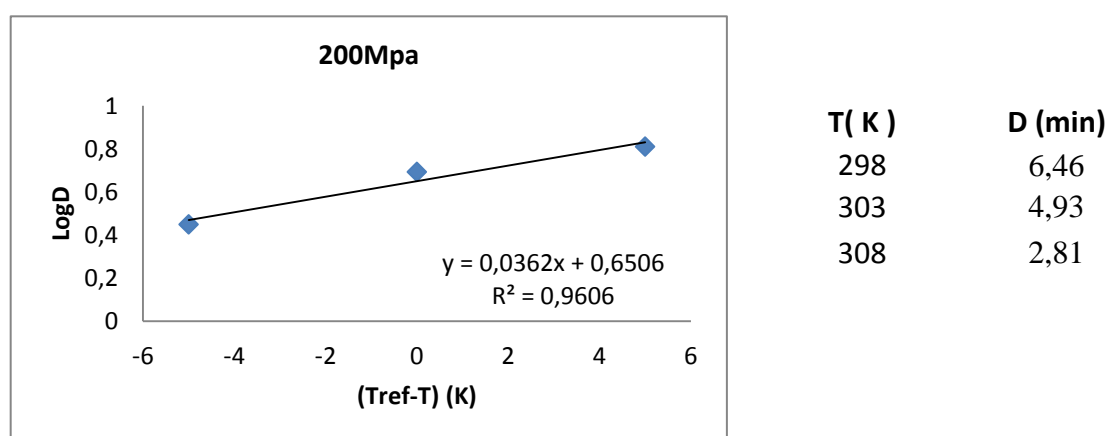
Θερμοκρασία (°C)	Σταθερά Εξάρτησης από την Πίεση $Z_P$ (MPa)	$R^2$
25	116,3	0,9844
30	112,4	0,9953
35	116,3	0,9951

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 7.19 φαίνεται ότι η σταθερά εξάρτησης από την πίεση παραμένει σχεδόν σταθερή με τη μεταβολή της θερμοκρασίας.

7.4.1.ii. Εξάρτηση της απενεργοποίησης του υποθετικού μικροοργανισμού από την εφαρμοζόμενη θερμοκρασία.

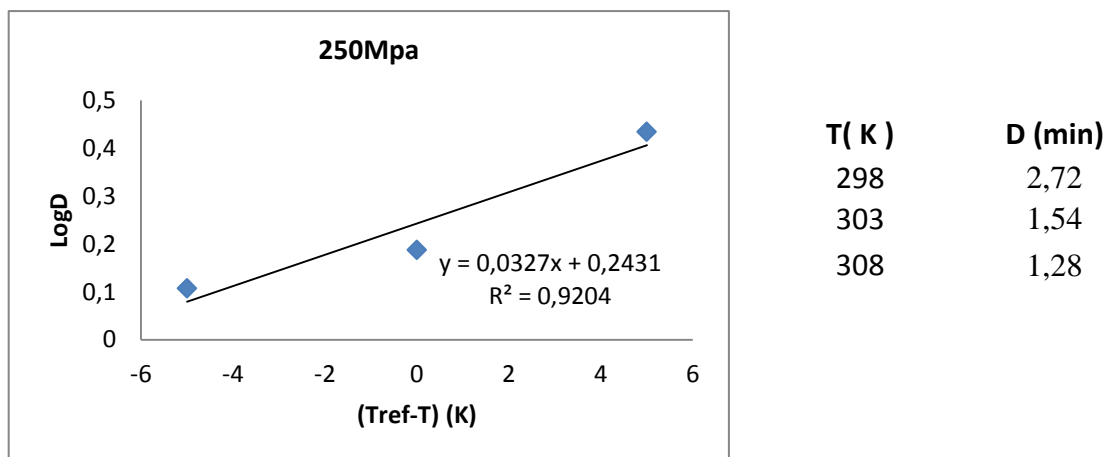


Διάγραμμα 7.66: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 150MPa.

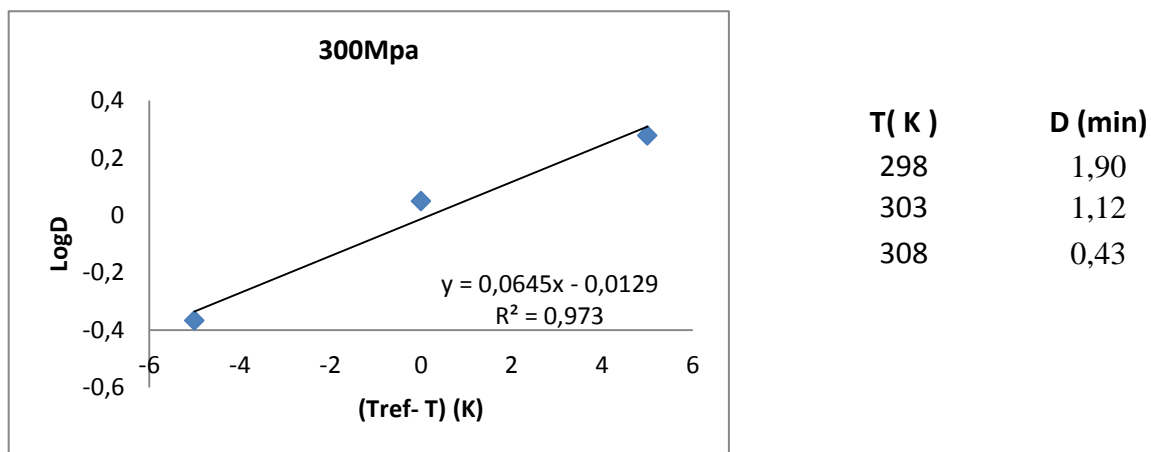


Διάγραμμα 7.67: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 200MPa.





Διάγραμμα 7.68: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 250MPa



Διάγραμμα 7.69: Εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για τα 300MPa

Πίνακας 7.20: Σταθερές Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία για Κάθε Πίεση

Πίεση (MPa)	Σταθερά Εξάρτησης από τη Θερμοκρασία $Z_T$ (°C)	$R^2$
150	15,72	0,9994
200	27,62	0,9943
250	30,58	0,9883
300	15,50	0,9645

**7.4.1.iii Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου απενεργοποίησης του υποθετικού μικροοργανισμού.**

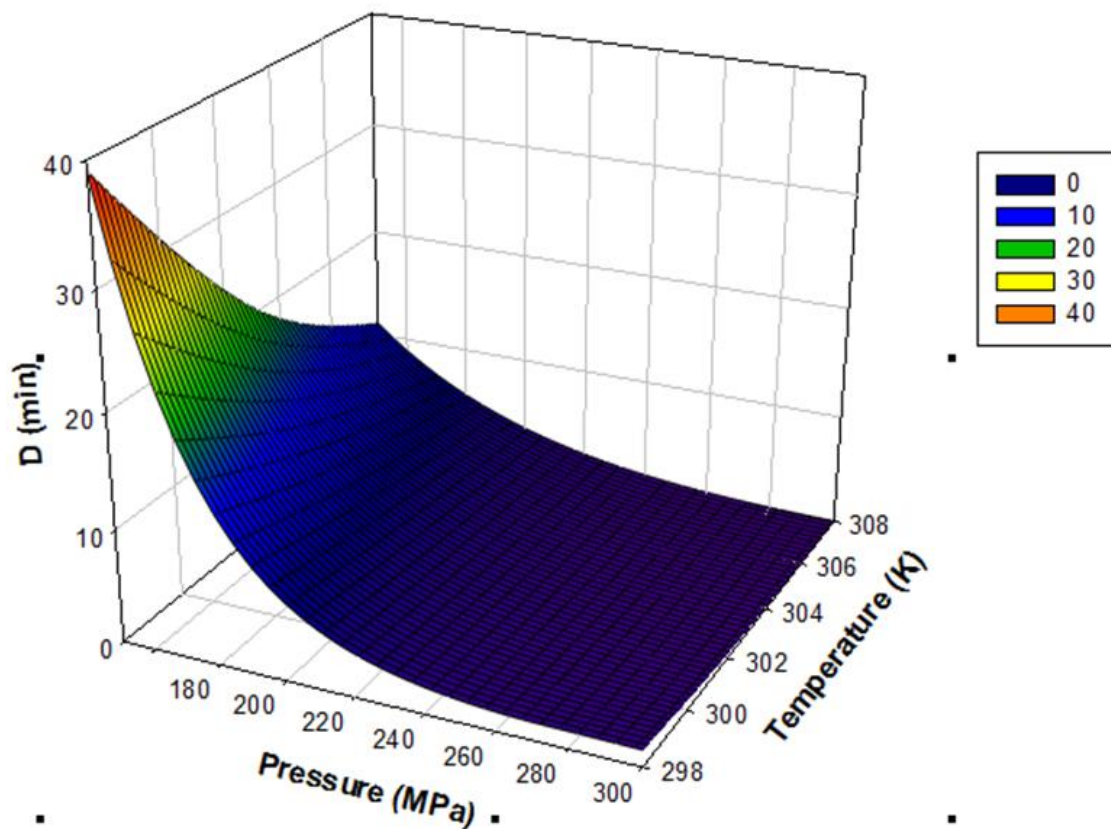
Όπως ακριβώς στην περίπτωση των LAB1 και LAB2, συνδυάζοντας τις εξισώσεις 7.9, 7.11, 7.5 και 7.12 προκύπτει το συνολικό μαθηματικό μοντέλο απενεργοποίησης του υποθετικού μικροοργανισμού ( εξίσωση 7.13)

Με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης (SYSTAT 10.2 Statistics, SPCC Inc., Chicago, Ill, USA) προσδιορίστηκαν οι παράμετροι της εξίσωσης 7.13 για τον υποθετικό μικροοργανισμό με συντελεστή συσχέτισης  $R^2 = 0.9933$ . Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί

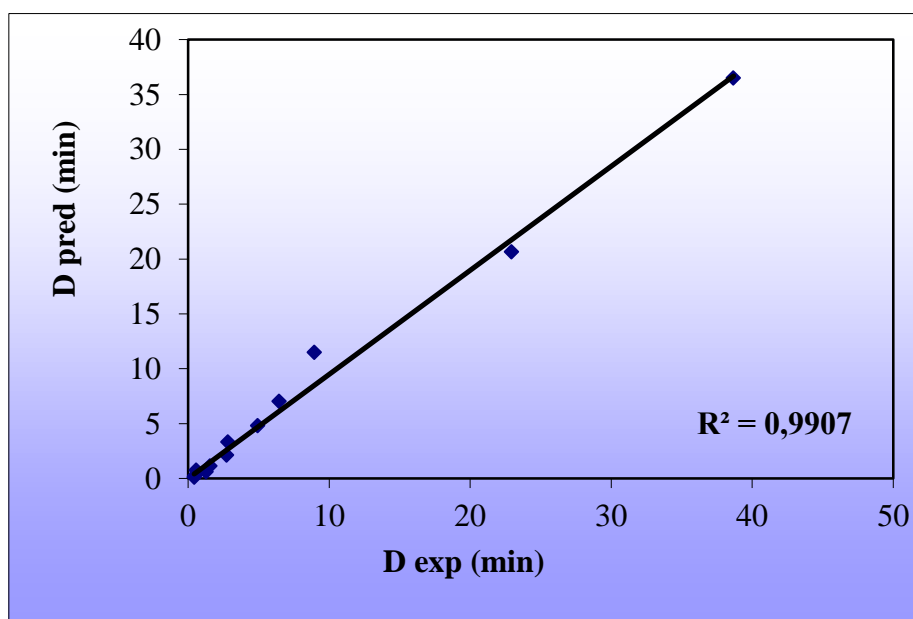
**Πίνακας 7.21:** Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου απενεργοποίησης του υποθετικού μικροοργανισμού υπό την επίδραση συνδυασμένης πίεσης (150–300MPa) και θερμοκρασίας (25-35°C ) (για  $P_{ref} = 200\text{MPa}$  και  $T_{ref} = 303\text{K}$ )

Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή	L (-95%)	U (+95%)
<b>D<sub>0</sub> (min)</b>	4,814	2,996	6,632
<b>Z<sub>T</sub> (°C)</b>	30,509	-5,197	66,215
<b>Z<sub>P</sub> (MPa)</b>	79,102	57,846	100,358
<b>A (MPa<sup>-1</sup>)</b>	0,021	0,034	0,008
<b>B (ml/mol*K)</b>	-5,043	-1,116	-4,519

Στο διάγραμμα 7.70 φαίνεται η εξάρτηση των προβλεπόμενων από το μοντέλο χρόνων υποδεκαπλασιασμού από την πίεση και τη θερμοκρασία, ενώ στο διάγραμμα 7.71 παρουσιάζεται η συσχέτιση των πειραματικών χρόνων υποδεκαπλασιασμού του υποθετικού μικροοργανισμού με τις αντίστοιχες σταθερές που προσδιορίστηκαν από το συνολικό μαθηματικό μοντέλο



Διάγραμμα 7.70: Προβλεπόμενες τιμές  $D$  συναρτήσει της πίεσης και της θερμοκρασίας με βάση το κινητικό μοντέλο απενεργοποίησης του υποθετικού μικροοργανισμού.



Διάγραμμα 7.71: Σύγκριση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων από το μαθηματικό μοντέλο χρόνων υποδεκαπλασιασμού του υποθετικού μικροοργανισμού.

Από το διάγραμμα 7.70 φαίνεται η συνεργιστική επίδραση πίεσης και θερμοκρασίας καθώς η αύξηση τους οδηγεί σε μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού D.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 7.71 η συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων από το μαθηματικό μοντέλο χρόνων υποδεκαπλασιασμού είναι πολύ καλή.

## 7.5 Επεξεργασία της πηκτινομεθυλεστεράσης με συνδυασμένη εφαρμογή πίεσης και θερμοκρασίας

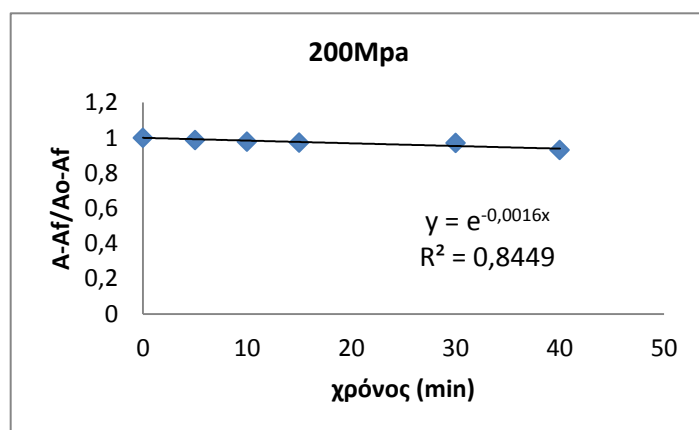
Κατά τη διεξαγωγή αυτής της σειράς πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας της ΠΜΕ του πορτοκαλοχυμού με υπερυψηλή πίεση σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία, για διάφορους χρόνους επεξεργασίας. Εφαρμόστηκαν πιέσεις από 200 έως 600Μρα και για θερμοκρασίες 20, 30 και 40°C. Η χρονική διάρκεια της επιβαλλόμενης πίεσης προσδιορίστηκε ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες επεξεργασίας. Ο προσδιορισμός της απενεργοποίησης του ενζύμου συναρτῆσει του χρόνου στις συγκεκριμένες συνθήκες έγινε με βάση τον υπολογισμό της εναπομένουσας δραστηκότητας της ΠΜΕ σε κάθε χρόνο επεξεργασίας.

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα, υπό την επίδραση της συνδυασμένης πίεσης και θερμοκρασίας παρατηρήθηκε ότι σε κάθε συνδυασμό ένα συγκεκριμένο ποσοστό της ΠΜΕ (περίπου 10%) δεν απενεργοποιείται. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι η ΠΜΕ του πορτοκαλοχυμού αποτελείται πιθανότατα από δύο συνένζυμα, το ένα περισσότερο ευαίσθητο στην πίεση και το άλλο ανθεκτικό σε αυτήν. Το κινητικό μοντέλο που βρέθηκε ότι εφαρμόζει στα πειραματικά δεδομένα και αφορά το ευαίσθητο συνένζυμο είναι το κλασματικό μοντέλο πρώτης τάξης της μορφής:

$$\frac{A - A_f}{A_0 - A_f} = e^{-kt} \quad \text{(εξίσωση 7.15)}$$

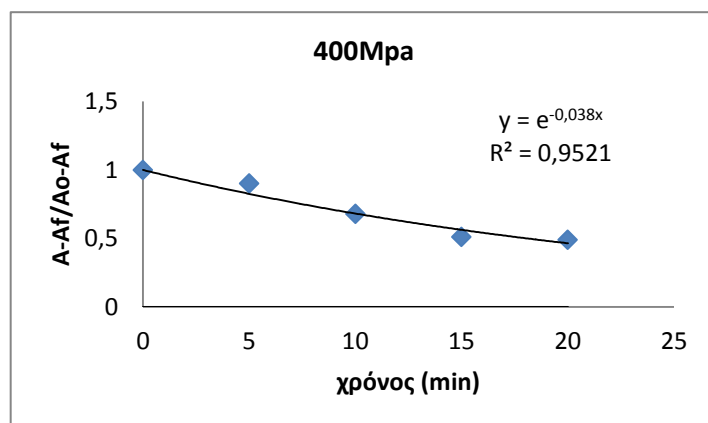
Όπου  $A_f$  η ενεργότητα που αντιστοιχεί στο πιο ανθεκτικό συνένζυμο,  $A$  η ενεργότητα του ενζύμου στη χρονική στιγμή  $t$ ,  $A_0$  η ενεργότητα τη χρονική στιγμή  $t=0$  και  $k$  η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης.

Με την εφαρμογή του παραπάνω μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα, υπολογίστηκε η κινητική σταθερά  $k$ . Αυτό φαίνεται αναλυτικά στα διαγράμματα που ακολουθούν.

**Επεξεργασία της ΠΜΕ με ΥΠ στους 20°C**

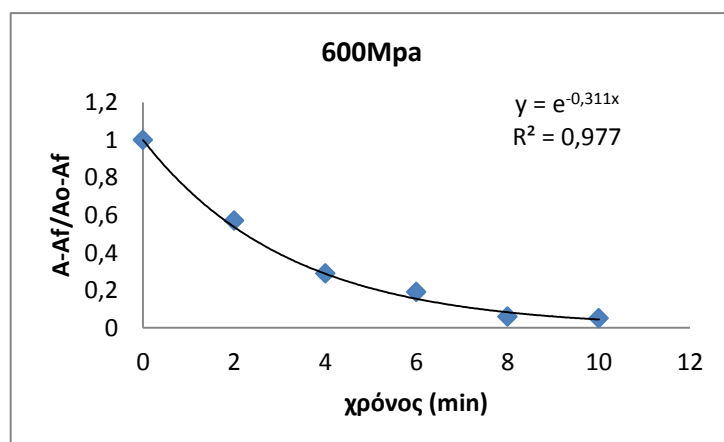
time (min)	A-A <sub>f</sub> /A <sub>o</sub> -A <sub>f</sub>
0	1,000
5	0,987
10	0,978
15	0,972
30	0,970
40	0,930

**Διάγραμμα 7.72:** Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 20°C και πίεση 200MPa



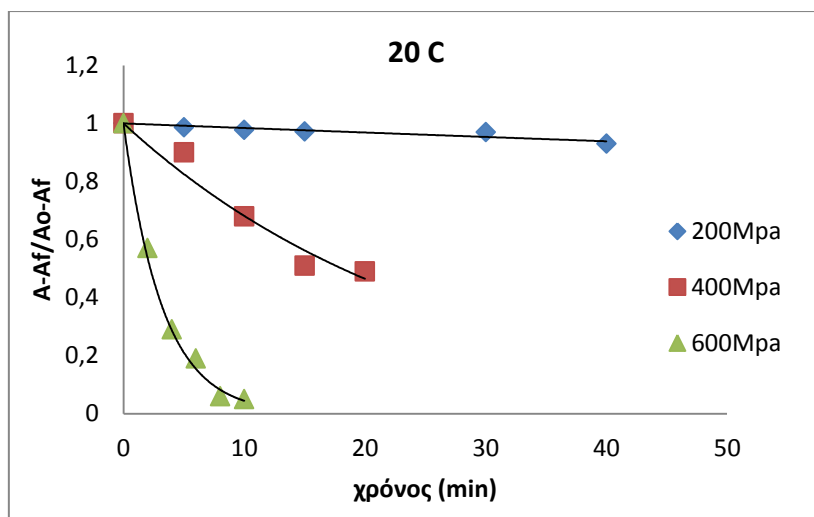
time (min)	A-A <sub>f</sub> /A <sub>o</sub> -A <sub>f</sub>
0	1
5	0,90
10	0,68
15	0,51
20	0,49

**Διάγραμμα 7.73:** Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 20°C και πίεση 400MPa



time (min)	A-A <sub>f</sub> /A <sub>o</sub> -A <sub>f</sub>
0	1
2	0,57
4	0,29
6	0,19
8	0,06
10	0,05

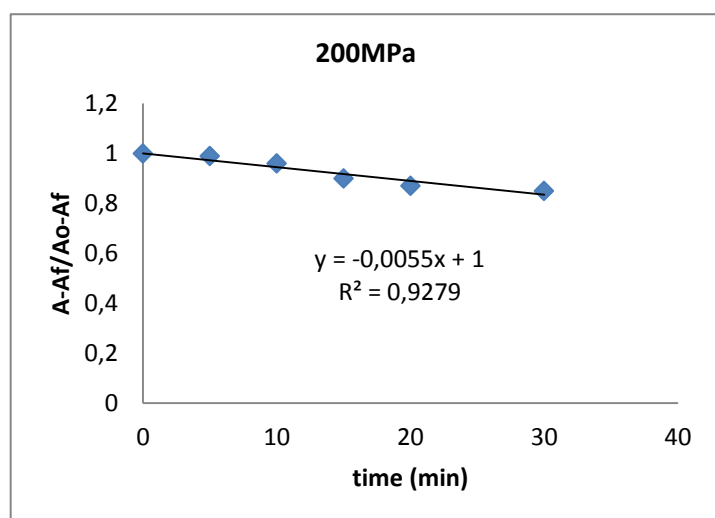
**Διάγραμμα 7.74:** Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 20°C και πίεση 600MPa



Διάγραμμα 7.75: Επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ στους 20°C

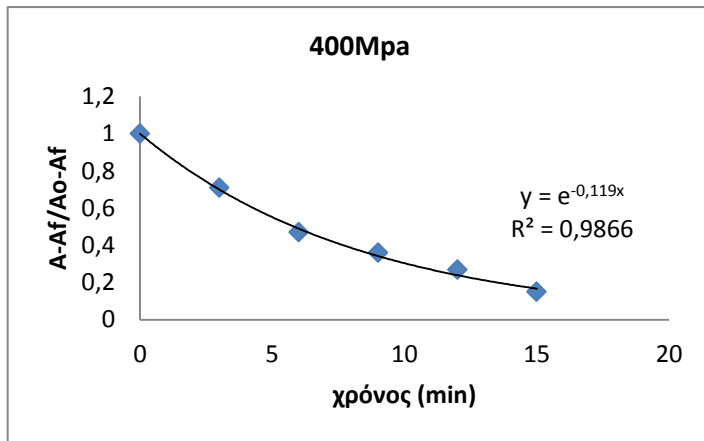
Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι με εφαρμογή πίεσης 200Mpa η ΠΜΕ απενεργοποιείται ελάχιστα καθώς μετά από 40 λεπτά είχε διατηρήσει το 0,93 της αρχικής ενεργότητας. Όσο όμως η εφαρμοζόμενη πίεση αυξάνεται, παρατηρείται αισθητή μείωση του χρόνου που απαιτείται για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Έτσι, σε πίεση 600MPa η ενεργότητα του ενζύμου υποδιπλασιάζεται σε μόλις 2 λεπτά και το ένζυμο απενεργοποιείται σχεδόν πλήρως σε χρονικό διάστημα 10 λετών.

## 2.2 Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΠ στους 30°C



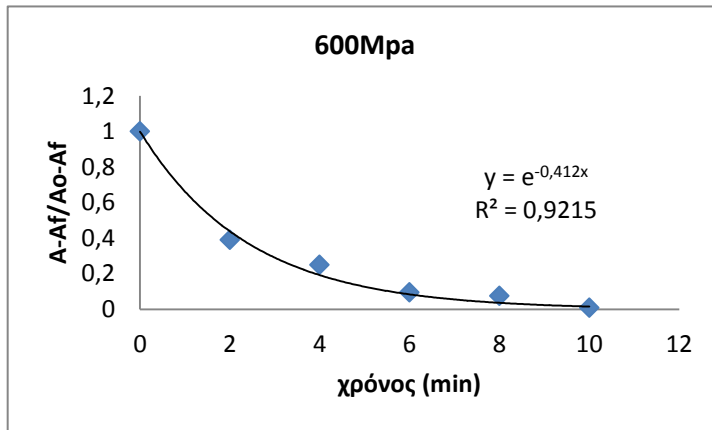
time (min)	A-Af/Ao-Af
0	1
5	0,99
10	0,96
15	0,90
20	0,87
30	0,85

Διάγραμμα 7.76: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 30°C και πίεση 200MPa



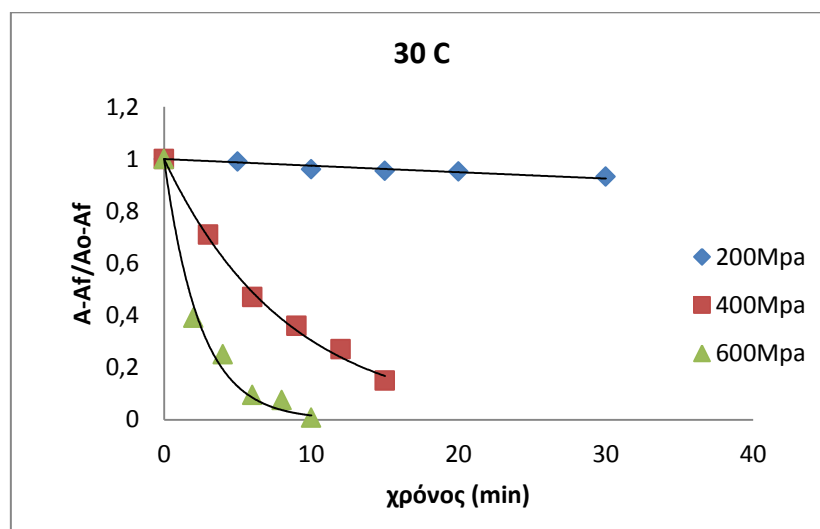
time (min)	A-A <sub>f</sub> /A <sub>0</sub> -A <sub>f</sub>
0	1
3	0,71
6	0,47
9	0,37
12	0,27
15	0,15

Διάγραμμα 7.77: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 30°C και πίεση 400MPa



time (min)	A-A <sub>f</sub> /A <sub>0</sub> -A <sub>f</sub>
0	1
2	0,390
4	0,250
6	0,095
8	0,075
10	0,008

Διάγραμμα 7.78: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 30°C και πίεση 600MPa

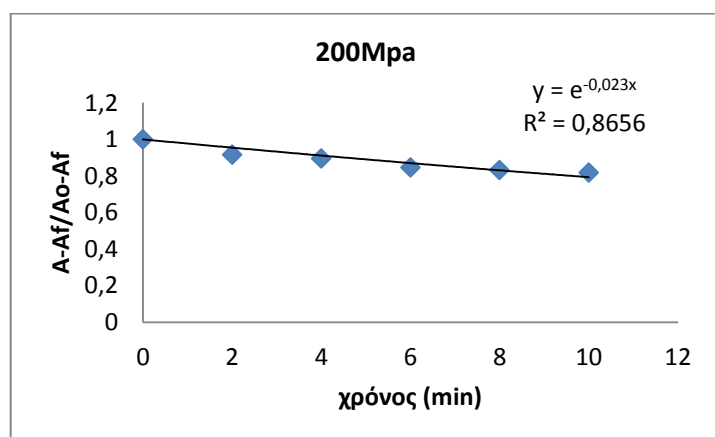


Διάγραμμα 7.79: Επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ στους 30°



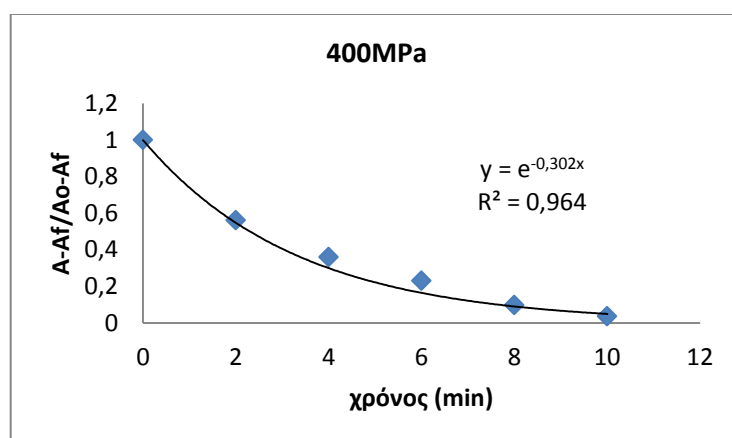
Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι η εφαρμογή πίεσης 200MPa έχει ελάχιστη επίδραση στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ καθώς μετά από 30 λεπτά είχε διατηρήσει το 0,85 της αρχικής ενεργότητας. Όσο όμως η εφαρμοζόμενη πίεση αυξάνεται στα 400 και 600MPa, παρατηρείται αισθητή μείωση του χρόνου που απαιτείται για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Συγκεκριμένα, σε πίεση 400MPa η ενεργότητα του ενζύμου φτάνει στο 15% της αρχικής μετά από 15 λεπτά και στα 600MPa παρατηρείται πλήρης απενεργοποίηση σε χρονικό διάστημα 10 λετών

### Επεξεργασία ΠΜΕ με ΥΠ στους 40°C



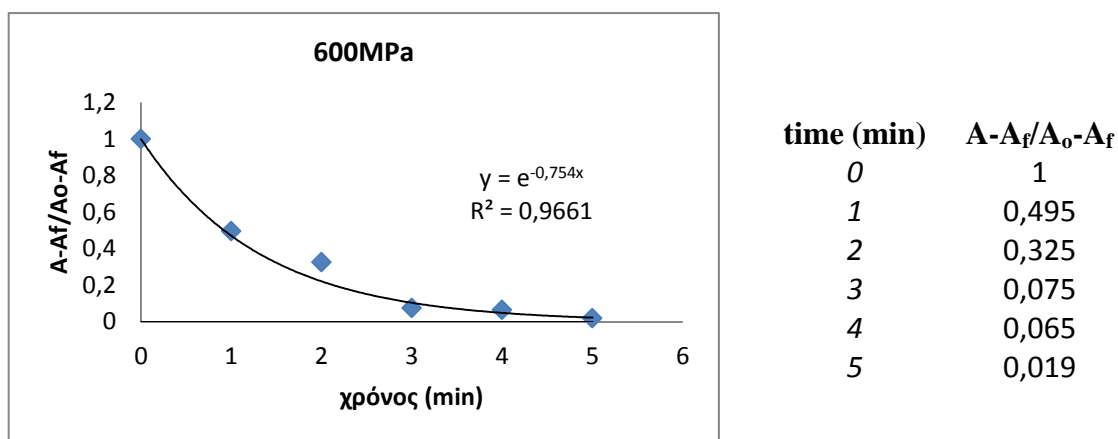
time (min)	A-Af/Ao-Af
0	1
2	0,916
4	0,895
6	0,846
8	0,832
10	0,818

**Διάγραμμα 7.80** Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 40°C και πίεση 200MPa

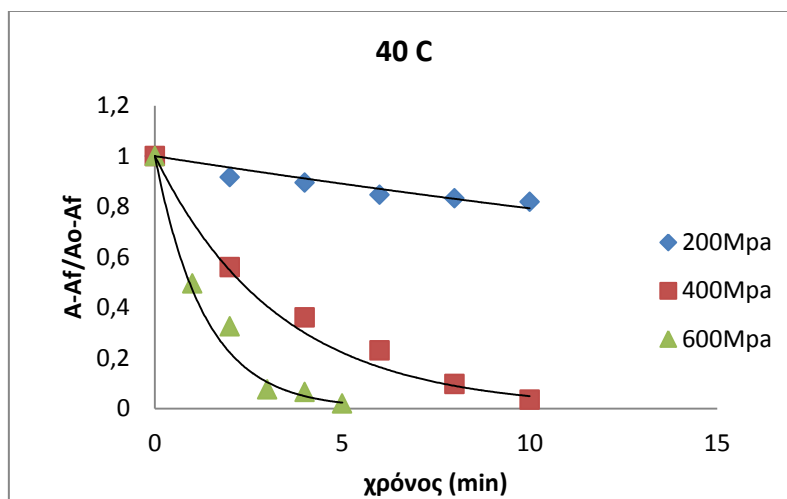


time (min)	A-Af/Ao-Af
0	1
2	0,560
4	0,360
6	0,230
8	0,096
10	0,035

**Διάγραμμα 7.81:** Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 40°C και πίεση 400MPa



Διάγραμμα 7.82: Κινητική απενεργοποίησης ΠΜΕ σε θερμοκρασία 40°C και πίεση 600MPa



Διάγραμμα 7.83: Επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ στους 40°C

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται ότι ακόμη και με εφαρμογή πίεσης 200MPa στους 40°C συμβαίνει σημαντική απενεργοποίηση της ΠΜΕ καθώς μετά από 10 λεπτά το ένζυμο έχει εναπομένουσα δραστηριότητα ίση με το 0,82 της αρχικής. Με αύξηση της πίεσης, παρατηρείται αισθητή μείωση του χρόνου που απαιτείται για την απενεργοποίηση του ενζύμου. Συγκεκριμένα, στα 600MPa ο χρόνος που απαιτείται για την πλήρη απενεργοποίηση του ενζύμου είναι περίπου 5 λεπτά.

Με εφαρμογή λοιπόν του κινητικού μοντέλου που ορίστηκε παραπάνω και με χρήση εκθετικής παρεμβολής στα πειραματικά δεδομένα των παραπάνω διαγραμμάτων προσδιορίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) της ΠΜΕ για κάθε πίεση και θερμοκρασία.

**Πίνακας 7.22:** Σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης ( $\text{min}^{-1}$ ) όπως προκύπτουν από την εκθετική παρεμβολή στα πειραματικά δεδομένα, για κάθε πίεση και θερμοκρασία.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	20°C	30°C	40°C
200MPa	0,0016	0,0055	0,0232
400MPa	0,038	0,119	0,302
600MPa	0,310	0,412	0,754

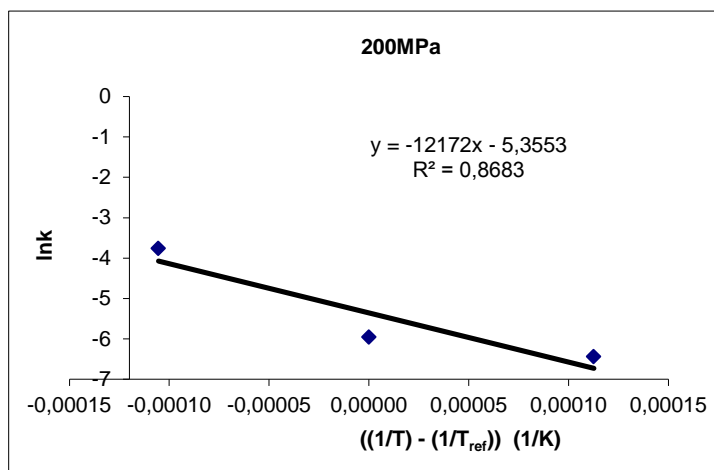
Από τον πίνακα 7.22 φαίνεται ότι για την ίδια θερμοκρασία, όσο αυξάνεται η τιμή της εφαρμοζόμενης πίεσης ο ρυθμός απενεργοποίησης αυξάνεται. Επίσης είναι φανερό ότι για την ίδια πίεση, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία του πειράματος παρατηρείται αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης.

### 7.5.1 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία για σταθερή πίεση (ενέργεια ενεργοποίησης)

Η ενέργεια ενεργοποίησης  $E_a$  εκφράζει την εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΙΜΕ από τη θερμοκρασία. Η εξάρτηση αυτή εκφράζεται μέσω της γραμμικοποιημένης σχέσης Arrhenius:

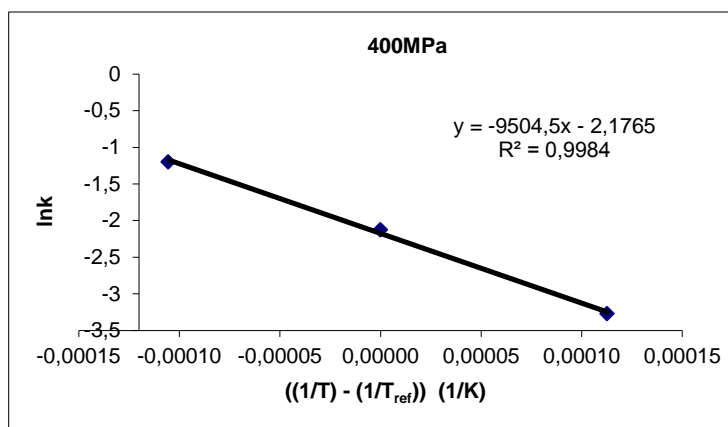
$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (\text{εξίσωση 7.16})$$

Με χάραξη του γραφήματος  $\ln k$  (από τα πειραματικά δεδομένα) σε συνάρτηση με την ποσότητα  $\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}$  παίρνουμε για κάθε πίεση και θερμοκρασία αναφοράς για 30°C τα παρακάτω διαγράμματα.



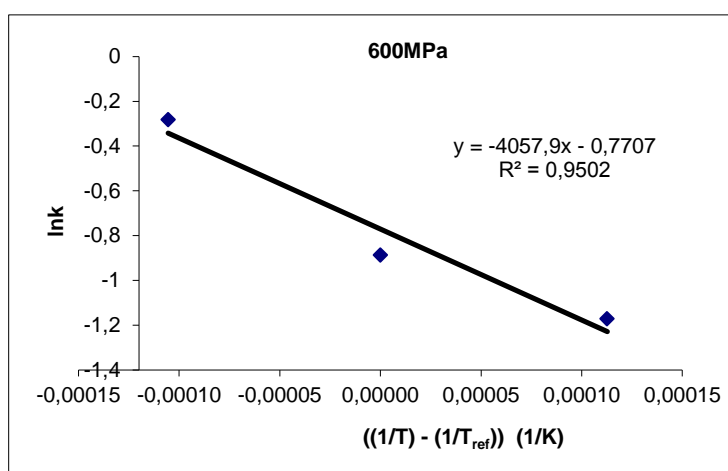
T (K)	K (min <sup>-1</sup> )
293	0,0016
303	0,0055
313	0,0232

**Διάγραμμα 7.84:** Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από τη θερμοκρασία πίεση 200Μρα



T (K)	K (min <sup>-1</sup> )
293	0,038
303	0,119
313	0,302

**Διάγραμμα 7.85:** Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από τη θερμοκρασία πίεση 400Μρα



T (K)	K (min <sup>-1</sup> )
293	0,310
303	0,412
313	0,754

**Διάγραμμα 7.86:** Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από τη θερμοκρασία πίεση 600Μρα

Για κάθε διάγραμμα, από την εξίσωση της προσαρμοζόμενης ευθείας και τη γραμμικοποιημένη μορφή της εξίσωσης Arrhenius μπορούν να υπολογιστούν οι ενέργειες ενεργοποίησης καθώς και οι σταθερές  $k_{ref}$ . Έτσι προκύπτει ο παρακάτω πίνακας με τις τιμές της  $E_a$  και του  $k_{ref}$  για κάθε πίεση επεξεργασίας.

**Πίνακας 7.23:** Υπολογισμένες τιμές ενέργειας ενεργοποίησης  $E_a$  (kJ/mol) και σταθεράς  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ) σε θερμοκρασία αναφοράς  $30^\circ\text{C}$ , για κάθε πίεση επεξεργασίας.

Πίεση επεξεργασίας (MPa)	$E_a$ (kJ/mol)	$k_{ref}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
200	101,2	0,0047
400	79,0	0,113
600	33,7	0,463

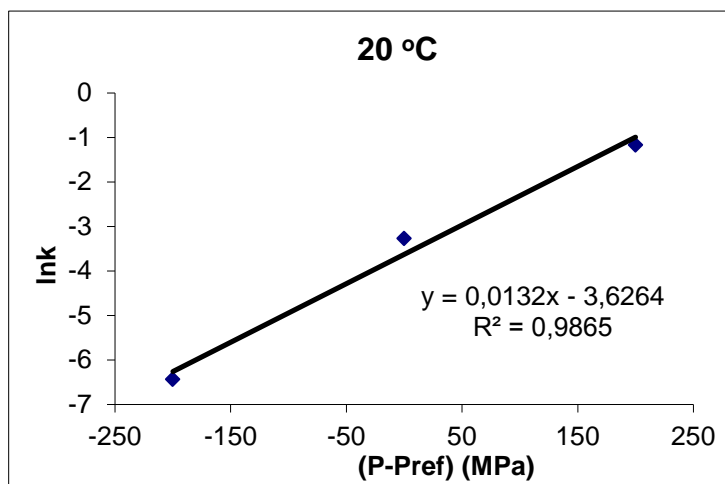
Από τα αποτελέσματα του πίνακα 7.23 φαίνεται ότι με αύξηση της πίεσης η ενέργεια ενεργοποίησης μειώνεται. Επομένως όσο αυξάνεται η πίεση τόσο λιγότερη επίδραση έχει η μεταβολή της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του ενζύμου.

### 7.5.2 Εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από την πίεση σε σταθερή θερμοκρασία (Όγκος ενεργοποίησης)

Η εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΙΜΕ από την πίεση επεξεργασίας σε σταθερή θερμοκρασία μπορεί να εκφραστεί μέσω της γραμμικοποιημένης εξίσωσης του Eyring:

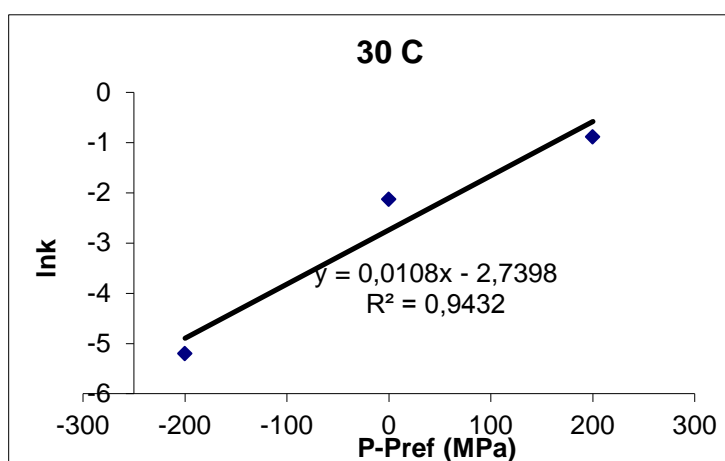
$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{V_a}{RT} (P - P_{ref}) \quad (\text{εξίσωση 7.17})$$

Όπου  $P_{ref}$  η πίεση αναφοράς και  $k_{ref}$  η σταθερά το ρυθμού στην πίεση αναφοράς. Η εξάρτηση του ρυθμού σε αυτή την περίπτωση εκφράζεται από την τιμή του  $V_a$  που ονομάζεται όγκος ενεργοποίησης. Χάραξη του διαγράμματος  $\ln k$  ως προς την ποσότητα  $P - P_{ref}$ , με πίεση αναφοράς 400MPa δίνει ευθεία με κλίση  $-\frac{V_a}{RT}$  και αποτέμνουσα  $\ln k_{ref}$ . Δίνονται παρακάτω τα διαγράμματα:



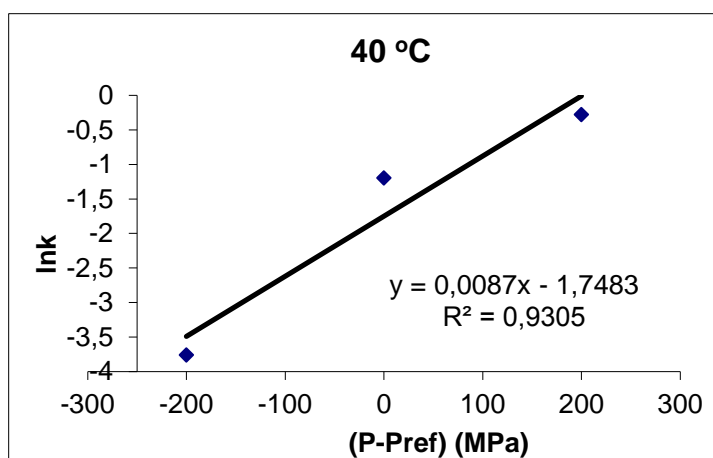
<b>P (Mpa)</b>	<b>K (min<sup>-1</sup>)</b>
200	0,0016
400	0,038
600	0,310

**Διάγραμμα 7.87:** εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από την πίεση για θερμοκρασία 20°C.



<b>P (Mpa)</b>	<b>K (min<sup>-1</sup>)</b>
200	0,0055
400	0,119
600	0,412

**Διάγραμμα 7.88:** εξάρτηση της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από την πίεση για θερμοκρασία 30°C



<b>P (Mpa)</b>	<b>K (min<sup>-1</sup>)</b>
200	0,023
400	0,302
600	0,754

**Διάγραμμα 7.89:** διάγραμμα εξάρτησης της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ από την πίεση για θερμοκρασία 40°C

Για κάθε διάγραμμα, από την εξίσωση της προσαρμοζόμενης ευθείας και τη γραμμικοποιημένη εξίσωση του Eyring μπορούν να υπολογιστούν ο όγκος ενεργοποίησης καθώς και οι σταθερές  $k_{ref}$ . Έτσι προκύπτει ο παρακάτω πίνακας με τις τιμές των  $V_a$  και  $k_{ref}$  για κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας.

**Πίνακας 7.24:** Υπολογισμένες τιμές όγκου ενεργοποίησης και σταθεράς  $k$  σε πίεση αναφοράς 400MPa, για κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας.

Θερμοκρασία επεξεργασίας (°C)	$V_a$ (mL/mol)	$k_{ref}$ (min <sup>-1</sup> )
20	-32	0,027
30	-27	0,050
40	-23	0,130

Οι αρνητικοί όγκοι ενεργοποίησης φανερώνουν ότι για σταθερή θερμοκρασία, η αύξηση της πίεσης οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ. Δηλαδή η απενεργοποίηση της ΠΜΕ ευνοήθηκε από την αύξηση της πίεσης. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση των απόλυτων τιμών του όγκου ενεργοποίησης που σημαίνει ότι η απενεργοποίηση έγινε λιγότερο εξαρτώμενη από την πίεση.

## 7.6 Προσδιορισμός του συνολικού μαθηματικού μοντέλου του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ πορτοκαλοχυμού Navel ως συνάρτηση της πίεσης και θερμοκρασίας.

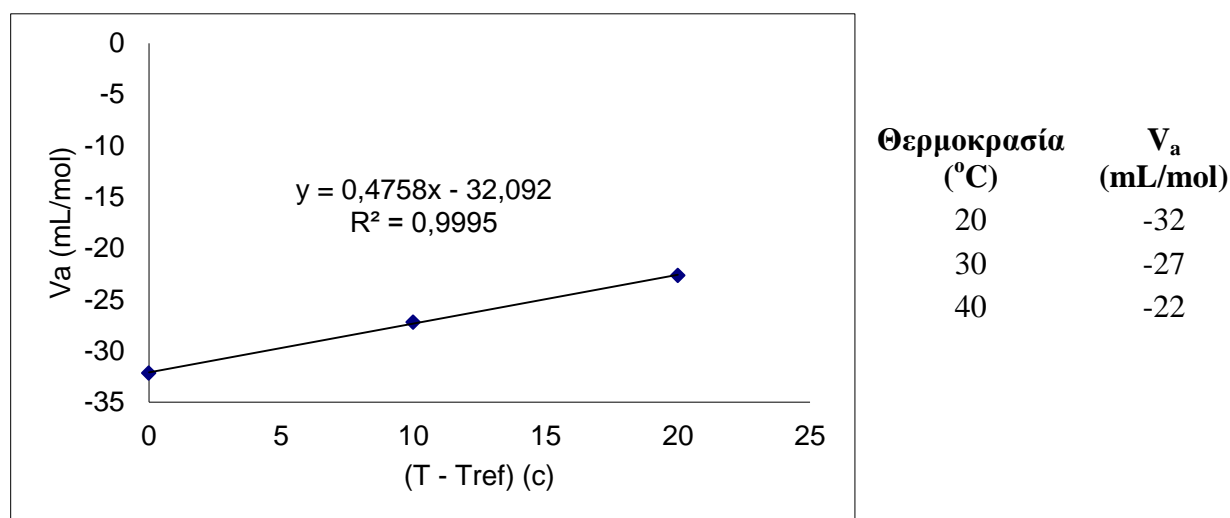
Σε κάθε θερμοκρασία η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης εκφράστηκε μέσω του όγκου ενεργοποίησης ( $V_a$ ) ;όπως αυτός εκφράζεται από την εξίσωση του Eyring (εξίσωση 7.17):

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{V_a}{RT} (P - P_{ref})$$

Οι όγκοι ενεργοποίησης υπολογίστηκαν για όλες τις εξεταζόμενες θερμοκρασίες και η επίδραση της θερμοκρασίας στον όγκο ενεργοποίησης εκφράστηκε από μία γραμμική συνάρτηση της μορφής: (Διάγραμμα 7.89)

$$V_a = A (T - T_{ref}) + V_{a,ref} \quad (\text{εξίσωση 7.18})$$

,όπου  $A = 0,4758 \text{ (mL/mol}\cdot\text{K)}$ ,  $T_{ref} = 20^\circ\text{C}$ ,  $V_{a,ref} = -32,092 \text{ (mL/mol)}$



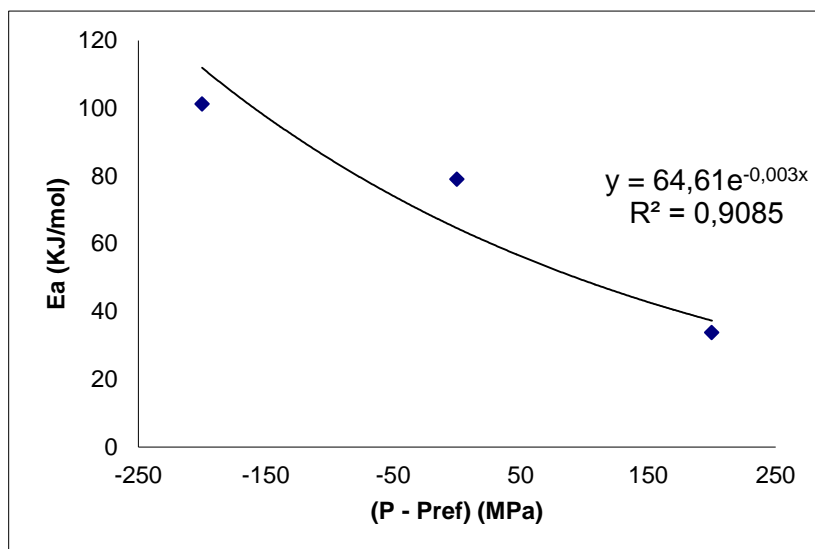
**Διάγραμμα 7.90:** Ο όγκος ενεργοποίησης ως συνάρτηση της θερμοκρασίας σε θερμοκρασία αναφοράς  $20^\circ\text{C}$

Σε κάθε πίεση, η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης εκφράστηκε από την ενέργεια ενεργοποίησης ( $E_a$ ), που υπολογίζεται από την εξίσωση Arrhenius με  $T_{ref} = 30^\circ\text{C}$ . (εξίσωση 7.16)

$$\ln k = \ln k_{ref} - \frac{E_a}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right)$$

Οι ενέργειες ενεργοποίησης υπολογίστηκαν για όλες τις πιέσεις που εξετάστηκαν





**Διάγραμμα 7.91:** Επίδραση της πίεσης στην ενέργεια ενεργοποίησης της ΠΜΕ για  $P_{ref}=400\text{MPa}$

Έτσι λοιπόν η επίδραση της πίεσης στην ενέργεια ενεργοποίησης εκφράστηκε από μια εκθετική εξίσωση της μορφής

$$E_a = E_{a,0} * \exp[-B(P-P_{ref})] \quad (\text{εξίσωση 7.19})$$

,όπου  $P_{ref}= 400\text{MPa}$ ,  $E_{a,0}= 64,61 \text{ kJ/mol}$  (ενέργεια ενεργοποίησης σε  $P_{ref}$ ) και  $B=0,003\text{MPa}^{-1}$ .

Βασιζόμενοι στην εξίσωση Arrhenius και την εξίσωση Eyrhing και λαμβάνοντας υπ' όψη την επίδραση της πίεσης στην ενέργεια ενεργοποίησης και την επίδραση της θερμοκρασίας στον όγκο ενεργοποίησης (εξισώσεις 7.16, 7.17, 7.18 και 7.19), η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης μπορεί να εκφραστεί από το παρακάτω κινητικό μοντέλο με δύο μεταβλητές (T,P) και πολλές παραμέτρους.

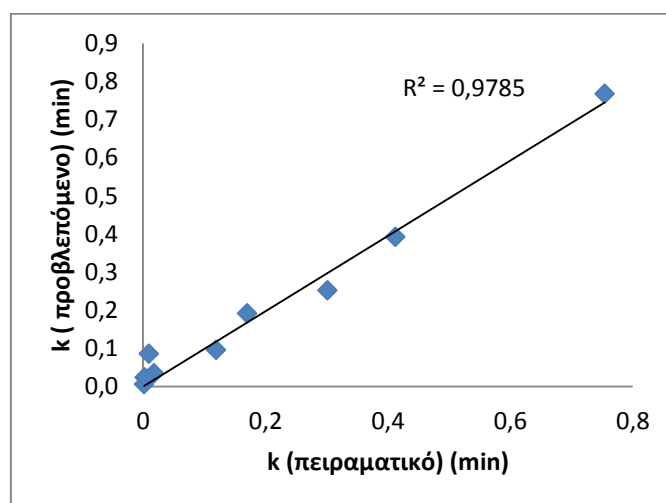
$$k = k_{refP,T} \cdot \exp \left\{ -\frac{E_{aP}}{R} \cdot \exp[-B \cdot (P - P_{ref})] \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \frac{A \cdot (T - T_{ref}) + V_{aT} \cdot (P - P_{ref})}{RT} \right\} \quad ()$$

Το μοντέλο αυτό λοιπόν λαμβάνει υπόψη την εξάρτηση του ρυθμού απενεργοποίησης του ενζύμου από την πίεση και τη θερμοκρασία, την εκθετική εξάρτηση της ενέργειας ενεργοποίησης από την πίεση καθώς και τη γραμμική εξάρτηση του όγκου ενεργοποίησης από τη θερμοκρασία.

Οι παράμετροι της εξίσωσης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης με το πρόγραμμα SYSTAT 10.2 Statistics (SPCC Inc., Chicago, USA) δίνοντας συντελεστή συσχέτισης  $R^2=0.9785$ . Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 7.25:** Παράμετροι μοντέλου όπως υπολογίστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση

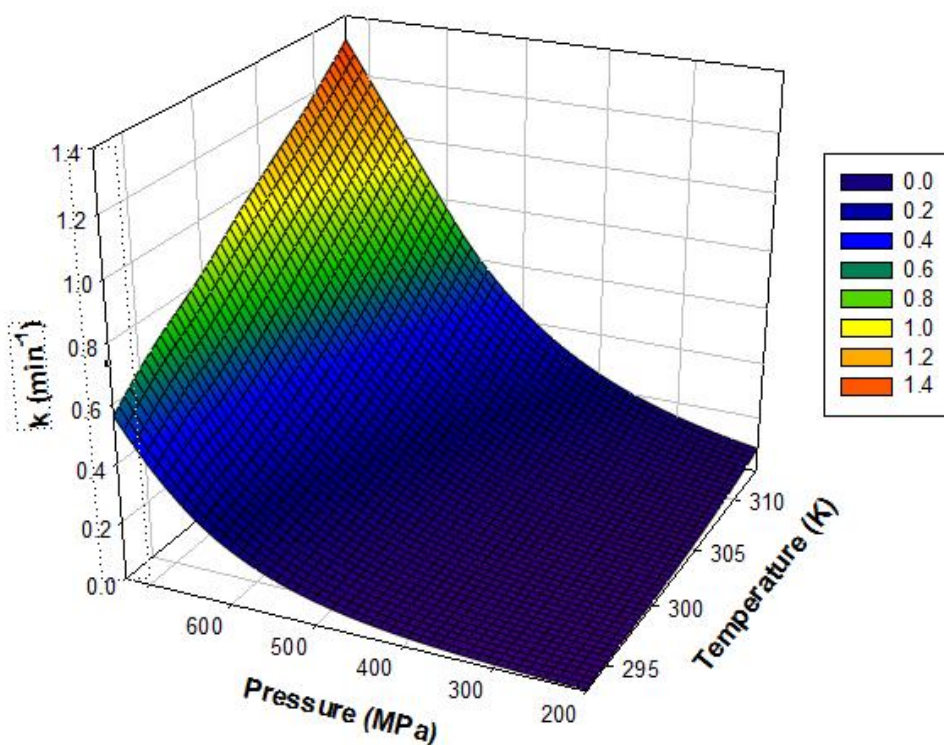
Παράμετρος	Εκτιμώμενη τιμή
$k_{refP,T} (\text{min}^{-1})$	0.392
$E_{aP} \left( \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right)$	52,92
$A \left( \frac{\text{mL}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \right)$	0,134
$B (\text{MPa}^{-1})$	-0.001
$V_{aP} \left( \frac{\text{mL}}{\text{mol}} \right)$	-17,749



**Διάγραμμα 7.92:** Σύγκριση μεταξύ πειραματικών και προβλεπόμενων από το συνολικό μαθηματικό μοντέλο σταθερών ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, υπήρξε καλή συσχέτιση μεταξύ των πειραματικών και των προβλεπόμενων από το μαθηματικό μοντέλο σταθερών του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ.

Στο διάγραμμα 7.93 φαίνεται η υπολογισμένη από το μαθηματικό μοντέλο τιμή του ρυθμού απενεργοποίησης ΠΜΕ για κάθε πίεση και θερμοκρασία επεξεργασίας. Φαίνεται η συνεργιστική επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης του ενζύμου.

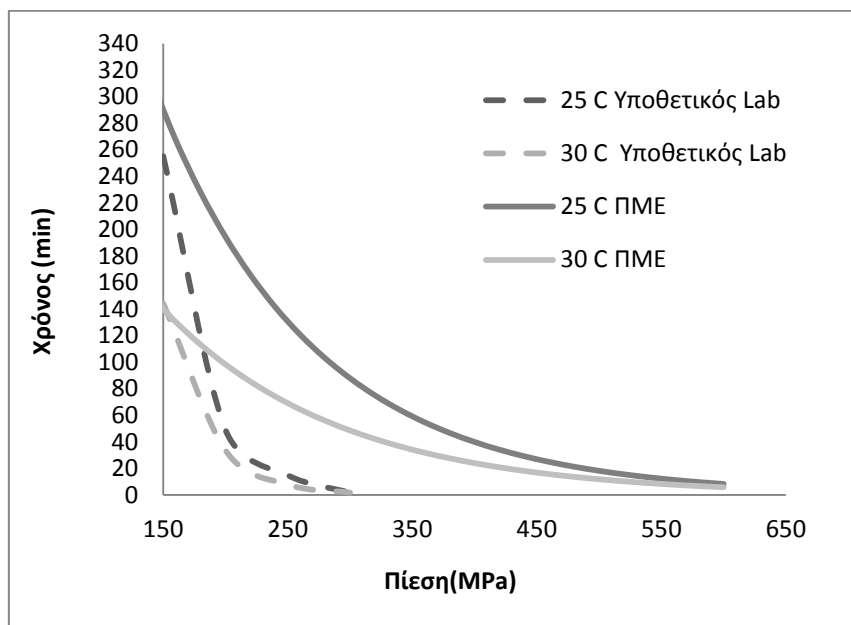


**Διάγραμμα 7.93:** τρισδιάστατη απεικόνιση της εξάρτησης της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία και την πίεση σύμφωνα με το μαθηματικό μοντέλο.

## 7.7 Επιλογή της βέλτιστης συνθήκης.

Η ποιότητα του φρέσκου χυμού πορτοκαλιού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την δραστικότητα των πηκτινολυτικών ενζύμων καθώς και την ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Επομένως στην περίπτωση του πορτοκαλοχυμού Navel, η επιλογή του κατάλληλου συνδιασμού πίεσης - μέτριας θερμοκρασίας, γίνεται με κριτήριο την επαρκή απενεργοποίηση και των δύο παραγόντων υποβάθμισης της ποιότητάς του. Έτσι η βέλτιστη συνθήκη καθορίζεται ως αυτή στην οποία επιτυγχάνεται αδρανοποίηση του 90% του ασταθούς κλάσματος της PME και μείωση 7D του πιο ανθεκτικού στελέχους των γαλακτικών βακτηρίων.

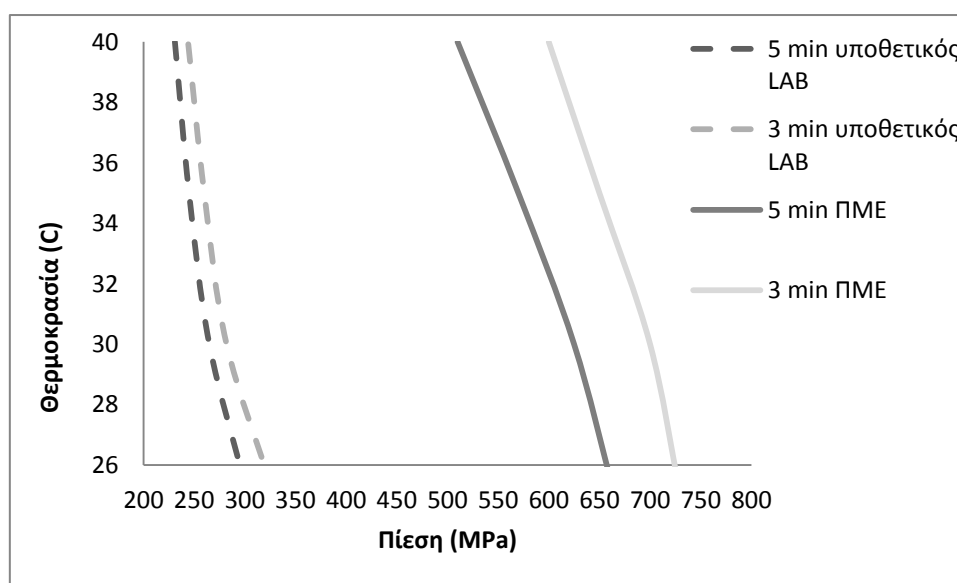
Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζονται οι απαιτούμενοι χρόνοι επεξεργασίας του πορτοκαλοχυμού για την επίτευξη 90% αδρανοποίησης του ασταθούς κλάσματος της PME καθώς και για μια 7D απενεργοποίηση του υποθετικού μικροοργανισμού ως συνάρτηση της εφαρμοζόμενης πίεσης, στους 25 και στους 30°C.



**Διάγραμμα 7.94:** Απαιτούμενος χρόνος επεξεργασίας για την επιθυμητή απενεργοποίηση της PME και των LAB σε συνάρτηση με την εφαρμοζόμενη πίεση στους 25 και 30°C. (διακεκομμένες γραμμές = 7D των LAB. Συνεχείς γραμμές = 90% απενεργοποίηση της ασταθούς PME)

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται ότι και στις δύο θερμοκρασίες για όλες τις πιέσεις η απενεργοποίηση της ΠΜΕ απαιτεί πολύ μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας απ' την απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων. Επίσης όσο αυξάνεται η εφαρμόζόμενη πίεση ο απαιτούμενος χρόνος μειώνεται σημαντικά.

Υπολογίστηκαν οι απαιτούμενες συνθήκες συνδυασμένης πίεσης-θερμοκρασίας για 90% απενεργοποίηση της ΠΜΕ και 7D απενεργοποίηση του υποθετικού μικροοργανισμού για χρόνους επεξεργασίας 5 και 3min. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



**Διάγραμμα 7.95 :** Καμπύλες που αντιπροσωπεύουν την ίδια 7D μείωση του μικροβιακού φορτίου των LAB (διακεκομμένες γραμμές) και την ίδια κατά 90% απενεργοποίηση του ασταθούς κλάσματος της ΠΜΕ (συνεχής γραμμές) για χρόνο επεξεργασίας 5 και 3min.

Από το διάγραμμα γίνεται φανερό λοιπόν ότι για την επεξεργασία του χυμού για χρόνους 3 και 5 min οι συνθήκες που απαιτούνται για την επιθυμητή απενεργοποίηση της ΠΜΕ είναι κατά πολύ πιο έντονες από αυτές που απαιτούνται για την επιθυμητή απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων. Έτσι αν κατά το σχεδιασμό της διεργασίας της παστερίωσης θέσουμε ως στόχο την απενεργοποίηση του 90% του ευαίσθητου κλάσματος της ΠΜΕ, τότε ταυτόχρονα εξασφαλίζεται και η απαραίτητη 7D μείωση του πληθυσμού του ανθεκτικότερου στελέχους των γαλακτικών βακτηρίων καθώς αυτό συμβαίνει σε πολύ πιο ήπιες συνθήκες. Επομένως

η επιλογή της βέλτιστης συνθήκης θα γίνει τελικά καθαρά και μόνο με κριτήριο την εξασφάλιση της απενεργοποίησης κατά 90% του ασταθούς κλάσματος της ΠΙΜΕ.

**Με βάση τα παραπάνω προτείνεται λοιπόν η επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού Navel σε πίεση 600MPa και θερμοκρασία 40°C για 3min.**

### **7.8 Κόστος παραγωγής χυμού πορτοκαλιού ποικιλίας Navel επεξεργασμένου με ΥΠ**

Το κόστος της παραγωγής πορτοκαλοχυμού επεξεργασμένου με ΥΠ είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που θα καθορίσουν μια πιθανή εμπορική επιτυχία του. Πιο συγκεκριμένα, το επιπλέον κόστος της παραγωγικής διαδικασίας για την επεξεργασία με ΥΠ συσκευασμένων χυμών εξαρτάται από τον όγκο του δοχείου ΥΠ, την πλήρωση του δοχείου και το χρόνο παραμονής τους στην επιθυμητή πίεση. Για την επεξεργασία με ΥΠ, στην περίπτωση που γινόταν σε μηχανήμα όγκου 300 L, με ποσοστό πλήρωσης του δοχείου περίπου 75%, πίεση επεξεργασίας 600MPa σε συνδυασμό με θερμοκρασία 40°C, χρόνο εφαρμογής της πίεσης 3 min, χρόνο πλήρωσης και αδειάσματος του δοχείου περίπου 2.5 min και χρόνο αύξησης της πίεσης περίπου 3 min, θα μπορούσαν να επεξεργαστούν με ΥΠ περίπου 1500 L/h έτοιμου προϊόντος. Το κόστος σε αυτή την περίπτωση θα ανερχόταν στα 0,15€/L, συμπεριλαμβανομένων της απαιτούμενης ενέργειας, των αναλωσίμων και του πάγιου κόστους κτήσης μιας τέτοιας συσκευής με χρόνο αποπληρωμής περίπου 5 χρόνια.

## 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας με υπερυψηλή πίεση και θερμοκρασία στην απενεργοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων και της πηκτινομεθυλεστεράσης σε χυμό πορτοκαλιού ποικιλίας Navel. Σκοπός ήταν να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες επεξεργασίας για την παραγωγή ασφαλούς και υψηλής ποιότητας προϊόντος.

Αρχικά απομονώθηκαν τα δύο πύο ανθεκτικά στην πίεση βακτήρια και μελετήθηκε η κινητική απενεργοποίησης τους με θερμική επεξεργασία. Μελετήθηκαν τέσσερις θερμοκρασίες των 47,5, 50, 52,55 και 55°C σε ατμοσφαιρική πίεση. Για κάθε θερμοκρασία επεξεργασίας υπολογίστηκε ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού των δύο γαλακτικών βακτηρίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική εξάρτηση της απενεργοποίησης από τη θερμοκρασία και για τους δύο μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα για το LAB1 παρατηρήθηκε ότι ο χρόνος που απαιτήθηκε για μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά 1 λογάριθμο μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σημαντική είναι η μείωση από τους 47,5 στους 50°C αλλά η σημαντικότερη μείωση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού παρατηρείται κατά τη μετάβαση από τους 50 στους 52,5°C, όπου η τιμή D υποδεκαπλασιάστηκε. Στους 55°C ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού υποδιπλασιάστηκε σε σχέση με αυτόν στους 52,5°C. Για το LAB2, για την ίδια πάντα μείωση του μικροβιακού φορτίου, ο χρόνος που απαιτήθηκε στους 47,5°C ήταν διπλάσιος από αυτόν που απαιτήθηκε στους 50°C, και αυτός με τη σειρά του διπλάσιος από αυτόν που απαιτήθηκε στους 52,5°C. Στους 55°C ο χρόνος που απαιτήθηκε ήταν κατά πέντε φορές μικρότερος από αυτόν στους 55°C.

Κατά την επεξεργασία των γαλακτικών βακτηρίων με συνδυασμένη εφαρμογή ΥΠ και θερμοκρασίας μελετήθηκαν οι συνθήκες απενεργοποίησης σε πιέσεις 150 έως 300MPa και θερμοκρασίες 25, 30 και 35°C. Παρατηρήθηκε συνεργιστική επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών. Αύξηση της θερμοκρασίας υπό σταθερή πίεση οδηγούσε συνεχώς σε αυξανόμενη θανάτωση των μικροοργανισμών και συνεπώς σε μειωμένους απαιτούμενους χρόνους επεξεργασίας. Το ίδιο συμπέρασμα προέκυψε και με την αύξηση της πίεσης υπό σταθερή θερμοκρασία. Συγκεκριμένα, για τον LAB1 οι τιμές D κυμάνθηκαν από 38,67min (σε συνθήκες 150MPa-25°C) έως 0,43min (σε συνθήκες 300MPa-35°C)

Αντίστοιχα για τον LAB2 οι τιμές  $D$  κυμάνθηκαν από 18,89min (σε συνθήκες 150MPa-25°C) έως 0,39 min (σε συνθήκες 300MPa-35°C).

Η επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών εκφράσθηκε μέσω της σταθεράς εξάρτησης από την πίεση  $Z_p$ . Όσο μικρότερη η τιμή του  $Z_p$  τόσο ισχυρότερη επίδραση έχει η πίεση στη δράση απενεργοποίησης. Για το LAB1, οι τιμές που υπολογίστηκαν ήταν 85.5, 90.1, και 116,3MPa για θερμοκρασίες 25, 30 και 35°C αντίστοιχα. Για το LAB2 οι τιμές που υπολογίστηκαν ήταν 153.8, 144.9 και 116,3MPa για τις αντίστοιχες θερμοκρασίες. Στην περίπτωση του LAB1 με αύξηση της θερμοκρασίας επεξεργασίας, παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του  $Z_p$  και επομένως η επίδραση λόγω της πίεσης στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού ήταν μικρότερη σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες επεξεργασίας. Αντιθέτως στην περίπτωση του LAB2 με αύξηση της θερμοκρασίας επεξεργασίας, παρατηρήθηκε μείωση της τιμής του  $Z_p$  και επομένως η επίδραση λόγω της πίεσης στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού ήταν μεγαλύτερη σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες επεξεργασίας

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών εκφράσθηκε μέσω της σταθεράς θερμικής αντίστασης,  $Z_T$ . Όσο μικρότερη η τιμή του  $Z_T$  τόσο ισχυρότερη επίδραση έχει η θερμοκρασία στο ρυθμό απενεργοποίησης του μικροοργανισμού. Για το LAB1 οι τιμές που υπολογίστηκαν ήταν 15.72, 27.62, 30,58 και 81,97°C αυξανόμενης της πίεσης από τα 150 στα 300MPa, ενώ για το LAB2 ήταν 27.62, 25.06, 21.37 και 14.53°C αυξανόμενης της πίεσης από τα 150 στα 300MPa, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι στην περίπτωση του LAB1 αυξανόμενης της εφαρμοζόμενης πίεσης η επίδραση της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού γίνεται ασθενέστερη. Αντιθέτως στην περίπτωση του LAB2 παρατηρήθηκε μείωση των τιμών της σταθεράς  $Z_T$  από τα 150 στα 300MPa και συνεπώς η επίδραση λόγω της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού ήταν μεγαλύτερη σε μεγαλύτερες πιέσεις επεξεργασίας

Μελετήθηκε η ύπαρξη ενός υποθετικού μικροοργανισμού που θα έφερε τα πιο ανθεκτικά χαρακτηριστικά συγκριτικά με τους δύο πραγματικούς μικροοργανισμούς. Βάσει των τιμών των χρόνων υποδεκαπλασιασμού που βρέθηκαν για τους δύο μικροοργανισμούς, επιλέχθηκαν οι υψηλότερες τιμές ως τιμή για κάθε συνθήκη του υποτιθέμενου τρίτου μικροοργανισμού. Στόχος ήταν να μελετηθεί η απενεργοποίηση του πιο ανθεκτικού μικροοργανισμού ώστε να βρεθούν οι συνθήκες επεξεργασίας που



θα εξασφάλιζαν την θανάτωση όλων των γαλακτικών βακτηριών που αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται στο χυμό.

Για την περίπτωση αυτή υπολογίστηκαν οι σταθερές εξάρτησης από την πίεση για κάθε θερμοκρασία, οι οποίες βρέθηκαν ίσες προς 116.3, 112.4 και 116.3MPa αυξανόμενης της θερμοκρασίας από τους 25 στους 35°C. Όπως φαίνεται, αυξανόμενης της θερμοκρασίας η τιμή της σταθεράς  $Z_p$  παραμένει σχεδόν σταθερή. Προσδιορίστηκαν ακόμη οι σταθερές εξάρτησης από τη θερμοκρασία για κάθε πίεση, και βρέθηκαν να είναι ίσες προς 15.7, 27.6, 30.6 και 15.5°C αυξανόμενης της πίεσης από τα 150 στα 300MPa, αντίστοιχα. Έτσι, περίπτωση του μικροοργανισμού αυτού παρατηρήθηκε αυξομείωση των τιμών της σταθεράς,

Για τους τρεις μικροοργανισμούς προσδιορίστηκε το συνολικό μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει τη συνδυασμένη επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίησή τους. Το μοντέλο αυτό λαμβάνει υπόψη την εξάρτηση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού των γαλακτικών βακτηρίων από την πίεση και τη θερμοκρασία, την εκθετική εξάρτηση της σταθεράς εξάρτησης από τη θερμοκρασία, από την πίεση, καθώς και τη γραμμική εξάρτηση της σταθεράς εξάρτησης από την πίεση, από τη θερμοκρασία.

Έτσι ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού για τις διάφορες συνθήκες πίεσης (150-300MPa) και θερμοκρασίας (25-35°C) εκφράστηκε μέσω της εξίσωσης :

$$D = D_o \cdot \left[ \exp \left\{ - \frac{2,303 \cdot T \cdot T_{ref}}{Z_T} \cdot \exp[-A(P - P_{ref})] \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \left( \frac{B \cdot (T - T_{ref}) - \left( \frac{2,303 \cdot R \cdot T}{Z_p} \right)}{R} \right) \cdot \frac{(P - P_{ref})}{T} \right\} \right]^{-1}$$

(Τροποποιημένη εξίσωση από Katsaros et al., 2010)

Οι τιμές των παραμέτρων της εξίσωσης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση του προγράμματος SYSTAT, θεωρώντας ως  $P_{ref} = 200\text{MPa}$  και  $T_{ref} = 30^\circ\text{C}$  για την περίπτωση και των τριών μικροοργανισμών. Τα αποτελέσματα δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

**Πίνακας 8.1:** Εκτίμηση των παραμέτρων του συνολικού μαθηματικού μοντέλου απενεργοποίησης των εξεταζόμενων μικροοργανισμών υπό την επίδραση συνδυασμένης πίεσης (150–300MPa) και θερμοκρασίας (25-35°C)

Παράμετρος	LAB1	LAB2	Υποθετικός LAB
<b>D<sub>0</sub> (min)</b>	4,686	3,143	4,814
<b>Z<sub>T</sub> (°C)</b>	32,189	30,36	30,51
<b>Z<sub>P</sub> (MPa)</b>	77,028	88,474	79,102
<b>A (MPa<sup>-1</sup>)</b>	0,027	-0,02	0,021
<b>B (ml/mol*K)</b>	-7,291	3,648	-5,043

Το μοντέλο αυτό έδωσε πολύ καλές προσαρμογές μεταξύ εκτιμώμενων και πειραματικών τιμών και θεωρήθηκε ότι αποτελεί ένα αρκετά αξιόπιστο και χρήσιμο εργαλείο για τον υπολογισμό του χρόνου υποδεκαπλασιασμού των γαλακτικών βακτηρίων στο χυμό πορτοκαλιού, στα εύρη των πιέσεων και θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται για την απενεργοποίησή τους, δίνοντας τη δυνατότητα υπολογισμού του χρόνου που απαιτείται για την επεξεργασία του με την τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα απενεργοποίησης της ΠΜΕ με συνδυασμένη εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης και ήπιας θερμοκρασίας. Μελετήθηκαν πιέσεις μεταξύ 200 και 600 MPa για θερμοκρασίες 20, 30 και 40°C. Η απενεργοποίηση περιγράφηκε ικανοποιητικά από το κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης. Παρατηρήθηκε συνεργιστική επίδραση πίεσης και θερμοκρασίας. Σε κάθε συνδυασμό συνθηκών επεξεργασίας ένα συγκεκριμένο ποσοστό της ΠΜΕ (περίπου 10%) δεν απενεργοποιήθηκε. Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι η ΠΜΕ του πορτοκαλοχυμού αποτελείται πιθανότατα από δύο ισοένζυμα, το ένα περισσότερο ευαίσθητο στην πίεση και το άλλο ανθεκτικό σε αυτήν. Το κινητικό μοντέλο που βρέθηκε ότι εφαρμόζει σε αυτά τα πειραματικά δεδομένα (ύπαρξη ενός ανθεκτικού και ενός ευαίσθητου ενζύμου) είναι το ακόλουθο εκθετικό κινητικό μοντέλο πρώτης τάξης της μορφής:

$$\frac{A - A_f}{A_0 - A_f} = e^{-kt}$$

Βάσει των πειραματικών δεδομένων υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης σε όλες τις μελετώμενες συνθήκες και οι τιμές κυμάνθηκαν από 0,0016min<sup>-1</sup> (σε συνθήκες 200MPa-20°C) μέχρι 0,754min<sup>-1</sup> (σε συνθήκες 600MPa –

40°C) που είναι και ο μεγαλύτερος ρυθμός που παρατηρήθηκε σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας της ΠΜΕ του χυμού.

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό απενεργοποίησης της ΠΜΕ εκφράστηκε μέσω της ενέργειας ενεργοποίησης  $E_a$ . Οι τιμές που υπολογίστηκαν ήταν 101.8, 79.01 και 33.7(kJ/mol) σε πίεση 200, 400 και 600MPa αντίστοιχα. Με αύξηση λοιπόν της πίεσης η ενέργεια ενεργοποίησης μειώνεται. Επομένως όσο αυξάνεται η πίεση τόσο λιγότερη επίδραση έχει η μεταβολή της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση του ενζύμου. Η επίδραση της πίεσης στο ρυθμό απενεργοποίησης της ΠΜΕ εκφράζεται μέσω του όγκου ενεργοποίησης,  $V_a$ , και οι τιμές που προέκυψαν ήταν -32, -27, και -22 (mL/mol) για θερμοκρασία 20, 30 και 40°C αντίστοιχα. Αρνητικές τιμές των όγκων ενεργοποίησης υποδηλώνουν ότι η απενεργοποίηση της ΠΜΕ ευνοήθηκε από την αύξηση της πίεσης. Η απόλυτη τιμή των όγκων ενεργοποίησης μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, φανερώνοντας έτσι ότι η επίδραση της πίεσης στην απενεργοποίηση του ενζύμου μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας.

Χρησιμοποιήθηκε ένα συνολικό μαθηματικό μοντέλο (Polydera et al, 2004) που περιγράφει τη συνδυασμένη επίδραση της πίεσης και της θερμοκρασίας στην απενεργοποίηση της ΠΜΕ, λαμβάνοντας υπόψη την εξάρτηση του όγκου απενεργοποίησης από την θερμοκρασία και της ενέργειας ενεργοποίησης από την πίεση. Ο ρυθμός απενεργοποίησης της ΠΜΕ στις διάφορες συνθήκες πίεσης (200 – 600MPa) και θερμοκρασίας (20 – 40°C) εκφράστηκε από την εξίσωση :

$$k = k_{refP,T} \cdot \exp \left\{ -\frac{E_{aP}}{R} \cdot \exp[-B \cdot (P - P_{ref})] \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) - \frac{A \cdot (T - T_{ref}) + V_{aT}}{RT} \cdot (P - P_{ref}) \right\} \quad (9)$$

Όπου  $T_{ref} = 303K$  και  $P_{ref} = 400MPa$ . Οι τιμές των παραμέτρων της εξίσωσης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης με χρήση του προγράμματος SYSTAT. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι τα εξής:  $k_{ref} = 0,392min^{-1}$ ,  $E_{aP} = 52,9$  (kJ/mol),  $V_{aT} = 17,749$ (mL/mol),  $A = 0,134$ (mL/mol\*K) και  $B = -0.001MPa^{-1}$ .

Οι προβλεπόμενες από το μοντέλο τιμές του ρυθμού απενεργοποίησης της ΠΜΕ συσχετίστηκαν πολύ καλά με τις πειραματικές τιμές. Θεωρήθηκε λοιπόν ότι αποτελεί ένα αρκετά αξιόπιστο και χρήσιμο εργαλείο για τον υπολογισμό της

σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης στο χυμό πορτοκαλιού, στα εύρη των πιέσεων και θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται για την απενεργοποίησή τους, δίνοντας τη δυνατότητα υπολογισμού του χρόνου που απαιτείται για την επεξεργασία του με την τεχνολογία της υπερυψηλής πίεσης

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την επεξεργασία των ανθεκτικότερων στελεχών των γαλακτικών βακτηρίων και της ΠΜΕ με την τεχνολογία της ΥΠ, προέκυψε ότι για την επεξεργασία του χυμού για χρόνους 3 και 5min οι συνθήκες που απαιτούνται για την επιθυμητή απενεργοποίηση της ΠΜΕ είναι κατά πολύ πιο έντονες από αυτές που απαιτούνται για την επιθυμητή απενεργοποίηση του πιο ανθεκτικού στελέχους μικροοργανισμών. Έτσι αν κατά το σχεδιασμό της διεργασίας της παστερίωσης θέσουμε ως στόχο την απενεργοποίηση του 90% του ευαίσθητου κλάσματος της ΠΜΕ, τότε ταυτόχρονα εξασφαλίζεται και η απαραίτητη 7D μείωση του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων. Με βάση τα παραπάνω προτείνεται η επεξεργασία του πορτοκαλοχυμού Navel σε **πίεση 600Μpa και θερμοκρασία 40°C για 3min**

Για την επεξεργασία με ΥΠ, στις συνθήκες που προτείνονται το κόστος θα ανερχόταν στα 0,15€/L, συμπεριλαμβανομένων της απαιτούμενης ενέργειας, των αναλωσίμων και του πάγιου κόστους κτήσης μιας τέτοιας συσκευής με χρόνο αποπληρωμής περίπου 5 χρόνια.

**BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Adams M.R., Moss M.O., (1999) “*Food Microbiology*”, *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge UK

Alonso J, Howel N, Canet W. (1997). ‘*Purification and characterization of two pectinmethylesterases from persimmon (Diospyros kaki)*’. *J Sci Food Agric* 75:352–8.

Azura E and Beristai C.I., (2002). ‘*Osmotic dehydration of apples by immersion in concentrated sucrose / matlodextrin solution*’. *Journal of Food Processing and Preservation*. 26: 295- 306.

Balci, A.T., and Wilbey, R.A (1999). ‘*High pressure processing of milk—the first 100 years in the development of new technology*’. *International Journal of Dairy Technology*, **52**:149–155

Balogh T, Smout C, Ly Nguyen B, Van Loey A, Hendrickx M. (2004). ‘*Thermal and high pressure inactivation kinetics of carrot pectinmethylesterase (PME): from model systems to real foods.*’ *IFSET* 5:429–36.

Balestrieri C., Castaldo D., Giovane A., Quagliuolo L., Servillo L. (1990). ‘*A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit*’. *Eur J Biochem* 193: 183–7.

Barbosa-Canovas G.V, (1998).‘*Nonthermal Preservation of Foods*’. New York: Marcel Dekker, Inc

Benen, Jacques A., Voragen Alphons G. J.,(2003) "*Pectic Enzymes.*" in Voragen Alphons G. J. , Wong Dominic W. S. Whitaker John R. *Handbook of Food Enzymology*. New York : Marcel Dekker, Inc

Beveridge T. (1997). ‘*Haze and cloud in apple juices*’. *Crit Rev Food Sci* 37:75–91.

Beveridge T. (2002). ‘*Opalescent and cloudy fruit juices: formation and particle stability*’. *Crit Rev Food Sci* 42:317–37.

Bordenave M. (1996). ‘*Analysis of pectin methyl esterases*’. In: Linskens HF, editor. *Plant cell wall analysis*. Berlin, Germany: Springer-Verlag. p 165–80.

Boulekou S., Katsaros G., Taoukis P. (2008). ‘*Inactivation Kinetics of Peach Pulp Pectin Methylesterase as a Function of High Hydrostatic Pressure and Temperature Process Conditions*’. *Food Bioprocess Technol*

Butz, P., Koller, W.D., Tauscher, B., and Wolf, S. (1994). ‘*Ultra high pressure processing of onions: chemical and sensory changes*’. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, **27**:463–467.

Butz, P and Tauscher B, (1997), ‘*Food chemistry under high hydrostatic pressure*’, In Isaacs N S (ed.), *High pressure food science, Bioscience and chemistry*, The royal society of chemistry, Cambridge, pp. 143-144

Cameron RG, Baker R. A and Grohmann K. (1998). ‘*Multiple forms of pectinesterase from citrus peel and their effects on juice cloud stability*’. *J Food Sci* 63(2):253–5

Coenen G., Bakx E., Verhoef H., Schols H., Voragen A. (2007). ‘*Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I*’. *Carbohydr Polym* 70:224–35.

Crawford Y J, Murano E A, Olson D G and Shenoy K. (1996). ‘*Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate Clostridium spirogenes spores in chicken breast*’. *Journal of Food Protection*, **59**:711–715.

Crelier S, Tache M-C, Renken A and Raetz E (1995), ‘*High pressure for the inactivation of enzymes in food products*’, Poster presentation at the 9<sup>th</sup> world congress on Food science and technology, July 31 – August 4, Budapest, Hungary.

Darvishi H, Hadi Khostaghaza M, Najafi G, (2012), ‘*Ohmic heating of pomegranate juice: Electrical conductivity and pH change*’, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*

Dissing J, Bruun- Jensen L and Skibsted L H (1997), ‘‘Effect of high pressure treatment on lipid oxidation in turkey thigh muscle during chill storage’’, *Z Lebensm unters Forsch A*, 205, 11- 13.

Donsi, G., Ferrari, G., Matteo, M.di., and Bruno, M.C.(1998). ‘‘High-pressure stabilization of lemon juice’’. *Italian Food & Beverage Technology*, **14**:14–16.

Duvelter T., Sila D.N, Van Buggenhout S., Jolie R., Van Loey A., and Hendrickx M. (2009), ‘‘Pectins in Processed Fruit and Vegetables: Part I—Stability and Catalytic Activity of Pectinases, Part II—Structure–Function Relationships, Part III—Texture Engineering’’, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, vol 8, 75-117

Erkman O and Karatas S. (1997), ‘‘Effect of high hydrostatic pressure on *Staphylococcus aureus* in milk’’. *Journal of Food Engineering*, **33**:257–262

Erkmen O.& Dogan C (2004).’’ *Kinetic analysis of Escherichia coli inactivation by high hydrostatic pressure in broth and foods*’’. *Food Microbiology* 21 181–185

Farr, D. 1990. ‘‘High-pressure technology in food industry’’. *Trends in Food Science and Technology*, **1**:14–16.

Galazka, V.B., and Ledward, D.A. (1995).’ *Development in high pressure processing. Food Technology International Europe*, **12**:123–125.

Giraffa G., Chanishvili N. and Widyastuti Y., (2010),’’ *Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology.*’’ *Research in Microbiology* 161 480-487

Gomes, M.R.A., and Ledward, D.A. (1996). ‘‘Effect of high pressure treatment on the activity of some polyphenoloxidases’’. *Food Chemistry*, **56**(1):1–5.

Hayashi R., (1990), ‘‘Application of high pressure to processing and preservation: philosophy and development’’. In *Engineering and Food*. (eds Spiess, W.E.L., and Schubert, H.). Elsevier Applied Science, London. UK. pp 815–826.

Heinz V and Knorr D, (1995). ‘*Inactivation of Bacillus subtilis endospores by ultra high pressure in combination with other treatments*’ IFT Annual Meeting 1995, Conference Proceedings

Hemme D., Foucaud and Scheunemann C. (2004). ‘*Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods*’. International Dairy Journal **14** 467–494

Hite, B.H., Giddings, N.J., & Weakly, C.E. (1914). ‘*The effects of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables*’. Washington, Va. University, Agriculture Experiment Station, Bulletin, 146, 1–67.

Hugas M., Garriga M., and Monfort J.M. (2002). ‘*New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology*’. Meat Science, **62**(3) 359– 371

Hyoung, S.L. and Coates, G.A. (2003). ‘*Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments*’. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 36(1):153–156

Iglesias J.D., Cercós M., Colmenero-Flores M. J., Naranjo A. M., Ríos G., Carrera E., Ruiz-Rivero O., Lliso I., Morillon R., Tadeo R. F., Talon M.,(2007), Physiology of citrus fruiting (review)

Jolie R., Duvetter T., Van Loey A.M., Hendrickx M., (2010), ‘*Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review*’, Carbohydrate Research 345, 2583–2595

Katsaros G, Tsevdou M, Panagiotou T & Taoukis P (2010), ‘*Kinetic study of high pressure microbial and enzyme inactivation and selection of pasteurization conditions for Valencia Orange Juice*’. International Journal of Food Science and Technology, 45(6), 1119-1129

Katsaros G., Apseridis I., Taoukis P.(2006) ‘*Modelling of High Hydrostatic Pressure inactivation of pectinmethylesterase from persimmon fruit*’, IUFOST

Kashyap D.R. , Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. (2001). ‘*Applications of pectinases in the commercial sector: a review*’. Bioresource Technology 77 215-227



- Kefford, J.F. (1959). ‘*The chemical constituents of citrus fruits*’. *Advan. Food. Res*
- Khalid K., (2011), ‘*An overview over lactic acid bacteria*’, *International journal of Biosciences*, 3, 1- 13
- Kimura K, Ida M, Yoshida Y, Ohki K, Fukumoto T and Sakui N, (1994), ‘*Comparison of keeping quality between pressure processed and heat- processed jam: changes in flavor components, hue and nutritional elements during storage*’, *Biosci Biotechnol Biochem*, 58, 1386- 1391.
- Knorr, D, (1995). ‘*Hydrostatic pressure treatment of food: microbiology*’. In pp. 159-175. Gould, G.W. (ed.) *New Methods for Food Preservation*, Blackie Academic and Professional, UK.
- Kropps J, Pilnik W. (1974). ‘*Cloud loss studies in citrus juices: cloud stabilization by a yeastpolygalacturonase*’. *Lebens-Wiss Technol* 7(2):121–4.
- Ly Nguyen B, Van Loey A, Fachin D, Verlent I, Indrawati, Hendrickx M. (2002a). ‘*Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from bananas (cv. Cavendish)*’. *Biotechnol Bioeng* 78:683–91.
- Ly Nguyen B, Van Loey A, Fachin D, Verlent I, Indrawati, Hendrickx M. (2002b). ‘*Partial purification, characterization and thermal and high-pressure inactivation of pectin methylesterase from carrots (Daucus carrota L.)*’. *J Agric Food Chem* 50:5437–44.
- Ly Nguyen B, Van Loey A, Fachin D, Verlent I, Duvetter T, Vu ST, Smout C, Hendrickx ME. (2002c). ‘*Strawberry pectin methylesterase (PME): purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation.*’ *Biotechnol Prog* 18:1447–50.
- Ly Nguyen B, Loey A M van, Smout C, Ozcan S E, Fachin D, Verlent I, Vu Truong S, Duvetter T and Hendrickx M E, (2003), ‘*Mild heat and highpressure inactivation of carrot pectin methylesterase: a kinetic study*’, *Journal of Food Science*, 68(4):1377–1383

Mainville I, Montpetit D, Durand N and Farnworth E R, (2001). ‘*Deactivating the bacteria and yeast in kefir using heat treatment, irradiation and high pressure.*’ International Dairy Journal, **11**(1/2):45–49

Morra M, Cassinelli C, Cascardo G. (2004). ‘*Effects on interfacial properties and cell adhesion of surface modification by pectic hairy regions*’. Biomacromolecules **5**:2094–104.

Navarro, J.L., Diaz, L.S. and Gasque, F. (1983). ‘*Determination of limonin in orange juice by HPLC*’. Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos **23**(2):276–280.

Ohlsson T., Bengtsson N., (2002). "*Minimal processing of Foods with non-thermal methods.*" *Minimal processing technologies in the food industry.* Cambridge, England : Woodhead Publishing Limited

O’Reilly, C.E., O’Connor, P.M., Kelly, A.L., Beresford, T.P., and Murphy, P.M. (2001). ‘*Use of high hydrostatic pressure for inactivation of microbial contaminants in cheese*’. Applied Environmental Microbiology, **66**:4890–4896

Orla Jensen S. (1919). ‘*The Lactic Acid Bacteria*’. Host and Son. Copenhagen

Park S. J., Lee J. I. and Park, J., (2002), ‘*Effects of a combined process of high pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice*’. Journal of Food Science, **67**(5):1827–1834

Patterson, M., Quinn, M., Simpson, R., and Gilmour, A. (1995). ‘*Effect of high pressure on vegetable pathogens. In High Pressure processing of foods.*’ (eds Ledward,

Polydera, A., Stoforos, N, and Taoukis, P. (2003). ‘*Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice.*’ Journal of Food Engineering, **60**(1):21–29.

Polydera A, Galanou E, Stoforos N, Taoukis P (2004), ‘*Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions*’ Journal of Food Engineering, **62**, 291–298

Plaza L, Duvetter T, Van der Plancken I, Meersman F, Van Loey A, Hendrickx M. (2008). ‘*Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant Aspergillus aculeatus pectinmethylesterase*’. Food Chem 111:912–20.

Quaglia G B, Gravina R, Paperi R and Paoletti F (1996), ‘*Effects of high pressure treatments on Peroxidase activity, ascorbic acid content and texture in green peas*’, Lebensm Wiss u Technol, 29, 552-555.

Rendueles E., Omer M.K., Alvseike O., Alonso-Calleja C., Capita R., Prieto M., (2011), ‘*Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review*’, LWT - Food Science and Technology, 44, 1251- 1260

Sampedro F., Rodrigo D, Hendrickx M (2008) , ‘*Inactivation kinetics of pectin methyl esterase under combined thermal–high pressure treatment in an orange juice–milk beverage*’, Journal of Food Engineering 86 133–139

Sancho F, Lambert Y, Demazeau Z, Largeteau A, Bouvier J M and Narbonne J F, (1999), ‘*Effect of ultra high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins*’, J Food Eng , 39, 247- 253.

Sandhu K.S – Minhas K.S. (2006), ‘*Oranges and Citrus juices*’, in Hui Y.H (eds), **Handbook of fruits and fruit processing**. 309 – 358, Oxford: Blackwell Publishing

Schleifer K.H & Kilpper-Balz (1987) , ‘*Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci enterococci and lactococci: A review*’. Syst Appl. Microbiol, 10: 1 -19

Schmidt, R.H., Sim, C.A., Parish, M.E., Pao, S. and Ismail, M.A. (1997). ‘*A model HACCP plan for small-scale, fresh-squeezed (non-pasteurized) citrus juice operations*’. University of Florida Cooperative Extension Service Circular No. 1179. Gainesville, Florida, 20 pp

Schols H., Voragen A. (1996). ‘*Complex Pectins: structure elucidation using enzymes*’. Prog Biotechnol 14:3–19.

- Severini C, Romani S, Dal' Aaglio G, Rovere P, Conte L and Lericci C R (1997), ‘*High pressure effects on oxidation of extr virgin olive- oils*’, *Int J Food Sci*, 3( 9 ), 183- 191.
- Sila D N., Smout C., Vu T S., and Hendrickx M. E. (2004). ‘*Effects of high pressure pretreatment and calcium soaking on the texture degradation kinetics of carrots during thermal processing*’. *Journal of Food Science*, **69** (5):E205– E211.
- Styles M.F., Hoover D.G. & Farkas D.F. (1991). ‘*Response of Listeriamonocytogenes and Vibrio Parahaemolyticus to high hydrostatic pressure*’. *Journal of Food Science*, **56**: 1404–1407.
- Shuler M., Kargi F.(2005), Ένζυμα, Μηχανική Βιοδιεργασιών Βασικές Έννοιες, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, σελ. 77-78.
- Termote F, Rombouts F M, Pilnik W, (1977), ‘*Stabilization of cloud in pectinesterase-active orange juice by pectic acid hydrolysates*’. *J Food Biochem* 1(1):15–34.
- Thakur B.R. and Nelson P.E, (1998). ‘*High pressure processing and preservation of foods*’. *Food Reviews International*, **14**(4), 427–447.
- Thibault J, Renard C, Axelos M, Roger P, Crepeau M. (1993). ‘*Studies of the length of homogalacturonic regions in pectins by acid hydrolysis*’. *Carbohydr Res* 238:271–86.
- Toepfl S, Heinz V., Knorr D. (2007), ‘*High intensity pulsed electric fields applied for food preservation*’, *Chemical Engineering and Processing* 46 537–546
- Truong T.T., Boff J.M., Min D.B. and Shellhammer T.H.,(2002). ‘*Effects of carbon dioxide in high pressure processing on pectinmethylesterase in single strength orange juice*’. *Journal of Food Science*, **67**(8):3058–3062
- Tsou, C.L. (1986). ‘*Location of active sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions*’. *Trends in Biochemical Science*, **11**:427–429.

Van Den Broeck I (2000), ‘ *Kinetics of temperature and pressure inactivation of Pectinesterases from oranges and tomatoes*’, PhD dissertation no. 415, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.

Van Den Broeck I, Ludikhuize L R, Van Loey A M and Hendrickx M E (2000), ‘*Effect of temperature and/or pressure on tomato pectinesterase activity*’, J Agric Food Chem, 48 , 551-8.

Van den Broeck, I., Ludikhuyze, L. R., Weemaes, C. A., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. (1999). ‘*Thermal inactivation kinetics of pectinase extracted from oranges*’. Journal of Food Processing Preservation, 23, 391–406.

Vincken J, Schols H, Oomen R, McCann M, Ulvskov P, Voragen A, Visser R. (2003).” *If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications of cell wall architecture*”. Plant Physiol 132:1781–9.

Voragen F, Schols H, Visser R, editors. (2003). ‘*Advances in pectin and pectinase research*’. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 491 p.

Waldron KW, Parker ML, Smith AC. (2003). ‘*Plant cell walls and food quality*’. Compr Rev Food Sci F 2:101–19.

Widmer, W. (2000.) ‘*Determination of naringin and neohesperidin in orange juice by liquid chromatography with UV detection to detect the presence of grapefruit juice: collaborative study*’. Journal of AOAC International 83(5):1155–1165

Winniczuk, P.P. (1994). ‘*Effects of sanitizing compounds on the microflora of orange fruit surfaces and orange juice*’. Thesis, Citrus Research & Education Center, University of Florida, Lake Alfred, FL.

Wong D.W.S, ‘*Food Enzymes, Structure and Mechanism*’, Chapman & Hall, 1995

Yen G C and Lin H T (1996), ‘*Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurization on the quality and shelf life of guava puree*’ Int J Food Sci Technol, 31, 205- 13

Zhan D, Janssen P, Mort A., 1998. ‘*Scarcity or complete lack of single rhamnose residues interspersed within the homogalacturonan regions of citrus pectin*’’. Carbohydr Res 308: 373–80.

Βασιλακάκης Μ.(2006), ‘*Μετασυλλεκτική Φυσιολογία Μεταχείριση Οπωροκηπευτικών και Τεχνολογία*’, Θεσσαλονίκη

Θωμόπουλος Χ.Δ,(1986) *Επιστήμη και τεχνική των τροφίμων*, Αθήνα 1986

Μπαλατσούρας Γ., (2006), ‘*Μικροβιολογία Τροφίμων*’, Εκδόσεις Έμβρυο

Τζιά Κ., Ταούκης Π., Ωραιοπούλου Β., (2007) *Επιστήμη και μηχανική τροφίμων: Συστατικά-Ιδιότητες-Μικροβιολογία-Ποιότητα-Συσκευασία*, Εκδόσεις Ε.Μ.Π, Αθήνα 2007.