



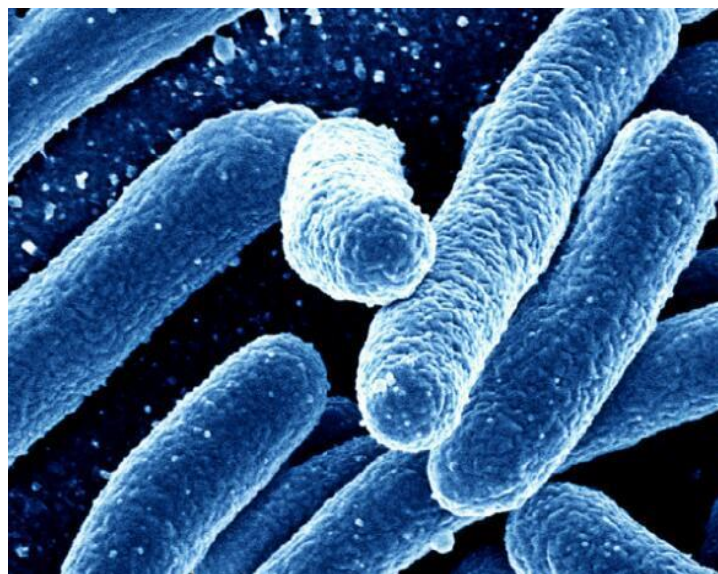
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**Κινητική μελέτη της απενεργοποίησης του *Bacillus coagulans*
με θέρμανση και παλμικά ηλεκτρικά πεδία και εφαρμογή σε
χυμό ροδάκινου και καρότου**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΤΑΟΥΚΗΣ ΠΕΤΡΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ, ΙΟΥΝΙΟΣ 2024

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ καθώς επίσης και στο Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Πέτρο Ταούκη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και την καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους διδάκτορες Γιώργο Κατσαρό και Βάνα Ανδρέου για την στήριξη και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου, καθώς και όλη την ομάδα του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων και του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων για τις χρήσιμες συμβουλές τους και το θερμό κλίμα που δημιούργησαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συμφοιτητές μου, Γιώργο και Λευτέρη για τη βοήθεια και τη στήριξή τους και ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τον συμφοιτητή και φίλο μου Αχιλλέα, με τον οποίο πορευτήκαμε μαζί, τόσο σε πανεπιστημιακό, όσο και σε προσωπικό επίπεδο όλα αυτά τα χρόνια σπουδών.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και τους καλύτερους μου φίλους για την διαρκή συμπαράσταση και το ενδιαφέρον που έδειξαν σε αυτό το μεγάλο ταξίδι.

Σταυρακάκης Ιωάννης

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2023

Περίληψη

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η κινητική μελέτη της επίδρασης της θερμικής επεξεργασίας και της επεξεργασίας των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων στην απενεργοποίηση των βλαστικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans*. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση των δύο μεθόδων σε πρότυπα διαλύματα διαφορετικού pH, αλλά και η συνδυαστική τους δράση με εφαρμογή σε δύο τρόφιμα, στον πουρέ ροδάκινο και στον χυμό καρότο.

Η ανάπτυξη του *B. coagulans* πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 45°C σε θρεπτικό υπόστρωμα BHI broth (Brain Heart Infusion), με στόχο την εύρεση του χρόνου στον οποίο ο μικροοργανισμός εισέρχεται στην φάση στασιμότητας και αποκτάει το μέγιστο δυνατό φορτίο (8,0 logCFU/g). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός του μικροοργανισμού σε πρότυπα διαλύματα με pH 4,5 – 6,5, για την εύρεση του βέλτιστου pH ανάπτυξης του. Η μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης και της απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού σε πρότυπα διαλύματα διαφόρων pH, όσο και των δύο τροφίμων πραγματοποιήθηκε σε ένα μεγάλο εύρος τιμών παραμέτρων της κάθε επεξεργασίας (θερμική, ΠΗΠ και συνδυαστική), με σκοπό την μελέτη της επίδραση των επεξεργασιών στην απενεργοποίηση του *B. coagulans*. Συγκεκριμένα, η θερμική διεργασία εφαρμόστηκε σε θερμοκρασίες 60 – 90 °C και χρόνους επεξεργασίας από 0 έως 20 λεπτά. Για τα ΠΗΠ εφαρμόστηκαν πεδία έντασης 11, 15 και 20 kV/cm και αριθμός παλμών 25 – 8000 με πλάτος παλμού 15 μs. Τέλος πραγματοποιήθηκε συνδυαστική χρήση των ΠΗΠ με προθέρμανση για θερμοκρασίες 50 και 60 °C.

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *B. coagulans* ολοκληρώθηκε μέσα σε 22 ώρες όπου απέκτησε το μέγιστο φορτίο του (8,0 logCFU/g). Τα εύρη pH που ο *B. coagulans* αναπτύσσεται κυμάνθηκε από 4,5 έως 6,5, με βέλτιστο pH ανάπτυξης μεταξύ 5-6. Οι δύο διεργασίες διαπιστώθηκε ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές στην απενεργοποίηση του μικροβιακού φορτίου του *B. coagulans*, ο οποίος βέβαια παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε ορισμένες συνθήκες επεξεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, στην θερμική επεξεργασία παρουσιάστηκε πολύ γρήγορη απενεργοποίηση στις θερμοκρασίες των 80 και 90 °C σε όλα τα pH, ενώ στις πιο ήπιες θερμοκρασίες (60 και 70 °C) η απενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε σε σημαντικά μικρότερο ρυθμό (έως και 10 φορές πιο αργά συγκρίνοντας τους 60 με τους 90°C) και ιδιαίτερα στο pH=5,5 που αποδείχθηκε ότι αποτελούσε το πιο ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη του *B. coagulans*. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στην θερμική επεξεργασία των δύο τροφίμων, στα οποία όμως ο μικροοργανισμός έδειξε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σύγκριση με τα πρότυπα διαλύματα ίδιου pH (πουρές ροδάκινο με πρότυπο διάλυμα pH=4,5 και χυμός καρότο με πρότυπο διάλυμα pH=6), καθώς ο ρυθμός απενεργοποίησης ήταν μικρότερος. Χαρακτηριστικά, στον πουρέ ροδάκινο ο ρυθμός απενεργοποίησης έφτανε μέχρι 2,49 min⁻¹ στην πιο ακραία συνθήκη επεξεργασίας των 90°C, την ώρα που στην ίδια συνθήκη το πρότυπο διάλυμα με pH=4,5 έφτανε μέχρι την τιμή 5,13 min⁻¹. Αντίστοιχα

για τον χυμό καρότο η τιμή αυτή έφτανε μέχρι $1,40 \text{ min}^{-1}$ στους 90°C και για το πρότυπο διάλυμα με $\text{pH}=6,0$ μέχρι $5,04 \text{ min}^{-1}$.

Όσον αφορά τα ΠΗΠ, η χρήση τους ήταν αποτελεσματική και παρατηρήθηκε πως όσο αυξάνονται η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και ο αριθμός των παλμών τόσο αυξανόταν και ο ρυθμός της μικροβιακής απενεργοποίησης. Στο $\text{pH}=4,5$ υπήρχε σημαντική επίδραση των ΠΗΠ, αφού η πλήρης απενεργοποίηση του μικροοργανισμού επιτεύχθηκε σε πολύ μικρούς χρόνους επεξεργασίας (έως 15 ms) σε όλες τις εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου που μελετήθηκαν, ενώ τόσο στο πρότυπο διάλυμα με $\text{pH}=6$, όσο και στα δύο τρόφιμα, ο μικροοργανισμός έδειξε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα. Αναλυτικά, στην πιο ακραία συνθήκη επεξεργασίας με ΠΗΠ, που ήταν η ένταση ηλεκτρικού πεδίου 20 kV/cm , ο ρυθμός απενεργοποίησης έφτανε μέχρι την τιμή $3,22 \text{ ms}^{-1}$ για το πρότυπο διάλυμα με $\text{pH}=4,5$, στο οποίο η απενεργοποίηση ήταν άμεση, ενώ αντίστοιχα για το πρότυπο διάλυμα με $\text{pH}=6,0$, η τιμή αυτή δεν ξεπερνούσε τα $0,22 \text{ ms}^{-1}$ και για τον πουρέ ροδάκινο τα $0,75 \text{ ms}^{-1}$.

Επιπλέον, μελετήθηκε η χρήση των ΠΗΠ με προθέρμανση τόσο στο πρότυπο διάλυμα με $\text{pH}=6$, όσο και στα δύο τρόφιμα για να δούμε αν η συνεργατική δράση των δύο μεθόδων θα έχει θετική επίδραση στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού. Έτσι, η προθέρμανση των δειγμάτων στους 60°C και η επεξεργασία με ΠΗΠ αποδείχθηκε ότι δρουν συνεργιστικά στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού καθώς σε όλες τις περιπτώσεις ο *B. coagulans* έφτασε σε πλήρη απενεργοποίηση σε πολύ μικρότερους χρόνους επεξεργασίας ακόμα και στο χαμηλότερο πεδίο έντασης των 11 kV/cm . Συγκεκριμένα, στο πρότυπο διάλυμα με $\text{pH}=6,0$, ο ρυθμός απενεργοποίησης πενταπλασιάστηκε, ενώ στα δύο τρόφιμα αυξήθηκε κατά δύο με τρεις φορές.

Λαμβάνοντας υπόψη τα συνολικά αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η μικροβιακή απενεργοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί το ίδιο αποτελεσματικά τόσο με την θερμική επεξεργασία, όσο και με τα ΠΗΠ. Η δε συνδυαστική επεξεργασία των δύο μεθόδων αποδείχθηκε ότι ήταν η πιο αποτελεσματική, αφού η απενεργοποίηση πραγματοποιούταν σε μικρότερους χρόνους, το οποίο σημαίνει μικρότερη κατανάλωση της ενέργειας, αλλά και μικρότερη υποβάθμιση των ποιοτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων. Συνολικά, κρίθηκε ότι τα ΠΗΠ μπορούν να αποτελέσουν έναν εναλλακτικό τρόπο παστερίωσης των τροφίμων, έχοντας πολλαπλά οφέλη τόσο στα ίδια τα τρόφιμα, όσο και στις βιομηχανίες, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να μελετηθούν οι ακριβείς συνθήκες επεξεργασίας που χρειάζονται για να επιτευχθεί η απαραίτητη μικροβιακή απενεργοποίηση για τα τελικά προϊόντα.

Kinetic study of *Bacillus coagulans* cells inactivation by heat and pulsed electric fields in peach and carrot juice

The objective of this thesis is the kinetic study of the inactivation of *Bacillus coagulans* vegetative cells, by thermal processing and Pulsed Electric Field (PEF) processing at various pH values. Additionally, a comparison of the two methods was carried out, along with their combined action applied to two foods, peach puree, and carrot juice.

The growth of *B. coagulans* was conducted at a temperature of 45°C in a nutrient medium, BHI broth (Brain Heart Infusion), with the goal of determining the time at which the microorganism enters the stationary phase and reaches its maximum potential load (8 log CFU/g). Subsequently, the microorganism was inoculated into standard solutions with pH values ranging from 4.5 to 6.5 to determine the optimal pH for its growth.

The study of thermal inactivation and inactivation with PEF of the microorganism in standard solutions at different pH levels, as well as both food products, was carried out over a wide range of processing parameters (thermal, PEF, and combined) to investigate the effects of these processes on the inactivation of *B. coagulans*. Specifically, the thermal process was applied at temperatures ranging from 60 to 90°C with processing times ranging from 0 to 20 minutes. For PEF, electric field intensities of 11, 15, and 20 kV/cm were applied, with pulse numbers ranging from 25 to 8000 and a pulse width of 15 μ s. Finally, a combined use of PEF with preheating at temperatures of 50 and 60°C was conducted.

The growth of the microorganism *B. coagulans* was completed within 22 hours, during which it reached its maximum load of 8 log CFU/g. The pH range in which *B. coagulans* developed varied from 4.5 to 6.5, with an optimal growth pH between 5 and 6. Both processes were found to be highly effective in inactivating the microbial load of *B. coagulans*, although the microorganism exhibited greater resistance under certain processing conditions. Specifically, rapid inactivation occurred in the thermal processing at temperatures of 80 and 90°C at all pH levels, while at milder temperatures (60 and 70°C), inactivation occurred at a significantly slower rate (up to 10 times slower when comparing 60°C to 90°C). Particularly at pH=5.5, which was found to be the most favorable environment for the growth of *B. coagulans*, the inactivation rate was slower.

Similar results were observed in the thermal processing of the two food products, where the microorganism showed greater resistance compared to standard solutions with the same pH (peach puree with a standard solution of pH=4.5 and carrot juice with a standard solution of pH=6). For example, in peach puree, the inactivation rate reached up to 2.49 min⁻¹ under the extreme processing condition of 90°C, while in the same condition, the standard solution with pH=4.5 reached a rate of 5.13 min⁻¹. Similarly, for carrot juice, the rate reached up to 1.40 min⁻¹ at 90°C, while for the standard solution with pH=6.0, it reached 5.04 min⁻¹.

Regarding Pulsed Electric Fields (PEF), their use was effective, and it was observed that as the intensity of the electric field and the number of pulses increased, the rate of microbial inactivation also increased. At pH=4.5, there was a significant effect of PEF, with complete inactivation of the microorganism achieved in very short processing times (up to 15 ms) at all studied electric field intensities, whereas in pH=6.0 and in both food products, the microorganism showed greater resistance. In detail, under the most extreme processing condition with Pulsed Electric Fields (PEF), which had an electric field intensity of 20 kV/cm, the inactivation rate reached up to 3.22 ms⁻¹ for the standard solution with pH=4.5, where the inactivation was immediate. Conversely, for the standard solution with pH=6.0, this value did not exceed 0.22 ms⁻¹, and for peach puree, it reached 0.75 ms⁻¹.

Additionally, the use of PEF with preheating in both the standard solution with pH=6.0 and the two food products was studied to determine if the synergistic action of the two methods would have a positive effect on the inactivation of the microorganism. Preheating the samples to 60°C and applying PEF was found to act synergistically in the inactivation of the microorganism, as in all cases, *B. coagulans* reached complete inactivation in much shorter processing times, even at the lowest electric field intensity of 11 kV/cm. Specifically, in the standard solution with pH=6.0, the inactivation rate increased fivefold, while in the two food products, it increased two to threefold.

Taking into consideration the overall results, it was found that microbial inactivation can be achieved equally effectively using both thermal processing and Pulsed Electric Fields (PEF). Furthermore, the combination of these two methods was proven to be the most effective, as it resulted in shorter processing times, meaning lower energy consumption and less degradation of the quality and sensory characteristics of the food products. Overall, it was concluded that PEF could serve as an alternative method for food pasteurization, offering multiple benefits for both the food products themselves and the industries. However, further research is needed to study the exact processing conditions required to achieve the necessary microbial inactivation that would make the food safe for consumption.

Πίνακας περιεχομένων

Κεφάλαιο 1: Μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων	1
1.1 Θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων	1
1.1.1 Εισαγωγή	1
1.1.2 Είδη θερμικών μεθόδων	2
1.1.3 Εξοπλισμός	5
1.1.4 Βασικές Αρχές Θερμικής Επεξεργασίας	6
1.1.5 Επίδραση των θερμικών διεργασιών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τροφίμων	8
1.2 Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ)	10
1.2.1 Εισαγωγή	10
1.2.2 Εξοπλισμός των ΠΗΠ	11
1.2.3 Ηλεκτροδιάτρηση	13
1.2.4 Παράμετροι Λειτουργίας	13
1.2.5 Παράμετροι επίδρασης της τεχνολογίας των ΠΗΠ στους μικροοργανισμούς	19
1.2.6 Δείκτης κυτταρικής διάρρηξης Z	20
1.2.7 Επίδραση της τεχνολογίας ΠΗΠ στην κυτταρική μεμβράνη	21
1.2.8 Εφαρμογή των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων στα τρόφιμα	22
1.2.9 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ΠΗΠ	25
1.2.10 Βιομηχανική εφαρμογή	27
Κεφάλαιο 2: Είδη Μικροοργανισμών	29
2.1 Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί	29
2.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί	30
2.3 <i>Bacillus Coagulans</i>	32
2.3.1 Εισαγωγή	32
2.3.2 Γενικά Χαρακτηριστικά	32
2.3.3 Αλλοιώσεις τροφίμων από τον <i>Bacillus coagulans</i>	34
2.4 Κινητική Ανάπτυξης Μικροοργανισμών	35
2.4.1 Στάδια Ανάπτυξης Μικροοργανισμών	35
2.4.2 Εμπειρικές εξισώσεις για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης	36
Κεφάλαιο 3: Ιδιότητες και χαρακτηριστικά καρότου και ροδάκινου	39
3.1 Καρότο	39
3.2 Ροδάκινο	40
Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι	42
4.1 Εισαγωγή – Στόχος	42
4.2 Πρώτες ύλες	42

4.3 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	42
4.3.1: 1 ^ο μέρος – Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i>	42
4.3.2: 2 ^ο μέρος – Εύρεση βέλτιστου pH ανάπτυξης του μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i>	43
4.3.3: 3 ^ο μέρος – Κινητική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i> σε πρότυπα διαλύματα.....	44
4.3.4: 4 ^ο μέρος – Κινητική μελέτη της απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i> σε πρότυπα διαλύματα.....	45
4.3.5: 5 ^ο μέρος – Συγκριτική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης και της απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i> σε πουρέ καρότου και ροδάκινου	47
4.4 Αναλυτικές μέθοδοι	47
4.4.1 Μικροβιολογική ανάλυση.....	47
4.4.2 Μέτρηση pH	48
4.4.3 Μέτρηση απορρόφησης.....	48
4.5 Μαθηματική επεξεργασία αποτελεσμάτων	49
4.5.1 Υπολογισμός Μικροβιακού φορτίου	49
4.5.2 Μοντέλο Gompertz	49
4.5.3 Παράμετροι Απενεργοποίησης.....	50
4.6 Στατιστική επεξεργασία	51
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα & Συζήτηση.....	52
5.1 Καμπύλη ανάπτυξης του <i>Bacillus Coagulans</i>	52
5.2 Κινητικό πείραμα ανάπτυξης μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i> σε διαφορετικά pH – Εύρεση βέλτιστων συνθηκών pH	53
5.3 Κινητικά πειράματα απενεργοποίησης του μικροοργανισμού <i>Bacillus Coagulans</i>	54
5.3.1 Κινητικό πείραμα θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού <i>Bacillus Coagulans</i> σε διαφορετικά pH	54
5.3.2 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης του μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i> με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία σε διαφορετικά pH.....	61
5.3.3 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης με παλμικά ηλεκτρικά πεδία και προ-θέρμανση του μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i> σε pH=6.0.....	64
5.3.4 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης του μικροοργανισμού <i>Bacillus coagulans</i> με εφαρμογή σε τρόφιμα	69
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα	80
Βιβλιογραφία	83
Ιστοσελίδες.....	90

Κεφάλαιο 1: Μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων

1.1 Θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων

1.1.1 Εισαγωγή

Η θερμική μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων που έχει στόχο την αδρανοποίηση μικροοργανισμών είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση στη βιομηχανία τροφίμων για τον έλεγχο και την εξάλειψη των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Περιλαμβάνει την έκθεση προϊόντων τροφίμων σε υψηλές θερμοκρασίες, συνήθως μέσω διαδικασιών όπως η παστερίωση, η αποστείρωση ή το ζεμάτισμα. Η θερμική αδρανοποίηση βασίζεται στην εφαρμογή θερμότητας για τη στόχευση και την καταστροφή μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ενζύμων, των ιών και των μυκήτων, που υπάρχουν στα τρόφιμα. Η διαδικασία της θερμικής αδρανοποίησης λειτουργεί εκθέτοντας το τρόφιμο σε θερμοκρασίες που είναι θανατηφόρες για τους μικροοργανισμούς. Η θερμότητα διαταράσσει τη μοριακή δομή των πρωτεϊνών, των ενζύμων και άλλων ζωτικών συστατικών των μικροοργανισμών, οδηγώντας σε μετουσίωση και τελικά σε θάνατο. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία και ο χρόνος που απαιτείται για τη θερμική αδρανοποίηση εξαρτώνται από τον τύπο του μικροοργανισμού, το προϊόν διατροφής και το επιθυμητό επίπεδο μικροβιακής μείωσης ή αποβολής.

Η θερμική επεξεργασία των τροφίμων έχει μία μακρά ιστορία και εξακολουθεί να είναι μια από τις σημαντικότερες μεθόδους συντήρησης. Η σταθεροποίηση με θερμική επεξεργασία είχε ήδη κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τον Appert (1810) στις αρχές του δέκατου ένατου αιώνα χωρίς καμία γνώση μικροβιολογίας. Στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα εισήχθη η παστερίωση, που πήρε το όνομά του από τον Λουί Παστέρ, για την εξάλειψη φυτικών παθογόνων ή μικροοργανισμών αλλοίωσης. Στις αρχές του εικοστού αιώνα διατυπώθηκαν καθιερωμένες, βασισμένες στην επιστήμη θερμικές διεργασίες (Esty and Meyer, 1922; Bigelow et al., 1920; Richardson and Ball, 1920). Στις παραδοσιακές θερμικές διεργασίες, τα περιθώρια μικροβιολογικής σταθερότητας είναι συχνά άσκοπα μεγάλα, λόγω μη βέλτιστου ελέγχου της διαδικασίας θέρμανσης ή έλλειψης ακριβούς γνώσης της κινητικής αδρανοποίησης των σχετικών μικροοργανισμών.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι κονσερβοποίησης στοχεύουν στην καταστροφή όλων των σπορίων (αποστείρωση) ή όλων των σπορίων που μπορούν να αναπτυχθούν στο δοχείο κάτω από τους 40 °C (εμπορική αποστείρωση ή εκτίμηση). Λόγω των νέων απαιτήσεων των καταναλωτών για προϊόντα που μοιάζουν με φρέσκα, υπάρχει ανάγκη για πιο ήπιες διαδικασίες π.χ. σε συνδυασμό με ψυχρή αποθήκευση και περιορισμένη διάρκεια ζωής. Ως αποτέλεσμα, πιο πρόσφατα, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στη θερμική αντοχή των σπορίων από ευαίσθητους σχηματιστές σπορίων ψυχρής ανάπτυξης καθώς και στα βλαστικά κύτταρα τους.

1.1.2 Είδη θερμικών μεθόδων

Οι θερμικές μέθοδοι διακρίνονται σε ήπιες και έντονες ανάλογα με το προκαλούμενο θερμικό αποτέλεσμα. Ήπιες θερμικές επεξεργασίες είναι το ζεμάτισμα και η παστερίωση, ενώ ως έντονη θερμική επεξεργασία θεωρείται η αποστείρωση.

Ζεμάτισμα

Το ζεμάτισμα είναι μια ήπια τεχνική θερμικής επεξεργασίας τροφίμων που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων και εφαρμόζεται, κυρίως, σε φρούτα, λαχανικά και ορισμένα προϊόντα θαλασσινών πριν από περαιτέρω επεξεργασία ή συντήρηση. Περιλαμβάνει τη σύντομη βύθιση του τροφίμου σε ζεστό νερό ή ατμό, ακολουθούμενη από γρήγορη ψύξη σε παγωμένο νερό.

Ένας από τους κύριους στόχους του ζεματίσματος είναι η αδρανοποίηση ενζύμων. Τα ένζυμα που υπάρχουν φυσικά στα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αλλαγές στο χρώμα, τη γεύση και την υφή κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία. Υποβάλλοντας το τρόφιμο σε υψηλές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια αυτής της επεξεργασίας, τα ένζυμα απενεργοποιούνται, επιβραδύνοντας ή σταματώντας τη δραστηριότητά τους. Από τα οξειδωτικά ένζυμα, αυτό που θεωρείται πιο θερμοάντοχο είναι η περοξειδάση, γι' αυτό και η απενεργοποίησή της αποτελεί μέτρο αποτελεσματικότητας του ζεματίσματος. Αυτό βοηθά στη διατήρηση της οπτικής ελκυστικότητας, της γεύσης και της υφής του τελικού προϊόντος.

Το ζεμάτισμα έχει σημαντικό ρόλο επίσης στη μείωση των μικροβίων. Αν και μπορεί να μην εξαλείφει εντελώς όλους τους μικροοργανισμούς, συμβάλλει στη μείωση του μικροβιακού φορτίου και στην απομάκρυνση των επιφανειακών ρύπων, ενισχύοντας την ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Η θερμική επεξεργασία κατά το ζεμάτισμα βοηθά στην εξάλειψη ή στην ελαχιστοποίηση παθογόνων και μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση, παρέχοντας ένα καθαρότερο σημείο εκκίνησης για τα επόμενα στάδια επεξεργασίας ή συντήρησης.

Η διατήρηση του χρώματος και η βελτίωση της υφής είναι μια άλλη σημαντική λειτουργία του ζεματίσματος. Η υψηλή θερμότητα που χρησιμοποιείται σε αυτή τη διεργασία βοηθά στη ρύθμιση των φυσικών χρωστικών στα φρούτα και τα λαχανικά, διατηρώντας τα ζωντανά τους χρώματα. Επιπλέον, το ζεμάτισμα μπορεί να βοηθήσει στην απομάκρυνση του αέρα που έχει παγιδευτεί στους ιστούς, αποτρέποντας τον αποχρωματισμό και διατηρώντας την ελκυστική οπτική εμφάνιση του φαγητού. Όσον αφορά την υφή, η σύντομη θερμική επεξεργασία μαλακώνει την υφή των φρούτων και των λαχανικών, καθιστώντας τα πιο εύκαμπτα και ευκολότερα στο χειρισμό κατά την επεξεργασία. Μπορεί επίσης να βοηθήσει στη βελτίωση της τρυφερότητας και της υφής ορισμένων προϊόντων θαλασσινών.

Συνολικά, Το ζεμάτισμα χρησιμοποιείται ευρέως σε διάφορες εφαρμογές τροφίμων. Χρησιμοποιείται συνήθως στην παρασκευή κατεψυγμένων φρούτων και λαχανικών, όπου το ζεμάτισμα βοηθά στη διατήρηση της ποιότητας, του χρώματος και της υφής

τους κατά την κατάψυξη. Χρησιμοποιείται επίσης στη βιομηχανία κονσερβοποίησης για την παρασκευή φρούτων και λαχανικών για συντήρηση σε κονσέρβες ή βάζα. Τέλος το ζεμάτισμα είναι ενισχύει την παραγωγή αφυδατωμένων φρούτων και λαχανικών, καθώς βοηθά στη διατήρηση του χρώματος και της γεύσης τους πριν από την ξήρανση.

Παστερίωση

Η θερμική παστερίωση είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία στη βιομηχανία τροφίμων για την εξάλειψη ή τη μείωση του μικροβιακού φορτίου στα τρόφιμα, καθιστώντας τα ασφαλή για κατανάλωση. Περιλαμβάνει την έκθεση του τροφίμου σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα για την καταστροφή των επιβλαβών παθογόνων μικροοργανισμών, διατηρώντας παράλληλα τη συνολική ποιότητα του προϊόντος.

Η διαδικασία της θερμικής παστερίωσης συνήθως περιλαμβάνει τη θέρμανση του τροφίμου σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 60°C έως 85°C (140°F έως 185°F) για μια συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Αυτό το εύρος θερμοκρασίας επιλέγεται με βάση τον τύπο του τροφίμου και τους μικροοργανισμούς-στόχους για να επιτευχθεί το επιθυμητό επίπεδο μικροβιακής απενεργοποίησης. Ο ακριβής συνδυασμός χρόνου και θερμοκρασίας καθορίζεται από επιστημονική έρευνα, τους κανονισμούς της βιομηχανίας και τις συγκεκριμένες ανάγκες του προϊόντος. Ο πρωταρχικός στόχος της θερμικής παστερίωσης είναι η εξάλειψη ή η σημαντική μείωση του πληθυσμού των παθογόνων βακτηρίων, όπως η *Salmonella*, η *Escherichia coli* (*E. coli*) και η *Listeria monocytogenes*, χωρίς να προκαλούνται ουσιαστικές αλλαγές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά και τη θρεπτική αξία των τροφίμων. Αυτή η διαδικασία διαταράσσει αποτελεσματικά τις κυτταρικές δομές και τις ενζυμικές δραστηριότητες των μικροοργανισμών, οδηγώντας στην αδρανοποίησή τους.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι θερμικής παστερίωσης που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων. Μια κοινή μέθοδος ονομάζεται στατική παστερίωση (batch pasteurization), όπου τα τρόφιμα τοποθετούνται σε δοχεία και θερμαίνονται σε ελεγχόμενο περιβάλλον, όπως υδατόλουτρο ή θάλαμος ατμού, για τον καθορισμένο χρόνο και θερμοκρασία. Αυτό το είδος παστερίωσης μπορεί να χωριστεί ακολουθώντας σε παστερίωση σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας-μεγάλου χρόνου (LTST, Low Temperature Short Time), ενδεικτικά γύρω στους 60°C για 30min, και σε παστερίωση σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας-μικρού χρόνου (HTST, High Temperature Short Time). Παράδειγμα συνθηκών της HTST παστερίωσης είναι η επεξεργασία του γάλακτος στους 72°C για 15sec, που σχεδιάστηκε έχοντας ως μικροοργανισμό - στόχο την *Coxiella burnetti*. Μια άλλη μέθοδος είναι η παστερίωση συνεχούς ροής, όπου το τρόφιμο διέρχεται συνεχώς μέσω εναλλάκτη θερμότητας ή μονάδας παστερίωσης, εξασφαλίζοντας συνεπή επεξεργασία.

Τα οφέλη της θερμικής παστερίωσης επεκτείνονται πέρα από τη μικροβιακή ασφάλεια, καθώς βοηθά επίσης στην παράταση της διάρκειας ζωής των προϊόντων

μειώνοντας τους μικροοργανισμούς και τα ένζυμα που προκαλούν αλλοίωση και μπορούν να προκαλέσουν υποβάθμιση. Επιπλέον, η θερμική παστερίωση μπορεί να βελτιώσει την πεπτικότητα και τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών ουσιών σε ορισμένα προϊόντα διατροφής. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ενώ η θερμική παστερίωση μειώνει αποτελεσματικά τους μικροβιακούς πληθυσμούς, μπορεί να μην εξαλείψει όλους τους μικροοργανισμούς, ειδικά τα ανθεκτικά στη θερμότητα σπόρια και ορισμένους ιούς. Επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρόσθετες μέθοδοι συντήρησης, όπως ψύξη ή τεχνικές συσκευασίας, σε συνδυασμό με τη θερμική παστερίωση για να διασφαλιστεί η μακροπρόθεσμη ασφάλεια και ποιότητα των διαφόρων προϊόντων. Συνολικά, η θερμική παστερίωση είναι μια κρίσιμη διεργασία στη βιομηχανία τροφίμων, παρέχοντας μια ισορροπία μεταξύ ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων.

Αποστείρωση

Η αποστείρωση είναι μια έντονη θερμική επεξεργασία που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για να διασφαλιστεί η πλήρης καταστροφή των μικροοργανισμών και των σπορίων τους. Πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες άνω των 100°C, που συνήθως κυμαίνονται από 110-121°C. Η αντοχή των βακτηριακών σπορίων στη θερμική καταστροφή καθορίζει την ένταση της επεξεργασίας αποστείρωσης, καθώς θεωρούνται τα πλέον θερμοάντοχα. Ανάμεσα στα πιο ανθεκτικά στη θερμότητα βακτήρια που σχηματίζουν σπόρους είναι το *Clostridium botulinum*, το οποίο απαιτεί επεξεργασία στους 121°C για λίγα δευτερόλεπτα για να καταστραφούν τα σπόρια του.

Ενώ η αποστείρωση μειώνει σημαντικά την πιθανότητα μικροβιακής επιβίωσης, η επίτευξη της πλήρους καταστροφής όλων των μικροοργανισμών και των σπορίων ίσως να μην είναι εφικτή. Ως εκ τούτου, ο όρος "εμπορικά αποστειρωμένο" χρησιμοποιείται συχνά αντί του "στείρου τροφίμου". Τα τρόφιμα που υποβάλλονται σε επεξεργασία αποστείρωσης έχουν γενικά παρατεταμένη διάρκεια ζωής, που συχνά εκτείνεται ακόμα και σε αρκετά χρόνια. Τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα χρησιμεύουν ως κύρια παραδείγματα εμπορικά αποστειρωμένων προϊόντων. Μια άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αποστείρωση είναι η διαδικασία Ultra High Temperature (UHT), που χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία γάλακτος, η οποία περιλαμβάνει θέρμανση του γάλακτος σε θερμοκρασία 135°C για 1-2 δευτερόλεπτα.

Χρησιμοποιώντας τεχνικές αποστείρωσης, η βιομηχανία τροφίμων μπορεί να εξαλείψει αποτελεσματικά τους μικροοργανισμούς και τα σπόρια τους, διασφαλίζοντας την ασφάλεια και την εκτεταμένη διάρκεια ζωής διαφόρων προϊόντων. Ο ακριβής έλεγχος και η εφαρμογή των διαδικασιών αποστείρωσης διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στη διατήρηση της ποιότητας, της ασφάλειας και της μακροζωίας των αποστειρωμένων τροφίμων.

1.1.3 Εξοπλισμός

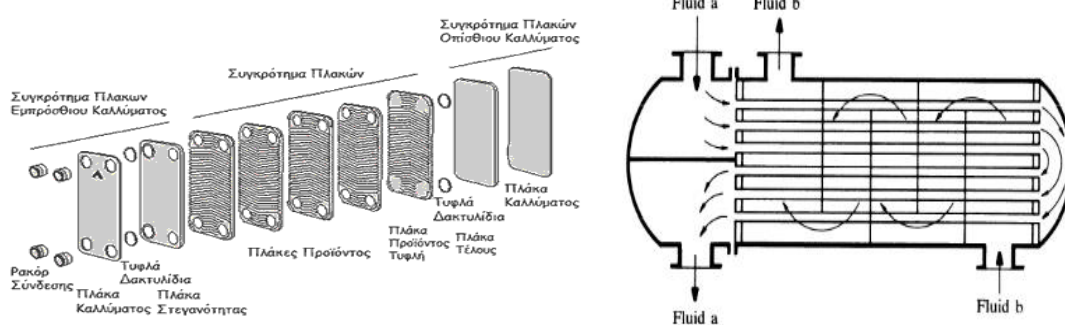
Στη διεργασία της παστερίωσης και γενικότερα στην θερμική επεξεργασία τροφίμων χρησιμοποιούνται συμβατικές μέθοδοι, οι οποίες περιλαμβάνουν συστήματα συνεχούς λειτουργίας για υγρά και ρευστά τρόφιμα και συστήματα διαλείποντος έργου κυρίως για στερεά τρόφιμα. Τα τελευταία λειτουργούν με τοποθέτηση παρτίδων τροφίμων σε κλειστές δεξαμενές, όπως υδατόλουτρα, ή δωμάτια και με κυκλοφορία ατμού, αέρα ή θερμού νερού θερμαίνονται. Αυτή η διαλείπουσα λειτουργία, λόγω των μικρών ρυθμών επεξεργασίας, δεν προτιμάται για ρευστά και υγρά τρόφιμα.

Τα συστήματα συνεχούς λειτουργίας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, άμεσης και έμμεσης θέρμανσης. Στα έμμεσης θέρμανσης ανήκουν οι εναλλάκτες θερμότητας, όπου η μεταφορά της θερμότητας γίνεται μέσω μιας επιφάνειας μεταξύ του θερμαντικού μέσου και του τροφίμου. Αντίθετα, στα άμεσης θέρμανσης περιλαμβάνονται τα συστήματα που διαβιβάζουν τα τρόφιμα στον κύριο όγκο ατμού ή το αντίθετο, και σε αυτά τα συστήματα υπάρχει επαφή του θερμαντικού μέσου με το τρόφιμο και η μεταφορά θερμότητας γίνεται απευθείας με αυτή την επαφή.

Οι εναλλάκτες που χρησιμοποιούνται κατά βάση στη βιομηχανία είναι οι πλακοειδείς και οι σωληνωτοί ή αυλωτοί. Οι πλακοειδείς εναλλάκτες θερμότητας αποτελούνται από μια σειρά από λεπτές πλάκες με μικρά κενά μεταξύ τους, δημιουργώντας κανάλια μικρού όγκου. Το τρόφιμο και το θερμαντικό μέσο εισέρχονται στον εναλλάκτη μέσω χωριστών σωλήνων, με ένα μόνο ρευστό να διέρχεται από κάθε κανάλι. Τυπικά, τα ρευστά ρέουν σε αντίθετες κατευθύνσεις (αντιρροή) μέσα στα κανάλια. Οι πλάκες αυτές είναι συνήθως κατασκευασμένες από ασάλι, με πάχος που κυμαίνεται από 0,5 έως 1,25 mm και απόσταση μεταξύ τους 3 έως 6 mm. Αυτός ο σχεδιασμός επιτρέπει μια μεγάλη επιφάνεια για μεταφορά θερμότητας, διατηρώντας παράλληλα τη δομική ακεραιότητα. Οι εναλλάκτες θερμότητας πλακών είναι ιδιαίτερα κατάλληλοι για υγρά τροφίμων χαμηλού ιξώδους, καθιστώντας τους ιδανικούς για εφαρμογές στην επεξεργασία γάλακτος και άλλων υγρών προϊόντων διατροφής. Ο συμπαγής και αποτελεσματικός σχεδιασμός των πλακών προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα στη βιομηχανία τροφίμων. Παρέχουν γρήγορη και ομοιόμορφη μεταφορά θερμότητας, επιτρέποντας τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας και την ελαχιστοποίηση της απώλειας θερμότητας. Οι υψηλοί συντελεστές μεταφοράς θερμότητας των πλακοειδών εναλλακτών θερμότητας επιτρέπουν την αποδοτική χρήση ενέργειας και μειώνουν τον χρόνο επεξεργασίας. Επιπλέον, η απλή κατασκευή τους επιτρέπει την εύκολη συντήρηση, τον καθαρισμό και την επεκτασιμότητα για να ανταποκρίνονται στις ποικίλες απαιτήσεις παραγωγής.

Οι σωληνωτοί εναλλάκτες θερμότητας προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα επιλογών σχεδιασμού, καθιστώντας τους ευέλικτους για διάφορες εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων. Στην απλούστερη μορφή τους, οι σωληνωτοί εναλλάκτες αποτελούνται από ένα σωλήνα τοποθετημένο ομόκεντρα στο εσωτερικό ενός άλλου σωλήνα. Το ρευστό τρόφιμο ρέει μέσω του εσωτερικού σωλήνα, ενώ το θερμαντικό μέσο

κυκλοφορεί εξωτερικά. Αυτός ο σχεδιασμός εξασφαλίζει αποτελεσματική μεταφορά θερμότητας μεταξύ των δύο υγρών. Μια άλλη παραλλαγή του σωληνωτού εναλλάκτη περιλαμβάνει πολλαπλούς σωλήνες που στεγάζονται μέσα σε έναν μεγαλύτερο σωλήνα ή δεξαμενή. Το υγρό τροφίμο διέρχεται από αυτούς τους πολλαπλούς σωλήνες, ενώ το θερμαντικό μέσο ρέει σε διάταξη αντίθετης ροής μέσα στη δεξαμενή. Αυτή η διαμόρφωση επιτρέπει βελτιωμένη ανταλλαγή θερμότητας και βελτιωμένη απόδοση. Συνολικά, οι σωληνωτοί εναλλάκτες προσφέρουν αποτελεσματική μεταφορά θερμότητας, ευελιξία και αξιοπιστία, καθιστώντας τους ένα πολύτιμο μέσο στη βιομηχανία τροφίμων για την επεξεργασία υγρών τροφίμων τόσο χαμηλού όσο και υψηλού ιξώδους.



Εικόνα 1.1: Εναλλάκτες θερμότητας, πλακοειδής αριστερά και σωληνωτός δεξιά

(Πηγή: http://www.monachos.gr/forum/content.php/345%CE%95%CE%BD%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%AC%CE%BA%CF%84%CE%B5%CF%82%CE%B8%CE%B5%CF%81%CE%BC%CF%8C%CF%84%CE%B7%CF%84%CE%B1%CF%82&new_comment)

1.1.4 Βασικές Αρχές Θερμικής Επεξεργασίας

Η καταστροφή ενός πληθυσμού μικροοργανισμών του ίδιου είδους με θέρμανση ακολουθεί κινητική πρώτης τάξης. Σε μια σταθερή θερμοκρασία ο ρυθμός μείωσης των μικροοργανισμών είναι:

$$-\frac{dC}{dt} = kC \rightarrow -\frac{dN}{dt} = kN \rightarrow \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt \rightarrow \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (1.1)$$

όπου N: ο αριθμός των ζώντων μικροοργανισμών σε χρόνο t, N_0 : ο αριθμός των ζώντων μικροοργανισμών σε χρόνο 0, k: η σταθερά του ρυθμού καταστροφής(s^{-1}) και $D=2,303/k$, είναι ο χρόνος θερμικού θανάτου ή ο χρόνος που απαιτείται για υποδεκαπλασιασμό του πληθυσμού(s).

Για την εξάρτηση του ρυθμού από την θερμοκρασία χρησιμοποιείται η εξίσωση Arrhenius:

$$k = k_0 * \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \quad \text{ή} \quad \ln\left(\frac{k}{k_{ref}}\right) = -\frac{Ea}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right) \quad (1.2)$$

Ο χρόνος D παρουσιάζει μείωση με την αύξηση της θερμοκρασίας όπως φαίνεται και στον εξής τύπο:

$$\log\left(\frac{D1}{D2}\right) = \frac{T1-T2}{z} \quad (1.3)$$

Όπου z: η σταθερά θερμική αντίστασης του μικροοργανισμού(°C ή°F).

Η μείωση του πληθυσμού κατά τη θερμική κατεργασία εκφράζεται και ως τιμή αποστείρωσης (SV) και δίνεται από την παρακάτω σχέση:

$$SV = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \quad (1.4)$$

Σημαντικό μέγεθος που χρησιμοποιείται είναι ο χρόνος θερμικού θανάτου (Thermal death time, TDT) ο οποίος συμβολίζεται με F. Αντιστοιχεί στον χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί δεδομένη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού υπό σταθερή θερμοκρασία.

Ο απαιτούμενος χρόνος (FT) σε θερμοκρασία T για να πραγματοποιηθεί μία τιμή αποστείρωσης SV θα είναι:

$$FT = SV * DT \quad (1.5)$$

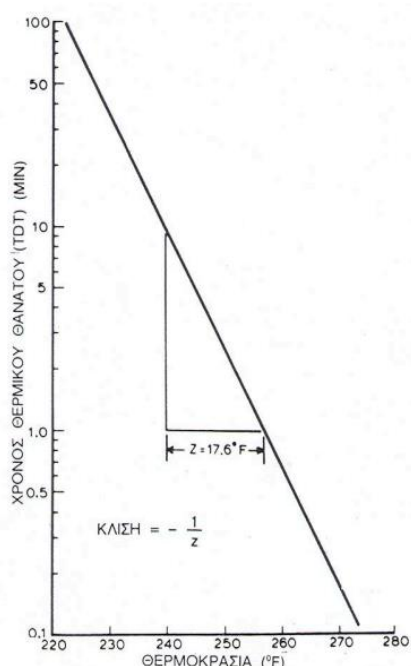
Ενώ, στους 121.1°C ο αντίστοιχος χρόνος (F₀) βρίσκεται από την εξίσωση:

$$F0 = SV * D0 \quad (1.6)$$

Επίσης, ο λογάριθμος του χρόνου θερμικού θανάτου (logF) έχει γραμμική εξάρτηση από τη θερμοκρασία:

$$\log\left(\frac{F}{F_{ref}}\right) = \frac{T - T_{ref}}{z} \quad (1.7)$$

Με βάση αυτή την παραπάνω εξίσωση μπορούν να υπολογιστούν οι κατάλληλοι συνδυασμοί χρόνου θερμοκρασίας έτσι ώστε να καταστραφούν οι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί. Ακολουθεί ο πίνακας με την θερμική αντίσταση διαφόρων μικροοργανισμών:



Σχήμα 1.1: Μεταβολή του χρόνου θερμικού θανάτου με τη θερμοκρασία (Πηγή: https://helios.ntua.gr/pluginfile.php/30318/mod_resource/content/0/Chapter_3.pdf)

Πίνακας 1.1: Θερμική αντίσταση των σημαντικότερων μικροοργανισμών σε διάφορες κατηγορίες κονσερβοποιημένων τροφίμων

Ομάδες Μικροοργανισμών	$D_{121.1C}$ (min)	z (°C)
<u>Τρόφιμα χαμηλής οξύτητας (pH>4.5)</u>		
Θερμόφιλα (σπόρια)		
Βακτήρια που παράγουν οξέα (<i>B. stearothermophilus</i>)	4.0-5.0	7.8-12.2
Βακτήρια αεριογόνα (<i>C. thermosaccharolyticum</i>)	3.0-4.0	8.9-12.2
Βακτήρια που παράγουν H ₂ S (<i>C. nigrificans</i>)	2.0-3.0	8.9-12.2
Μεσόφιλα (σπόρια)		
<i>C. botulinum</i> (τύπος A και B)	0.1-0.2	7.8-10
ομάδα <i>C. sporogenes</i> (συμπεριλ. του P.A. 3679)	0.1-1.5	7.8-10
<u>Όξινα τρόφιμα (4.0<pH<4.5)</u>		
Θερμόφιλα (σπόρια)		
<i>B. coagulans</i>	0.01-0.07	7.8-10
Μεσόφιλα (σπόρια)		
<i>B. polymyxa</i> και <i>B. macerans</i>	0.10-0.50 ^a	6.7-8.9
Βουτυρικά αναερόβια (<i>C. pasteurianum</i>)	0.10-0.50 ^a	6.7-8.9
<u>Τρόφιμα υψηλής οξύτητας (pH<4.0)</u>		
Μεσόφιλα μη σπορογόνα βακτήρια		
<i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i>	0.50-1.00 ^b	4.4-5.6
Ζύμες και ευρωτομύκητες	0.50-1.00 ^b	4.4-5.6

^a: D_{100C} , ^b: $D_{65.6C}$

Πηγή: Stumbo, 1973, με μετατροπή στις μονάδες.

1.1.5 Επίδραση των θερμικών διεργασιών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τροφίμων

Οι θερμικές διεργασίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συντήρηση και την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά μπορούν επίσης να επηρεάσουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Η επίδραση των θερμικών διεργασιών στην ποιότητα των τροφίμων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος επεξεργασίας και το συγκεκριμένο τρόφιμο που υφίσταται επεξεργασία.

Ένα από τα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από τις θερμικές διεργασίες είναι το θρεπτικό περιεχόμενο. Τα ευαίσθητα στη θερμότητα θρεπτικά συστατικά, όπως οι βιταμίνες και τα ένζυμα, μπορεί να υποστούν υποβάθμιση ή απώλεια κατά τη θέρμανση. Για παράδειγμα, η βιταμίνη C είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στη θερμότητα και μπορεί να μειωθεί σημαντικά σε τρόφιμα που υποβάλλονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Συγκεκριμένα, το ζεμάτισμα αναφέρεται ότι μπορεί να επιφέρει μείωση έως και 40% σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες (ιδιαίτερα βιταμίνης C και θειαμίνης), 35% σε σάκχαρα και 20% σε πρωτεΐνες και αμινοξέα (Selman, 1988, Leskova et al., 2006, Igwemmar et al. 2013). Ομοίως, τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις στα τρόφιμα μπορούν να αδρανοποιηθούν, επηρεάζοντας το συνολικό διατροφικό προφίλ και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Το χρώμα είναι ένα άλλο σημαντικό ποιοτικό χαρακτηριστικό που επηρεάζεται από τις θερμικές διεργασίες. Η εφαρμογή θερμότητας μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στις χρωστικές, οδηγώντας σε αλλοιώσεις στο χρώμα των τροφίμων. Το ενζυμικό μαύρισμα, που προκαλείται από την αλληλεπίδραση ενζύμων και οξυγόνου, μπορεί να μειωθεί με θέρμανση και μπορεί να βοηθήσει στη διατήρηση του χρώματος των φρούτων και των λαχανικών. Ωστόσο, μη ενζυμικές αντιδράσεις μαυρίσματος, όπως η αντίδραση Maillard, μπορεί να εμφανιστούν κατά τη θέρμανση, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό καφέ χρωστικών και την αλλαγή του χρώματος του τροφίμου.

Η υφή επηρεάζεται επίσης από τις διάφορες θερμικές μεθόδους. Οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να επηρεάσουν τη δομική ακεραιότητα των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων, οδηγώντας σε αλλαγές στην υφή. Για παράδειγμα, το υπερβολικό ψήσιμο μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια υγρασίας και τρυφερότητας στο κρέας, καθιστώντας το σκληρό και στεγνό. Από την άλλη πλευρά, η ελεγχόμενη θέρμανση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθούν επιθυμητές αλλαγές υφής, όπως το μαλάκωμα των λαχανικών κατά το ζεμάτισμα ή η ζελατινοποίηση των αμύλων.

Τέλος, η γεύση και το άρωμα μπορούν επίσης να επηρεαστούν από τις θερμικές διεργασίες. Οι πτητικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση των τροφίμων μπορούν να αλλοιωθούν ή να χαθούν κατά τη θέρμανση, οδηγώντας σε αλλαγές στην αισθητηριακή αντίληψη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι επιθυμητές γεύσεις μπορεί να ενισχυθούν, όπως η ανάπτυξη καβουρδισμένων γεύσεων στον καφέ ή η καραμελοποίηση των σακχάρων σε ορισμένα επιδόρπια.

Συνολικά, η επίδραση των θερμικών διεργασιών στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ο σωστός έλεγχος της θερμοκρασίας, του χρόνου επεξεργασίας και των συνθηκών είναι ιδιαίτερα σημαντικός για την επίτευξη της επιθυμητής ισορροπίας μεταξύ της ασφάλειας των τροφίμων, της διάρκειας ζωής και της διατήρησης των βέλτιστων ποιοτικών χαρακτηριστικών στο τελικό προϊόν.

1.2 Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (ΠΗΠ)

1.2.1 Εισαγωγή

Τα Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία (Pulsed Electric Fields – PEF) αποτελούν μία καινοτόμα και ενδιαφέρουσα μη θερμική τεχνολογία, η οποία εξελίσσεται συνεχώς τα τελευταία χρόνια και χρησιμοποιείται ευρέως ως ένας εναλλακτικός τρόπος επεξεργασίας τροφίμων και όχι μόνο.

Η συγκεκριμένη τεχνολογία βρίσκει εφαρμογή σε πολλές διεργασίες τροφίμων, η οποία βασίζεται στην εφαρμογή σύντομων (ms-μs) και επαναλαμβανόμενων παλμών υψηλής έντασης (0,1-30,0 kV/cm) σε ένα υλικό που τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Αυτοί οι παλμοί προκαλούν αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, μια διαδικασία που ονομάζεται ηλεκτροδιάτρηση. Ο στόχος είναι η απενεργοποίηση μικροοργανισμών και η βελτίωση της μεταφοράς μάζας. Για τη βελτίωση της μεταφοράς μάζας στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η διάρρηξη των κυττάρων μπορεί να επιτευχθεί με χαμηλής έντασης ηλεκτρικών πεδίων (<10 kV/cm) και χρόνους επεξεργασίας από 1 έως 10.000 μs. Από την άλλη πλευρά, η μικροβιακή απενεργοποίηση απαιτεί πιο έντονες συνθήκες με ηλεκτρικά πεδία >10 kV/cm.

Με αυτόν τον τρόπο βρίσκει εφαρμογή στην απενεργοποίηση παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών και ενζύμων. Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην επεξεργασία με ΠΗΠ σε υψηλής έντασης ηλεκτρικά πεδία και σχετίζονται με το σχεδιασμό εφαρμογών συντήρησης, αλλά και παστερίωσης ως εναλλακτική λύση στις συμβατικές θερμικές διεργασίες. Χρησιμοποιώντας τα ΠΗΠ, μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαμηλότερες θερμοκρασίες από αυτές που απαιτούνται στις θερμικές διεργασίες, προκειμένου να επιτευχθούν τα επιθυμητά επίπεδα μικροβιακής απενεργοποίησης, καθώς και την παρατήρηση της επίδρασης της διεργασίας αυτής στην ενζυμική δραστηριότητα (Mohamed et al., 2012, Soliva-Fortuny et al., 2009, Klownowski et al., 2006). Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι τα ΠΗΠ είναι εξίσου αποτελεσματικά στην καταστροφή μικροοργανισμών σε τρόφιμα σε σχέση με τις κλασικές θερμικές μεθόδους, προκαλώντας επιπλέον και μικρότερη ποιοτική υποβάθμιση. Η συγκεκριμένη σύγκριση των δύο μεθόδων για την απενεργοποίηση ενός συγκεκριμένου μικροοργανισμού (*B. Coagulans*), αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Άλλες εφαρμογές των ΠΗΠ αφορούν στην κυτταρική αποσύνθεση και την αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς επίσης και στην ενεργοποίηση του μεταβολισμού κυττάρων, ανάλογα με την ένταση των παραμέτρων της μεθόδου. Τέλος, η εφαρμογή των ΠΗΠ με ήπια ή μέτρια ένταση ηλεκτρικού πεδίου βρίσκεται υπό μελέτη για να διαπιστωθεί εάν η ενίσχυση της μεταφοράς μάζας και η αύξηση της διαπερατότητας των ιστών επιτρέπουν την εφαρμογή τους ως προεπεξεργασία σε υπάρχουσες διεργασίες, όπως η εκχύλιση ή αφυδάτωση (Soliva-Fortuny et al., 2009).

1.2.2 Εξοπλισμός των ΠΗΠ

Τα συστήματα των ΠΗΠ χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια και μπορούμε να τα συναντήσουμε σε βιομηχανική, ημιβιομηχανική και σε εργαστηριακή κλίμακα. Οι μονάδες τους έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ένα πολύ μεγάλο αριθμό παλμών υψηλής τάσης, το πλεονέκτημα των οποίων είναι η πολύ μικρή χρονική διάρκεια της τάσης των μs. Μία τυπική διάταξη ΠΗΠ αποτελείται γενικά από τρία βασικά μέρη: μια γεννήτρια παλμών υψηλής τάσης, ένα θάλαμο επεξεργασίας και ένα σύστημα ελέγχου για την παρακολούθηση και τον έλεγχο των παραμέτρων της διαδικασίας. Πιο αναλυτικά, αποτελείται από μια γεννήτρια παλμών υψηλής τάσης, μία συστοιχία πυκνωτών αποθήκευσης ενέργειας, μία αντίσταση που περιορίζει το ρεύμα φόρτισης, έναν διακόπτη για την ενεργειακή αποφόρτιση των πυκνωτών, ένα θάλαμο επεξεργασίας και ένα σύστημα ελέγχου των παραμέτρων της διεργασίας.

Το σύστημα ελέγχου είναι υπεύθυνο για την παρακολούθηση των παραμέτρων της διεργασίας και αποτελείται από δύο κύριες συσκευές: έναν παλμογράφο και έναν καταγραφικό θερμοκρασίας. Ο παλμογράφος μετρά την τάση κατά μήκος του θαλάμου επεξεργασίας και δείχνει το σχήμα της τάσης εξόδου. Προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι ηλεκτρομαγνητικές παρεμβολές, ο παλμογράφος θα πρέπει να τοποθετείται σε μια προστατευμένη περιοχή. Η θερμοκρασία του δείγματος μετριέται με ένα θερμοστοιχείο που τοποθετείται μέσα στο θάλαμο επεξεργασίας (De Vito, 2005).

Η πηγή ισχύος αποτελείται από μια γεννήτρια συνεχούς ρεύματος υψηλής τάσης, η οποία μετατρέπει το συνεχές ρεύμα μιας συμβατικής τάσης (π.χ. 110 V) σε εναλλασσόμενο ρεύμα υψηλής τάσης. Αυτό το υψηλής τάσης ρεύμα παρέχει την απαραίτητη ενέργεια για την επεξεργασία των τροφίμων. Στη συνέχεια, το ρεύμα μετατρέπεται και πάλι σε συνεχές ρεύμα υψηλής τάσης. Η ενέργεια αποθηκεύεται στη συστοιχία πυκνωτών και απελευθερώνεται στο θάλαμο επεξεργασίας, όπου βρίσκεται το τρόφιμο, για τη δημιουργία ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η μέγιστη τάση κατά μήκος των πυκνωτών είναι ίση με την τάση κατά μήκος της γεννήτριας. Ακόμη, ένας ηλεκτρικός διακόπτης χρησιμοποιείται για την εκτόνωση της ενέργειας που αποθηκεύεται στη συστοιχία πυκνωτών, εκπέμποντας στιγμιαία σε εκατομμύρια του δευτερολέπτου.

Ο θάλαμος επεξεργασίας είναι ένα από τα σημαντικότερα και πιο περίπλοκα στοιχεία του συστήματος επεξεργασίας. Στόχος αυτού του θαλάμου είναι η διατήρηση του επεξεργασμένου προϊόντος στο εσωτερικό κατά τη διάρκεια εφαρμογής των υψηλής έντασης παλμών. Για τον λόγο αυτό, η ομοιομορφία της επεξεργασίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το σχεδιασμό του θαλάμου επεξεργασίας, στον οποίο τοποθετείται το τρόφιμο. Αποτελείται λοιπόν, από τουλάχιστον δύο ηλεκτρόδια, εκ των οποίων το ένα έχει υψηλή τάση, ενώ το άλλο έχει γείωση και διαχωρίζονται με μονωτικό υλικό.

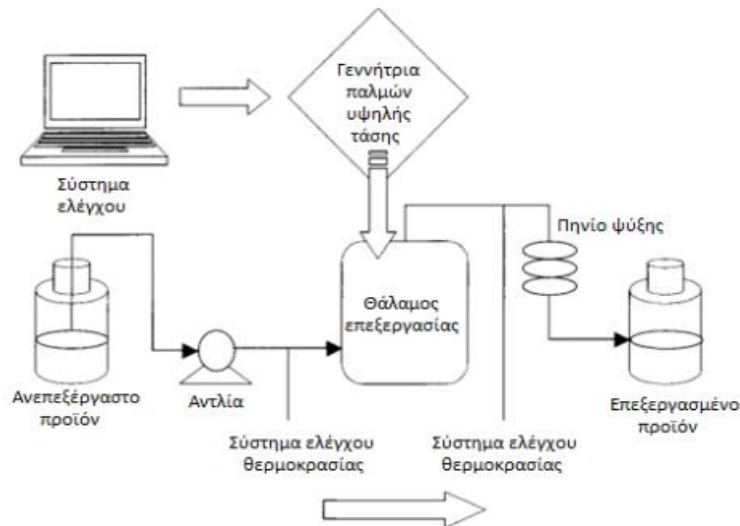
Οι θάλαμοι επεξεργασίας κατατάσσονται σε 2 μεγάλες κατηγορίες, συνεχούς και διαλείποντος έργου. Οι θάλαμοι διαλείποντος έργου είναι πιο χρήσιμοι όσον αφορά

την εργαστηριακή χρήση, όπως επίσης και στο επίπεδο επεξεργασίας τροφίμων κυρίως σε στερεά και ημιστερεά τρόφιμα. Ο θάλαμος επεξεργασίας είναι συνήθως μια αποσπώμενη μονάδα, ώστε να μπορεί να προσαρμόζεται εύκολα σε ένα πλαίσιο όπου περιέχονται τα ηλεκτρόδια. Απαιτούνται μικροί όγκοι επεξεργασίας και η θερμοκρασία επεξεργασίας είναι εύκολο να διατηρηθεί σταθερή με ψύξη των ηλεκτροδίων και με χαμηλούς ρυθμούς επανάληψης των παλμών (μικρή συχνότητα). Επιπλέον, στον συγκεκριμένο τύπο θαλάμου είναι εύκολος ο έλεγχος των παραμέτρων της επεξεργασίας, οι οποίοι είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, ο αριθμός των παλμών, ο χρόνος επεξεργασίας και η ειδική ενέργεια. Από την άλλη μεριά, οι θάλαμοι συνεχούς επεξεργασίας χρησιμοποιούνται περισσότερο για επεξεργασία υγρών τροφίμων και δειγμάτων γενικότερα, και μπορούν να ενσωματωθούν εύκολα σε μεγαλύτερης έκτασης βιομηχανικές διεργασίες, καθώς θεωρούνται πιο αποτελεσματικοί και οικονομικά αποδοτικοί για την επεξεργασία του συγκεκριμένου τύπου τροφίμων. Υπάρχουν διάφορες γεωμετρίες θαλάμων επεξεργασίας και ηλεκτροδίων. Χαρακτηριστική γεωμετρία του διαλείποντος έργου θαλάμου είναι αυτή των παράλληλων πλακών, ενώ συχνότερες γεωμετρίες συνεχούς λειτουργίας είναι οι ομοαξονικοί (coaxial) και οι συγγραμμικοί (co-field) θάλαμοι. Σε βιομηχανικές εφαρμογές απαιτούνται υψηλές ταχύτητες ροής. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει οι παλμοί να εφαρμόζονται σε ρυθμό με υψηλές επαναλήψεις, με αποτέλεσμα αυξάνεται γρήγορα η θερμοκρασία στο τρόφιμο. Η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας μπορεί να απαιτεί υψηλές προσπάθειες ψύξης ή ενδιάμεση ψύξη μεταξύ των πολλαπλών ζωνών επεξεργασίας (Toerfl, 2014).

Εκτός από αυτά τα κύρια συστήματα, λοιπόν, υπάρχουν και μερικά πρόσθετα εξαρτήματα που είναι απαραίτητα για την ομαλή λειτουργία του συστήματος. Για παράδειγμα, ένα σύστημα ψύξης, όπως αναφέρθηκε, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειωθεί η θέρμανση του τροφίμου που προκαλείται από την ωμική επίδραση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Αισθητήρες υψηλής τάσης και υψηλού ρεύματος χρησιμοποιούνται επίσης για τη μέτρηση της τάσης και του ρεύματος που δέχεται ο θάλαμος επεξεργασίας.

Όλα αυτά τα συστήματα συνεργάζονται αρμονικά για να επιτύχουν μια αποτελεσματική επεξεργασία των τροφίμων με τη χρήση του συστήματος ΠΗΠ.

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες εταιρίες επενδύουν στην τεχνολογία των ΠΗΠ. Επιγραμματικά, κάποιες από τις εταιρίες που ειδικεύονται σε συστήματα εξοπλισμού ΠΗΠ είναι: Pulsmaster με έδρα στην Ολλανδία, Elea GmbH που εδρεύει στην Γερμανία, Food Physics που βρίσκεται στις ΗΠΑ και άλλες πολλές, τις οποίες τις εμπιστεύονται πλήθος εταιριών για την παραγωγή των προϊόντων τους χρησιμοποιώντας την τεχνολογία των ΠΗΠ.



Σχήμα 1.2: Διάγραμμα ροής συστήματος επεξεργασίας τροφίμων PEF

1.2.3 Ηλεκτροδιάτρηση

Η ηλεκτροδιάτρηση στο πλαίσιο της επεξεργασίας παλμικών ηλεκτρικών πεδίων αναφέρεται στην εφαρμογή ηλεκτρικών παλμών υψηλής τάσης για τον σχηματισμό πόρων, επηρεάζοντας έτσι τις κυτταρικές τους μεμβράνες, προκαλώντας τοπικές αλλαγές στην κυτταρική τους δομή. Αυτό είναι το φαινόμενο στο οποίο βασίζεται η λειτουργία των ΠΗΠ και προκαλεί δραστική αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών, οι οποίες χάνουν την ημιπερατότητά τους, είτε προσωρινά είτε μόνιμα (Weaver & Chizmadzhed, 1996).

Η ηλεκτροδιάτρηση έχει διάφορες εφαρμογές σε διαφορετικούς κλάδους. Στη βιομηχανία τροφίμων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση της εκχύλισης ενδοκυτταρικών ενώσεων από φυτικούς ιστούς, τη βελτίωση της έγχυσης γεύσεων ή για τη διευκόλυνση της απελευθέρωσης θρεπτικών συστατικών κατά την πέψη. Μπορεί επίσης να εφαρμοστεί στη βιοτεχνολογία και την ιατρική για να βοηθήσει στην ενσωμάτωση φαρμάκων ή γονιδίων σε ζωντανά κύτταρα.

1.2.4 Παράμετροι Λειτουργίας

Η αποτελεσματικότητα των ΠΗΠ στην πρόκληση ηλεκτροδιάτρησης στις κυτταρικές μεμβράνες βασίζεται σε διάφορους παράγοντες επιρροής. Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν παραμέτρους όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, ο χρόνος επεξεργασίας, η ειδική ενέργεια, το σχήμα παλμού, το πλάτος παλμού, η συχνότητα και η θερμοκρασία. Επιπρόσθετα, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μέσου, συμπεριλαμβανομένου του pH και της αγωγιμότητας, και τα ειδικά γνωρίσματα των επεξεργασμένων κυττάρων, όπως το μέγεθος, το σχήμα, οι ιδιότητες της κυτταρικής

μεμβράνης και η κυτταρική δομή, επηρεάζουν σημαντικά το αποτέλεσμα της επεξεργασίας με ΠΗΠ.

Η βελτιστοποίηση αυτών των παραμέτρων και η κατανόηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους και των χαρακτηριστικών των επεξεργασμένων κυττάρων και του μέσου είναι απαραίτητη για την επίτευξη των επιθυμητών αποτελεσμάτων σε εφαρμογές ΠΗΠ. Επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο της διαδικασίας ηλεκτροδιάτρησης, εξασφαλίζοντας αποτελεσματική και επιλεκτική επεξεργασία των κυττάρων, διατηρώντας παράλληλα τη βιωσιμότητα των κυττάρων και διατηρώντας τη συνολική κυτταρική δομή. Η συνεχής έρευνα και διερεύνηση αυτών των παραγόντων συμβάλλει στην προώθηση των ΠΗΠ και στην επέκταση των εφαρμογών του σε διάφορους τομείς, όπως η επεξεργασία τροφίμων, η βιοϊατρική έρευνα και η βιοτεχνολογία.

Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι της διεργασίας που καθορίζουν την αποτελεσματικότητα της απενεργοποίησης των μικροοργανισμών είναι:

Ένταση ηλεκτρικού πεδίου

Μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους της απενεργοποίησης μικροοργανισμών με χρήση ΠΗΠ είναι η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, υπάρχει μία ελάχιστη τιμή της έντασης (E_c) πάνω από την οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί ηλεκτροδιάτρηση και εν συνεχεία μικροβιακή απενεργοποίηση. Όσο μεγαλύτερη ένταση από αυτή την οριακή τιμή εφαρμόζεται, επιτυγχάνεται πιο εύκολα μικροβιακή απενεργοποίηση, αλλά υπάρχει ο κίνδυνος και για μεγαλύτερη αύξηση της θερμοκρασίας του τροφίμου. Η κρίσιμη αυτή τιμή διαφέρει ανάλογα το είδος και το μέγεθος του κάθε μικροοργανισμού, αλλά και συνδυαστικά με άλλες παραμέτρους όπως το μέγεθος και ο αριθμός των παλμών. Έτσι έχει επισημανθεί ότι για διαφορετικούς ιστούς, η απαιτούμενη κρίσιμη τιμή έντασης ηλεκτρικού πεδίου κυμαίνεται από 0.05-0.5 kV/cm, ανάλογα με τον τύπο του ιστού, όταν η διάρκεια της επεξεργασίας με ΠΗΠ σε αυτές τις χαμηλές έως μέτριες εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου ήταν 100- 10.000 μ s (Asavasanti et al., 2010, Vorobiev & Lebonka 2006). Αντίστοιχα, η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών απαιτεί συνήθως υψηλότερης έντασης ηλεκτρικό πεδίο της τάξης 12-45 kV/cm (Toerfl et al., 2007). Ο τύπος που χαρακτηρίζει την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου είναι ο εξής:

$$E = \frac{V}{d} \quad (1.8)$$

όπου, V η εφαρμοζόμενη τάση και d η απόσταση των ηλεκτροδίων του θαλάμου επεξεργασίας.

Οι μονάδες μέτρησης του ηλεκτρικού πεδίου στο SI είναι V/m, παρόλα αυτά στις επεξεργασίες με ΠΗΠ χρησιμοποιείται η μονάδα kV/cm, η οποία προσεγγίζει καλύτερα την τάξη μεγέθους της απόστασης ηλεκτροδίων που χρησιμοποιούνται στις διατάξεις ΠΗΠ.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι εξίσου σημαντική είναι και η κατανομή της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στο θάλαμο επεξεργασίας. Η ομοιογενής κατανομή μέσα στο θάλαμο μας επιτρέπει να έχουμε απόλυτο έλεγχο του πραγματικού φορτίου εφαρμογής, ενώ είμαστε πιο σίγουροι ότι όλα τα κύτταρα του δείγματος μέσα στις περιοχές του θαλάμου επηρεάζονται το ίδιο.

Χρόνος επεξεργασίας

Εξίσου σημαντική παράμετρος είναι και ο χρόνος επεξεργασίας, ο οποίος μετριέται συνήθως σε πολύ μικρούς χρόνους της τάξης των μs και ορίζεται ως το γινόμενο της διάρκειας του κάθε παλμού επί των αριθμό των παλμών που εφαρμόζεται στο τρόφιμο:

$$t = \tau * n \quad (1.9)$$

όπου, τ η διάρκεια κάθε παλμού και n ο αριθμός των παλμών.

Σχετικά με την συγκεκριμένη παράμετρο πρέπει να αναφερθεί ότι με αύξηση της διάρκειας των παλμών, αυξάνεται η θερμοκρασία του τροφίμου, ενώ με αύξηση του αριθμού των παλμών αυξάνεται η συνολική κατανάλωση ενέργειας. Πάραυτα, επιπλέον αυξήσεις στην τιμή του χρόνου επεξεργασίας ή της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου πάνω από κάποια τιμή, δεν προκαλούν περαιτέρω βελτίωση της μεταφοράς μάζας ή του ποσοστού απενεργοποίησης μικροοργανισμών, υποδεικνύοντας ότι έχει επιτευχθεί η μέγιστη διάρρηξη στο κύτταρο (Knorr & Angersbach 1998; Praporscic et al., 2004). Αυτή η μέγιστη τιμή μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικούς συνδυασμούς της έντασης ηλεκτρικού πεδίου και του αριθμού των παλμών, όπου σημαντική παράμετρος για την επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού είναι το ποσό της συνολικής καταναλισκόμενης ενέργειας.

Συχνότητα παλμών

Η συχνότητα των παλμών εκφράζει τον αριθμό των παλμών που δέχεται το τρόφιμο στη μονάδα του χρόνου και μετριέται σε Hz. Η συχνότητα που εφαρμόζεται σύμφωνα με την βιβλιογραφία είναι από 1 έως 500 Hz. Αν και η συχνότητα σαν παράμετρος δεν επηρεάζει τον βαθμό απενεργοποίησης μικροοργανισμών και ενζύμων ή το ποσοστό ηλεκτροδιάτρησης των κυττάρων, με αύξηση της μειώνεται ο συνολικός χρόνος επεξεργασίας, αλλά αυξάνεται και η θερμοκρασία στον θάλαμο επεξεργασίας επηρεάζοντας την ιδιότητες του τροφίμου (Raso et al., 1998). Έτσι η συχνότητα δε δραματίζει τόσο σημαντικό ρόλο, αρκεί να έχει εφαρμοστεί ο ίδιος συνολικός αριθμός παλμών.

Θερμοκρασία επεξεργασίας

Τα ΠΗΠ αποτελούν μία μη θερμική μέθοδο επεξεργασίας και το σημαντικό τους πλεονέκτημα είναι ότι χρησιμοποιούν ήπιες θερμοκρασίες, οι οποίες δεν αλλοιώνουν τα ποιοτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Κατά την επεξεργασία, βέβαια, υπάρχει μία μικρή αύξηση της θερμοκρασίας, η οποία έχει συνεργατική δράση στην αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας και της καταστροφής μικροβίων, καθώς έχει σημαντική επίδραση στη ρευστότητα και τη σταθερότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Σε πολλές περιπτώσεις, κυρίως όταν τα ΠΗΠ χρησιμοποιούνται ως μέθοδος παστερίωσης, για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών γίνεται προθέρμανση του τροφίμου και στη συνέχεια προκαλείται περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας λόγω των ΠΗΠ. Η επίδραση της θερμοκρασίας έχει μελετηθεί στις ιδιότητες υφής του μήλου από τους Lebonka et al. (2004), δείχνοντας ότι η προθέρμανση στους 50 °C οδήγησε σε πιο αποτελεσματική καταστροφή του ιστού και σε καλύτερη εξαγωγή χυμού με πίεση. Επίσης, οι Dunn & Pearlman (1987) διαπίστωσαν ότι ένας ο συνδυασμός της επεξεργασίας με ΠΗΠ και ήπιας προθέρμανσης πριν την επεξεργασία ήταν πιο αποτελεσματικός από τη συμβατική θερμική επεξεργασία. Ο συνδυασμός της προθέρμανσης σε θερμοκρασία 55°C και των ΠΗΠ οδήγησε σε μεγαλύτερο ποσοστό απενεργοποίησης μικροοργανισμών σε γάλα της *E. Coli* (Zhang et al., 1995).

Σχήμα και χαρακτηριστικά του παλμού

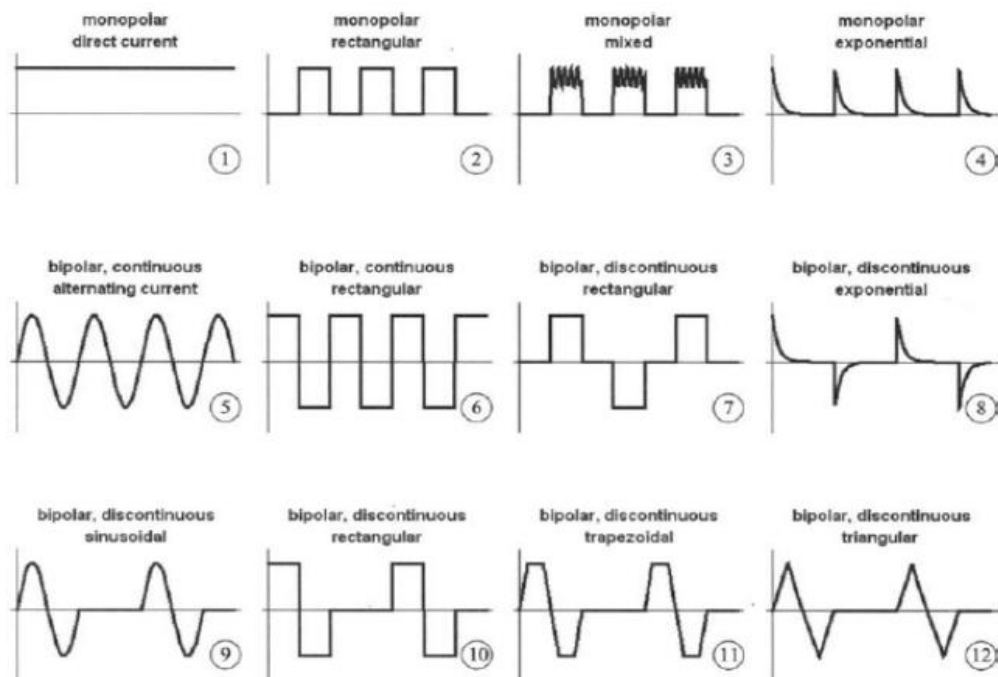
Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων επηρεάζεται από το σχήμα των παλμών. Υπάρχουν διάφορες μορφές παλμών, η καθεμία με τα δικά της χαρακτηριστικά. Οι πιο κοινές μορφές παλμών περιλαμβάνουν την εκθετική αποσύνθεση, τους τετραγωνικούς, τους ταλαντούμενους, τους διπολικούς και τους στιγμιαίους παλμούς αντιστροφής. Οι στιγμιαίοι παλμοί αντιστροφής εμφανίζουν θετική τιμή τάσης σε μια στιγμή και αρνητική τιμή στον επόμενο κύκλο (Ho and Mittal, 1997). Η βασική διαφορά μεταξύ των διπολικών και των στιγμιαίων παλμών αναστροφής είναι η συμπερίληψη ενός διαστήματος μηδενικής τάσης, γνωστό και ως διάστημα χαλάρωσης, στο πρώτο.

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα, οι ταλαντούμενοι παλμοί θεωρούνται οι λιγότερο αποδοτικοί. Η ταλάντωση της τάσης εμποδίζει τους μικροοργανισμούς να βιώσουν ένα περιβάλλον σταθερής υψηλής έντασης πεδίου, το οποίο εμποδίζει την μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση. Οι τετραγωνικοί παλμοί είναι πιο καταστροφικοί και ενεργειακά αποδοτικοί σε σύγκριση με τους παλμούς εκθετικής αποσύνθεσης. Αυτό συμβαίνει επειδή τα δείγματα τροφίμων εκτίθενται σε τιμές υψηλής τάσης για μεγαλύτερη διάρκεια ανά παλμό (Amiali et al., 2006).

Οι διπολικοί παλμοί είναι πιο αποτελεσματικοί στην αδρανοποίηση μικροοργανισμών από τους μονοπολικούς. Η εφαρμογή ενός διπολικού παλμού είναι ενεργειακά ισοδύναμη με την εφαρμογή δύο αντίστοιχων μονοπολικών παλμών. Επιπλέον, η αντιστροφή της κατεύθυνσης του πεδίου σε διπολικούς παλμούς

επιβάλλει πίεση στους μικροοργανισμούς και μηχανική καταπόνηση στα δομικά τους στοιχεία. Οι διπολικοί παλμοί έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας, περιορισμένη εναπόθεση στερεών στα ηλεκτρόδια και λιγότερη ηλεκτρόλυση τροφίμων (Qin et al., 1994).

Από την άλλη πλευρά, η αποτελεσματικότητα των στιγμιαίων παλμών αντιστροφής στην απενεργοποίηση μικροοργανισμών ποικίλλει ασυνεπώς. Μερικές φορές μπορεί να είναι ιδιαίτερα καταστροφικές, ενώ άλλες φορές η επίδρασή τους είναι λιγότερο σημαντική. Η αγωγιμότητα του δείγματος του τροφίμου επηρεάζει τα χαρακτηριστικά παλμού. Η αύξηση της αγωγιμότητας μειώνει τη διάρκεια και το πλάτος των θετικών και αρνητικών μερών του παλμού, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα μια αυξημένη μέση τάση παλμού (Ho and Mittal, 1997). Τα καταστροφικά αποτελέσματα των στιγμιαίων παλμών αντιστροφής αποδίδονται στην πίεση και τη μηχανική καταπόνηση που επιβάλλουν στις δομές των μικροοργανισμών. Τέτοιοι παλμοί φαίνεται επίσης να μειώνουν την κρίσιμη τιμή της έντασης ηλεκτρικού πεδίου (E_c) που απαιτείται για την αποτελεσματική απενεργοποίηση (Ho and Mittal, 1997). Επιπλέον, η εφαρμογή τους μπορεί να οδηγήσει σε εξοικονόμηση κόστους ενέργειας και εξοπλισμού περίπου 1/5 ή 1/6 σε ορισμένες περιπτώσεις.



Εικόνα 1.2: Διαγράμματα διαφόρων μορφών παλμών ΠΗΠ

Ειδική ενέργεια

Η ειδική ενέργεια εκφράζει την ενέργεια που καταναλώνεται κατά την επεξεργασία ανά μονάδα μάζας τροφίμου. Έχει προταθεί ως παράμετρος ελέγχου της επεξεργασίας με ΠΗΠ και εκφράζεται σε kJ/kg. Η αύξηση της αυξάνει την μικροβιακή

απενεργοποίηση, και επιπλέον αποτελεί μια ολοκληρωμένη παράμετρο, η οποία λαμβάνει υπόψη την αντίσταση του θαλάμου επεξεργασίας, η οποία εξαρτάται από τις διαστάσεις του και την αγωγιμότητα του μέσου επεξεργασίας, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και τον χρόνο επεξεργασίας. Η ειδική ενέργεια μπορεί να υπολογισθεί από την ακόλουθη σχέση:

$$W = \frac{V * I * t}{m} \quad (1.10)$$

όπου W η ειδική ενέργεια (J/kg), t ο χρόνος επεξεργασίας (s), I η ένταση ηλεκτρικού ρεύματος (A), V η ηλεκτρική τάση (V) και m η μάζα του τροφίμου (kg).

Χαρακτηριστικά του μέσου επεξεργασίας

Πολλές φορές στα ΠΗΠ επεξεργάζονται είτε υγρά τρόφιμα, όπως για παράδειγμα χυμοί φρούτων, είτε χρησιμοποιείται κάποιο υγρό μέσο, συνήθως νερό, όταν πρόκειται για επεξεργασία στερών τροφίμων. Αυτό συμβαίνει γιατί τα υγρά μέσα έχουν ορισμένους εγγενείς παράγοντες, κάθε ένας από τους οποίους αποτελεί και διαφορετική παράμετρο που επηρεάζει την επεξεργασία με ΠΗΠ. Αναλυτικά αυτοί είναι: η αγωγιμότητα, η αντίσταση τους, οι διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου, η ιοντική ισχύς, το pH και η ενεργότητα του νερού.

Η αγωγιμότητα είναι υπεύθυνη για την δημιουργία ηλεκτρικού πεδίου μέσα στον θάλαμο επεξεργασίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η αγωγιμότητα, τόσο μειώνεται η αντίσταση, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται μικρότερες τιμές μέγιστου πεδίου και συνεπώς σε μικρότερα επίπεδα απενεργοποίησης. Όσον αφορά το pH, έχει βρεθεί ότι έχει συνεργατική δράση με τα ΠΗΠ, και αυτό διότι όσο μειώνεται το pH από ουδέτερο σε όξινο, τόσο αυξάνεται ο ρυθμός απενεργοποίησης των βακτηρίων. Αντίστοιχα, η ιοντική ισχύς δρα συνεργατικά με τα ΠΗΠ για τη φθορά και τη διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης και έτσι σε διαλύματα μεγαλύτερης ιοντικής ισχύος μειώνεται ο ρυθμός απενεργοποίησης των βακτηρίων. Οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν την ομοιόσταση των μικροοργανισμών και αυξάνουν τον ρυθμό απενεργοποίησής τους (Jeyamkondan et al., 1999).

Η διηλεκτρική αντοχή έχει επίσης σημαντική δράση στην εφαρμογή με τα ΠΗΠ, αφού η ηλεκτρική εκκένωση πρέπει να αποφευχθεί. Σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η ύπαρξη ή η δημιουργία φυσαλίδων κατά την επεξεργασία, οι οποίες μπορεί να φθείρουν τα ηλεκτρόδια και να οδηγήσουν σε διηλεκτρική κατάρρευση του τροφίμου, επηρεάζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της διεργασίας. Για αυτόν τον λόγο, ο αέρας πρέπει να αφαιρείται από το προϊόν, για να διατηρείται η ομοιογένεια του τροφίμου ιδιαίτερα στη μικροβιακή αδρανοποίηση, όπου η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου κυμαίνεται από 30 έως 50 kV/cm. Τέλος, η ενεργότητα επηρεάζει την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών, αφού η μείωση της οδηγεί σε αύξηση της αντοχής πολλών βακτηρίων και ζυμών στα ΠΗΠ (Álvarez et al., 2000, 2002, 2003b; Min and Zhang, 2000; Aronsson and Ronner, 2001).

1.2.5 Παράμετροι επίδρασης της τεχνολογίας των ΠΗΠ στους μικροοργανισμούς

Όπως έχει αναφερθεί η μικροβιακή απενεργοποίηση αποτελεί μια από τις κύριες λειτουργίες της τεχνολογίας των ΠΗΠ. Έτσι, πέρα από τις γενικές παραμέτρους λειτουργίας, υπάρχουν και οι ειδικές που αφορούν τους μικροοργανισμούς. Αυτές είναι το είδος του μικροοργανισμού, η συγκέντρωση των μικροοργανισμών αλλά και η φάση ανάπτυξης του εκάστοτε μικροοργανισμού.

Κάθε μικροοργανισμός έχει διαφορετική αντοχή στα ΠΗΠ και αυτό εξαρτάται από παράγοντες όπως το μέγεθος, η σύσταση ή η οικογένεια. Γενικά έχει παρατηρηθεί, ότι μικροοργανισμοί με μεγαλύτερο μέγεθος έχουν μικρότερη αντοχή, το οποίο μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ζύμες και οι μύκητες είναι πιο ευαίσθητοι στους παλμούς του ηλεκτρικού πεδίου σε σχέση με τα βακτήρια. Επιπλέον, τα gram-θετικά βακτήρια έχουν μεγαλύτερη αντοχή σε σχέση με τα gram-αρνητικά (Hülshager et al., 1983). Αντίστοιχα, έρευνες έχουν δείξει ότι η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών επηρεάζεται από την συγκέντρωσή τους στα τρόφιμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην δημιουργία συμπλεγμάτων κυττάρων, για την περίπτωση των ζυμών, ή μπορεί να αποδοθεί στη συγκάλυψη ορισμένων μικροοργανισμών από άλλους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο *S. cerevisiae* σε χυμό μήλου, ο οποίος με αύξηση της συγκέντρωσής του οδήγησε σε μικρότερη απενεργοποίηση, για συνθήκες 1 παλμού διάρκειας 25 μ sec και έντασης πεδίου 25 kV/cm (Barbosa-Canovas et al., 1999).

Η κυτταρική μεμβράνη υφίσταται αλλαγές στη σύνθεση και τη δομή κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού. Οι έρευνες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί στην εκθετική φάση της ανάπτυξης είναι πιο ευαίσθητοι στην έκθεση σε παλμικά ηλεκτρικά πεδία σε σύγκριση με εκείνους στη λανθάνουσα ή στατική φάση τους (Pothakamury et al., 1996). Αυτή η ευαισθησία μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι καθώς οι μικροοργανισμοί αναπαράγονται, η κυτταρική τους μεμβράνη γίνεται λιγότερο ανθεκτική στο ηλεκτρικό πεδίο. Οι Gaskona et al. (1996) έδειξαν ότι η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών στην εκθετική φάση είναι 30% υψηλότερη σε σύγκριση με αυτούς στη φάση στατικής ανάπτυξης. Επίσης, η απενεργοποίηση των σπορίων αν και είναι εφικτή, δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε σχέση με την αντίστοιχη των μικροοργανισμών. Για τον λόγο αυτό έχει δημιουργηθεί η ανάγκη, σε πολλές περιπτώσεις, του συνδυασμού των ΠΗΠ με άλλες θερμικές και μη επεξεργασίες για διεργασίες όπως η παστερίωση και όχι μόνο.

Συνολικά, τα ΠΗΠ έχει αποδειχθεί ότι έχουν θετική επίδραση στην απενεργοποίηση της πλειονότητας των μικροοργανισμών που συναντώνται σε τρόφιμα, καθώς και σε μεγάλο αριθμό σπορίων τους και ενζύμων. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι περισσότεροι εκ των μικροοργανισμών, ενζύμων και σπορίων, των οποίων η καταστροφή με ΠΗΠ έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 1.2: Μικροοργανισμοί, σπόρια και ένζυμα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι έχουν απενεργοποιηθεί αποτελεσματικά με μέθοδο των ΠΗΠ.

Ζύμες	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida albicans (path.)</i>	<i>Kluyveramyces lactis</i> <i>Zygosacchromyces bailii</i>
Βακτήρια	<u>Gram-negative</u> <i>Escherichia coli (path.)*</i> <i>E. coli O157:H7 (path.)</i> <i>Salmonella Dublin</i> <i>Salmonella typhimurium (path.)</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas aeruginosa (path.)</i> <i>Yersinia enterocolitica (path.)</i> <i>Cambylobacter jejuni (path.)</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<u>Gram-positive</u> <i>Staphylococcus aureus (path.)</i> <i>Listeria monocytogenes (path.)</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Enterococcus faecium (path.)</i> <i>Bacillus cereus (path., sp.)**</i> <i>Bacillus subtilis (sp.)</i> <i>Bacillus megaterium (sp.)</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Sarcina lutea</i> <i>Clostridium welchii (sp.)</i>
Σπόρια	<i>Bacillus cereus spore</i> <i>Bacillus polymyxa spore</i>	
Ένζυμα	Plasmin (fibrinolysin EC 3.4.21.7) (milk) ALP (alkaline phosphatase) (milk) Peroxidase (soybean, milk) PPO (polyphenoloxidase) (mushroom, apple, peach) Proteases PME (Pectinmethylesterase) (orange, tomato)	Lipoxygenase (soybean, pea) Glycose oxidase Lipase (milk, P. fluorescens) Lysozyme a-amylase

1.2.6 Δείκτης κυτταρικής διάρρηξης Z

Στο πλαίσιο των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων, ο όρος "δείκτης κυτταρικής διάρρηξης z" αναφέρεται στην αδιάστατη παράμετρο που αντιπροσωπεύει την έκταση της ηλεκτροδιάτρησης ή της διαπερατότητας της μεμβράνης. Ο αριθμός z είναι μία μέτρηση του αριθμού των πόρων που δημιουργούνται στην κυτταρική μεμβράνη ανά μονάδα επιφάνειας.

Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με ΠΗΠ, ηλεκτρικοί παλμοί υψηλής έντασης εφαρμόζονται στα κύτταρα, οδηγώντας στον σχηματισμό προσωρινών νανοπόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτοί οι νανοπόροι επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων, μορίων και άλλων ουσιών μέσω της μεμβράνης, κάτι που μπορεί να έχει διάφορες

επιπτώσεις στα κύτταρα, όπως κυτταρικό θάνατο ή αυξημένη πρόσληψη μορίων. Ο αριθμός z προσδιορίζεται τυπικά πειραματικά με μέτρηση της πρόσληψης ορισμένων μορίων από τα κύτταρα μετά από επεξεργασία με ΠΗΠ. Προσδιορίζει ποσοτικά το επίπεδο διαπερατότητας της μεμβράνης και μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες, όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, η διάρκεια του παλμού και τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής μεμβράνης. Μια υψηλότερη τιμή του αριθμού z υποδηλώνει μεγαλύτερο βαθμό διαπερατότητας της μεμβράνης, που σημαίνει ότι δημιουργούνται περισσότεροι πόροι στην κυτταρική μεμβράνη. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι υπερβολικά υψηλές τιμές του z μπορεί να οδηγήσουν σε μη αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση της μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο.

Ο αριθμός z είναι μια πολύτιμη παράμετρος στην έρευνα με ΠΗΠ, καθώς βοηθά στην κατανόηση και τη βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας για συγκεκριμένες εφαρμογές, όπως η μικροβιακή αδρανοποίηση, η γονιδιακή επιμόλυνση ή η βελτίωση της εκχύλισης ενδοκυτταρικών ενώσεων. Ελέγχοντας τις παραμέτρους του ηλεκτρικού πεδίου, οι ερευνητές μπορούν να διαμορφώσουν τον αριθμό z για να επιτύχουν το επιθυμητό αποτέλεσμα ελαχιστοποιώντας παράλληλα τις ανεπιθύμητες επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων.

Το μέγεθος αυτό ονομάστηκε δείκτης κυτταρικής διάρρηξης Z και ορίζεται ως ο λόγος των κατεστραμμένων κυττάρων λόγω των ΠΗΠ προς τον συνολικό αριθμό των κυττάρων. Ο δείκτης αυτό παίρνει τιμές από 0 έως 1. Για $z=0$ θεωρούμε ότι η κυτταρική μεμβράνη είναι άθικτη (ανεπεξέργαστο κύτταρο) και για $z=1$ θεωρούμε ότι η κυτταρική μεμβράνη είναι πλήρως διερρηγμένη.

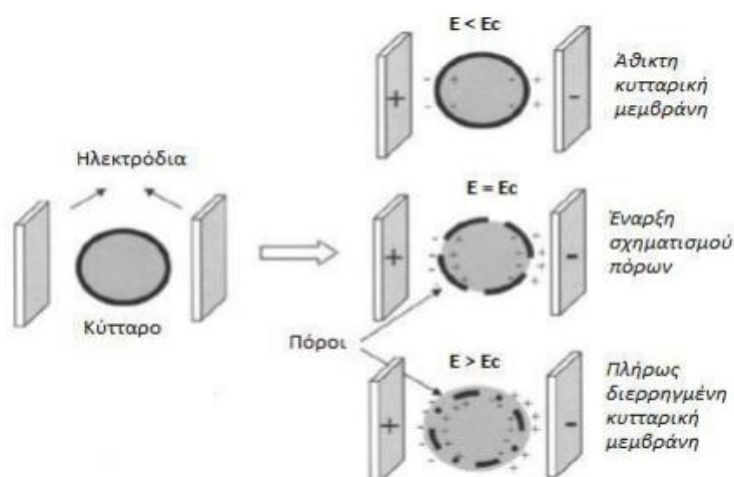
1.2.7 Επίδραση της τεχνολογίας ΠΗΠ στην κυτταρική μεμβράνη

Η χρήση της τεχνολογίας παλμικών ηλεκτρικών πεδίων σε εφαρμογές τροφίμων αποσκοπεί κυρίως στην αδρανοποίηση μικροοργανισμών και στην ενίσχυση της μεταφοράς μάζας μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας γνωστής ως ηλεκτροδιάτρησης, η οποία αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.

Η επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου σε ένα κύτταρο μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τέσσερα στάδια. Αρχικά, το διαμεμβρανικό δυναμικό του κυττάρου αυξάνεται λόγω του εφαρμοζόμενου εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Στη συνέχεια, αρχίζουν να σχηματίζονται μικροί υδρόφιλοι πόροι, οι οποίοι σταδιακά αυξάνονται τόσο σε μέγεθος όσο και σε αριθμό. Η έκθεση σε παλμούς υψηλής έντασης προκαλεί αποσταθεροποίηση της λιπιδικής διπλοστιβάδας και των πρωτεϊνών εντός της κυτταρικής μεμβράνης. Στο τελικό στάδιο, μπορεί να διαρρεύσουν ενδοκυτταρικές ουσίες από το κύτταρο ή να εισέλθουν εξωκυτταρικές ενώσεις. Σε αυτό το στάδιο, εάν η ηλεκτροδιάτρηση είναι αναστρέψιμη, οι πόροι θα κλείσουν και το κύτταρο θα επιστρέψει στην αρχική του κατάσταση. Ωστόσο, εάν η διαπερατότητα της μεμβράνης είναι πολύ υψηλή, το κύτταρο μπορεί να θανατωθεί.

Η αναστρεψιμότητα ή η μη αναστρέψιμη επίδραση του φαινομένου ηλεκτροδιάτρησης εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τον χρόνο επεξεργασίας και τον αριθμό των παλμών. Κάθε κύτταρο έχει μια κρίσιμη τιμή έντασης ηλεκτρικού πεδίου (E_c) πάνω από την οποία σπάει η κυτταρική μεμβράνη ή δημιουργούνται πόροι. Η πλήρης διάσπαση της μεμβράνης είναι απαραίτητη στην εφαρμογή των ΠΗΠ για αδρανοποίηση μικροοργανισμών. Αντίθετα, εάν η ένταση του πεδίου δεν είναι αρκετά υψηλή για να προκαλέσει μόνιμες αλλαγές, η κυτταρική μεμβράνη τείνει να επιστρέψει στην αρχική της κατάσταση. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται όταν οι τιμές της έντασης είναι κοντά στην κρίσιμη τιμή.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι θεωρίες που αναπτύχθηκαν για την ηλεκτροδιάτρηση βασίζονται σε πειραματικά αποτελέσματα σε απλά συστήματα. Ωστόσο, τα συστήματα τροφίμων είναι πιο περίπλοκα και η κατανομή του ηλεκτρικού πεδίου εξαρτάται από τις ηλεκτρικές ιδιότητες των συστατικών των τροφίμων, τη σύνθεσή τους και τις δομικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας με ΠΗΠ (Vorobiev and Lebonka, 2006).



Σχήμα 1.3: Στάδια διάρρηξης της κυτταρικής μεμβράνης ανάλογα με την εφαρμοζόμενη ένταση του ηλεκτρικού πεδίου

1.2.8 Εφαρμογή των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων στα τρόφιμα

1.2.8.1 Εφαρμογή των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων για την απενεργοποίηση μικροοργανισμών

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι μια μη θερμική τεχνολογία επεξεργασίας τροφίμων που έχει κερδίσει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια λόγω της ικανότητάς της να αδρανοποιεί αποτελεσματικά τους μικροοργανισμούς διατηρώντας παράλληλα την ποιότητα των προϊόντων διατροφής. Τα ΠΗΠ περιλαμβάνουν την εφαρμογή σύντομων, έντονων εκρήξεων ηλεκτρικής ενέργειας σε ένα δείγμα τροφής που τοποθετείται μεταξύ δύο ηλεκτροδίων. Οι ηλεκτρικοί

παλμοί δημιουργούν ένα ηλεκτρικό πεδίο που διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες των μικροοργανισμών, οδηγώντας στην αδρανοποίησή τους. Ο μηχανισμός που είναι γενικά αποδεκτός είναι η άμεση επίδραση του εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου πάνω στην κυτταρική μεμβράνη

Πιο αναλυτικά, ένας από τους κύριους μηχανισμούς με τους οποίους τα ΠΗΠ απενεργοποιούν τους μικροοργανισμούς είναι μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται ηλεκτροδιάτρηση (Electroporation). Η ηλεκτροδιάτρηση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αναφέρεται στην αναστρέψιμη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών λόγω της εφαρμογής ηλεκτρικού πεδίου. Όταν ένας μικροοργανισμός εκτίθεται στους ηλεκτρικούς παλμούς υψηλής έντασης των ΠΗΠ, το ηλεκτρικό πεδίο διαταράσσει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης, δημιουργώντας προσωρινούς πόρους ή νανοπόρους. Αυτοί οι νανοπόροι επιτρέπουν την εισροή ιόντων, μορίων και νερού στον μικροοργανισμό, προκαλώντας ανισορροπία και επακόλουθη κυτταρική δυσλειτουργία.

Αυτή η διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών από τα ΠΗΠ, οδηγεί στην απώλεια της επιλεκτικής διαπερατότητας. Απαραίτητα μόρια όπως το ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), που είναι ζωτικής σημασίας για τον μεταβολισμό της κυτταρικής ενέργειας, διαρρέουν από τον μικροοργανισμό. Αυτή η διαταραχή της ακεραιότητας της μεμβράνης βλάπτει περαιτέρω τις ζωτικές κυτταρικές διεργασίες, οδηγώντας τελικά σε μικροβιακή αδρανοποίηση.

Τα ΠΗΠ μπορεί επίσης να προκαλέσουν άμεση βλάβη στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένου του DNA και του RNA. Οι ηλεκτρικοί παλμοί υψηλής έντασης μπορούν να προκαλέσουν: σπασίματα στους κλώνους του DNA, διασταυρώσεις μορίων DNA και άλλες δομικές τροποποιήσεις. Αυτή η καταστροφή στο DNA αλλοιώνει την ικανότητα του μικροοργανισμού να αντιγράφεται, να μεταγράφει γενετικές πληροφορίες και να εκτελεί βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Κατά συνέπεια, οι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα ένζυμα, τα ΠΗΠ μπορεί να προκαλέσουν μετουσίωση και αδρανοποίηση αυτών των ενζύμων. Το ηλεκτρικό πεδίο υψηλής έντασης διαταράσσει την τρισδιάστατη δομή των ενζύμων, καθιστώντας τα μη λειτουργικά. Με τα βασικά τους ένζυμα απενεργοποιημένα, οι μικροοργανισμοί χάνουν την ικανότητα να πραγματοποιούν βασικές βιοχημικές αντιδράσεις που είναι απαραίτητες για την επιβίωσή τους.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι ακριβείς μηχανισμοί της μικροβιακής απενεργοποίησης στα ΠΗΠ μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού, τις ηλεκτρικές παραμέτρους που χρησιμοποιούνται και άλλους παράγοντες. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα των ΠΗΠ στη μικροβιακή απενεργοποίηση επηρεάζεται από παράγοντες λειτουργίας που αναλύθηκαν παραπάνω, όπως η διάρκεια του παλμού, η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, ο χρόνος επεξεργασίας και η θερμοκρασία.

Ιστορικά, η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας τα ΠΗΠ έχει μελετηθεί μέσω διαφόρων τεχνικών μικροσκοπίας, συμπεριλαμβανομένης της σάρωσης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Scanning Electron Microscopy, SEM) και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (Transmission Electron Microscopy, TEM) (Harrison, 1996; Pothakamury, 1995). Αυτές οι μελέτες έχουν αποδειχθεί πολύτιμες, καθώς δίνουν πληροφορίες για τις επιδράσεις των ΠΗΠ σε μικροοργανισμούς όπως ο *S. aureus* και ο *S. cerevisiae*. Κατά την εξέτασή τους οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί, τόσο οι επεξεργασμένοι όσο και οι μη επεξεργασμένοι, παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές. Οι επεξεργασμένοι μικροοργανισμοί εμφάνισαν πιο τραχιές επιφάνειες μεμβράνης και εμφάνισαν μικρά ανοίγματα στις μεμβράνες τους. Αυτό δείχνει ότι η επεξεργασία με ΠΗΠ οδηγεί σε δομικές αλλαγές στις μικροβιακές μεμβράνες. Επιπλέον, υπήρξαν ενδείξεις διαρροής ενδοκυτταρικού υλικού και μείωση του μεγέθους των κυττάρων, ενώ η πιο σημαντική παρατήρηση ήταν ότι στους επεξεργασμένους μικροοργανισμούς παρατηρήθηκε καταστροφή οργανιδίων και ιδιαίτερα των ριβοσωμάτων. Αυτή η καταστροφή των ριβοσωμάτων είναι ένα σημαντικό εύρημα, καθώς τα ριβοσώματα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη σύνθεση πρωτεϊνών εντός των κυττάρων. Η βλάβη ή η καταστροφή αυτών των βασικών κυτταρικών συστατικών συμβάλλει στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η καταστροφή ριβοσωμάτων και άλλων οργανιδίων είναι ο πρωτογενής μηχανισμός απενεργοποίησης μικροοργανισμών που προκαλείται από τα ΠΗΠ. Οι διασπαστικές επιδράσεις των ΠΗΠ στις κυτταρικές μεμβράνες δηλαδή η ηλεκτροδιάτρηση, που συμβάλλει στην κυτταρική δυσλειτουργία, χρησιμεύει ως δευτερογενής μηχανισμός στη διαδικασία απενεργοποίησης.

Αυτά τα ευρήματα αυτά, υπογραμμίζεται η πολύπλευρη επίδραση των ΠΗΠ στους μικροοργανισμούς, επηρεάζοντας τη δομική τους ακεραιότητα, το κυτταρικό περιεχόμενο και τα οργανίδια τους. Ο συνδυασμός διάσπασης της μεμβράνης, διαρροής ενδοκυτταρικού υλικού και καταστροφής ριβοσωμάτων οδηγεί τελικά στην απενεργοποίηση μικροοργανισμών, καθιστώντας τα ΠΗΠ μια αποτελεσματική τεχνολογία στην επεξεργασία και τη συντήρηση τροφίμων.

1.2.8.2 Εφαρμογή Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων για την ενίσχυση των φαινομένων μεταφοράς μάζας

Εκτός από την αποτελεσματικότητά στη μικροβιακή αδρανοποίηση και τον αντίκτυπό τους στη δραστηριότητα των ενζύμων, η εφαρμογή των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων προσφέρει μια εξαιρετικά αποτελεσματική και φιλική προς το περιβάλλον προεπεξεργασία για τα τρόφιμα και τα συστατικά τους (Guderjan et al., 2005). Η τεχνολογία των ΠΗΠ έχει τη δυνατότητα να υποστηρίξει και να ενισχύσει ένα ευρύ φάσμα διεργασιών που σχετίζονται με τη μεταφορά μάζας, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα κάθε διεργασίας. Συγκεκριμένα, η χρήση των ΠΗΠ μπορεί να ενισχύσει τη μεταφορά μάζας στα φυτικά κύτταρα αυξάνοντας τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών τους. Αυτό έχει ως στόχο τη σημαντική εξοικονόμηση

ενέργειας, τη βελτιωμένη απόδοση και τον μειωμένο χρόνο διεργασίας. Η αρχή της μεθόδου των ΠΗΠ στην ενίσχυση των φαινομένων μεταφοράς μάζας βασίζεται στη διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης των φυτικών ιστών, μέσω της εφαρμογής εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου. Όταν ένα φυτικό κύτταρο εκτίθεται σε ηλεκτρικό πεδίο, τα μόρια που υπάρχουν στην κυτταρική μεμβράνη διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους, μετατρέποντας αποτελεσματικά το κύτταρο σε δίπολο-πυκνωτή. Ξεπερνώντας ένα κρίσιμο όριο, συνήθως γύρω στο 1V διαμεμβρανικού δυναμικού, τα φορτισμένα μόρια δημιουργούν πόρους σε συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης. Αυτό το φαινόμενο αυξάνει σημαντικά τη διαπερατότητα της μεμβράνης, επιτρέποντας τη βελτιωμένη μεταφορά μάζας.

Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις, τα ΠΗΠ χρησιμοποιούνται ως προεπεξεργασία σε διάφορες διεργασίες, όπως στις διεργασίες της αφυδάτωσης, της ενυδάτωσης, της εκχύλισης και ανάκτησης ενδοκυτταρικών συστατικών, καθώς και της χυμοποίησης φρούτων και λαχανικών κτλ. Η βελτιστοποίηση αυτών των διεργασιών με την χρήση ΠΗΠ είναι αντικείμενο πρόσφατων ερευνών. Στην περίπτωση της ξήρανσης, πειράματα απέδειξαν ότι με την χρήση ΠΗΠ βελτιώνεται η απόδοσή της κατά 20-30% σε διάφορους φυτικούς ιστούς, όπως σε ιστούς καρότου (Rastogi et al., 1999) και μήλου (Ade-Omowaye et al., 2000), ενώ τέλος, η χρήση των ΠΗΠ μπορεί να βελτιώσει την χυμοποίηση φυτικών καρπών (Vorobiev and Lebonka, 2008).

1.2.9 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ΠΗΠ

Τα παλμικά ηλεκτρικά πεδία είναι μια τεχνολογία που έχει κερδίσει την προσοχή και την εφαρμογή σε διάφορους κλάδους λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων και των πιθανών πλεονεκτημάτων της. Ωστόσο, όπως κάθε τεχνολογία, τα ΠΗΠ έχουν επίσης και τα μειονεκτήματά τους.

Πλεονεκτήματα των ΠΗΠ:

- Μικροβιακή αδρανοποίηση: Τα ΠΗΠ είναι εξαιρετικά αποτελεσματικά στην αδρανοποίηση μικροοργανισμών όπως βακτήρια, ζυμομύκητες και μούχλα. Μπορεί να μειώσει σημαντικά τους μικροβιακούς πληθυσμούς στα τρόφιμα, βελτιώνοντας, έτσι, την ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής τους χωρίς την ανάγκη υπερβολικής θερμότητας ή χημικών πρόσθετων.
- Ελάχιστη Διατροφική Απώλεια: Τα ΠΗΠ έχουν το πλεονέκτημα της διατήρησης της διατροφικής ποιότητας των προϊόντων διατροφής. Σε αντίθεση με τις παραδοσιακές μεθόδους θερμικής επεξεργασίας, τα ΠΗΠ λειτουργούν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ελαχιστοποιώντας την υποβάθμιση των θρεπτικών συστατικών και διατηρώντας τις φυσικές γεύσεις, τα χρώματα και τις υφές των επεξεργασμένων τροφίμων.

- **Ενισχυμένη Εκχύλιση και Διαχωρισμός:** Μπορεί να ενισχύσει την εξαγωγή πολύτιμων ενώσεων από φυτικά υλικά, όπως χυμοί, έλαια και βιοενεργά συστατικά. Βελτιώνει τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας διαταράσσοντας τις κυτταρικές δομές, διευκολύνοντας την απελευθέρωση και την εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων. Τα ΠΗΠ μπορούν επίσης να βοηθήσουν στον διαχωρισμό των αιωρούμενων σωματιδίων, διευκολύνοντας τις επακόλουθες διαδικασίες διήθησης ή άλλων.
- **Ενεργειακή απόδοση:** Προσφέρει δυνατότητες εξοικονόμησης ενέργειας σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους θερμικής επεξεργασίας. Οι μικρότεροι χρόνοι επεξεργασίας και οι χαμηλότερες θερμοκρασίες λειτουργίας μπορούν να μειώσουν τη συνολική κατανάλωση ενέργειας, καθιστώντας τα ΠΗΠ πιο βιώσιμη επιλογή για την επεξεργασία τροφίμων.
- **Μεγαλύτερη διάρκεια ζωής:** Η επεξεργασία με ΠΗΠ μπορεί να παρατείνει τη διάρκεια ζωής των προϊόντων διατροφής μειώνοντας το μικροβιακό φορτίο και διατηρώντας την ποιότητα των επεξεργασμένων τροφίμων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λιγότερα απόβλητα τροφίμων και βελτιωμένη διαθεσιμότητα προϊόντων για τους καταναλωτές.

Μειονεκτήματα των ΠΗΠ:

- **Πολυπλοκότητα και κόστος εξοπλισμού:** Ο εξοπλισμός μπορεί να είναι περίπλοκος και δαπανηρός στην εγκατάσταση και τη συντήρηση. Η τεχνολογία απαιτεί εξειδικευμένες γεννήτριες, ηλεκτρόδια και συστήματα ελέγχου, τα οποία μπορεί να αποτελέσουν εμπόδιο στην υιοθέτησή της για εργασίες μικρής κλίμακας ή περιορισμένων πόρων.
- **Περιορισμένη γνώση των βέλτιστων παραμέτρων:** Οι βέλτιστες παράμετροι επεξεργασίας, όπως η διάρκεια, η συχνότητα και η ένταση του παλμού, μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος. Η επίτευξη των επιθυμητών αποτελεσμάτων απαιτεί ενδελεχή κατανόηση αυτών των παραμέτρων και η βελτιστοποίηση μπορεί να είναι μια χρονοβόρα και δύσκολη διαδικασία.
- **Η περιορισμένη διαθεσιμότητα αυτών των μονάδων στο εμπόριο:** Τα ΠΗΠ είναι μία καινούρια τεχνολογία με έναν αρκετά περίπλοκο εξοπλισμό, με αποτέλεσμα να υπάρχουν μόνο λίγες εταιρίες στο εμπόριο, οι οποίες να διαθέτουν αυτές τις μονάδες.
- **Περιορισμένο πεδίο εφαρμογής:** Τα ΠΗΠ είναι πιο αποτελεσματικό για υγρά ή ρευστά τρόφιμα, όπου οι ηλεκτρικοί παλμοί μπορούν να διεισδύσουν και

να θεραπεύσουν ολόκληρο τον όγκο. Η εφαρμογή του σε στερεά ή παχύρρευστα τρόφιμα είναι πιο δύσκολη λόγω του περιορισμένου βάθους διείσδυσης και των δυσκολιών στην εξασφάλιση ομοιόμορφης επεξεργασίας.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι για την συγκεκριμένη τεχνολογία υπάρχει μία συνεχής έρευνα και τεχνολογική πρόοδος, με στόχο τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας, της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας και της εφαρμογής τους σε διαφορετικούς κλάδους και τύπους προϊόντων.

1.2.10 Βιομηχανική εφαρμογή

Η τεχνολογία των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων έχει κάνει σημαντικές προόδους στη βιομηχανία των τροφίμων, προσφέροντας μια σειρά από οφέλη και εφαρμογές. Τα ΠΗΠ έχουν αναδειχθεί ως ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τη βελτίωση της αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας τροφίμων, τη βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων και την παράταση της διάρκειας ζωής.

Πιο συγκεκριμένα τα ΠΗΠ μπορούν να βρουν εφαρμογή στην επεξεργασία χυμών και ποτών. Υποβάλλοντας τα φρούτα και τα λαχανικά σε επεξεργασία με ΠΗΠ, οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται πιο διαπερατές, διευκολύνοντας την απελευθέρωση του χυμού και ενισχύοντας την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Οι χυμοί που έχουν υποστεί επεξεργασία με ΠΗΠ παρουσιάζουν βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως ενισχυμένη γεύση, άρωμα και χρώμα, ενώ διατηρούν και τη θρεπτική τους αξία. Η επεξεργασία με ΠΗΠ βοηθά επίσης στη διατήρηση των φρέσκων χυμών μειώνοντας το μικροβιακό φορτίο, επεκτείνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής τους χωρίς την ανάγκη υπερβολικής θερμότητας ή χημικών πρόσθετων.

Μία άλλη πολύ σημαντική εφαρμογή των ΠΗΠ στην βιομηχανία είναι η επεξεργασία του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα ΠΗΠ έχουν βρει εφαρμογή στη γαλακτοβιομηχανία για διάφορους σκοπούς. Στην επεξεργασία του γάλακτος, η επεξεργασία με ΠΗΠ, όπως και στους χυμούς, μπορεί να βοηθήσει στη μικροβιακή αδρανοποίηση, μειώνοντας την ανάγκη για παστερίωση σε υψηλή θερμοκρασία και διατηρώντας τα ποιοτικά και θρεπτικά χαρακτηριστικά του γάλακτος. Τα ΠΗΠ μπορεί επίσης να βελτιώσουν τις ιδιότητες ομογενοποίησης του γάλακτος, με αποτέλεσμα καλύτερη σταθερότητα γαλακτώματος και κρεμώδη υφή σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το τυρί, το γιαούρτι και το παγωτό.

Επιπρόσθετα, τα ΠΗΠ μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανικό επίπεδο για την επεξεργασία κρέατος. Η τεχνολογία των ΠΗΠ έχει χρησιμοποιηθεί στην επεξεργασία κρέατος για την ενίσχυση της τρυφερότητας. Η επεξεργασία με ΠΗΠ βοηθά στη διάσπαση των μυϊκών ινών και στη διάσπαση των συνδετικών ιστών, με αποτέλεσμα το κρέας να γίνεται πιο τρυφερό.

Πέρα από αυτά τα προϊόντα, η τεχνολογία των ΠΗΠ έχει βρει εφαρμογή και στη βιομηχανία της ζάχαρης, συγκεκριμένα στην εξαγωγή σακχαρόζης από

ζαχαρότευτλα. Υποβάλλοντας τα ζαχαρότευτλα σε επεξεργασία με ΠΗΠ, οι κυτταρικές μεμβράνες των ιστών των τεύτλων μπορούν να γίνουν πιο διαπερατές, επιτρέποντας πιο αποτελεσματική εκχύλιση σακχαρόζης κατά τα επόμενα στάδια επεξεργασίας. Αυτή η τεχνολογία έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε πειράματα εργαστηριακής και πιλοτικής κλίμακας, οδηγώντας στην ανάπτυξη βιομηχανικών πρωτοτύπων για την επεξεργασία ζαχαρότευτλων με χρήση ΠΗΠ.

Γενικότερα, στα περισσότερα τρόφιμα στη βιομηχανία τα ΠΗΠ χρησιμοποιούνται για να επιτευχθεί παράταση διατήρησης και της διάρκειας ζωής. Τα ΠΗΠ προσφέρουν μια μέθοδο μη θερμικής συντήρησης για διάφορα προϊόντα διατροφής, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής τους διατηρώντας παράλληλα την ποιότητά τους. Η επεξεργασία με ΠΗΠ μπορεί να απενεργοποιήσει αποτελεσματικά τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ζυμομυκήτων και των μούχλων, χωρίς την ανάγκη για υψηλές θερμοκρασίες ή χημικά συντηρητικά. Αυτό επιτρέπει την παραγωγή ελάχιστα επεξεργασμένων τροφίμων με βελτιωμένα ποιοτικά χαρακτηριστικά και παρατεταμένη διάρκεια ζωής. Επιπλέον πολύ σημαντική είναι και η απενεργοποίηση ενζύμων. Τα ΠΗΠ έχουν χρησιμοποιηθεί για την αδρανοποίηση των ενζύμων που υπάρχουν στα τρόφιμα. Ένζυμα, όπως η οξειδάση πολυφαινόλης στα φρούτα και τα λαχανικά, μπορεί να οδηγήσουν σε ενζυμικό μαύρισμα και υποβάθμιση της ποιότητας. Η επεξεργασία με ΠΗΠ μπορεί να βοηθήσει στην αδρανοποίηση αυτών των ενζύμων, διατηρώντας το χρώμα, την υφή και τη γεύση των προϊόντων διατροφής.

Κεφάλαιο 2: Είδη Μικροοργανισμών

2.1 Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση αλλοιώσεων στα τρόφιμα, οδηγώντας σε αλλοίωση και υποβάθμιση της ποιότητάς τους. Αυτοί οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν βακτήρια, ζυμομύκητες, μούχλα και ένζυμα που μπορούν να ευδοκιμήσουν σε διάφορα περιβάλλοντα τροφίμων και να συμβάλουν σε ανεπιθύμητες αλλαγές.

Τα βακτήρια αποτελούν την σημαντικότερη ομάδα, η οποία είναι υπεύθυνη για την αλλοίωση των τροφίμων. Μπορούν να προκαλέσουν δυσάρεστες γεύσεις, οσμές και αλλαγές υφής στα τρόφιμα. Μερικά κοινά βακτήρια που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα ανήκουν στα γένη των *Pseudomonas*, *Bacillus* και *Lactobacillus*. Τα *Pseudomonas spp.* είναι γνωστά για την ικανότητά τους να παράγουν ένζυμα που διασπούν πρωτεΐνες και λίπη, οδηγώντας σε αλλοίωση του κρέατος, των ψαριών και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Τα *Bacillus spp.* έχουν την ικανότητα να παράγουν σπόρια ανθεκτικά στη θερμότητα που μπορούν να επιβιώσουν στις διαδικασίες μαγειρέματος και να προκαλέσουν αλλοίωση στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα. Στο γένος αυτό ανήκει και ο μικροοργανισμός *Bacillus coagulans*, ο οποίος αποτελεί αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής. Τέλος, τα *Lactobacillus spp.* είναι βακτήρια γαλακτικού οξέος που μπορούν να ζυμώσουν τα σάκχαρα και να παράγουν οξέα, προκαλώντας ξινή γεύση στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση.

Η μαγιά είναι ένας άλλος τύπος μικροοργανισμών που μπορεί να αλλοιώσει τα τρόφιμα, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τις διαδικασίες ζύμωσης, όπως για την παραγωγή ψωμιού, μπίρας και κρασιού. Η μαγιά μετατρέπει τα σάκχαρα σε αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την υφή, τη γεύση και την εμφάνιση του τροφίμου. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη ζύμης μπορούν επίσης να προκαλέσουν αλλοίωση, οδηγώντας σε δυσάρεστες γεύσεις και παραγωγή αερίου στα τρόφιμα.

Οι μούχλες είναι μύκητες με μορφή νήματος που μπορούν να αναπτυχθούν σε διάφορες επιφάνειες τροφίμων, ιδιαίτερα κάτω από ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Παράγουν ορατά σπόρια και μπορούν να προκαλέσουν αποχρωματισμό, αλλαγές υφής και ανάπτυξη μυκοτοξινών. Τα κοινά είδη μούχλας που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα περιλαμβάνουν το *Aspergillus*, το *Penicillium* και το *Fusarium*. Αυτές οι μούχλες μπορούν να χαλάσουν τα φρούτα, τα δημητριακά, τους ξηρούς καρπούς και τα γαλακτοκομικά προϊόντα και μερικά από αυτά παράγουν μυκοτοξίνες που μπορεί να είναι επιβλαβείς εάν καταναλωθούν.



Εικόνα 2.1: Εμφάνιση μούχλας τύπου *Penicillium* σε εσπεριδοειδή

(Πηγή: <https://www.e-geoponoi.gr/index.php/mega-2/core-features-3/social-comments-6/2021-04-11-19-39-15>)

Τα ένζυμα, τέλος, είναι φυσικές ουσίες που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς και καταλύουν βιοχημικές αντιδράσεις. Μπορούν να υπάρχουν σε πρώτες ύλες τροφίμων ή να παράγονται από μικροοργανισμούς. Τα ένζυμα μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα τρόφιμα διασπώντας πολύπλοκα μόρια σε απλούστερες μορφές. Για παράδειγμα, ένζυμα όπως η αμυλάση μπορούν να διασπάσουν τα άμυλα σε σάκχαρα, οδηγώντας σε αλλαγές στην υφή και τη γλυκύτητα. Ένζυμα όπως η πρωτεάση μπορούν να διασπάσουν τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την τρυφερότητα και την υποβάθμιση της ποιότητας του κρέατος.

2.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία και μπορούν να προκαλέσουν πλήθος ασθενειών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν βακτήρια, ιούς, παράσιτα και μύκητες που έχουν τη δυνατότητα να μολύνουν διάφορα είδη τροφίμων σε όλα τα στάδια παραγωγής, επεξεργασίας, διανομής και παρασκευής.

Μία από τις πιο γνωστές ομάδες παθογόνων βακτηρίων είναι η σαλμονέλα, η οποία απαντάται συνήθως σε ωμά ή μισοψημένα πουλερικά, αυγά, κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα. Η λοίμωξη από σαλμονέλα μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα όπως διάρροια, κοιλιακές κράμπες, πυρετό και έμετο.

Ένα άλλο πασίγνωστο βακτήριο είναι το *Escherichia coli* (*E. coli*), ιδιαίτερα το στέλεχος *E. coli* O157:H7. Αυτό το στέλεχος παράγει τοξίνες που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες, ειδικά όταν καταναλώνεται μολυσμένος βοδινός κιμάς, μη παστεριωμένο γάλα, ωμά λαχανικά και μολυσμένο νερό. Η μόλυνση από *E. coli* μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα που κυμαίνονται από ήπια διάρροια έως απειλητικές για τη ζωή καταστάσεις όπως το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), το οποίο μπορεί να προκαλέσει νεφρική ανεπάρκεια.

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα άλλο σημαντικό παθογόνο βακτήριο που βρίσκεται σε διάφορα τρόφιμα, όπως τα έτοιμα προς κατανάλωση κρέατα, τα μαλακά τυριά και τα ωμά λαχανικά. Η λιστερίωση, η λοίμωξη που προκαλείται από αυτό το βακτήριο, προσβάλλει κυρίως έγκυες γυναίκες, νεογνά, ηλικιωμένους και άτομα με εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα. Μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα όπως πυρετό, μυϊκούς πόνους, ναυτία και, σε σοβαρές περιπτώσεις, μηνιγγίτιδα.

Εκτός από τα βακτήρια, ιοί όπως ο νοροϊός και ο ιός της ηπατίτιδας Α μπορούν επίσης να μολύνουν τα τρόφιμα και να προκαλέσουν ασθένειες, που είναι επιβλαβείς για την υγεία του ανθρώπου. Ο νοροϊός είναι εξαιρετικά μεταδοτικός και μεταδίδεται συνήθως μέσω μολυσμένων τροφίμων ή νερού. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν έμετο, διάρροια, ναυτία και πόνους στο στομάχι, ενώ ο συγκεκριμένος ιός έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί το συχνότερο αίτιο της ιογενούς γαστρεντερίτιδας. Ο ιός της ηπατίτιδας Α μεταδίδεται, επίσης, κυρίως μέσω μολυσμένων τροφίμων ή νερού και μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα όπως πυρετό, κόπωση, ίκτερο και κοιλιακό άλγος.

Τα παράσιτα, όπως το *Cryptosporidium*, το *Giardia* και το *Toxoplasma*, μπορούν επίσης να μολύνουν τα τρόφιμα και να προκαλέσουν λοιμώξεις. Αυτά τα παράσιτα εντοπίζονται συνήθως σε μολυσμένο νερό, άψητο κρέας και άπλυτα φρούτα και λαχανικά. Η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε συμπτώματα όπως διάρροια, κοιλιακό άλγος και συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη.

Τέλος, ορισμένοι μύκητες, όπως ο *Aspergillus* και το *Fusarium*, οι οποίοι όπως αναφέρθηκε στους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση μούχλας, μπορούν να παράγουν επιβλαβείς τοξίνες που ονομάζονται μυκοτοξίνες και μολύνουν τα δημητριακά, τους ξηρούς καρπούς και τα αποξηραμένα φρούτα. Η κατανάλωση τροφής μολυσμένης με μυκοτοξίνες μπορεί να οδηγήσει σε διάφορα προβλήματα υγείας, ανάλογα με τη συγκεκριμένη τοξίνη που εμπλέκεται.

Η πρόληψη της παρουσίας όχι μόνο των παθογόνων, αλλά και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων. Οι σωστές τεχνικές χειρισμού, αποθήκευσης και μαγειρέματος των τροφίμων, καθώς και η διατήρηση καλών πρακτικών υγιεινής, ο έλεγχος της θερμοκρασίας, του pH και των επιπέδων υγρασίας και η χρήση μεθόδων συντήρησης όπως η ψύξη, η παστερίωση και η αποστείρωση μπορούν να βοηθήσουν στην αναστολή της ανάπτυξης και της δραστηριότητας των μικροοργανισμών. Επιπλέον, η τακτική παρακολούθηση και ο έλεγχος των προϊόντων τροφίμων για μικροβιακή μόλυνση μπορεί να διασφαλίσει την έγκαιρη ανίχνευση και την πρόληψη ζητημάτων αλλοίωσης και επικίνδυνης για τους καταναλωτές μόλυνσης.

2.3 Bacillus Coagulans

2.3.1 Εισαγωγή

Η πρώτη αναφορά στο γένος *Bacillus* χρονολογείται το 1872 όταν ο Coehn περιέγραψε τα βακτήρια αυτού του γένους ως ικανά να παράγουν σπόρια και να είναι ανθεκτικά στη θερμότητα. Ο *Bacillus* ανήκει στο βασίλειο των βακίλων, το οποίο υπάγεται στο φύλο *Firmicutes*, στην κατηγορία *Bacilli*, στην τάξη *Bacillales* και στην οικογένεια *Bacillaceae* (Maughan et al., 2011). Οι βάκιλοι είναι θετικά κατά Gram βακτήρια που είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, με ορισμένα στελέχη να είναι αυστηρά αναερόβια (Vos et al., 2011). Το γένος *Bacillus* περιλαμβάνει συνολικά 284 γνωστά είδη (Parte, 2018), ένα από τα οποία είναι ο *B. coagulans*.

Ο *B. coagulans* αναφέρθηκε αρχικά το 1915 από τον Hammer, ο οποίος απομόνωσε τον οργανισμό από χαλασμένο κονσερβοποιημένο γάλα και τον αναγνώρισε ως ένα νέο είδος (Hammer, 1915; Nakamura et al., 1988). Στη συνέχεια, ανακαλύφθηκαν και ταυτοποιήθηκαν και άλλα στελέχη αυτού του μικροοργανισμού. Το 1933, οι Horowitz-Wlassowa και Nowotelnow αναγνώρισαν έναν μικροοργανισμό ως *Lactobacillus sporogenes*, ο οποίος αργότερα αναταξινομήθηκε ως *B. coagulans* λόγω των κοινών χαρακτηριστικών του με το *B. coagulans* (Muhammed et al., 2016). Μετά από μελέτη που διεξήχθη σε 90 στελέχη που αρχικά αναγνωρίστηκαν ως *Bacillus coagulans*, μόνο τα 52 στελέχη ταξινομήθηκαν τελικά ως το είδος (Nakamura et al., 1988).

2.3.2 Γενικά Χαρακτηριστικά

Ο *Bacillus coagulans* είναι ένα κατά Gram θετικό βακτήριο που παρουσιάζει προαιρετικές αναερόβιες ιδιότητες. Τα κύτταρα του μικροοργανισμού έχουν σχήμα ράβδου και μπορούν να βρεθούν ως μεμονωμένα κύτταρα, ζεύγη ή μικρές αλυσίδες, σχηματίζοντας πιο σπάνια νημάτια με ίσια ή καμπύλα, στρογγυλεμένα άκρα. Η διάμετρος αυτών των κυττάρων κυμαίνεται τυπικά από 0,6 έως 1,0 μm (De Clerck et al., 2004). Όντας μέλος του γένους *Bacillus*, ο *B. coagulans* είναι γνωστός για την ικανότητα παραγωγής σπορίων. Τα σπόρια έχουν σχήμα οβάλ ή κυλινδρικό, με λεπτά τοιχώματα και σποριαγγεία που δεν είναι διογκωμένα. Βρίσκονται είτε κεντρικά είτε τερματικά εντός του κελιού (Οικονόμου, 2005). Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ τα περισσότερα στελέχη του *B. coagulans* μπορούν να παράγουν εύκολα σπόρια, ορισμένα στελέχη μπορεί να έχουν μειωμένη ή περιορισμένη ικανότητα σχηματισμού σπορίων (De Clerck et al., 2004).

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός θεωρείται ένα οξυάντοχο και θερμόφιλο βακτήριο. Γενικά παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών για την ανάπτυξη του, επιτρέποντάς του να ευδοκιμήσει σε διάφορες συνθήκες. Είναι γνωστό ότι αναπτύσσεται εντός του εύρους θερμοκρασιών από περίπου 30°C έως 55°C (86°F έως 131°F). Ωστόσο, η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη του *Bacillus coagulans* τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 37°C και 50°C (98,6°F έως 122°F). Μέσα σε αυτό το εύρος θερμοκρασίας, το βακτήριο επιδεικνύει τον υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης και

μεταβολική του δραστηριότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι συγκεκριμένα στελέχη του *B. coagulans* μπορεί να έχουν μικρές διακυμάνσεις στις προτιμήσεις θερμοκρασίας τους, αλλά το συγκεκριμένο εύρος αντιπροσωπεύει τα γενικά χαρακτηριστικά του είδους. Όσον αφορά το pH, ο *B. coagulans* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται μέσα σε ένα σχετικά μεγάλο εύρος. Είναι γνωστό ότι ανέχεται και αναπτύσσεται σε συνθήκες pH που κυμαίνονται από pH 4 έως pH 9. Ωστόσο, το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη του *B. coagulans* τυπικά εμπίπτει στο ελαφρώς όξινο έως ουδέτερο εύρος pH 5,5 έως pH 7. Επιπλέον, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το ακριβές βέλτιστο pH για την ανάπτυξη μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο στέλεχος και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Κατά την ανάπτυξή του ο μικροοργανισμός σχηματίζει αποικίες λευκού χρώματος με λεία επιφάνεια, οι οποίες γίνονται κρεμ μετά το πέρας της ηλικίας του κυττάρου (De Clerck et al., 2004, Οικονόμου, 2005). Όπως αναφέρθηκε, ο *B. coagulans* είναι ένα ανθεκτικό βακτήριο, γεγονός που του επιτρέπει να επιβιώνει σε μη ευνοϊκό για την ανάπτυξη του περιβάλλον. Έτσι μπορεί να βρεθεί σε εξοπλισμό και σε μηχανήματα μεταποιητικών μονάδων, αφού τα σπόρια του μπορούν να προσκολληθούν σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα και να σχηματίσουν βιοϋμένια (Parkar et al., 2001). Προσκόλληση μπορεί να πραγματοποιηθεί επίσης και σε πλαστικές επιφάνειες υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Για παράδειγμα, ο *B. coagulans* έχει βρεθεί ότι έχει την μέγιστη ικανότητα να σχηματίζει βιοϋμένια σε θερμοκρασίες 37 και 45 °C και κατά την ύπαρξη γλυκόζης, σε ποσοστό από 1,25 μέχρι 5,25 % C (Elhariry, 2008). Αυτό το γεγονός είναι ικανό να προκαλέσει προβλήματα τόσο στην γραμμή παραγωγής, όσο και στο τελικό προϊόν.

Ο *Bacillus coagulans* έχει την ικανότητα να υδρολύει το άμυλο και την καζεΐνη. Η ανάπτυξή του υποστηρίζεται από διάφορες πηγές όπως η μαλτόζη, η ραφινόζη, η μαννιτόλη, η τρεαλόζη και η γλυκόζη (De Clerck et al., 2004). Μεταξύ αυτών των πηγών, η γλυκόζη χρησιμεύει ως η κύρια πηγή ενέργειας για τον μικροοργανισμό. Κατά τη ζύμωση, τα υποστρώματα αυτά μετατρέπονται σε οξέα, χωρίς την παραγωγή αερίου. Συγκεκριμένα, η ζύμωση γλυκόζης έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή L-γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος και αιθανόλης ως τα κύρια υποπροϊόντα (Zhou et al., 2013). Η ζύμωση διεξάγεται επίσης και σε άλλα σάκχαρα όπως πεντόζες (ριβόζη, ξυλόζη) και εξόζες (D-γαλακτόζη, D-φρουκτόζη), οδηγώντας στο γαλακτικό οξύ ως το πρωταρχικό προϊόν. Ωστόσο, η παραγωγή οξέος από τη ζύμωση λακτόζης μπορεί να ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του *B. coagulans* (De Clerck et al., 2004). Έχει παρατηρηθεί ότι διαφορετικά στελέχη παρουσιάζουν ποικίλες αντιδράσεις για τις πηγές ανάπτυξης, με αποτέλεσμα διαφορετικές αποδόσεις οξέος (Vos et al., 2011). Γενικά, ο *B. coagulans* θεωρείται ως ένας εξαιρετικός παραγωγός γαλακτικού οξέος λόγω των χαρακτηριστικών του, όπως αναφέρεται σε διάφορες μελέτες (Patel et al., 2006; Wang et al., 2013, 2015). Το γαλακτικό οξύ, μαζί με άλλα θερμοσταθερά ένζυμα και μεταβολίτες που παράγονται από τον *B. coagulans*, βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε βιομηχανίες όπως η επεξεργασία τροφίμων (Batra et al., 2002; Payot et al., 1999; Yoon et al., 2002), ενώ αναγνωρίζεται και για την

αντιμικροβιακή του δράση τόσο έναντι παθογόνων όσο και μη παθογόνων μικροοργανισμών (Stanojevic´-Nikolic et al., 2016).



Εικόνα 2.2:Μικροσκοπική απεικόνιση *Bacillus coagulans* Unique IS-2

(Πηγή:<https://www.optibacprobiotics.com/uk/professionals/probiotics-database/bacillus/bacillus-coagulans/bacillus-coagulans-unique-is-2>)

2.3.3 Αλλοιώσεις τροφίμων από τον *Bacillus coagulans*

Ο *Bacillus coagulans* είναι ένα βακτήριο γνωστό για την ικανότητά του να προκαλεί αλλοίωση των τροφίμων σε διάφορα προϊόντα. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός σχετίζεται με αλλοίωση σε θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα, καθώς και με όξινα περιβάλλοντα τροφίμων. Η επίδρασή του στην ποιότητα των τροφίμων είναι ιδιαίτερα αξιοσημείωτη σε προϊόντα με επίπεδα pH που κυμαίνονται από 4,0 έως 4,5 (Mallidis et al., 2007).

Ένας από τους τομείς όπου ο *B. coagulans* μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση είναι τα κονσερβοποιημένα φρούτα και λαχανικά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τα προϊόντα με βάση την ντομάτα. Τα κονσερβοποιημένα προϊόντα, παρά το γεγονός ότι υποβάλλονται σε θερμική επεξεργασία, μπορεί ακόμα να είναι ευάλωτα στην αλλοίωση από αυτό το βακτήριο. Η αλλοίωση αυτή αναφέρεται συνήθως ως "επίπεδη οξίνιση", καθώς δεν έχει τα συνήθη σημάδια αλλοίωσης όπως η παραγωγή αερίου ή η διόγκωση της συσκευασίας. Στην περίπτωση των γαλακτοκομικών προϊόντων, ο *B. coagulans* μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες αλλαγές. Το γάλα, για παράδειγμα, μπορεί να εμφανίζεται ως ενιαίο τυρόπηγμα λόγω της παρουσίας αυτού του βακτηρίου. Η αλλοίωση που προκαλείται από τον *B. coagulans* μπορεί επίσης να επηρεάσει άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα όπως το τυρί τύπου Ricotta, το γάλα βουβάλου και το παστεριωμένο ή το γάλα UHT (Cosentino et al., 1997, Shehata et al., 1983).

Τα προϊόντα τομάτας, επίσης, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στην αλλοίωση από τον *B. coagulans*. Η υψηλή οξύτητα αυτών των προϊόντων παρέχει ένα περιβάλλον που

ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Η αλλοίωση που προκαλείται από αυτό το βακτήριο μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστες γεύσεις, αλλαγές στην υφή και γενική φθορά του προϊόντος. Η διαδικασία αλλοίωσης από το *B. coagulans* περιλαμβάνει τη ζύμωση των σακχάρων που υπάρχουν στα τρόφιμα, οδηγώντας στην παραγωγή γαλακτικού οξέος ως μεταβολικού υποπροϊόντος. Αυτή η διαδικασία ζύμωσης έχει ως αποτέλεσμα την οξίνιση του τροφίμου, συμβάλλοντας στην αλλοίωση του. Η παρουσία γαλακτικού οξέος σε μεγάλες ποσότητες είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα της αλλοίωσης του *B. coagulans*.

Η κατανόηση της πιθανότητας αλλοίωσης από τον *B. coagulans* είναι ζωτικής σημασίας για τους παραγωγούς και τους μεταποιητές τροφίμων να εφαρμόσουν τα κατάλληλα προληπτικά μέτρα. Αυτό περιλαμβάνει τη διατήρηση αυστηρών πρακτικών υγιεινής, την εφαρμογή αποτελεσματικών θερμικών επεξεργασιών και την παρακολούθηση των επιπέδων pH για την αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού αυτού του βακτηρίου. Με την εφαρμογή αυτών των στρατηγικών, ο κίνδυνος αλλοίωσης των τροφίμων από τον *B. coagulans* μπορεί να ελαχιστοποιηθεί, διασφαλίζοντας την παραγωγή ασφαλών και υψηλής ποιότητας προϊόντων διατροφής για τους καταναλωτές.

2.4 Κινητική Ανάπτυξης Μικροοργανισμών

2.4.1 Στάδια Ανάπτυξης Μικροοργανισμών

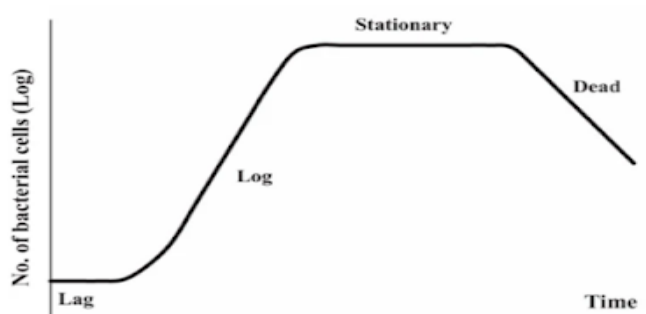
Τα στάδια από τα οποία περνάει ένας μικροοργανισμός κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του είναι κατά σειρά: η λανθάνουσα φάση, η εκθετική φάση η φάση στασιμότητας και τέλος η φάση θανάτου.

Λανθάνουσα φάση (Lag phase): Όταν οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο, συνήθως δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται φάση προσαρμογής. Αν και τα κύτταρα στην φάση αυτή δεν διαιρούνται και δεν υπάρχει καθαρή αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, συνθέτουν νέα συστατικά. Το στάδιο αυτό πριν την έναρξη της διαδικασίας διαίρεσης των κυττάρων είναι απαραίτητο για διάφορους λόγους, όπως για παράδειγμα η προσαρμογή στην διαφορετική σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, η ανάγκη ανάπτυξης ενζύμων για τον μεταβολισμό των θρεπτικών κλπ. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, εξαρτάται από την «κατάσταση» στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, την φύση και την θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου κλπ.

Εκθετική φάση (Exponential phase): Η εκθετική φάση είναι το μόνο τμήμα του κύκλου αύξησης το οποίο μπορεί να περιγραφεί με τις βασικές εξισώσεις αύξησης. Συχνά η αύξηση στη φάση αυτή αναφέρεται ως ισορροπημένη αύξηση, επειδή όλες οι βιολογικές πορείες που επηρεάζουν την παραγωγή της βιομάζας αυξάνονται με τον ίδιο ρυθμό.

Φάση Στασιμότητας (Stationary phase): Στη φάση όπου ο πληθυσμός είναι μέγιστος, γνωστή ως φάση στασιμότητας, ο πληθυσμός παραμένει μεταβολικά ενεργός αν και η ενεργή αύξηση έχει παύσει, διατηρώντας τη δυνατότητα να συνεχίσει την αύξηση η οποία θα συνέβαινε, αν νέες ευνοϊκές συνθήκες αύξησης μπορούσαν να δημιουργηθούν.

Φάση θανάτου (Death phase): Στη διάρκεια της φάσης θανάτου η βιωσιμότητα ελαττώνεται. Ο θάνατος του μικροβιακού πληθυσμού όπως και η αύξησή του ακολουθεί το εκθετικό πρότυπο, δηλαδή συγκεκριμένη ποσότητα κυττάρων πεθαίνει κάθε ώρα. Ο μοναδικός τρόπος ελέγχου της βιωσιμότητας ενός κυττάρου είναι η επώασή του σε νέο θρεπτικό υλικό και η παρατήρηση της παραγωγής ή όχι νέου πληθυσμού.



Σχήμα 2.1: Στάδια ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού

2.4.2 Εμπειρικές εξισώσεις για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης

Έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες εμπειρικές μαθηματικές εξισώσεις για να περιγράψουν τη σιγμοειδή καμπύλη ανάπτυξης, περιγράφοντας την ανάπτυξη των μικροβιακών καλλιεργειών υπό σταθερές συνθήκες. Το αξιοσημείωτο πλεονέκτημα αυτών των εξισώσεων έγκειται στη συμβατότητά τους με τεχνικές μη γραμμικής παλινδρόμησης, επιτρέποντας τον προσδιορισμό της βέλτιστης καμπύλης που αντιστοιχεί στα πειραματικά δεδομένα, διατηρώντας παράλληλα την ευκολία της να αναπαραχθεί. Αυτές οι εξισώσεις διευκολύνουν την εκτίμηση της διάρκειας λανθάνουσας φάσης και του ρυθμού ανάπτυξης εντός των πειραματικών παραμέτρων, προσαρμόζοντας τις προβλέψεις στα μοναδικά χαρακτηριστικά κάθε συστήματος. Εν συνέχεια εξετάζονται δύο από τις εκφράσεις που έχουν παρουσιαστεί στη βιβλιογραφία και έχουν καθιερωθεί ως εμπειρικές εξισώσεις (Εξίσωση Monod, Συνάρτηση Gompertz), που η απλότητα στην εφαρμογή τους και η ακρίβεια των αποτελεσμάτων που προσφέρουν, αποτελούν τα χρησιμότερα εργαλεία για την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης.

2.4.2.1 Εκθετική εξίσωση (Εξίσωση Monod)

Η μεθοδολογία του Monod (1949) για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης έχει τεράστια επιστημονική και ιστορική σημασία. Σε αυτή την προσέγγιση, ο ρυθμός ανάπτυξης αναπαρίσταται μέσω της ακόλουθης σχέσης (McDonald & Sun, 1999):

$$N_t = N_0 \cdot e^{k \cdot t}$$

όπου N_t η πυκνότητα των κυττάρων (κυτταρική πυκνότητα) τη χρονική στιγμή t (CFU/mL), N_0 η πυκνότητα των κυττάρων σε χρόνο $t=0$ (CFU/mL), k ειδική σταθερά του ρυθμού ανάπτυξης (h^{-1}), t ο χρόνος (h).

Ωστόσο, παρά την ιστορική της σημασία και τον ρόλο της ως πρόδρομος των μεταγενέστερων σιγμοειδών συναρτήσεων, αυτή η σχέση έχει χάσει την πρακτική εφαρμογή της στη σύγχρονη εποχή. Σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί ότι δεν έχει την ικανότητα να εκφράσει τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης μέσω της μορφής της εξίσωσής του, κάτι που απαιτεί τον προσδιορισμό της αποκλειστικά από πειραματικά δεδομένα (McDonald & Sun, 1999). Ωστόσο, η αρχική αναπαράσταση του ρυθμού ανάπτυξης μέσω της σταθερής αναλογίας k σηματοδότησε την έναρξη πιο ολοκληρωμένων εξισώσεων, που αποτελούν το θεμέλιο της ανάπτυξης της προορρητικής μικροβιολογίας.

2.4.2.2 Συνάρτηση Gompertz

Η συνάρτηση Gompertz αρχικά αναπτύχθηκε για να περιγραφούν τα δεδομένα θνησιμότητας ανθρώπων (Gompertz, 1825). Στη συνάρτηση ισχύει μια εκθετική σχέση μεταξύ του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και της πυκνότητας του πληθυσμού. Μια από τις αρχικές παραμετροποιήσεις αυτής της εξίσωσης που παρουσιάστηκε στη βιβλιογραφία έχει τη μορφή (McMeekin et al., 1993):

$$N_t = C_{GL} \cdot \exp \{ \exp (-B_G \cdot (t - M)) \}$$

όπου B_G ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σε χρόνο $t=M$ (h^{-1}).

Για την εξίσωση Gompertz διατυπώθηκε μια ανάλογη τροποποιημένη μορφή. Στη νέα αυτή έκφραση, εξαρτημένη μεταβλητή αποτέλεσε ο λογάριθμος της πυκνότητας του πληθυσμού, ενώ επιπλέον προστέθηκε ένας όρος, ώστε να εκφραστεί και σε αυτή την περίπτωση η φάση υστέρησης. Η μορφή της “τροποποιημένης εξίσωσης Gompertz” έχει ως εξής:

$$\log N_t = A + C \cdot \exp \{ \exp (-B \cdot (t - M)) \}$$

Η βασικότερη διαφορά μεταξύ της εξίσωσης Gompertz με άλλες συναρτήσεις είναι ότι αυτή δεν είναι συμμετρική γύρω από το σημείο καμπής της και δεν παρουσιάζει συμμετρία. Ωστόσο, εξαιτίας της μη συμμετρικότητάς της, η συνάρτηση Gompertz απαιτεί την ύπαρξη περισσότερων σημείων στην καμπύλη ανάπτυξης (Skinner et al., 1994). Αφού κατασκευαστεί η καμπύλη ανάπτυξης, βάσει των παραπάνω εξισώσεων, προκύπτουν οι κινητικές παράμετροι που διέπουν την ανάπτυξη μιας καλλιέργειας μικροοργανισμών, όπως ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης, ο χρόνος διπλασιασμού και

ο χρόνος υστέρησης. Οι τιμές αυτές για την τροποποιημένη εξίσωση Gompertz, συνοψίζονται στον Πίνακα (Willocx et al., 1993).

Πίνακας 2.2: Κινητικές παράμετροι εξίσωσης Gompertz

Παράμετρος	Συνάρτηση Gompertz
Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης	$\mu_{\max} = \frac{B \cdot C}{\exp(1)}$
Χρόνος υστέρησης	$\lambda = M - \frac{1}{B}$
Χρόνος αναπαραγωγής (t=M)	$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\exp(1) \cdot \log(2)}{B \cdot C}$
Μέγιστη πυκνότητα πληθυσμού	$N_{\max} = A + C$

Κεφάλαιο 3: Ιδιότητες και χαρακτηριστικά καρότου και ροδάκινου

3.1 Καρότο

Τα καρότα (*Daucus carota*) είναι λαχανικά ρίζας γνωστά για το έντονο πορτοκαλί χρώμα και την τραγανή υφή. Η χημική σύνθεση των καρότων χαρακτηρίζεται από μια ποικιλία ενώσεων που συμβάλλουν στη διατροφική τους αξία και τις μοναδικές αισθητηριακές τους ιδιότητες.



Εικόνα 3.1: Ρίζες Καρότου

Τα καρότα είναι πλούσια σε υδατάνθρακες, που αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του ξηρού βάρους τους. Αυτοί οι υδατάνθρακες υπάρχουν κυρίως με τη μορφή σακχάρων, με τη σακχαρόζη, τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη να είναι οι κύριοι τύποι που υπάρχουν. Η γλυκύτητα των καρότων μπορεί να αποδοθεί στα φυσικά σάκχαρα που περιέχουν.

Μία από τις βασικές ενώσεις στα καρότα είναι οι διαιτητικές ίνες. Τα καρότα περιέχουν τόσο αδιάλυτες όσο και διαλυτές φυτικές ίνες, με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη να είναι οι κύριες αδιάλυτες ίνες, ενώ οι πηκτίνες συμβάλλουν στην περιεκτικότητα σε διαλυτές ίνες. Οι διαιτητικές ίνες είναι σημαντικές για την υγεία του πεπτικού συστήματος, προάγοντας τις τακτικές κινήσεις του εντέρου και παρέχοντας ένα αίσθημα πληρότητας.

Τα καρότα είναι επίσης άφθονα σε βιταμίνες και μέταλλα. Αποτελούν εξαιρετική πηγή καροτενοειδών προβιταμίνης Α, ιδιαίτερα βήτα-καροτίνης, που δίνει στα καρότα το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα τους. Η βήτα-καροτίνη μετατρέπεται σε βιταμίνη Α στο σώμα και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της υγιούς όρασης, την υποστήριξη της λειτουργίας του ανοσοποιητικού και την προαγωγή της υγείας του δέρματος. Εκτός από τη βιταμίνη Α, τα καρότα περιέχουν μικρές ποσότητες άλλων βιταμινών όπως βιταμίνη C, βιταμίνη Κ, βιταμίνη Ε και αρκετές βιταμίνες Β, συμπεριλαμβανομένου του φυλλικού οξέος. Αυτές οι βιταμίνες παίζουν διάφορους ρόλους στο σώμα, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής δράσης, της σύνθεσης κολλαγόνου, της ρύθμισης της πήξης του αίματος και του ενεργειακού μεταβολισμού.

Τα καρότα παρέχουν επίσης μια σειρά από μέταλλα, όπως κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο και φώσφορο. Αυτά τα μέταλλα είναι σημαντικά για τη διατήρηση της σωστής ισορροπίας των υγρών, την υποστήριξη της λειτουργίας των νεύρων, την προώθηση της υγείας των οστών και τη συμμετοχή σε πολυάριθμες ενζυμικές αντιδράσεις μέσα στο σώμα. Επιπλέον, τα καρότα περιέχουν φυτοχημικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων πολυφαινολών και καροτενοειδών, που διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Αυτές οι ενώσεις βοηθούν στην προστασία των κυττάρων από την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες και

μπορεί να προσφέρουν πιθανά οφέλη για την υγεία, όπως η μείωση του κινδύνου χρόνιων ασθενειών.

Η γεύση των καρότων επηρεάζεται από έναν συνδυασμό ενώσεων. Οι κύριες πτητικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για το χαρακτηριστικό τους άρωμα περιλαμβάνουν τερπένια, όπως το άλφα-πινένιο και το βήτα-πινένιο. Αυτές οι πτητικές ενώσεις συμβάλλουν στο ευχάριστο άρωμα και το άρωμα των καρότων.

Τα καρότα είναι γνωστό ότι έχουν pH που κυμαίνεται από 5,8 έως 6,0, υποδηλώνοντας μια ελαφρώς όξινη φύση. Η οξύτητα αποδίδεται κυρίως στην παρουσία οργανικών οξέων, όπως το κιτρικό οξύ και το μηλικό οξύ. Αυτά τα οξέα συμβάλλουν στο γενικό γευστικό προφίλ του χυμού καρότου, παρέχοντας μια λεπτή πικρία και ενισχύοντας τη γευστική αίσθηση.

3.2 Ροδάκινο

Τα ροδάκινα (*Prunus persica*) είναι νόστιμα και ζουμερά φρούτα γνωστά για τη γλυκιά και αρωματική τους γεύση. Η χημική σύνθεση των ροδάκινων συμβάλλει στη μοναδική γεύση και διατροφικό τους προφίλ.



Εικόνα 3.2: Καρπός Ροδάκινου

Το κύριο συστατικό των ροδάκινων είναι το νερό, το οποίο αποτελεί σημαντικό μέρος του βάρους τους. Ωστόσο, τα ροδάκινα περιέχουν επίσης διάφορες οργανικές ενώσεις, όπως υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα και φυτοχημικά. Οι υδατάνθρακες είναι η κύρια πηγή ενέργειας στα ροδάκινα. Τα κύρια σάκχαρα που περιέχουν είναι η φρουκτόζη, η γλυκόζη και η σακχαρόζη. Αυτά τα σάκχαρα παρέχουν τη χαρακτηριστική γλυκύτητα του φρούτου.

Τα ροδάκινα περιέχουν επίσης διαιτητικές ίνες, όπως και τα καρότα, οι οποίες αποτελούνται τόσο από διαλυτές όσο και από αδιάλυτες ίνες. Η περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες συμβάλλει στη βελτίωση της πεπτικής υγείας και βοηθά στη ρύθμιση των κινήσεων του εντέρου. Τα οργανικά οξέα από την άλλη, παίζουν καθοριστικό ρόλο στο γευστικό προφίλ των ροδάκινων. Το μηλικό οξύ είναι το κυρίαρχο οργανικό οξύ που βρίσκεται στα ροδάκινα, συμβάλλοντας στην πικάντικη και ελαφρώς ξινή γεύση τους. Άλλα οργανικά οξέα που υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες περιλαμβάνουν το κιτρικό οξύ και το τρυγικό οξύ. Αυτά τα οργανικά οξέα ρυθμίζουν και την οξύτητα και τα επίπεδα pH των συγκεκριμένων φρούτων τα οποία κυμαίνονται σε εύρος περίπου 3,3 έως 4,0, υποδηλώνοντας μια μέτρια όξινη φύση.

Όσον αφορά την περιεκτικότητα τους σε βιταμίνες, είναι ιδιαίτερα πλούσια σε βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η οποία δρα ως αντιοξειδωτικό και παίζει ζωτικό ρόλο στην υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος και της σύνθεσης κολλαγόνου. Τα ροδάκινα περιέχουν επίσης μικρές ποσότητες άλλων βιταμινών, όπως βιταμίνη A, βιταμίνη E και αρκετές βιταμίνες του συμπλέγματος B.

Εκτός από υδατάνθρακες, οργανικά οξέα, βιταμίνες και μέταλλα, τα ροδάκινα περιέχουν φυτοχημικά. Αυτές είναι φυσικές βιοδραστικές ενώσεις που συμβάλλουν στο έντονο χρώμα του καρπού και στα πιθανά οφέλη για την υγεία. Τα ροδάκινα είναι πλούσια σε καροτενοειδή, συμπεριλαμβανομένης της β-καροτίνης, η οποία δρα ως πρόδρομος της βιταμίνης Α και έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Άλλα φυτοχημικά που βρίσκονται στα ροδάκινα περιλαμβάνουν φλαβονοειδή, φαινολικές ενώσεις και ανθοκυανίνες, οι οποίες σχετίζονται με διάφορες επιδράσεις που προάγουν την υγεία. Οι πτητικές ενώσεις στα ροδάκινα που συμβάλλουν στο ξεχωριστό άρωμά τους είναι οι εστέρες, οι αλδεΐδες και οι κετόνες.

Κεφάλαιο 4: Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Εισαγωγή – Στόχος

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η κινητική ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του. Έπειτα, έγινε πλήρες κινητικό πείραμα θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *B. coagulans* σε πρότυπα διαλύματα με pH από 4,5 έως 6,5. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας των Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων (ΠΗΠ) καθώς και η χρήση ήπιας προθέρμανσης πριν την επεξεργασία με ΠΗΠ στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού *B. coagulans* στα πρότυπα διαλύματα των διαφόρων pH. Τέλος, έγινε σύγκριση της εφαρμογής των ΠΗΠ με την θερμική επεξεργασία στις βέλτιστες συνθήκες απενεργοποίησης του μικροοργανισμού σε πουρέ ροδάκινου με pH=4,5 και σε χυμό καρότου με pH=6,0.

4.2 Πρώτες ύλες

Η παραλαβή, η συντήρηση αλλά και η επεξεργασία του μικροοργανισμού *B. coagulans* αποτελούσε το πιο σημαντικό και ταυτόχρονα το πιο απαιτητικό κομμάτι των πειραμάτων. Η παραλαβή του *B. coagulans* έγινε από την βιβλιοθήκη του μικροβιολογικού εργαστηρίου στο Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων του Ελληνικού Γεωργικού Οργανισμού «ΔΗΜΗΤΡΑ» και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -18°C.

4.3 Πειραματικός Σχεδιασμός

4.3.1: 1^ο μέρος – Καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμού *Bacillus coagulans*

Στο πρώτο μέρος της πειραματικής διαδικασίας μελετήθηκε η κινητική ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του. Ο μικροοργανισμός για να αποκτήσει κατάλληλο φορτίο για τα περαιτέρω πειράματα απενεργοποίησης του, έγινε εμβολιασμός σε διάλυμα BHI broth (Brain Heart Infusion) όπου παρέμεινε στους 55 °C (βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης) για 48 h (1^η γενιά). Στο τέλος των 48 h, δείγμα από την καλλιέργεια εμβολιάστηκε εκ νέου σε νέο διάλυμα BHI broth όπου παρέμεινε για 24 h στους 48 °C (2^η γενιά). Στο τέλος των 24 h, δείγμα από την καλλιέργεια εμβολιάστηκε εκ νέου σε νέο διάλυμα BHI broth όπου παρέμεινε για ακόμη 24 h στους 48 °C (3^η γενιά). Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλαμβανόταν με 3 συνεχείς



Εικόνα 4.2: Διάλυμα B. coagulans σε BHI broth

ανανεώσεις ώστε το φορτίο του μικροοργανισμού να παραμείνει ισχυρό και ίδιο για τα περαιτέρω πειράματα.

Για την κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού, χρειάστηκε σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα ανά 3 ώρες να παραλαμβάνεται δείγμα από την καλλιέργεια (από την 3^η ανανέωση – γενιά) και να προσδιορίζεται το μικροβιακό του φορτίο. Η ανάπτυξη του στελέχους του *B. Coagulans* πραγματοποιήθηκε σε τριβλύα σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα BHI Agar (Biolife, Italy) υπό αναερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία 37 °C για δύο μέρες επώασης. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού συσχετίστηκε επίσης με την αύξηση της απορρόφησης, A, στα 600 nm. Τα βακτήρια λαμβάνονταν για περαιτέρω πειράματα στο τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους (περίπου 10⁸ cfu/g, με αντίστοιχη απορρόφηση A_{600nm}≈1,8). Ένα οπτικό δείγμα για το αν έχει αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός αποτελούσε η θολότητα, καθώς το διάλυμα broth αρχικά ήταν διαυγές και όταν ο μικροοργανισμός αναπτυσσόταν γινόταν θολό, όπως στην εικόνα 4.1.

4.3.2: 2^ο μέρος – Εύρεση βέλτιστου pH ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans*

Για την μελέτη της εξάρτησης του *B. coagulans* με το pH χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα με pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 και 7.0. Για την παρασκευή αυτών των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια Sodium citrate και citric acid monohydrate. Πιο συγκεκριμένα, τα δύο αντιδραστήρια διαλύονταν σε 100 ml απιονισμένου νερού και από το Sodium citrate παρασκευαζόταν ένα βασικό διάλυμα, ενώ από citric acid monohydrate το αντίστοιχο όξινο. Ύστερα, με την ανάμειξη της κατάλληλης ποσότητας των δύο διαλυμάτων, παρασκευάζονταν τα ρυθμιστικά διαλύματα των 50ml με pH από 4,0 έως 7,0.



Εικόνα 4.3: Πρότυπο διάλυμα pH=6,0 με εμβολιασμένο *B. coagulans*

Στην συνέχεια, αφού είχαν παρασκευαστεί τα ρυθμιστικά διαλύματα με το κατάλληλο pH, έπρεπε να γίνει ο εμβολιασμός του *B. coagulans* σε αυτά τα διαλύματα. Για να συμβεί αυτό, έπρεπε να απομονωθεί ο μικροοργανισμός από το BHI broth στο οποίο είχε αναπτυχθεί μέσω φυγοκέντρησης. Έτσι, λάμβαναν χώρα διαδοχικά 3 φυγοκεντρίσεις, όπου στην πρώτη αφαιρούνταν το broth και στην



Εικόνα 4.4: Διαχωρισμός του *B. coagulans* με το BHI broth μετά τη φυγοκέντριση

συνέχεια γινόντουσαν δύο εκπλύσεις με αποστειρωμένο Ringer, ώστε να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του broth από τον μικροοργανισμό. Για αυτή την διαδικασία ήταν αναγκαίο να ζυγιστούν δύο ισόποσα διαλύματα σε σωληνάρια κωνικά τύπου Falcon, ώστε μπορέσουν να μπουν στην φυγόκεντρο αντιδιαμετρικά και να λειτουργήσει. Έπειτα, αφού είχε απομονωθεί ο μικροοργανισμός, γινόταν ανάμειξη με το αντίστοιχο ρυθμιστικό και παρασκευαζόταν το πρότυπο διάλυμα (Εικόνα 4.2). Στην συνέχεια, τα διαλύματα που είχαν εμβολιαστεί με τον μικροοργανισμό επώαζονταν στις βέλτιστες συνθήκες έως την εκθετική φάση όπου και προσδιοριζόταν το μικροβιακό φορτίο. Τα εύρη pH που αναπτύχθηκε ο μικροοργανισμός ήταν από 4,5 έως και 6,5.

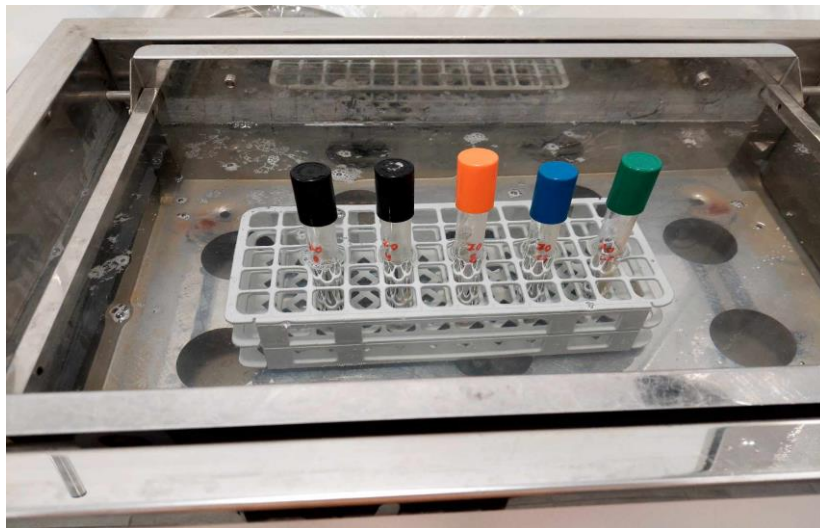


Εικόνα 4.5: Φυγοκέντριση των δειγμάτων στις κατάλληλες συνθήκες

4.3.3: 3^ο μέρος – Κινητική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε πρότυπα διαλύματα

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε πρότυπα διαλύματα με pH από 4,5 έως 6,5. Για την θερμική απενεργοποίηση του *B. coagulans* χρησιμοποιήθηκε ένα υδατόλουτρο τύπου WB/OB 7-45, MEMMERT (GmbH & Co. KG, Schwabach, Germany) (Εικόνα 4.5). Τα δείγματα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα σωληνάκια και παρέμεναν στο υδατόλουτρο για χρόνους από 0 έως 20 min, ενώ έγιναν και κάποια δοκιμαστικά πειράματα για την αντοχή του μικροοργανισμού σε ακραίους χρόνους

μέχρι 45 min. Οι θερμοκρασίες οι οποίες εφαρμόστηκαν, ήταν 60, 70, 80 και 90 °C αντίστοιχα. Όταν τα δείγματα έβγαιναν από το υδατόλουτρο, έμπαιναν αμέσως σε παγωμένο νερό για να κρυώσουν και εν συνεχεία ακολουθούσε η μικροβιολογική ανάλυση. Η διαδικασία αυτή ακολουθήθηκε για όλα τα πρότυπα διαλύματα.



Εικόνα 4.5: Παραμονή δειγμάτων μέσα στο υδατόλουτρο

4.3.4: 4^ο μέρος – Κινητική μελέτη της απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε πρότυπα διαλύματα

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη της απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε πρότυπα διαλύματα με ή χωρίς ήπια προθέρμανση. Τα πειράματα των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων διεξήχθησαν σε μία πιλοτικής κλίμακας μονάδα (Elcrack-5kW, DIL, Quakenbrück, Γερμανία) (Εικόνα 4.7). Αποτελείται από μία γεννήτρια παλμών και ένα σύστημα χειρισμού υγρών που λειτουργεί αυτόνομα. Όλα τα δείγματα (πρότυπα διαλύματα, πουρές ροδάκινο και χυμός καρότο), επεξεργάστηκαν μέσα σε πρότυπες κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης με σταθερή απόσταση ηλεκτροδίων 2 mm και 4 mm (Εικόνα 4.6).



Εικόνα 4.6: Κυψελίδες ηλεκτροδιάτρησης απόστασης ηλεκτροδίων 0.2-1 cm



Εικόνα 4.7: Η μονάδα επεξεργασίας ΠΗΠ ELCRACK-5kW του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ

Σχετικά με την διαδικασία της διεργασίας, αρχικά τοποθετούνταν η κατάλληλη ποσότητα υγρού μέσα στις κυψελίδες (800 μl στην κυψελίδα των 4 mm και 400 μl στην κυψελίδα των 2 mm). Η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου ήταν 11, 15 και 20 kV/cm. Ο αριθμός των παλμών κυμαινόταν από 25 έως 8000, το πλάτος του παλμού ήταν 15 μs και η συχνότητα ήταν ίση με 20 Hz. Το σχήμα του παλμού ήταν διπολικό και σχεδόν τετραγωνικό.

Στην συνέχεια, η κυψελίδα τοποθετούνταν στον θάλαμο επεξεργασίας και έχοντας ρυθμιστεί όλες οι παραπάνω παράμετροι, ξεκίναγε η επεξεργασία. Αμέσως μετά την επεξεργασία με ΠΗΠ, οι κυψελίδες ψύχονταν σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία κοντά στους 5°C και τέλος τα δείγματα αποθηκεύονταν σε αποστειρωμένα σωληνάκια, ώστε να ακολουθήσει η κατάλληλη μικροβιολογική ανάλυση.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε χρήση των ΠΗΠ σε συνδυασμό με προθέρμανση. Οι θερμοκρασίες που εφαρμόστηκαν ήταν 50 και 60 °C. Ως προς την διαδικασία, αρχικά ρυθμίστηκε ένας παστεριωτήρας στην θερμοκρασία την οποία θέλαμε να γίνει η προθέρμανση. Οι κυψελίδες οι οποίες εμπειρεύσαν το δείγμα παρέμεναν στον παστεριωτήρα μέχρι την στιγμή που το δείγμα έφτανε τους 50 και 60 °C και στην συνέχεια τοποθετούνταν απευθείας στον θάλαμο επεξεργασίας των ΠΗΠ. Έπειτα, αφού είχαν ήδη ρυθμιστεί οι κατάλληλες παράμετροι επεξεργασίας, ξεκινούσε αμέσως η επεξεργασία με ΠΗΠ και ακολουθούσε η ίδια διαδικασία που λάμβανε χώρα και στα πειράματα χωρίς προθέρμανση.

4.3.5: 5^ο μέρος – Συγκριτική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης και της απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε πουρέ καρότου και ροδάκινου

Τέλος πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της θερμικής απενεργοποίησης και της απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε χυμό καρότου και πουρέ ροδάκινου. Ο πουρές ροδάκινου (pH=4,5) και ο χυμός καρότου (pH=6,0) που χρησιμοποιήθηκαν για το συγκεκριμένο πείραμα, παραλήφθηκαν από την Οικογένεια



Εικόνα 4.8: Καρπός Ροδάκινου

Χριστοδούλου σε μπουκάλια του 1L, τα οποία αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -40°C ώστε να μην επιμολυνθούν. Τα προϊόντα αυτά προέρχονταν από τη βιομηχανική παραγωγή της Οικογένειας Χριστοδούλου και πιο συγκεκριμένα από το στάδιο πριν την παστερίωση. Για τον λόγο αυτό, πριν από κάθε πείραμα, αφού ξεπάγωνα ένα μικρό δείγμα που απαιτούνταν για το εκάστοτε πείραμα, γινόταν αποστείρωση των δειγμάτων με στόχο την πλήρη απενεργοποίηση όλων των πιθανών μικροοργανισμών που μπορεί να προϋπήρχαν. Στην συνέχεια, έχοντας εξασφαλίσει ότι τα προϊόντα ήταν μικροβιολογικά αδρανή, εμβολιαζόταν ο *B. coagulans*, ώστε να γίνει η επεξεργασία και η ακριβής μικροβιολογική ανάλυση. Ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού γινόταν ακριβώς με τον ίδιο τρόπο που αναλύθηκε παραπάνω στα πρότυπα διαλύματα με τις φυγοκεντρίσεις, με την διαφορά ότι στο τέλος γινόταν ανάμειξη του μικροοργανισμού με τα αποστειρωμένα

προϊόντα. Σε αυτά τα δείγματα πραγματοποιήθηκε θερμική απενεργοποίηση του *B. Coagulans* σε θερμοκρασίες 70, 80 και 90 °C. Επιπλέον, για τον πουρέ ροδάκινου και τον χυμό καρότου που είχαν εμβολιαστεί με *B. Coagulans* πραγματοποιήθηκε και απενεργοποίηση με ΠΗΠ με και χωρίς ήπια προθέρμανση (60 °C) με στόχο να συγκριθούν οι δύο επεξεργασίες μεταξύ τους.



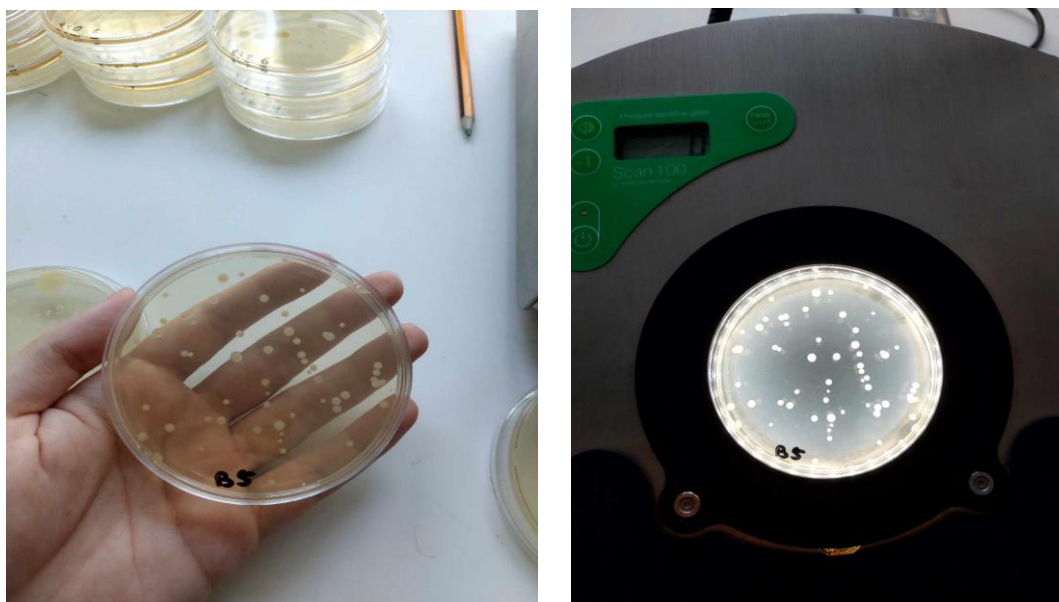
Εικόνα 4.9: Ρίζες καρότου

4.4 Αναλυτικές μέθοδοι

4.4.1 Μικροβιολογική ανάλυση

Στην μικροβιολογική ανάλυση προσδιορίστηκε το ολικό μικροβιακό φορτίο του *B. coagulans* με τη μέθοδο της επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα BHI (Brain Heart Infusion, Biolife, Milano, Italy). Για τον υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου στα δείγματα εφαρμόστηκε η μέθοδος της επιφανειακής ανάπτυξης σε τρυβλία petri. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι από ένα μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται μία αποικία και συνεπώς η μέτρηση των αποικιών δίνει τον αριθμό των μικροοργανισμών απ' όπου προήλθαν. Δείγμα (1 ml) του εκάστοτε επεξεργασμένου

υγρού (πρότυπα διαλύματα, πουρές ροδάκινο, χυμός καρότο) μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωληνάκι των 10 ml, όπου συμπληρώνεται από 9 ml διαλύματος αποστειρωμένου Ringer. Από το ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται 1 ml και τοποθετείται σε ένα νέο σωληνάκι με 9 ml αποστειρωμένου Ringer και το μείγμα αναδεύεται. Από αυτόν λαμβάνεται 1 ml και μεταφέρεται στο επόμενο σωληνάκι και συνεχίζεται αυτή η διαδικασία μέχρι να πετύχουμε την επιθυμητή αραιώση που χρειάζεται. Κάθε αραιώση αποτελεί υποδεκαπλάσια της προηγούμενης. 0,1 ml από τα δείγματα λαμβάνονται και φέρονται στην επιφάνεια κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και ακολουθεί επάλειψη με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιούταν, ήταν το BHI Agar (Brain Heart Infusion Agar, Biolife, Milano, Italy). Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για όλες τις αραιώσεις που είναι απαραίτητες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C για 2 ημέρες προτού γίνει η καταμέτρηση των αποικιών. Ο μικροοργανισμός που μελετήθηκε, σχηματίζει αποικίες λευκού χρώματος με λεία επιφάνεια, οι οποίες γίνονται κρεμ μετά το πέρασμα της ηλικίας του κυττάρου (De Clerck et al., 2004, Οικονόμου, 2005) (Εικόνα 10).



*Εικόνα 4.10: Τρυβλία με αποικίες του *B. Coagulans* και καταμέτρηση*

4.4.2 Μέτρηση pH

Ο υπολογισμός του pH των δειγμάτων έγινε με τη χρήση συσκευής μέτρησης pH (AMEL 338, AMEL Instruments, Italy) με ακρίβεια 0,001. Το pH κάθε δείγματος μετρούνταν ξεχωριστά χρησιμοποιώντας ένα γυάλινο ηλεκτρόδιο των 12 mm. Το ηλεκτρόδιο βυθιζόταν στο δείγμα και σημειωνόταν η τιμή του pH όταν αυτό έφτανε σε μια σταθερή τιμή.

4.4.3 Μέτρηση απορρόφησης

Ο προσδιορισμός της απορρόφησης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με μέτρηση της απορρόφησης τους στα 600 nm σε πλαστική κυψελίδα μήκους 1 cm, με τη χρήση

φασματοφωτομέτρου (UNICAM Helios α, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Η απορρόφηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος οφείλεται μόνο στην σκέδαση του φωτός από τα αιωρούμενα σωματίδια, και στην περίπτωση των δειγμάτων μας στην παρουσία κυττάρων του μικροοργανισμού *B.Coagulans*.

4.5 Μαθηματική επεξεργασία αποτελεσμάτων

4.5.1 Υπολογισμός Μικροβιακού φορτίου

Το μικροβιακό φορτίο σε κάθε περίπτωση υπολογιζόταν μέσω της μέτρησης των αποικιών στα τριβλύα. Ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιαζόμενος με τον αντίστροφο της αραιώσης μας έδιναν τις ικανές αποικίες να σχηματίσουν βιολογικές μονάδες ανά γραμμάριο (CFU/g).

$$\text{Μικροβιακό Φορτίο} = \frac{\text{Μετρούμενες Αποικίες}}{\text{Αραίωση}} \quad (4.1)$$

Για την επεξεργασία όμως των αποτελεσμάτων, επειδή δεν χρησιμοποιούνται τόσο μεγάλοι αριθμοί, χρησιμοποιήθηκε ο δεκαδικός λογάριθμος (logCFU/g)

$$\text{Μικροβιακό Φορτίο} = \log\left(\frac{\text{Μετρούμενες Αποικίες}}{\text{Αραίωση}}\right) \quad (4.2)$$

4.5.2 Μοντέλο Gompertz

Στα πειραματικά δεδομένα προσαρμόστηκε το κινητικό μοντέλο Gompertz, το οποίο περιγράφεται από την Εξίσωση 4.6:

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = (\log N_{\text{residual}} - \log N_0) \cdot e^{-e^{\frac{k \cdot e}{\log N_{\text{residual}} - \log N_0}(\lambda - t) + 1}} \quad (4.3)$$

Όπου N: το μικροβιακό φορτίο της εκάστοτε συνθήκης, N₀: τα αρχικό μικροβιακό φορτίο, N_{residual}: το τελικό μικροβιακό φορτίο που φτάνει ο μικροοργανισμός στο τέλος της επεξεργασίας, k: η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης, λ: ο χρόνος μέχρι να επιτευχθεί η πρώτη απενεργοποίηση και t: ο χρόνος επεξεργασίας.

Για το μοντέλο αυτό έγινε η παραδοχή ότι logN_{residual} = 2, ότι δηλαδή στο τέλος της επεξεργασίας υπήρχε μία αποικία στην πρώτη αραιώση, καθώς ο στόχος όλων των πειραμάτων ήταν η ολική απενεργοποίηση του μικροοργανισμού *B. Coagulans*. Έτσι, έχοντας όλα τα δεδομένα έγινε εφαρμογή μη γραμμικής παλινδρόμησης μέσω χρήσης του προγράμματος SPSS Statistics Version 19 από την IBM Corporation (Armonk, NY), από όπου προέκυψαν οι σταθερές k και λ, καθώς και όλα τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο.

4.5.3 Παράμετροι Απενεργοποίησης

Για τις διάφορες συνθήκες επεξεργασίας που μελετήθηκαν, υπολογίστηκαν οι τρεις βασικές παράμετροι απενεργοποίησης οι οποίες είναι: ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου D-value (min), η σταθερά θερμικής αντίστασης z (°C) και η ενέργεια ενεργοποίησης E_a (kJ/mol). Αρχικά υπολογίστηκε το D-value για κάθε συνθήκη μέσω των κινητικών σταθερών k από την Εξίσωση 4.4.

$$D - value = \frac{1}{k_T} \quad (4.4)$$

Μέσω του D-value που υπολογίστηκε, μπορούσε να υπολογιστεί και η σταθερά θερμικής αντίστασης z (°C) με χρήση δύο διαδοχικών θερμοκρασιών T_1 και T_2 (Εξίσωση 4.5).

$$z - value = \frac{T_1 - T_2}{\log D_{T_1} - \log D_{T_2}} \quad (4.5)$$

Στην συνέχεια, μέσω της γραμμικοποιημένης εξίσωσης Arrhenius για τιμές αναφοράς T_{ref} και D_{ref} ανάμεσα στις πειραματικές τιμές, υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης E_a (kJ/mol) για κάθε pH ξεχωριστά.

$$\ln D = \ln D_{ref} - \frac{E_a}{R} \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \quad (4.6)$$

Όπου k : η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης, E_a : η ενέργεια ενεργοποίησης σε J/mol, R : η παγκόσμια σταθερά των αερίων (8,314 J/(mol·K) και D : ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου.

Για την εξίσωση Arrhenius, όταν υπάρχουν μόνο τρεις τιμές του k , το διάστημα εμπιστοσύνης είναι συνήθως πολύ μεγάλο. Προκειμένου να ληφθούν αξιόπιστες εκτιμήσεις της E_a , απαιτούνται δεδομένα σε περισσότερες θερμοκρασίες. Μία εκτίμηση του βέλτιστου αριθμού πειραμάτων που δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα είναι 5 ή 6 θερμοκρασίες (Lenz & Lund, 1980). Όταν τα πειραματικά σημεία περιορίζονται σε τρεις μόνο θερμοκρασίες, τότε μόνο με γραμμική προσαρμογή ή με τη μέθοδο σημείου προς σημείο (point by point), μπορεί να υπολογιστούν οι παράμετροι της σχέσης του Arrhenius με μικρότερα διαστήματα εμπιστοσύνης (Labuza & Kamman, 1983). Η μέθοδος αυτή υπολογισμού των παραμέτρων της σχέσης Arrhenius, απαιτεί ισόθερμα κινητικά πειράματα σε τρεις τουλάχιστον θερμοκρασίες.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε μία απλή γραμμική εξίσωση, αντίστοιχη της εξίσωσης Arrhenius, η οποία περιγράφει την εξάρτηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου με τους χρόνους υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου για τιμές αναφοράς E_{ref} και D_{ref} , μέσω της σταθεράς a και έχει την εξής μορφή:

$$D = D_{ref} + a \cdot (E - E_{ref}) \quad (4.7)$$

Όπου D: ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου σε ms, E: η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου έντασης σε kV/cm και a: η σταθερά που περιγράφει την εξάρτηση της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου και του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου.

4.6 Στατιστική επεξεργασία

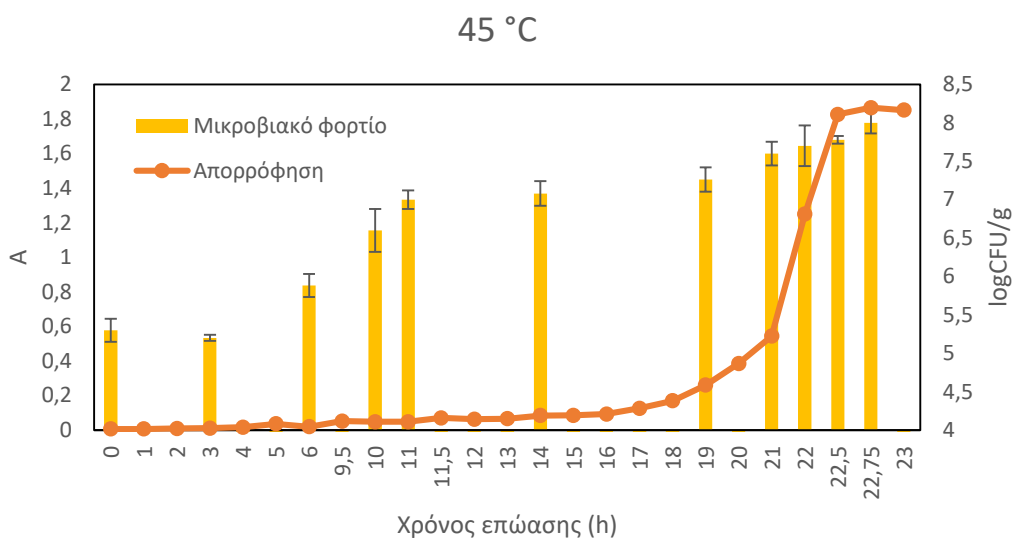
Τα πειραματικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση χρησιμοποιώντας λογισμικό Statistica Release 12 από την StatSoft Inc. (Tulsa, OK, ΗΠΑ). Για να εξακριβωθεί η σημασία μεταξύ των μέσων διαφορών, εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) με έναν ή δύο παράγοντες (Factorial ANOVA), προσαρμοσμένη στον συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό, με επίπεδο σημαντικότητας που ορίστηκε στο 95% εμπιστοσύνη ($p < 0,05$). Στη συνέχεια, η δοκιμή πολλαπλών εύρους του Duncan χρησιμοποιήθηκε για εκ των υστέρων ανάλυση για να διακρίνει στατιστικά σημαντικές διακρίσεις μεταξύ παραγόντων μετά την ανάλυση διακύμανσης.

Όπου ήταν εφικτό, τα πειραματικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε μαθηματικό έλεγχο μέσω μη γραμμικής παλινδρόμησης. Αυτό περιλάμβανε την προσαρμογή κατάλληλων μαθηματικών εξισώσεων στα δεδομένα χρησιμοποιώντας το λογισμικό IBM SPSS Statistics Version 19 από την IBM Corporation (Armonk, NY). Για κάθε προσαρμογή, εξήχθησαν παράμετροι μαζί με τον συντελεστή συσχέτισης (R^2) και το τυπικό σφάλμα (SE) αυτών των παραμέτρων. Η επιλογή των μαθηματικών μοντέλων για κάθε προσαρμογή εξαρτάται από έναν συνδυασμό της υπάρχουσας βιβλιογραφίας και των εγγενών μαθηματικών ιδιοτήτων των εξισώσεων. Ο πρωταρχικός στόχος ήταν η επιλογή εξισώσεων που αποτύπωσαν εύστοχα τα πειραματικά δεδομένα, χρησιμοποιώντας τον ελάχιστο αριθμό παραμέτρων, διασφαλίζοντας παράλληλα τη φυσική σημασία και να είναι δυνατή η ερμηνεία τους.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα & Συζήτηση

5.1 Καμπύλη ανάπτυξης του *Bacillus Coagulans*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος, ο *B. Coagulans* είναι ένας θερμοφίλος μικροοργανισμός (cite). Για τον λόγο αυτό, η θερμοκρασία ανάπτυξης ορίστηκε στους 45°C, ενώ η ανάπτυξη του μικροοργανισμού έγινε σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα BHI Broth (Brain Heart Infusion). Η πορεία αύξησης του μικροβιακού φορτίου και της απορρόφησης του *B. Coagulans* σε σχέση με τον χρόνο φαίνεται στο διάγραμμα 5.1.



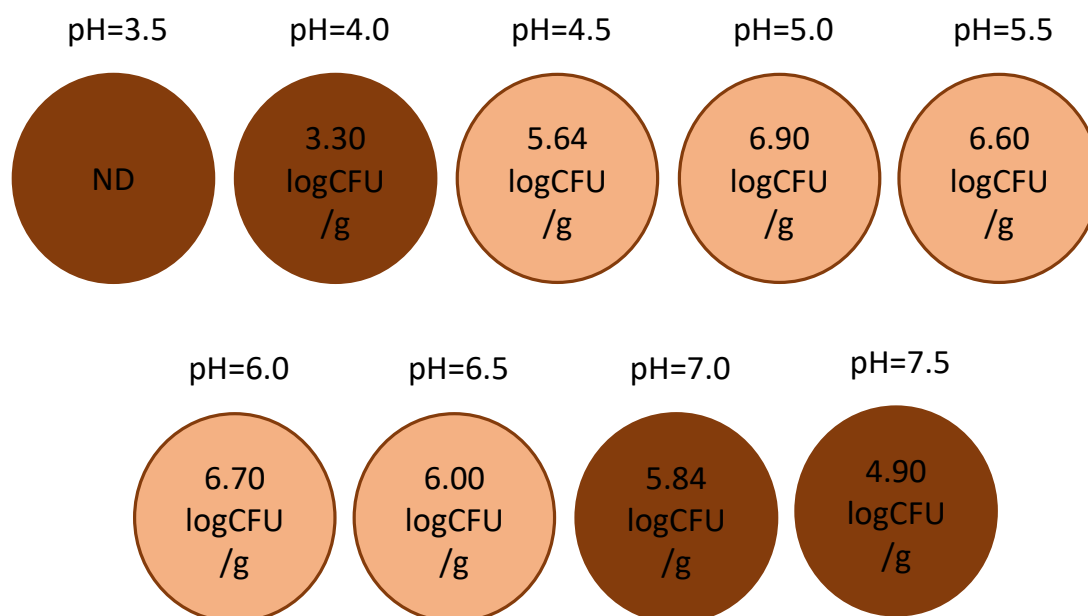
Διάγραμμα 5.6: Διάγραμμα ανάπτυξης του μικροοργανισμού *B. Coagulans* – μικροβιακό φορτίο (logCFU/g) με τον χρόνο και απορρόφηση στα 600 nm.

Από το διάγραμμα 5.1 μπορούν να εξαχθούν αρκετά συμπεράσματα για την πορεία ανάπτυξης του *B. Coagulans* μέσα στον χρόνο. Αρχικά, η λανθάνουσα φάση ξεκινάει από τον χρόνο 0 και διαρκεί για περίπου 5 ώρες. Στην συνέχεια, ο μικροοργανισμός μπαίνει στην εκθετική φάση όπου αναπτύσσεται με μεγάλο ρυθμό μέχρι τις 10 ώρες και συνολικά η εκθετική φάση συνεχίζει μέχρι περίπου τις 22 ώρες. Από εκείνη την στιγμή και μετά ξεκινάει η φάση στασιμότητας, όπου ο μικροοργανισμός έχει αποκτήσει φορτίο ίσο με 8,0 logCFU/g. Όσον αφορά την πορεία αύξησης της απορρόφησης, παρατηρείται ότι μέχρι τις 17 ώρες παραμένει σταθερή περίπου ίση με 0,1. Έπειτα, ακολουθεί μία απότομη αύξηση της απορρόφησης μέχρι την τιμή $A \approx 1,9$ μετά από 22 ώρες και στην συνέχεια σταθεροποιείται. Αυτό σημαίνει ότι η απορρόφηση αυξάνεται μέχρι ο μικροοργανισμός να μπει στην φάση στασιμότητας, όπου και έχει την μέγιστη τιμή. Η αύξηση αυτή της απορρόφησης οφείλεται στην αύξηση της θολότητας του διαλύματος όπου εμπεριείχε τον μικροοργανισμό. Η θολότητα αυτή οφειλόταν στην ανάπτυξη κυττάρων του μικροοργανισμού. Συνολικά, το συγκεκριμένο πείραμα βοήθησε στον σχεδιασμό και την οργάνωση των επόμενων

πειραμάτων που ακολούθησαν για την μελέτη του *B. Coagulans*. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το διάγραμμα 5.1, υπολογιζόταν η ώρα που έπρεπε να εμβολιαστεί ο μικροοργανισμός στο BHI broth, ώστε την επόμενη μέρα να ξεκινήσουν τα πειράματα την στιγμή όπου ο μικροοργανισμός βρισκόταν στο τέλος της εκθετικής φάσης και στην αρχή της φάσης της στασιμότητας, καθώς τότε είχε το μέγιστο μικροβιακό φορτίο. Επιπλέον, η μέτρηση της απορρόφησης και ο συσχετισμός με το μικροβιακό φορτίο βοήθησε ώστε να γίνεται άμεσα αντιληπτό αν ο μικροοργανισμός ήταν ήδη στο τέλος της εκθετικής του φάσης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι τα παραπάνω αποτελέσματα αντιστοιχούν στις συγκεκριμένες συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε το πείραμα, δηλαδή στον εμβολιασμό 250 μl σε 100 ml BHI broth και σε θερμοκρασία ανάπτυξης 45°C. Αν οποιαδήποτε από αυτές τις συνθήκες ήταν διαφορετική, τότε θα άλλαζε και ο χρόνος και η πορεία ανάπτυξης του *B. Coagulans*.

5.2 Κινητικό πείραμα ανάπτυξης μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε διαφορετικά pH – Εύρεση βέλτιστων συνθηκών pH

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών τιμών pH στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *B. Coagulans*. Έτσι, μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε πρότυπα διαλύματα με pH από 3,5 έως 7,5. Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης στο τέλος της εκθετικής φάσης του μικροοργανισμού για τα διαφορετικά pH φαίνονται στην εικόνα 5.1.



*Εικόνα 5.1: Μικροβιακό φορτίο του μικροοργανισμού *B. Coagulans* σε διαφορετικά pH από 3,5 έως 7,5*

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η επίδραση του pH είναι σημαντική για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο *B. Coagulans*

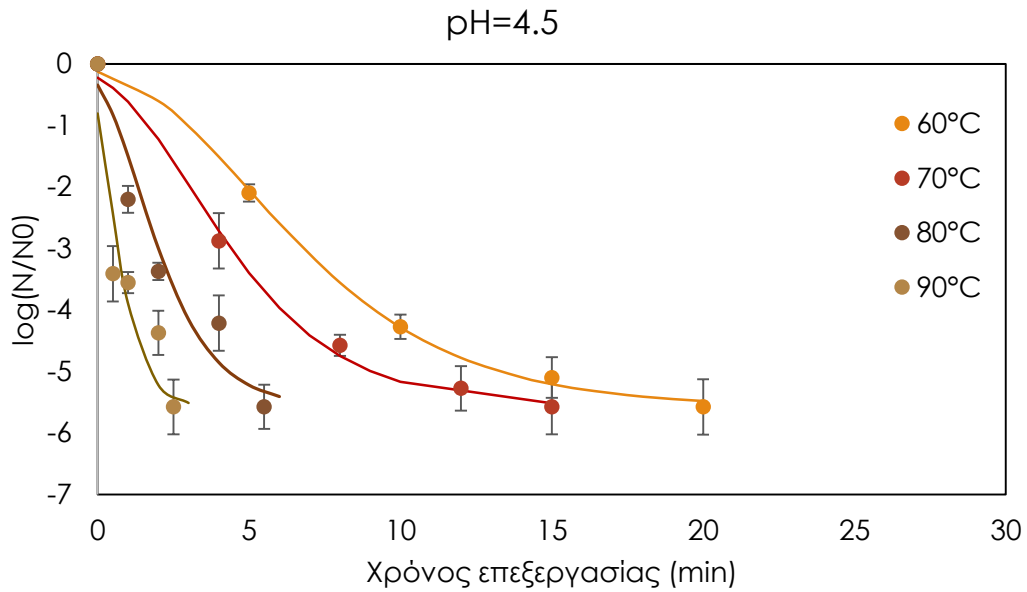
αναπτύσσεται σε pH με εύρος 4 – 9, ενώ το βέλτιστο pH ανάπτυξης έχει τιμές 5,5 – 6,5 (Misiou, Zourou, Koutsoumanis 2021). Τα παραπάνω αποτελέσματα ανταποκρίνονται και ταυτίζονται με την βιβλιογραφία καθώς για τιμές του pH από 4,0 έως 7,5 υπήρχε ανάπτυξη του μικροοργανισμού, ενώ για pH<4 δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη. Ταυτόχρονα, πειραματικά αποδείχθηκε ότι το βέλτιστο pH ανάπτυξης έχει τιμές για pH ίσα με 5,0 , 5,5 και 6,0 , όπου το μικροβιακό φορτίου ήταν ίσο με 6,90 , 6,60 και 6,70 logCFU/g. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η μελέτη για την απενεργοποίηση του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε για τιμές pH από 4,5 έως 6,5, όπου ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί.

5.3 Κινητικά πειράματα απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus Coagulans*

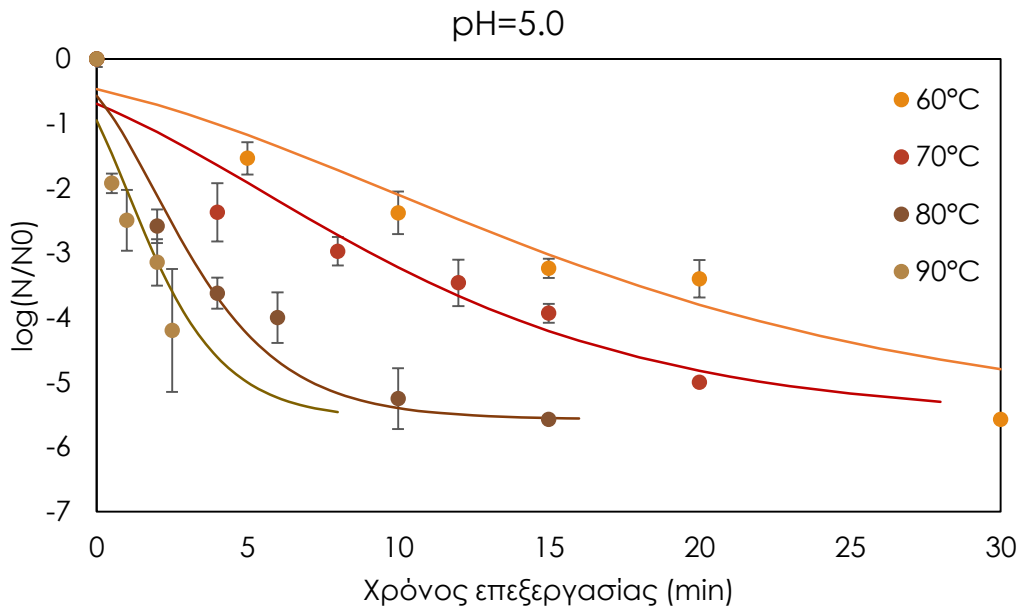
Αφού ολοκληρώθηκε η κινητική μελέτη ανάπτυξης του *B. Coagulans* στον χρόνο αλλά και στα διαφορετικά pH, ακολούθησε η μελέτη της απενεργοποίησης του μικροοργανισμού με δύο διαφορετικές μεθόδους, την θερμική και τα Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα pH που επιλέχθηκαν για τα συγκεκριμένα πειράματα είχαν τιμές 4,5 – 6,5. Το αρχικό φορτίο του μικροοργανισμού στο BHI broth ήταν 8,0 logCFU/g, ενώ στην συνέχεια γινόταν εμβολιασμός του *B. Coagulans* στα πρότυπα διαλύματα με pH=4,5 – 6,5 με τον τρόπο που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”.

5.3.1 Κινητικό πείραμα θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus Coagulans* σε διαφορετικά pH

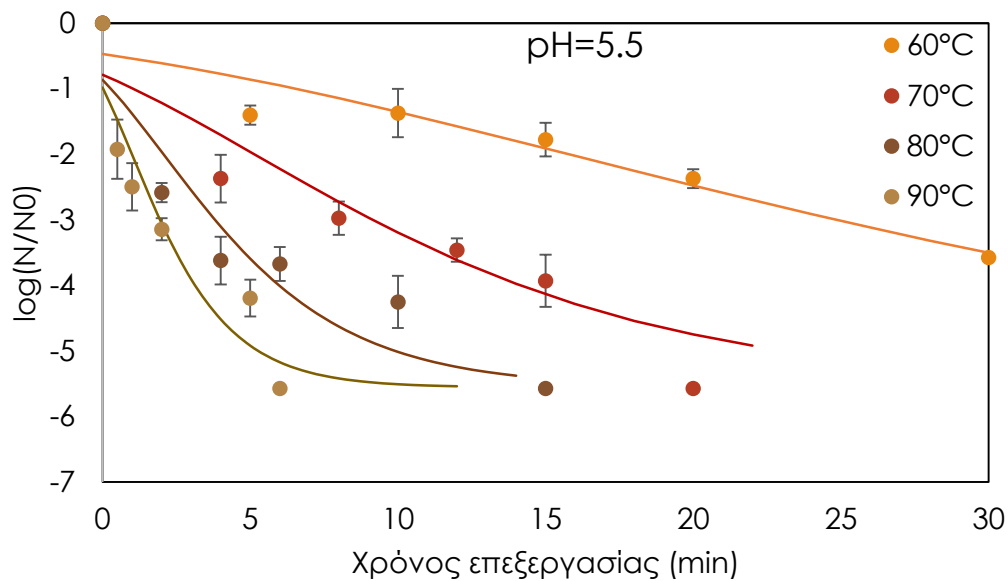
Η θερμική επεξεργασία προσομοιώθηκε σε ένα υδατόλουτρο, ενώ η μελέτη έγινε σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες και 5 διαφορετικούς χρόνους για την κάθε θερμοκρασία. Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν 60°C, 70°C, 80°C και 90°C και οι χρόνοι επεξεργασίας ήταν (0 – 20) min για τους 60°C, (0 – 15) min για τους 70°C, (0 – 10) min για τους 80°C και (0 – 5) min για τους 90°C. Σε κάθε δείγμα διαφορετικής θερμοκρασίας και χρόνου επεξεργασίας πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση και δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα για την απενεργοποίηση του μικροοργανισμού σε όλες τις συνθήκες. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για όλα τα πρότυπα διαλύματα με διαφορετικό pH και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.2 – 5.6.



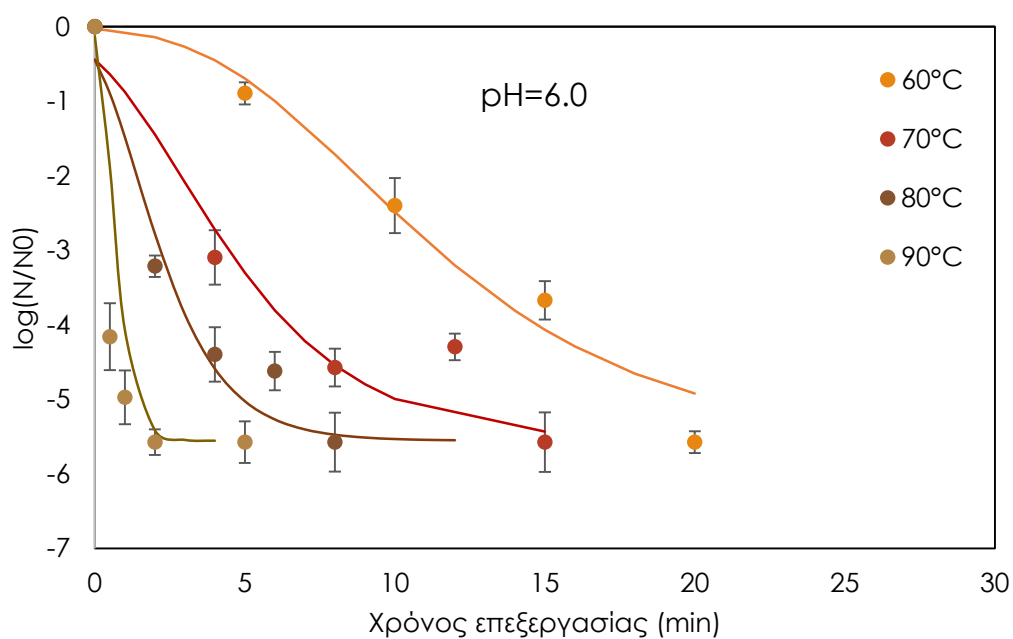
Διάγραμμα 5.7: Θερμική απενεργοποίηση *B. coagulans* σε πρότυπο διάλυμα με pH=4,5 σε θερμοκρασίες 60, 70, 80 και 90 °C για χρόνους επεξεργασίας έως 20 min. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



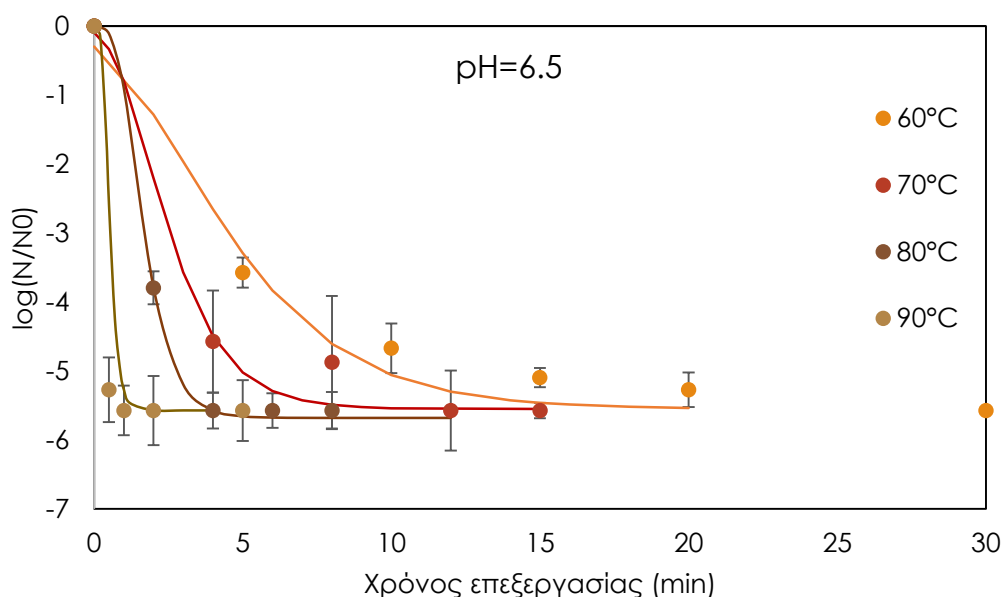
Διάγραμμα 5.3: : Θερμική απενεργοποίηση *B. coagulans* σε πρότυπο διάλυμα με pH=5,0 σε θερμοκρασίες 60, 70, 80 και 90 °C για χρόνους επεξεργασίας έως 20 min. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



Διάγραμμα 5.4: : Θερμική απενεργοποίηση *B. coagulans* σε πρότυπο διάλυμα με pH=5,5 σε θερμοκρασίες 60, 70, 80 και 90 °C για χρόνους επεξεργασίας έως 20 min. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



Διάγραμμα 5.5: : Θερμική απενεργοποίηση *B. coagulans* σε πρότυπο διάλυμα με pH=6,0 σε θερμοκρασίες 60, 70, 80 και 90 °C για χρόνους επεξεργασίας έως 20 min. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



Διάγραμμα 5.6: : Θερμική απενεργοποίηση *B. coagulans* σε πρότυπο διάλυμα με pH=6,5 σε θερμοκρασίες 60, 70, 80 και 90 °C για χρόνους επεξεργασίας έως 20 min. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.

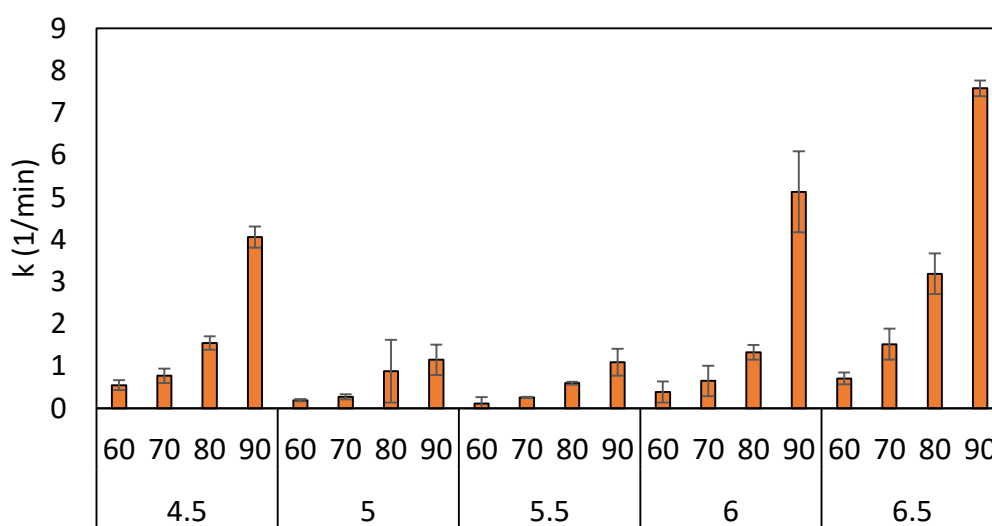
Όπως είναι ευκολά αντιληπτό από τα παραπάνω διαγράμματα, ο *B. Coagulans* έχει διαφορετική συμπεριφορά ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και πιο συγκεκριμένα ανάλογα με το pH και την θερμοκρασία. Αρχικά συγκρίνοντας τα διαφορετικά pH αναμεσα τους φαίνεται ότι ο μικροοργανισμός απενεργοποιείται με μεγαλύτερη δυσκολία για τιμές του pH 5,0 και 5,5 και ειδικότερα για pH=5,5. Αυτό δικαιολογείται καθώς έχει αποδειχθεί και βιβλιογραφικά από πληθώρα εργασιών ότι το βέλτιστο pH ανάπτυξης για τον *B. Coagulans* κυμαίνεται από 5 έως 7. Επιπλέον, στα συγκεκριμένα pH για να επιτευχθεί ολική απενεργοποίηση του μικροοργανισμού, κυρίως στις πιο ήπιες θερμοκρασίες (<70 °C), χρειάζονταν πολύ μεγαλύτεροι χρόνοι επεξεργασίας (>20 min). Σε pH<5 ή pH>6 η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού επιτυγχάνεται σχετικά άμεσα για χρόνους <20 min ακόμα και στην πιο ήπια θερμοκρασία επεξεργασίας (60 °C).

Όσον αφορά τις διάφορες θερμοκρασίες όπου μελετήθηκαν, υπήρχε σημαντική διαφορά στον ρυθμό απενεργοποίησης ανάμεσα στις ήπιες θερμάνσεις (60 και 70 °C) και τις πιο ακραίες (80 και 90 °C). Ο *B. Coagulans* ως θερμοφίλος μικροοργανισμός αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μέχρι και 55°C. Για τον λόγο αυτό η απενεργοποίηση στις ήπιες συνθήκες θέρμανσης είναι δυσκολότερη για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό και σε κάποιες περιπτώσεις όπου το περιβάλλον ήταν ευνοϊκό για αυτόν χρειάστηκαν μεγαλύτεροι χρόνοι (>20 min) για την ολική απενεργοποίηση.

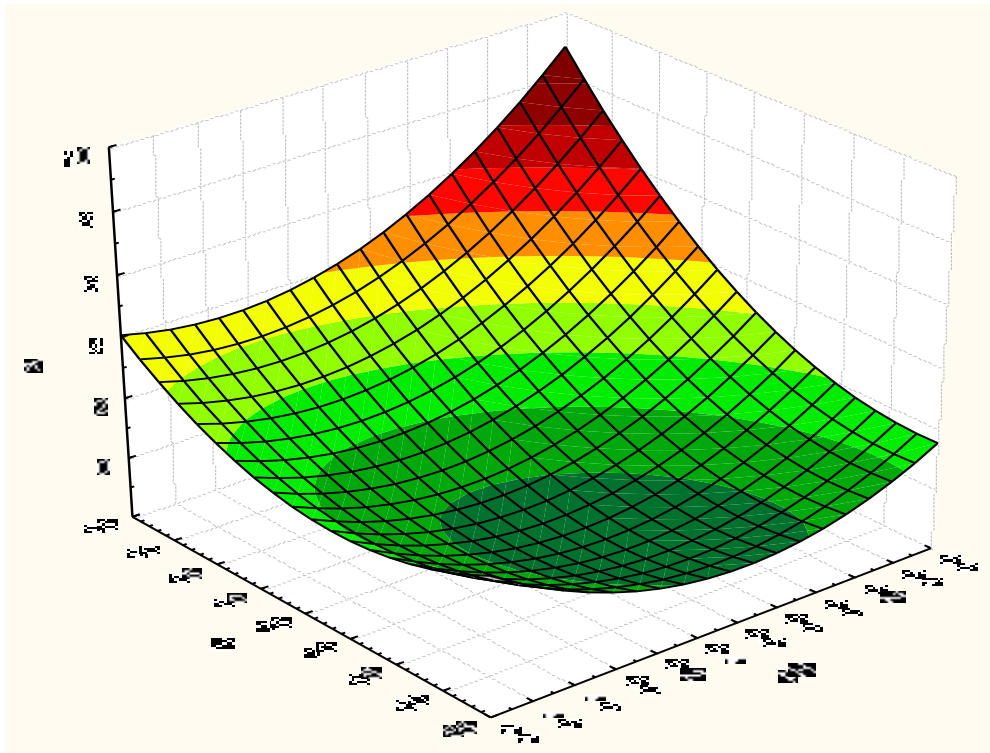
Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα περιεγράφηκαν μαθηματικά χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Gompertz (Εξίσωση 4.3), καθώς είχε καλή προσαρμογή στα

πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Από την εξίσωση του Gompertz υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης για όλες τις μελετώμενες συνθήκες, οι οποίες παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5.7 και 5.8.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι όσο η θερμοκρασία απενεργοποίησης αυξάνεται τόσο μεγαλύτερος ήταν και ο ρυθμός απενεργοποίησης του μικροοργανισμού. Οι ρυθμοί θερμικής απενεργοποίησης κυμαίνονταν από 0,12 έως 7,47 min⁻¹ για όλες τις συνθήκες που μελετήθηκαν. Σε pH ίσο με 4,5, ο ρυθμός απενεργοποίησης πενταπλασιάστηκε όταν η θερμική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε στους 60 °C σε σύγκριση με τους 90 °C. Από τα αποτελέσματα προκύπτει επίσης πως για pH 4,5, 6,0 και 6,5 οι ρυθμοί απενεργοποίησης ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι από τους ρυθμούς που υπολογίστηκαν για τα pH 5,0 και 5,5. Πιο συγκεκριμένα, για θερμοκρασία απενεργοποίησης ίση με 80 °C, οι ρυθμοί απενεργοποίησης υπολογίστηκαν ίσοι με 1,54, 0,88, 0,64, 1,38 και 3,18 min⁻¹ για pH ίσο με 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 και 6,5, αντίστοιχα (Πίνακας 5.1). Παρατηρήθηκε πως ο ρυθμός απενεργοποίησης για pH ίσο με 5,5 ήταν σημαντικά μικρότερος σε σχέση με τα υπόλοιπα, καθώς ήταν σχεδόν ο μισός από τα pH 4,5 και 6,0, και υποπενταπλάσιος για από το pH 6,5. Τα αποτελέσματα λοιπόν επιβεβαιώνουν πως το pH 5,5 ήταν το βέλτιστο για τον μικροοργανισμό, καθώς σε αυτήν την θερμοκρασία απενεργοποιούνταν σημαντικά πιο αργά σε σχέση με τα υπόλοιπα. Η πιο αποτελεσματική δε απενεργοποίηση συμβαίνει για pH>6.0 ή pH<5.0 για θερμοκρασίες >80 °C.



Διάγραμμα 5.7: Κινητικές σταθερές k για την απενεργοποίηση του *B. coagulans* σε πρότυπα διαλύματα με pH 4,5 – 6,5 σε θερμοκρασίες 60, 70, 80 και 90 °C. Το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3.



Διάγραμμα 5.8: Γραφική τρισδιάστατη απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας και του pH στην αύξηση της κινητικής σταθεράς k .

Στην συνέχεια υπολογίστηκαν ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου D -value (min), η σταθερά θερμικής αντίστασης z ($^{\circ}\text{C}$) και η ενέργεια ενεργοποίησης E_a (kJ/mol), σύμφωνα με τις εξισώσεις 4.4 – 4.6, ενώ οι σταθερές k (1/min) και λ (min) υπολογίστηκαν μέσω της μοντελοποίησης με την εξίσωση Gompertz (Εξίσωση 4.3). Ως T_{ref} ορίστηκε η ενδιάμεση θερμοκρασία των 85°C , όπου χρειάστηκε, ενώ η $D_{T_{\text{ref}}}$ υπολογίστηκε από τα πειραματικά δεδομένα που προέκυψαν μέσω της εξίσωσης 4.6. Τα αποτελέσματα όλων αυτών των μετρήσεων μαζί με τα σφάλματά τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα παραμέτρων θερμικής επεξεργασίας για τις τιμές pH 4,5 – 6,5 σε θερμοκρασίες 60, 70, 80 και 90°C .

pH	T($^{\circ}\text{C}$)	k(1/min)	D(min)	λ (min)	$D_{T_{\text{ref}}}(\text{min})$	$E_a(\text{kJ/mol})$	$z(^{\circ}\text{C})$
4,5	60	$0,55 \pm 0,03^{cA}$	$1,82 \pm 0,09^{aC}$	$1,23 \pm 0,04^a$	$0,35 \pm 0,08^C$	$74,5 \pm 15,5^B$	$30,8 \pm 5,85^A$
	70	$0,77 \pm 0,09^{cB}$	$1,30 \pm 0,15^{abB}$	$0,44 \pm 0,06^b$			
	80	$1,55 \pm 0,16^{bB}$	$0,65 \pm 0,35^{abB}$	$0,03 \pm 0,01^c$			
	90	$5,13 \pm 0,22^{aB}$	$0,19 \pm 0,01^{bC}$	-			
5	60	$0,22 \pm 0,05^{cC}$	$4,71 \pm 1,09^{aB}$	-	$0,84 \pm 0,12^B$	$71,7 \pm 7,6^B$	$32,3 \pm 2,86^A$
	70	$0,35 \pm 0,09^{cC}$	$2,99 \pm 0,80^{bA}$	-			
	80	$0,81 \pm 0,03^{bB}$	$1,24 \pm 0,05^{cAB}$	-			
	90	$1,81 \pm 0,13^{aC}$	$0,55 \pm 0,03^{cB}$	-			
5,5	60	$0,12 \pm 0,01^{dC}$	$8,37 \pm 0,70^{aA}$	-	$1,11 \pm 0,15^A$	$76,3 \pm 3,66^B$	$30,4 \pm 1,97^A$
	70	$0,32 \pm 0,08^{cC}$	$3,26 \pm 0,84^{bA}$	-			

	80	0,64±0,01 ^{bb}	1,57±0,02 ^{ca}	-			
	90	1,24±0,02 ^{ac}	0,81±0,01 ^{ca}	-			
6	60	0,39±0,08 ^{cba}	2,63±0,55 ^{ac}	3,57±1,60 ^a	0,37±0,12 ^c	83,7±13,6 ^A	27,4±3,9 ^A
	70	0,68±0,13 ^{bcB}	1,50±0,29 ^{bb}	-			
	80	1,38±0,40 ^{bb}	0,77±0,23 ^{cab}	-			
	90	5,04±0,62 ^{ab}	0,20±0,02 ^{cc}	-			
6,5	60	0,69±0,15 ^{ca}	1,49±0,33 ^{ac}	2,14±0,02 ^a	0,18±0,04 ^D	83,3±7,1 ^A	27,6±2,5 ^A
	70	1,49±0,20 ^{ca}	0,68±0,09 ^{bb}	0,52±0,06 ^b			
	80	4,61±0,82 ^{ba}	0,22±0,04 ^{cb}	0,13±0,06 ^c			
	90	7,47±0,94 ^{aa}	0,13±0,02 ^{cd}	0,07±0,01 ^c			

Τα ± αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3, 4.4, 4.5 και 4.6. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών και διαφορετικά μεγάλα γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών pH από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.1, ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου (D-value) μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας σε όλες τις συνθήκες pH, ενώ οι τιμές του είναι σημαντικά μεγαλύτερες για τις τιμές του pH 5 – 6. Το αποτέλεσμα αυτό είναι απόλυτα λογικό καθώς όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, αυξάνεται και ο ρυθμός απενεργοποίησης k και έτσι μειώνεται ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου παίρνουν τιμές από 0,81 έως 8,06 min στο pH=5,5, οι οποίοι είναι υπερπενταπλάσιοι από τους αντίστοιχους χρόνους για τα pH 4,5 και 6,5, οι οποίοι δεν υπερβαίνουν τα 1,82 min ακόμα και για την θερμοκρασία των 60°C. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν την πολύ πιο γρήγορη απενεργοποίηση του μικροοργανισμού στα pH>6.0 και pH<5.0, η οποία είναι πολύ πιο αποτελεσματική σε αυτές τις τιμές του pH και ιδιαίτερα στις θερμοκρασίες των 80 και 90 °C.

Όσον αφορά τις τιμές z-value, αυτές παίρνουν τιμές από 27,4 για pH=6 έως 32,3 για pH=5. Τα αποτελέσματα του z-value έρχονται σε πλήρη συσχέτιση με τις τιμές της ενέργειας ενεργοποίησης E_a , καθώς όσο αυξάνεται το z-value τόσο μειώνεται η E_a , η οποία παίρνει τιμές από 71,6 για pH=5 έως 84,0 για pH=6.

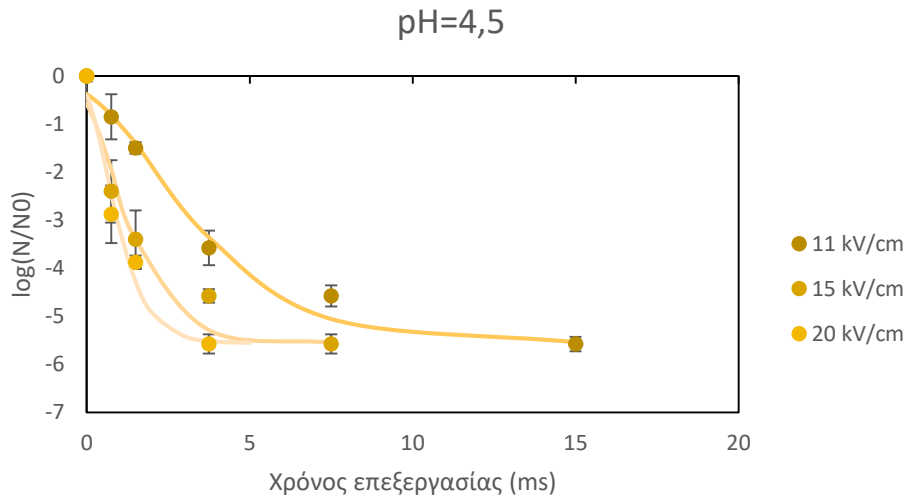
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για την θερμική απενεργοποίηση του *B. coagulans* (El-Bisi and Ordal, 1956; Feig and Stersky, 1981; Mallidis et al., 1990; Nakajo and Moriyama, 1993, Palop A., 1998; Gozde Konuray Altun, 2021). Η διαφορά μεταξύ των βιβλιογραφικών ερευνών και της παρούσας εργασίας είναι ότι στις περισσότερες από αυτές πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη των σπορίων του στελέχους του *B. coagulans* και στην συνέχεια ακολούθησε η θερμική απενεργοποίηση αυτών, σε αντίθεση με την παρούσα εργασία που μελετήθηκε η απευθείας απενεργοποίηση των βλαστικών κυττάρων του μικροοργανισμού, χωρίς να έχουν αναπτυχθεί σπόρια. Η διαφορά αυτή φαίνεται και

στις θερμοκρασίες οι οποίες εξετάστηκαν, καθώς τα σπόρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμική αντοχή και έτσι οι βιβλιογραφικές έρευνες επικεντρώνονται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες για την απενεργοποίηση του μικροοργανισμού της τάξης των 80 – 100 °C (El-Bisi and Ordal, 1956; Gozde Konuray Altun, 2021) ή και ακόμα μεγαλύτερες της τάξης των 105 – 130 °C (Nakajo and Moriyama, 1993, Palop A., 1998).

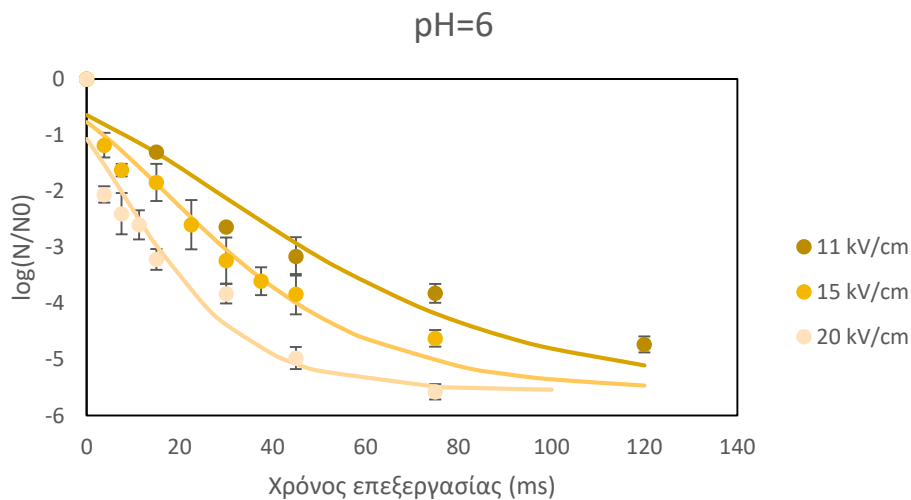
Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι όσο αυξάνεται το pH για τιμές από 4 έως 7, αυξάνεται και η θερμική αντοχή του μικροοργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, οι Nakajo and Moriyama (1993) και Palop A. (1998) μελετώντας την επίδραση του pH για τιμές 4, 5, 6 και 7 στην απενεργοποίηση του *B. coagulans*, έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός απενεργοποιείται με μεγαλύτερη δυσκολία στο pH=7 παρουσιάζοντας μεγαλύτερες τιμές D-value και αντιστρόφως με μεγαλύτερη ευκολία στο pH=4. Αντίστοιχα και ο Mallidis et al (1990) συγκρίνοντας τις τιμές του pH 4 και 7 απέδειξε ότι ο *B. coagulans* απενεργοποιείται με πολύ μεγαλύτερη ευκολία στο όξινο pH, ενώ οι El-Bisi and Ordal (1956) συνέκριναν τα pH 5, 6 και 7 και έδειξαν ότι αυτές οι 3 τιμές έχουν σχετικά παρόμοια συμπεριφορά στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού, με το pH=7 να παρουσιάζει μεγαλύτερη θερμική αντοχή. Τα αποτελέσματα αυτά δεν έρχονται σε πλήρη αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς και στην παρούσα έρευνα αποδείχθηκε ότι για pH=4,5 η απενεργοποίηση επιτυγχάνεται πολύ πιο γρήγορα και αποτελεσματικά σε σύγκριση με τις άλλες τιμές pH. Η διαφορά είναι ότι πειραματικά αποδείχθηκε ότι το πιο θερμοάντοχο περιβάλλον για τον *B. coagulans* είναι το 5,5.

5.3.2 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* με Παλμικά Ηλεκτρικά Πεδία σε διαφορετικά pH

Η μελέτη απενεργοποίησης του *B. coagulans* με την χρήση Παλμικών Ηλεκτρικών Πεδίων, έγινε στην πιλοτικής κλίμακας μονάδα (Elcrack-5kW, DIL, Quakenbrück, Γερμανία) του Εργαστηρίου Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ, όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 4.3.4. Οι συνθήκες οι οποίες μελετήθηκαν ήταν για ένταση ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm, ενώ εφαρμόστηκαν παλμοί που κυμαίνονταν σε τιμές από 50 έως 8000. Τα συγκεκριμένα πειράματα εφαρμόστηκαν για τα πρότυπα διαλύματα pH=4,5 και pH=6,0 με αρχικό μικροβιακό φορτίο 8,0 logCFU/g. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκαν αυτές οι δύο τιμές pH ήταν για να μπορέσουν να συγκριθούν τα αποτελέσματα αυτής της διεργασίας στα πρότυπα διαλύματα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα επόμενης ενότητας στην επεξεργασία του πουρέ ροδάκινου (pH=4,5) και του χυμού καρότου (pH=6,0). Στην συνέχεια, όπως και στην θερμική επεξεργασία, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση για όλα τα δείγματα και στα διαγράμματα 5.9 έως 5.10 παρουσιάζονται οι καμπύλες απενεργοποίησης του μικροοργανισμού με την μέθοδο των ΠΗΠ. Στα διαγράμματα παρουσιάζεται η συσχέτιση του μικροβιακού φορτίου με τον χρόνο επεξεργασίας σε ms.



Διάγραμμα 5.9: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* με ΠΗΠ σε πρότυπο διάλυμα με pH=4,5 σε πεδία ηλεκτρικής έντασης 11,15 και 20 kV/cm για χρόνους επεξεργασίας έως 15 ms. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



Διάγραμμα 5.10: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* με ΠΗΠ σε πρότυπο διάλυμα με pH=6,0 σε πεδία ηλεκτρικής έντασης 11,15 και 20 kV/cm για χρόνους επεξεργασίας έως 120 ms. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.

Σύμφωνα με το διάγραμμα 5.9, παρατηρούμε ότι υπάρχει πολύ μεγάλη επίδραση των ΠΗΠ στην απενεργοποίηση του *B.coagulans* στο πρότυπο διάλυμα με pH=4,5. Συγκεκριμένα για το πεδίο έντασης των 20 kV/cm χρειάζονται μόλις 4 ms επεξεργασίας για να απενεργοποιηθεί πλήρως ο μικροοργανισμός, ενώ για πεδία έντασης 11 και 15 kV/cm χρειάζονται χρόνοι 8 και 15 ms, αντίστοιχα. Αντίθετα στο πρότυπο διάλυμα με pH=6 παρατηρούμε ότι χρειάζονται ακραίες συνθήκες επεξεργασίας της τάξης των 80 με 120 ms και πάραυτα δεν επιτυγχάνεται η πλήρης απενεργοποίηση του μικροοργανισμού παρά μόνο στο πεδίο των 20 kV/cm για χρόνο

επεξεργασίας περίπου 80 ms. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός είναι λιγότερο ισχυρός σε pH=4,5 και για τον λόγο αυτό χρειάζεται πολύ μικρότερους χρόνους επεξεργασίας σε σχέση με pH=6 για να απενεργοποιηθεί. Παρόλα αυτά παρατηρούμε ότι υπάρχει σημαντική επίδραση των ΠΗΠ στην απενεργοποίηση του *B. coagulans*, καθώς ακόμα και στο pH=6 όπου το μικροβιακό φορτίο μειώνεται σημαντικά. Βέβαια, τα αποτελέσματα του διαγράμματος 6.10 μας προϊδεάζουν ότι για να επιτευχθεί η πλήρης απενεργοποίηση σε ένα περιβάλλον όπου ο μικροοργανισμός παρουσιάζει ισχυρό φορτίο, όπως για το pH=6, είναι αναγκαία είτε η εφαρμογή ακόμα πιο ακραίων συνθηκών της τάξης $E > 20 \text{ kV/cm}$ ή η συνδυαστική δράση των ΠΗΠ και της θερμικής επεξεργασία η οποία θα μελετηθεί στην ενότητα 5.3.3.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα περιεγράφηκαν μαθηματικά χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Gompertz (Εξίσωση 4.3), καθώς είχε καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Από την εξίσωση του Gompertz υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης για όλες τις μελετώμενες συνθήκες, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.

Στην συνέχεια, υπολογίστηκαν οι παράμετροι απενεργοποίησης όπως στην θερμική μέθοδο μέσω των εξισώσεων 4.4 (για τον χρόνο υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου D-value) και 4.7 (για την σταθερά a). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2.

Πίνακας 5.4: Αποτελέσματα παραμέτρων απενεργοποίησης για την επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm στα πρότυπα διαλύματα με pH 4,5 και 6,0.

pH	E(kV/cm)	k(1/ms)	D(ms)	λ(ms)	a	Dref
4,5	11	0,92±0,14 ^{cA}	1,10±0,16 ^{aB}	-	0,08±0,01 ^B	0,40±0,16 ^B
	15	2,45±0,31 ^{bA}	0,41±0,05 ^{bB}	-		
	20	3,22±0,41 ^{aA}	0,31±0,04 ^{bB}	-		
6,0	11	0,07±0,02 ^{aB}	15,15±4,50 ^{aA}	-	1,17±0,11 ^A	6,67±0,48 ^A
	15	0,10±0,02 ^{bB}	10,20±2,09 ^{abA}	-		
	20	0,22±0,08 ^{bB}	4,59±1,91 ^{bA}	-		

Τα ± αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3, 4.4 και 4.7. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ηλεκτρικών πεδίων και μεγάλα γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών pH από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Από τον πίνακα 5.2 επιβεβαιώνεται πως οι ρυθμοί απενεργοποίησης για το pH ίσο με 4,5 ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι από το pH 6,0 σε όλες τις εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου. Συγκεκριμένα, οι ρυθμοί απενεργοποίησης για το pH=4,5 ήταν από 0,92 μέχρι 3,22 ms^{-1} , ενώ για το pH=6 λαμβάνει τιμές από 0.07 έως 0.22 ms^{-1} . Αντίστοιχα ο χρόνος υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου είναι πολύ μεγαλύτερος για

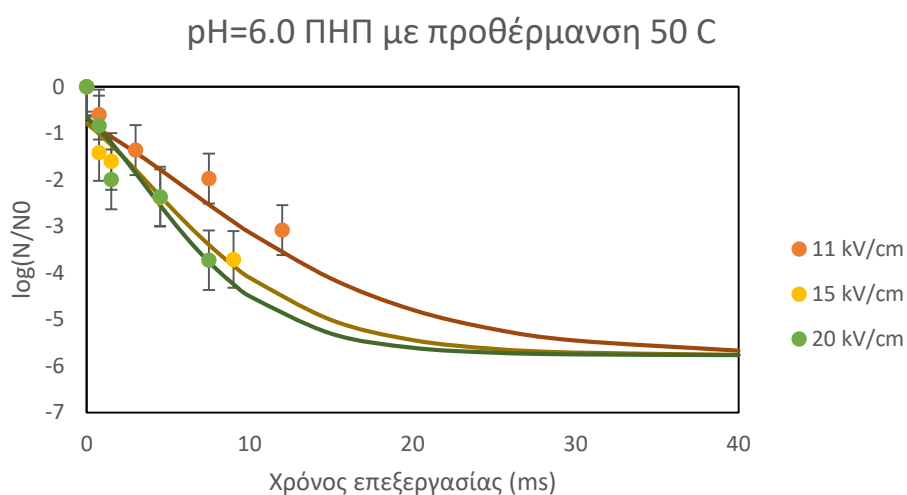
το pH=6 σε όλα τα πεδία, αποτέλεσμα που δηλώνει ότι η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού στο συγκεκριμένο pH είναι πολύ πιο δύσκολη, ενώ τα οι παράμετροι a δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο τιμών pH. Επίσης να σημειωθεί πως μέσω της μοντελοποίησης με την εξίσωση του Gompertz (Εξίσωση 4.3) όλα τα λ βγήκαν πρακτικά μηδέν, οπότε θεωρούμε πως δεν απαιτείται κάποιος χρόνος μέχρι να πραγματοποιηθεί η πρώτη απενεργοποίηση. Τέλος, η παράμετρος a υπολογίστηκε μέσω μία τιμής αναφοράς E_{ref} , όπου στην προκειμένη περίπτωση ορίστηκαν τα 18 kV/cm, και υποδηλώνει την εξάρτηση που έχει η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, όπου στην προκειμένη περίπτωση παίρνει τιμές 6,35 και 7,46 για τις δύο τιμές του pH. Άρα συμπεραίνουμε ότι η εξάρτηση αυτή είναι μεγαλύτερη για το pH=6,0.

Στην βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί ακόμα η απενεργοποίηση του *B. coagulans* μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ. Παρόλα αυτά υπάρχει εκτενής μελέτη για την μικροβιακή απενεργοποίηση και οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε άλλους μικροοργανισμούς. Αρχικά, οι Sale & Hamilton (1967) και οι Hulsheger, Potel & Niemann (1983) ήταν από τους πρώτους οι οποίοι έδειξαν ότι η μικροβιακή απενεργοποίηση σχετίζεται άμεσα τόσο με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου όσο και με τον χρόνο της επεξεργασίας. Όσο δηλαδή αυξάνεται μία ή και οι 2 αυτές παράμετροι, τόσο μεγαλύτερη είναι η απενεργοποίηση των διαφόρων μικροοργανισμών που μελετιούνται μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ. Οι Aronsson et al. (2001) μελέτησαν την απενεργοποίηση των *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* και *Saccharomyces cerevisiae* σε συνθήκες έντασης ηλεκτρικού πεδίου 25 – 35 kV/cm και χρόνους επεξεργασίας έως 120 ms. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι ο *S. cerevisiae* είναι σαφώς πιο ευαίσθητος στην επεξεργασία με ΠΗΠ και επιτυγχάνεται η πλήρης απενεργοποίηση του, ενώ την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα έδειξαν οι *L. Innocua* και *L. Mesenteroides*. Αυτό δείχνει ότι ο κάθε μικροοργανισμός έχει διαφορετική συμπεριφορά στην επεξεργασία με ΠΗΠ και ο ρυθμός απενεργοποίησης τους βασίζεται σε διάφορους παράγοντες όπως το σχήμα, το μέγεθος και τα γενικότερα χαρακτηριστικά των μικροοργανισμών. Έτσι, οι Mazurek, Lubicki & Staroniewicz (1995) έχουν αποδείξει πειραματικά ότι τα αρνητικά κατά gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα στην επεξεργασία μέσω ΠΗΠ σε σχέση με τα θετικά κατά gram. Η παρατήρηση αυτή μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι θεωρητικά και ο *B. coagulans* θα απενεργοποιείται με μεγαλύτερη δυσκολία, καθώς αποτελεί θετικό κατά gram βακτήριο.

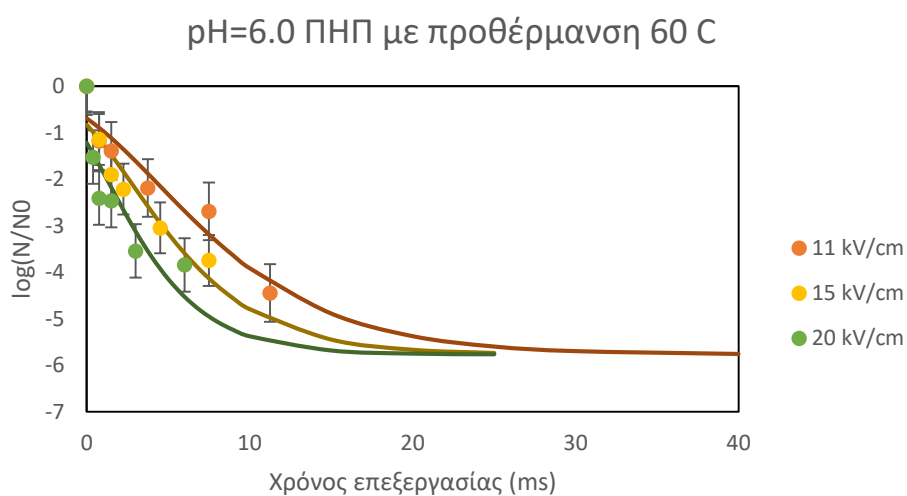
5.3.3 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης με παλμικά ηλεκτρικά πεδία και προ-θέρμανση του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* σε pH=6.0

Όπως παρατηρήθηκε στην ενότητα 6.3.2, παρόλο που υπήρχε επίδραση των ΠΗΠ στην απενεργοποίηση του *B. coagulans* στο pH=6, δεν επιτεύχθηκε η πλήρης απενεργοποίηση του μικροοργανισμού. Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση των ΠΗΠ με την βοήθεια της προθέρμανσης για να διευκρινιστεί αν η προθέρμανση μπορεί να ενισχύσει την επίδραση των ΠΗΠ στην απενεργοποίηση του

μικροοργανισμού. Ως θερμοκρασίες προθέρμανσης μελετήθηκαν οι 50 και οι 60 °C αντίστοιχα. Τα δείγματα προθερμαίνονταν μέχρι να φτάσουν την κατάλληλη θερμοκρασία και στην συνέχεια ακολουθούσε η επεξεργασία με ΠΗΠ. Οι συνθήκες οι οποίες μελετήθηκαν ήταν οι ίδιες με αυτές της επεξεργασίας χωρίς προθέρμανση για να μπορέσει να υπάρξει σύγκριση μεταξύ τους (11, 15 και 20 kV/cm). Στην συνέχεια, όπως σε όλα τα πειράματα, πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση και δημιουργήθηκαν τα διαγράμματα απενεργοποίησης του *B. coagulans* μέσω επεξεργασίας με ΠΗΠ με την βοήθεια της προθέρμανσης.

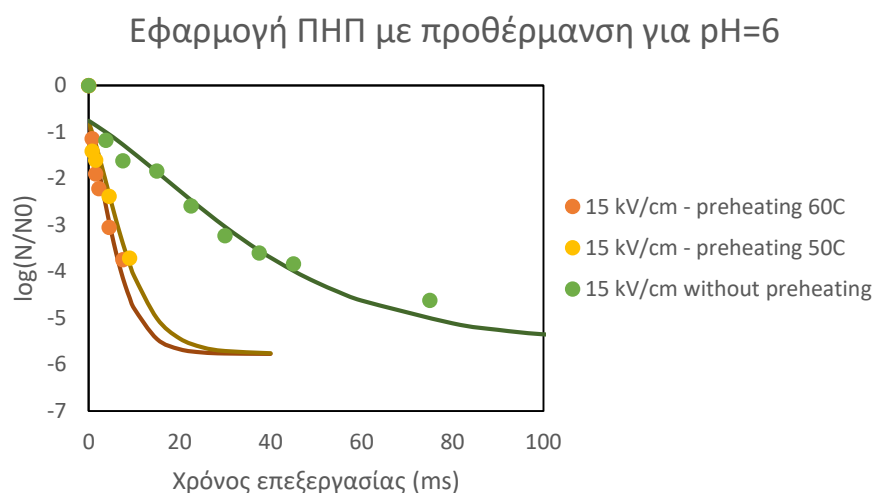


Διάγραμμα 5.11: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* στο pH=6,0 για επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11,15 και 20 kV/cm με την βοήθεια προθέρμανσης στους 50°C. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



Διάγραμμα 5.12: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* στο pH=6,0 για επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11,15 και 20 kV/cm με την βοήθεια προθέρμανσης στους 60°C. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν

την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



*Διάγραμμα 5.13: Σύγκριση απενεργοποίησης *B. coagulans* μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ στα 15 kV/cm με προθέρμανση στους 50 και 60 °C και χωρίς προθέρμανση. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.*

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, με την εφαρμογή της προθέρμανσης ο μικροοργανισμός απενεργοποιήθηκε πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με την απλή επεξεργασία με ΠΗΠ και οι χρόνοι επεξεργασίας που χρειάστηκαν για την πλήρη απενεργοποίηση ήταν μικρότεροι των 20 ms για όλα τα πεδία που μελετήθηκαν. Επιπλέον, όπως αναμενόταν η προθέρμανση στους 60°C οδήγησε σε πιο γρήγορη απενεργοποίηση του μικροοργανισμού σε σύγκριση με αυτή στους 50°C και παρά τις μικρές διαφορές θεωρείται πιο αποτελεσματική θερμοκρασία προθέρμανσης για τον *B. coagulans*.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα περιγράφηκαν μαθηματικά χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Gompertz (Εξίσωση 4.3), καθώς είχε καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Από την εξίσωση του Gompertz υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης για όλες τις μελετώμενες συνθήκες, οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 5.3. Εν συνεχεία, υπολογίστηκαν οι παράμετροι απενεργοποίησης σύμφωνα με τις εξισώσεις 4.4 και 4.7. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα παραμέτρων απενεργοποίησης για την επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm στο πρότυπο διαλύματα με pH 6,0 με την βοήθεια της προθέρμανσης στους 50 και 60 °C

T(°C)	E(kV/cm)	k(1/ms)	D(ms)	λ(ms)	a	Dref
50	11	0,27±0,05 ^{bA}	3,72±0,71 ^{aA}	-	0,21±0,09 ^A	
	15	0,49±0,15 ^{abA}	2,05±0,70 ^{ba}	-		1,98±0,47 ^A
	20	0,55±0,16 ^{aB}	1,93±0,58 ^{ba}	-		

60	11	0,44±0,11 ^{bA}	2,37±0,61 ^{aA}	-	0,17±0,02 ^A	1,08±0,02 ^B
	15	0,68±0,19 ^{bA}	1,55±0,45 ^{abA}	-		
	20	1,25±0,32 ^{aA}	0,83±0,22 ^{bB}	-		

Τα ± αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3, 4.4 και 4.7. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ηλεκτρικών πεδίων και μεγάλα γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών προθέρμανσης από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Από τον πίνακα 5.3 επιβεβαιώνεται ότι η προθέρμανση στους 60°C είναι πιο αποτελεσματική από αυτήν στους 50°C, καθώς οι ρυθμοί απενεργοποίησης είναι μεγαλύτεροι σε όλα τα πεδία και αντίστοιχα οι χρόνοι υποδεκαπλασιασμού είναι μικρότεροι. Συγκεκριμένα, οι ρυθμοί απενεργοποίησης για την προθέρμανση στους 50°C παίρνουν τιμές από 0,27 έως 0,55 ms^{-1} , ενώ για την προθέρμανση στους 60°C έχει τιμές από 0,44 έως 1,25 ms^{-1} . Η απενεργοποίηση μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ υποβοηθούμενη από προθέρμανση στους 60°C πραγματοποιείται 2 με 3 φορές πιο γρήγορα από την αντίστοιχη στους 50°C.

Επιπλέον δεν υπάρχει σημαντική διαφορά και στις παραμέτρους a , καθώς η διαφορά μεταξύ των δύο θερμοκρασιών προθέρμανσης είναι 2 μονάδες, οπότε η εξάρτηση της απενεργοποίησης από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου είναι λίγο μεγαλύτερη για την επεξεργασία με προθέρμανση στους 50°C. Όσον αφορά την σύγκριση της απλής επεξεργασίας με ΠΗΠ με την επεξεργασία με την βοήθεια της προθέρμανσης θα παρατηρήσουμε ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στις παραμέτρους απενεργοποίησης. Έτσι, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του πίνακα 5.2 με αυτά του πίνακα 5.3 φαίνεται ότι οι ρυθμοί απενεργοποίησης στο πρότυπο διάλυμα με $\text{pH}=6,0$ με την βοήθεια της προθέρμανσης είναι σημαντικά μεγαλύτεροι, αφού χωρίς την προθέρμανση λαμβάνουν τιμές έως 0,22 ms^{-1} στα 20 kV/c, ενώ η αντίστοιχη τιμή μέσω της προθέρμανσης στους 60°C είναι 1,25 ms^{-1} στο ίδιο ηλεκτρικό πεδίο. Υπάρχει, δηλαδή, αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης έως και 5 φορές. Αντίστοιχα οι τιμές του D-value είναι πολύ μικρότερες όταν υπάρχει προθέρμανση. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι με την βοήθεια της προθέρμανσης ο μικροοργανισμός φτάνει σε πλήρη απενεργοποίηση και απενεργοποιείται πολύ πιο γρήγορα και αποτελεσματικά σε όλες τις εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου.

Έτσι λοιπόν, είναι εύκολα αντιληπτό ότι σε πολλές περιπτώσεις η ύπαρξη της προθέρμανσης πριν από την επεξεργασία με ΠΗΠ είναι απαραίτητη ώστε οι μικροοργανισμοί να απενεργοποιηθούν πολύ πιο γρήγορα χωρίς να χρησιμοποιούνται ακραίες τιμές έντασης ηλεκτρικού πεδίου ($E > 20 \text{ kV/cm}$), μειώνοντας έτσι και την κατανάλωση ενέργειας.

Βιβλιογραφικά δεν έχει μελετηθεί η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού *B. coagulans* μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ. Παρόλα αυτά υπάρχει πληθώρα ερευνών που έχουν αναλύσει την απενεργοποίηση άλλων μικροοργανισμών, όπως της *E. coli*,

του *B. subtilis* και άλλων, μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ με την βοήθεια της θερμικής μεθόδου ως μέθοδο προεπεξεργασίας (Siemer et al. 2013; Amiali 2006; Zeyao Yan 2021). Οι Siemer et al. (2013) μελέτησαν την απενεργοποίηση των σπορίων του *B. subtilis* μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ σε συνδυασμό με την εφαρμογή θερμικής ενέργειας. Η εφαρμογή θερμικής ενέργειας αύξανε και την θερμοκρασία και μελετήθηκε το ποσοστό της απενεργοποίησης που οφείλεται στην θερμική μέθοδο και αντίστοιχα στην επεξεργασία με ΠΗΠ. Οι θερμοκρασίες προθέρμανσης οι οποίες μελέτησε ήταν από 50 έως 80 °C και η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόστηκε ήταν 9 kV/cm, ενώ η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε διαλύματα με pH 4 και 7. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέσω της προθέρμανσης υπήρξε απενεργοποίηση των σπορίων του μικροοργανισμού μέχρι και 1,5 log(N/N₀) και συνολικά τα ΠΗΠ πεδία ευθύνονται για το 60 – 90 % της απενεργοποίησης και έτσι απέδειξε την θετική επίδραση της συνδυαστικής εφαρμογής των ΠΗΠ με την θερμική μέθοδο. Ο Amiali (2006) ερεύνησε την συνεργιστική δράση της θερμικής επεξεργασίας και των ΠΗΠ για την απενεργοποίηση των *E. coli* και *S. enteritidis* στον υγρό κρόκο αυγού. Ως προθέρμανση όρισε τους 20, 30 και 40 °C και ως ένταση ηλεκτρικού πεδίου τα 20 και 30 kV/cm. Μέσω των αποτελεσμάτων αποδείχθηκε πως παρόλο που δεν υπάρχει μεγάλη διαφορά στην απενεργοποίηση μεταξύ των δύο ηλεκτρικών πεδίων, υπάρχει μεγάλη διαφορά όσο αυξάνεται η θερμοκρασία προθέρμανσης. Έτσι, όσο αυξανόταν η θερμοκρασία, αυξανόντουσαν και οι ρυθμοί απενεργοποίησης και στους δύο μικροοργανισμούς. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι οι παραπάνω μικροοργανισμοί είναι μεσόφιλοι, γι' αυτό και οι θερμοκρασίες προθέρμανσης είναι χαμηλότερες από αυτές που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία για τον *B. coagulans*, ο οποίος είναι θερμόφιλος. Τέλος, ο Zeyao Yan (2021) σε μία πολύ ολοκληρωμένη έρευνα μελέτησε την επίδραση της προθέρμανσης στην απενεργοποίηση διαφόρων μικροοργανισμών μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ. Οι μικροοργανισμοί με που μελετήθηκαν ήταν οι *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* και *Bacillus velezensis*. Η έρευνα παρουσίασε πολλές ομοιότητες με την παρούσα εργασία μελετώντας πληθώρα συνθηκών όσον αφορά την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου και του αριθμού των παλμών που εφαρμόστηκαν. Έτσι, εφάρμοσε ένταση ηλεκτρικού πεδίου 5 – 25 kV/cm, αριθμό παλμών 0 – 1200 και θερμοκρασίες προθέρμανσης 30 – 50 °C. Απέδειξε πως υπάρχει μεγάλη επίδραση της προθέρμανσης στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών μέσω των ΠΗΠ. Για παράδειγμα, η διαφορά μεταξύ της απλής εφαρμογής ΠΗΠ σε σύγκριση με την με την εφαρμογή ΠΗΠ με την βοήθεια της προθέρμανσης στους 50 °C είχε διαφορά απενεργοποίησης 2 – 3 λογαριθμικούς μικροβιακού φορτίου στους μικροοργανισμούς και γενικότερα αύξησε τον ρυθμό αδρανοποίησης τους. Ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί ότι η παρουσία της προθέρμανσης θα μπορούσε να μειώσει αποτελεσματικά το ποσοστό επιβίωσης των μικροβίων από τα ΠΗΠ και να αποφύγει τη διηλεκτρική διάσπαση που προκαλείται από την υπερβολική ένταση ηλεκτρικού πεδίου.

Από την άλλη πλευρά όσον αφορά τον μικροοργανισμό που μελετήθηκε στην παρούσα έρευνα, *B. coagulans*, παρόλο που βιβλιογραφικά δεν έχει μελετηθεί ακόμα

η συνδυαστική επίδραση των ΠΗΠ με την θερμική μέθοδο, έχει ερευνηθεί η συνεργιστική δράση της προθέρμανσης με μία άλλη μη θερμική μέθοδο επεξεργασίας, την Υπερυψηλή Πίεση (Wang 2009; Gao 2011). Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών έδειξαν σημαντική επίδραση της προθέρμανσης στην απενεργοποίηση του *B. coagulans* ακολουθούμενη από επεξεργασία Υπερυψηλής πίεσης. Τα συμπεράσματα αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ανοίγουν τον δρόμο ώστε στο μέλλον να υπάρξουν περισσότερες και πιο ολοκληρωμένες έρευνες για την επίδραση των ΠΗΠ με και χωρίς προθέρμανσης στην απενεργοποίηση του *B. Coagulans*.

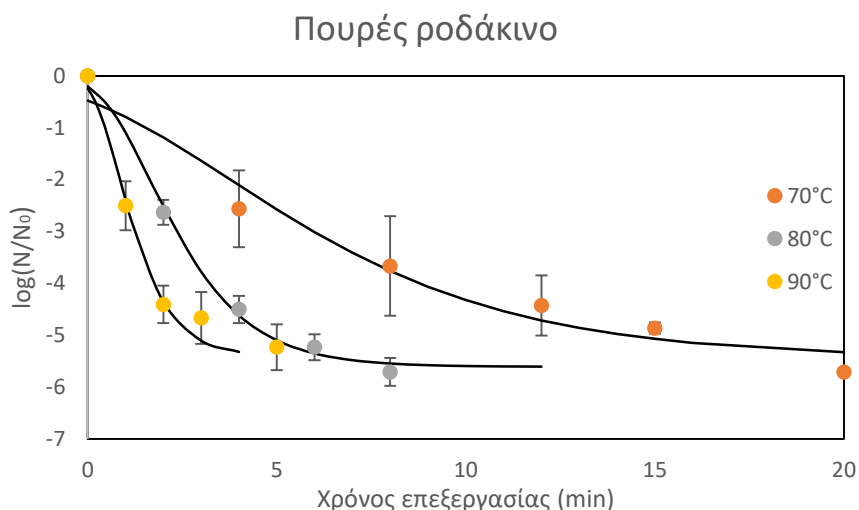
Συνολικά, τόσο βιβλιογραφικά όσο και πειραματικά αποδείχθηκε ότι η εφαρμογή της προθέρμανσης μπορεί να έχει σημαντικά οφέλη στην απενεργοποίηση των μικροοργανισμών και να αυξήσει τον αντίστοιχο ρυθμό απενεργοποίησης χωρίς να γίνεται εφαρμογή ακραίων συνθηκών των παραμέτρων των ΠΗΠ. Είναι ανάγκη να υπάρξει περαιτέρω έρευνα και μελέτη για την εφαρμογή των κατάλληλων θερμοκρασιών και συνθηκών για κάθε μικροοργανισμό ενδιαφέροντος ξεχωριστά.

5.3.4 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* με εφαρμογή σε τρόφιμα

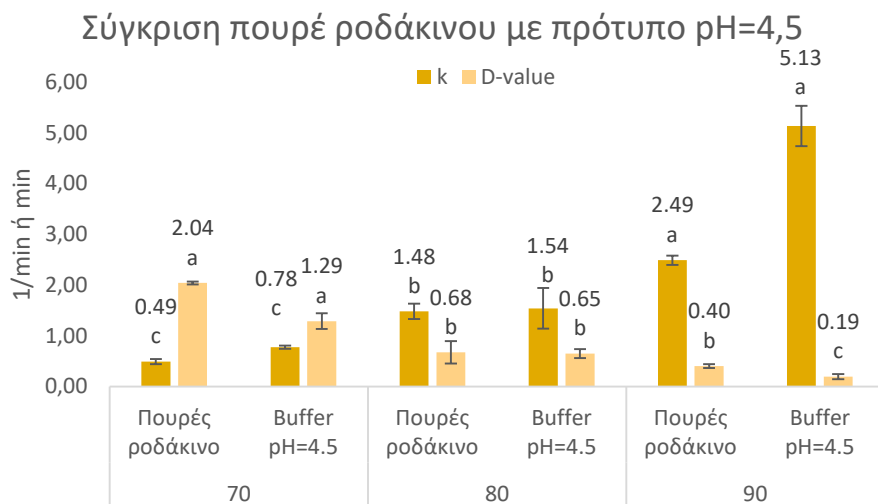
Αφού ολοκληρώθηκε η έρευνα για την απενεργοποίηση του *B. coagulans* μέσω της θερμικής επεξεργασίας, των ΠΗΠ αλλά και μέσω της συνδυαστικής επεξεργασίας σε πρότυπα διαλύματα διαφόρων pH, ακολούθησε η εφαρμογή όλων των παραπάνω σε τρόφιμα και πιο συγκεκριμένα σε πουρέ ροδακίνου με pH=4,5, και σε χυμό καρότο με pH=6,0. Τα τρόφιμα αφού είχαν αποστειρωθεί πλήρως, εμβολιαζόταν σε αυτά ο μικροοργανισμός (8,0 logCFU/g) και ακολουθούσε η ίδια διαδικασία που είχε πραγματοποιηθεί και στα πειράματα με τα πρότυπα διαλύματα. Στο θερμικό πείραμα εξετάστηκαν οι θερμοκρασίες των 70, 80 και 90 °C, ενώ αντίστοιχα για τα ΠΗΠ μελετήθηκαν τα ηλεκτρικά πεδία έντασης 11, 15 και 20 kV/cm σε διάφορους χρόνους επεξεργασίας. Τέλος εφαρμόστηκε και η συνδυαστική επίδραση των ΠΗΠ με την θερμική μέθοδο μέσω της προθέρμανσης στους 60 °C.

5.3.4.1 Κινητικό πείραμα θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* εμβολιασμένο σε πουρέ ροδάκινου και σε χυμό καρότου

Η κινητική θερμικής απενεργοποίησης του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* εμβολιασμένου σε πουρέ ροδακίνου με pH=4,5, και σε χυμό καρότο με pH=6,0 και η σύγκριση τους με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα με το ίδιο pH φαίνεται στα διαγράμματα 5.14 – 5.17. Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα περιεγράφηκαν μαθηματικά χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Gompertz (Εξίσωση 4.3), καθώς είχε καλή προσαρμογή στα πειραματικά δεδομένα σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν. Από την εξίσωση του Gompertz υπολογίστηκαν οι σταθερές του ρυθμού απενεργοποίησης για όλες τις μελετώμενες συνθήκες και οι παράμετροι απενεργοποίησης σύμφωνα με τις εξισώσεις 4.4 – 4.6.

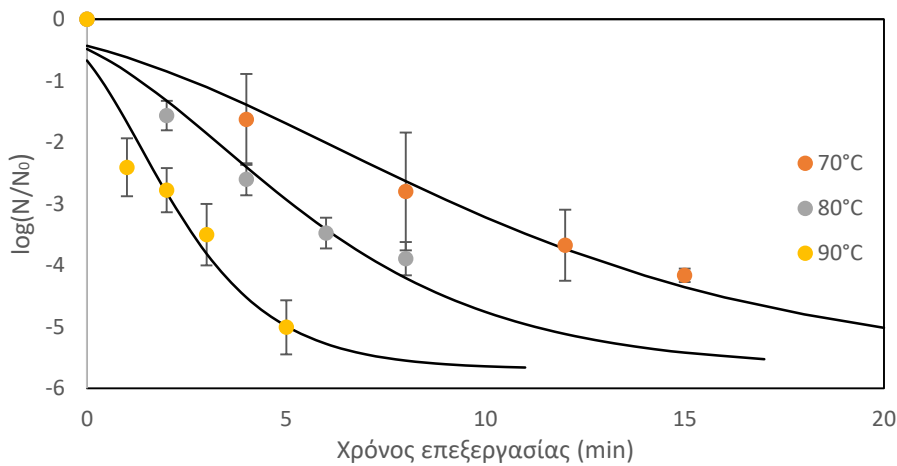


Διάγραμμα 5.14: Θερμική απενεργοποίηση *B. coagulans* σε πουρέ ροδάκινο σε θερμοκρασίες 70, 80 και 90 °C για χρόνους επεξεργασίας έως 20 min. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.



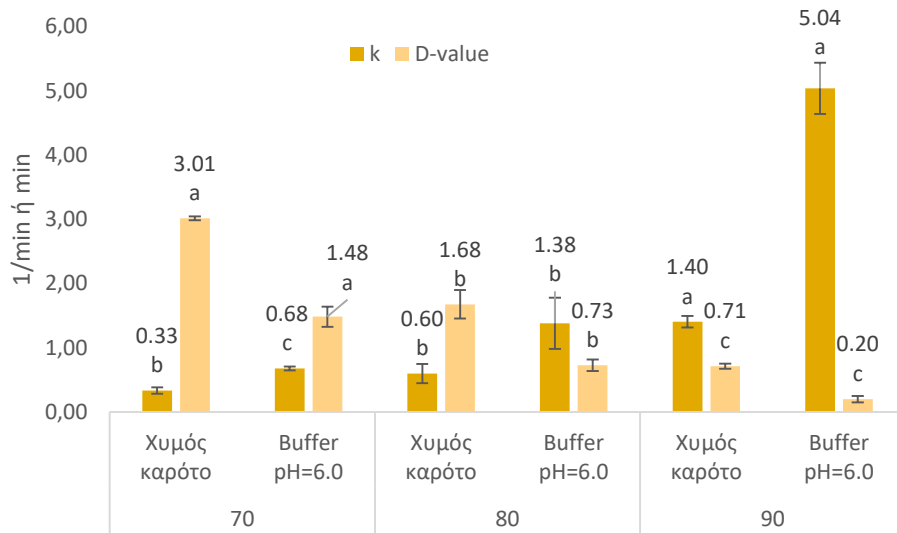
Διάγραμμα 5.15: Κινητικές σταθερές *k* και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου *D-value* για την θερμική απενεργοποίηση του *B. coagulans* σε πουρέ ροδάκινο σε σύγκριση με το πρότυπο διάλυμα με pH 4,5 σε θερμοκρασίες 70, 80 και 90 °C. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα που υπολογίστηκε από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3 και 4.4. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Χυμός καρότο



Διάγραμμα 5.16: Θερμική απενεργοποίηση *B. coagulans* σε χυμό καρότο σε θερμοκρασίες 70, 80 και 90 °C για χρόνους επεξεργασίας έως 20 min. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.

Σύγκριση χυμού καρότου με πρότυπο pH=6,0



Διάγραμμα 5.17: Κινητικές σταθερές *k* και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου *D-value* για την θερμική απενεργοποίηση του *B. coagulans* σε χυμό καρότο σε σύγκριση με το πρότυπο διάλυμα με pH 6,0 σε θερμοκρασίες 70, 80 και 90 °C. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα που υπολογίστηκε από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3 και 4.4. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Αρχικά όπως αναμενόταν η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού στον χυμό καρότο ήταν πιο αργή και λιγότερο αποτελεσματική από ότι στον πουρέ ροδάκινο, όπως αντίστοιχα είχε γίνει και στα πρότυπα διαλύματα με pH 6,0 και 4,5, αντίστοιχα. Όπως έχει αναφερθεί ήδη, ο *B. coagulans* δείχνει μεγαλύτερη αντοχή σε περιβάλλον με pH κοντά στην τιμή 6 και σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα αποδείχθηκε ότι η

παρατήρηση αυτή ισχύει και στα πραγματικά τρόφιμα πέρα από τα πρότυπα διαλύματα.

Συγκρίνοντας τους ρυθμούς απενεργοποίησης για τα δύο τρόφιμα, παρατηρούμε ότι η απενεργοποίηση του *B. coagulans* στον πουρέ ροδάκινο πραγματοποιείται περίπου δύο φορές πιο γρήγορα σε σχέση με τον χυμό καρότο, καθώς οι ρυθμοί απενεργοποίησης έχουν τιμές 0,49, 1,48 και 2,49 min⁻¹ για τον πουρέ ροδάκινο όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, ενώ αντίστοιχα για τον χυμό καρότο οι τιμές είναι 0,33, 0,60 και 1,40 min⁻¹.

Εν συνεχεία, όπως φαίνεται από τα διαγράμματα υπάρχει πολύ έντονη διαφορά στην συμπεριφορά του *B. coagulans* μεταξύ των πρότυπων διαλυμάτων και των πραγματικών τροφίμων στα ίδια pH. Τα πρότυπα διαλύματα κατασκευάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να μελετηθεί η καθαρή εξάρτηση της απενεργοποίησης του μικροοργανισμού στις διάφορες τιμές του pH. Στα τρόφιμα, και στην προκειμένη περίπτωση στον πουρέ ροδάκινου και στον χυμό καρότου, περιέχονται και διάφορες άλλες χημικές ουσίες, όπως υδατάνθρακες, βιταμίνες, μέταλλα, σάκχαρα κ. α. , οι οποίες μπορούν να ενισχύσουν την ανάπτυξη του μικροβιακού φορτίου του *B. coagulans* και με αυτόν τον τρόπο να δημιουργήσουν ένα πιο ευνοϊκό περιβάλλον για τον μικροοργανισμό και τελικώς να μειωθεί ο ρυθμός απενεργοποίησης του σε σχέση με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα. Όλα αυτά δικαιολογούν την μεγάλη διαφορά στους ρυθμούς απενεργοποίησης μεταξύ των τροφίμων και των πρότυπων διαλυμάτων, η οποία μπορεί να είναι μέχρι και διπλάσια για τον πουρέ ροδάκινου και υπερτριπλάσια για τον χυμό καρότου στους 90°C. Αντίστοιχη είναι και η διαφορά και στους χρόνους υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου, καθώς τα D-value παίρνουν τιμές από 0,40 min στους 90°C έως 2,04 min στους 70°C για τον πουρέ ροδάκινο και από 0,71 min στους 90°C έως 3,01 min στους 70°C για το χυμό καρότο. Οι αντίστοιχες τιμές για το πρότυπο διάλυμα με pH=4,5 είναι 0,19 – 1,29 min όσο μειώνεται η θερμοκρασία και αντίστοιχως για το πρότυπο διάλυμα με pH=6,0 είναι 0,20 – 1,48 min.

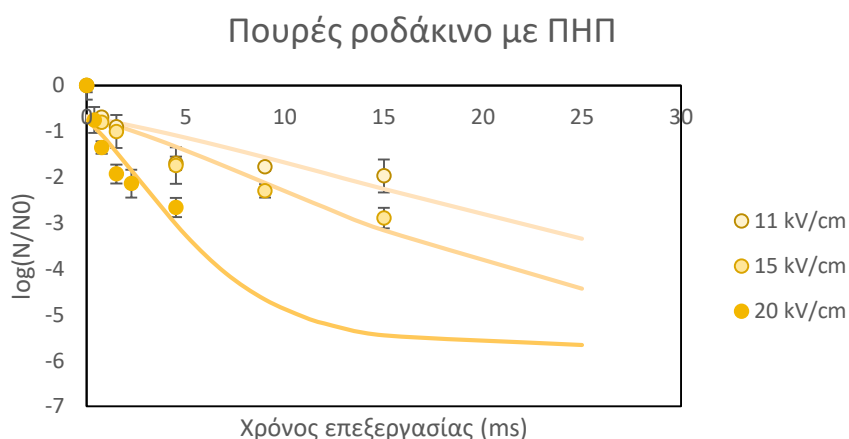
Τέλος υπολογίστηκαν και οι αντίστοιχες ενέργειες ενεργοποίησης και σταθερές θερμικής αντοχής για τα δύο τρόφιμα, οι οποίες παίρνουν τιμές $E_a=73,6\pm 9,1$ kJ/mol και $z=28,33\pm 8,5$ °C για τον πουρέ ροδάκινου και $E_a=84,4\pm 17,1$ kJ/mol και $z=26,95\pm 3,1$ °C.

Βιβλιογραφικά, μέχρι τώρα δεν έχουν αναφερθεί έρευνες για την απενεργοποίηση του *B. coagulans* σε πουρέ ροδάκινο ή χυμό καρότου, ώστε να μπορέσει να υπάρξει σύγκριση με τα αποτελέσματά μας. Οι περισσότερες μελέτες για την απενεργοποίηση του *B. coagulans* με την θερμική μέθοδο επεξεργασίας έχουν επικεντρωθεί κυρίως σε γαλακτοκομικά τρόφιμα και σε προϊόντα τομάτας (Mallidis 1990; Palop 1998; Jing Peng 2012). Ο Palop (1998) στην έρευνα που έκανε, μελέτησε την θερμική απενεργοποίηση του *B. coagulans* σε τομάτα και σπαράγγι σε pH 4 και 7 και τα συνέκρινε με πρότυπα διαλύματα ίδιων pH. Συγκρίνοντας τους χρόνους υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι τα δύο τρόφιμα απενεργοποιούνται πολύ πιο γρήγορα στο pH=4 σε σχέση με το pH=7.

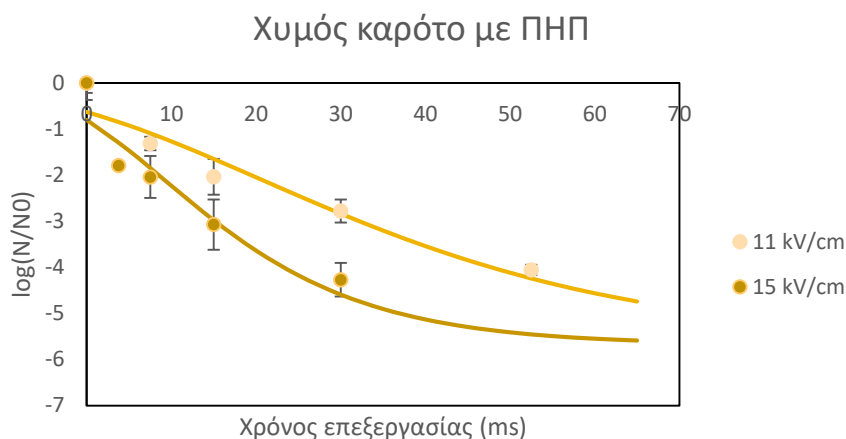
Πιο συγκεκριμένα, στο pH=4 τα D-value είχαν τιμές 0,79 min η τομάτα και 1,6 min το σπαράγγι και στο pH=7 είχαν 5,8 min και 4,4 min, αντίστοιχα. Σχετικά με την σύγκριση με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα, τα δύο τρόφιμα παρουσιάζουν αρκετά παρόμοια συμπεριφορά και αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σπόρια του στελέχους του *B. coagulans*, τα οποία πιθανόν να επηρεάζονται λιγότερο από τις διάφορες χημικές ουσίες που μπορεί να υπάρχουν στα εκάστοτε τρόφιμα. Οι Mallidis (1990) και Jing Peng (2012) από την πλευρά τους μελέτησαν την θερμική απενεργοποίηση του *B. coagulans* σε πάστα τομάτας και σε χυμό τομάτας με pH 4 – 4,5. Και οι δύο έδειξαν ότι με αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται ο ρυθμός απενεργοποίησης. Οι τιμές του D-value είναι παρόμοιες με αυτές του πουρέ ροδάκινου που έχει ίδιο pH, αλλά δε μπορεί να υπάρξει καθαρή σύγκριση μεταξύ τους καθώς πρόκειται για διαφορετικά τρόφιμα και η μελέτη έγινε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και αναφέρεται σε σπόρια του *B. coagulans*.

5.3.4.2 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* εμβολιασμένο σε πουρέ ροδάκινου και σε χυμό καρότου

Η απενεργοποίηση του *B. coagulans* με την μέθοδο των ΠΗΠ στα δύο τρόφιμα, φαίνεται στα Διαγράμματα 6.18 και 6.19, ενώ η κινητική απενεργοποίησης και σε αυτήν την περίπτωση υπακούει στην εξίσωση του Gompertz (Εξίσωση 4.3), από την οποία υπολογίστηκαν οι ρυθμοί απενεργοποίησης k (1/min) σε κάθε περίπτωση.



*Διάγραμμα 5.18: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* με ΠΗΠ σε πουρέ ροδάκινο σε πεδία ηλεκτρικής έντασης 11,15 και 20 kV/cm. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.*



Διάγραμμα 5.19: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* με ΠΗΠ σε χυμό καρότο σε πεδία ηλεκτρικής έντασης 11 και 15 kV/cm. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.

Βλέποντας τα παραπάνω διαγράμματα είναι εύκολα αντιληπτό ότι όπως και στην θερμική επεξεργασία, έτσι και στην επεξεργασία με ΠΗΠ, ο *B. coagulans* απενεργοποιείται με μικρότερο ρυθμό στο χυμό καρότο που έχει pH=6 σε σχέση με τον πουρέ ροδάκινο με pH=4,5. Όσο αυξάνεται η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου τόσο αυξανόταν και ο ρυθμός απενεργοποίησης του μικροοργανισμού και στα 2 τρόφιμα.

Η σύγκριση των δύο τροφίμων με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα, καθώς και οι παράμετροι απενεργοποίησης, οι οποίες υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις 4.4 και 4.7 φαίνονται στους πίνακες 5.4 και 5.5.

Πίνακας 5.6: Αποτελέσματα παραμέτρων απενεργοποίησης για την επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm στον πουρέ ροδάκινο σε σύγκριση με το πρότυπο διάλυμα με pH 4,5.

	E(kV/cm)	k(1/ms)	D(ms)	λ(ms)	a
Πουρές ροδάκινο	11	0,16±0,06 ^{bB}	6,25±2,79 ^{aA}	-	0,54±0,06 ^A
	15	0,28±0,06 ^{bB}	3,61±0,81 ^{abA}	-	
	20	0,75±0,14 ^{aB}	1,34±0,26 ^{bA}	-	
pH=4,5	11	0,92±0,14 ^{cA}	1,10±0,16 ^{aB}	-	0,08±0,01 ^B
	15	2,45±0,31 ^{bA}	0,41±0,05 ^{bB}	-	
	20	3,22±0,41 ^{aA}	0,31±0,04 ^{bB}	-	

Τα ± αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3, 4.4 και 4.7. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ηλεκτρικών πεδίων και μεγάλα γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ του χυμού ροδάκινου και του διαλύματος με pH=4,5 από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Πίνακας 5.7: Αποτελέσματα παραμέτρων απενεργοποίησης για την επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm στον χυμό καρότο σε σύγκριση με το πρότυπο διάλυμα με pH 6,0.

	E(kV/cm)	k(1/ms)	D(ms)	λ(ms)	a
Χυμός καρότο	11	0,09±0,02 ^{aA}	11,49±2,61 ^{aA}	-	1,43±0,00 ^A
	15	0,20±0,07 ^{aA}	5,46±2,03 ^{bB}	-	
pH=6	11	0,07±0,02 ^{aA}	15,15±4,50 ^{aA}	-	1,17±0,11 ^B
	15	0,10±0,02 ^{aB}	10,20±2,09 ^{aA}	-	

Τα ± αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3, 4.4 και 4.7. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ηλεκτρικών πεδίων και μεγάλα γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ του χυμού καρότου και του διαλύματος με pH=6 από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

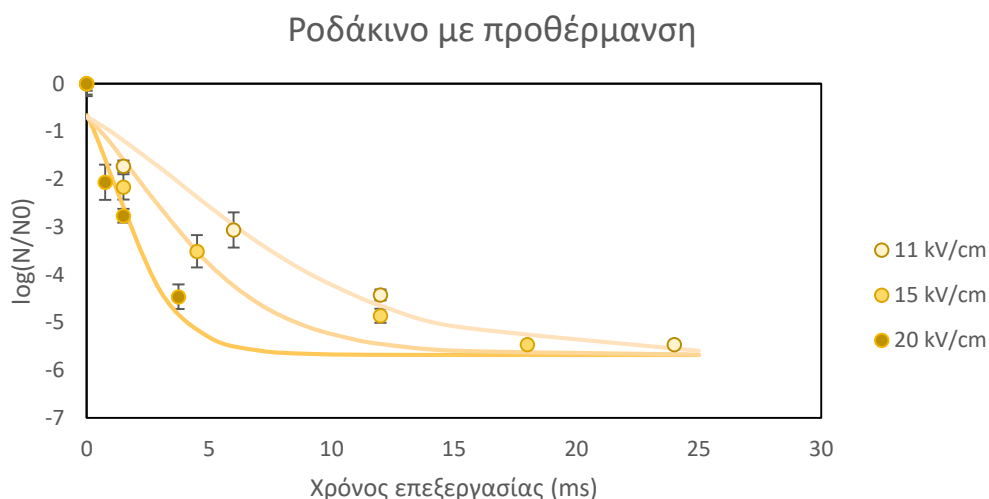
Η επεξεργασία με ΠΗΠ στα δύο τρόφιμα έδειξε σημαντικές διαφορές στην απενεργοποίηση του *B. coagulans* σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα, για τον πουρέ ροδάκινο η σταθερά απενεργοποίησης k παίρνει τιμές από 0,16 έως 0,75 ms^{-1} όσο αυξάνεται η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, οι οποίες είναι 4 με 5 φορές μικρότερες από τις αντίστοιχες τιμές για το πρότυπο διάλυμα με pH=4,5. Η διαφορά αυτή φαίνεται και στους χρόνους υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου. Όσον αφορά τον χυμό καρότο, φαίνεται ότι η απενεργοποίηση του *B. coagulans* επιτυγχάνεται πιο γρήγορα σε σχέση με το πρότυπο διάλυμα με pH=6, με τις διαφορές, ωστόσο, να είναι μικρότερες σε αυτήν την περίπτωση. Αυτό φαίνεται τόσο στις τιμές της σταθεράς k που είναι ελάχιστα μεγαλύτερες για τον χυμό καρότο, 0,09 ms^{-1} σε σχέση με 0,07 ms^{-1} αντίστοιχα στα 11 kV/cm, όσο και στις τιμές του D-value αλλά και της παραμέτρου a , που στην προκειμένη περίπτωση στον πουρέ ροδάκινο είναι μεγαλύτερη, δείχνοντας έτσι μεγαλύτερη εξάρτηση της απενεργοποίησης με την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου.

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την απενεργοποίηση μικροοργανισμών μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ σε διάφορα τρόφιμα, αλλά προς το παρόν δεν έχει ερευνηθεί ακόμα βιβλιογραφικά ο *B. Coagulans* εμβολιασμένος μέσα σε τρόφιμα. Για παράδειγμα, οι Kang Huang et al. (2014) μελέτησαν την απενεργοποίηση με ΠΗΠ σε πεδία έντασης 12, 18 και 24 kV/cm τριών μικροοργανισμών (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* DH5 α , και *Saccharomyces cerevisiae*) στον χυμό σταφυλιού, ο οποίος είχε pH=6. Στην έρευνα τους έδειξαν ότι ο *S. cerevisiae* παρουσιάζει την μεγαλύτερη ευαισθησία στην επεξεργασία με ΠΗΠ σε σχέση με τους άλλους δύο μικροοργανισμούς. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση στην οποία κατέληξαν οι Kang Huang et al. (2014) συγκρίνοντας αυτούς τους τρεις μικροοργανισμούς, ήταν ότι η απενεργοποίησή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος και το σχήμα των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, έδειξαν ότι όσο μεγαλύτερα είναι τα κύτταρα του κάθε μικροοργανισμού, τόσο πιο εύκολα πραγματοποιείται η ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων και συνεπώς επιταχύνεται η μικροβιακή απενεργοποίηση με ΠΗΠ. Σε μία

άλλη βιβλιογραφική έρευνα του Allen L. Garner (2019) υπάρχει μία σύνοψη των περισσότερων εργασιών που έχουν ασχοληθεί με την απενεργοποίηση διάφορων μικροοργανισμών σε προϊόντα τροφίμων μέσω επεξεργασίας με ΠΗΠ. Οι συνθήκες επεξεργασίας και η απενεργοποίηση των μικροοργανισμών ποικίλουν ανάλογα το τρόφιμο, αλλά και τον εκάστοτε μικροοργανισμό που μελετήθηκε.

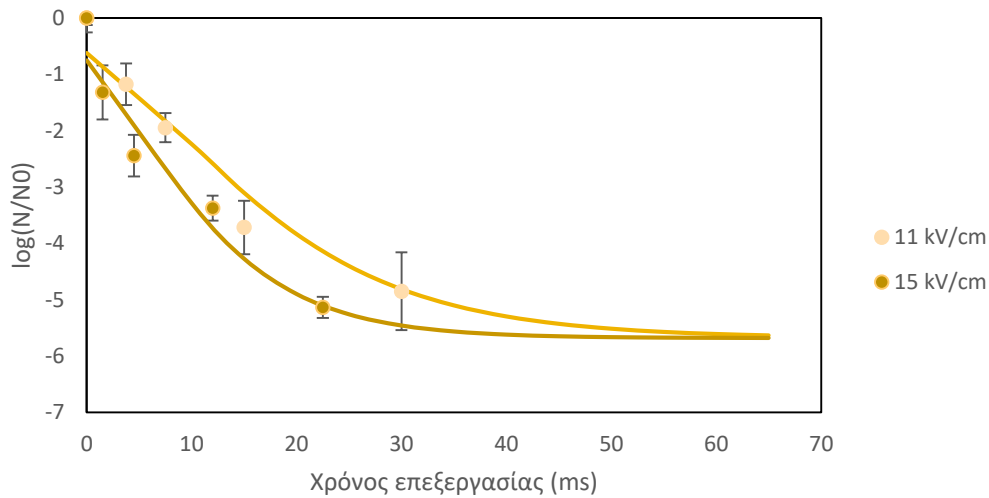
5.3.4.3 Κινητικό πείραμα απενεργοποίησης με ΠΗΠ του μικροοργανισμού *Bacillus coagulans* εμβολιασμένο σε πουρέ ροδάκινου και σε χυμό καρότου με την βοήθεια της προθέρμανσης

Τα αποτελέσματα στην ενότητα 5.3.4.2 έδειξαν ότι ο *B. coagulans* παρουσιάζει υψηλή ανθεκτικότητα στην επεξεργασία με ΠΗΠ και παρόλο που τα ΠΗΠ έχουν επίδραση στην απενεργοποίηση του, δεν απενεργοποιείται πλήρως στις συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Για τον λόγο αυτό, μελετήθηκε και η συνδυαστική χρήση της θερμικής μεθόδου με τα ΠΗΠ για να εξακριβωθεί αν η προθέρμανση δρα συνεργιστικά με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού. Οι συνθήκες που εξετάστηκαν ήταν για ένταση ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm σε χρόνους επεξεργασίας έως 30 ms και η θερμοκρασία προθέρμανσης ήταν οι 60 °C. Η απενεργοποίηση του *B. coagulans* περιγράφεται από το κινητικό μοντέλο Gompertz σε όλες τις συνθήκες επεξεργασίας.



*Διάγραμμα 5.20: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* στον πουρέ ροδάκινου για επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11,15 και 20 kV/cm με την βοήθεια προθέρμανσης στους 60°C. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.*

Καρότο με προθέρμανση



Διάγραμμα 5.21: Απενεργοποίηση του *B. coagulans* στον χυμό καρότο για επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11 και 15 kV/cm με την βοήθεια προθέρμανσης στους 60°C. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.

Τα Διαγράμματα 5.20 και 5.21 επιβεβαιώνουν ότι η προθέρμανση δρα συνεργιστικά με τα ΠΗΠ στην απενεργοποίηση του *B. coagulans*. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι επιτυγχάνεται πλήρης απενεργοποίηση του μικροοργανισμού σε χρόνους επεξεργασίας μέχρι 25 ms για τον πουρέ ροδάκινο και μέχρι 60 ms για τον χυμό καρότο, ενώ χωρίς προθέρμανση δεν καταφέραμε την πλήρη απενεργοποίηση. Οι ρυθμοί απενεργοποίησης υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Gompertz και οι παράμετροι απενεργοποίησης υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις 4.4 και 4.5 και παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.8: Αποτελέσματα παραμέτρων απενεργοποίησης για την επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm στον πουρέ ροδάκινο με την βοήθεια της προθέρμανσης στους 60 °C.

T(°C)	E(kV/cm)	k(1/ms)	D(ms)	λ(ms)	a
60	11	0,48±0,14 ^b	2,21±0,67 ^a	-	0,17±0,03 ^B
	15	0,85±0,23 ^b	1,24±0,35 ^b	-	
	20	1,76±0,38 ^a	0,59±0,13 ^b	-	

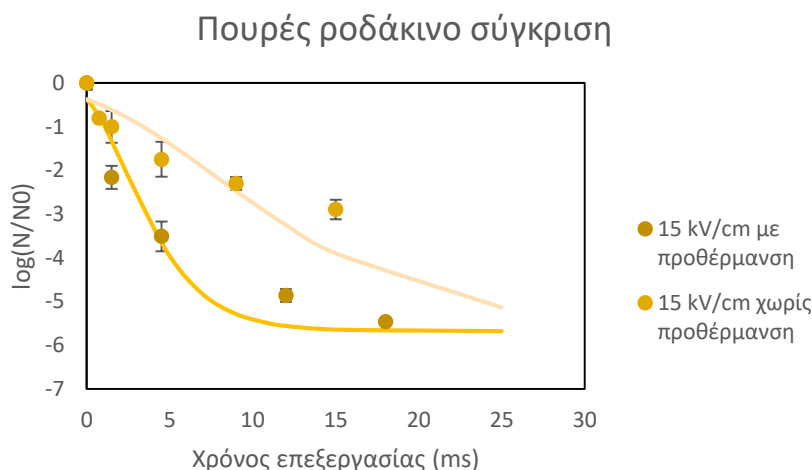
Τα ± αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3, 4.4 και 4.7. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ηλεκτρικών πεδίων από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Πίνακας 5.9: Αποτελέσματα παραμέτρων απενεργοποίησης για την επεξεργασία με ΠΗΠ σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11 και 15 kV/cm στον χυμό καρότο με την βοήθεια της προθέρμανσης στους 60 °C.

T(°C)	E(kV/cm)	k(1/ms)	D(ms)	λ(ms)	a
60	11	0,25±0,04 ^a	4,03±0,65 ^a	-	0,26±0,01 ^A
	15	0,33±0,11 ^a	3,28±1,25 ^a	-	

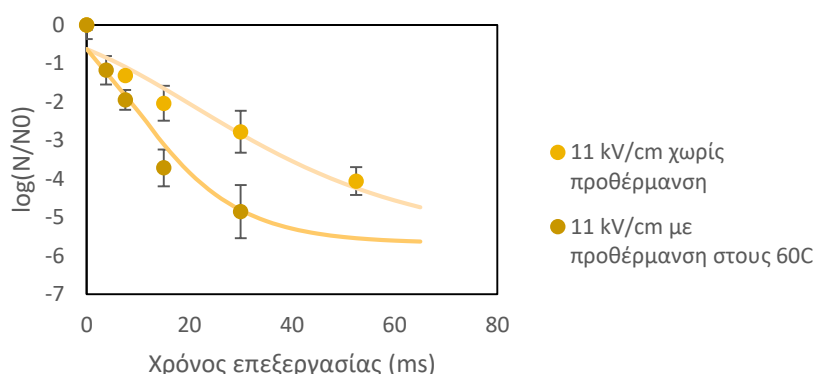
Τα \pm αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στις Εξ. 4.3, 4.4 και 4.7. Διαφορετικά μικρά γράμματα υποδεικνύουν σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) μεταξύ των διαφορετικών ηλεκτρικών πεδίων από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την one-way ANOVA analysis.

Και σε αυτήν την περίπτωση παρατηρούμε ότι οι ρυθμοί απενεργοποίησης k είναι μικρότερες στον χυμό καρότο, καθώς η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού παρατηρείται με πιο αργό τρόπο σε σχέση με τον πουρέ ροδάκινο. Αυτό φαίνεται και από τις τιμές του D-value. Οι αντίστοιχες παράμετροι a παίρνουν τιμές 5,75 για τον πουρέ ροδάκινο και 13,57 για τον χυμό καρότου. Επιπλέον, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με τα αποτελέσματα στους πίνακες 5.4 και 5.5 παρατηρείται ότι η απενεργοποίηση στα δύο τρόφιμα επιτυγχάνεται 2 με 3 φορές πιο γρήγορα και αποτελεσματικά σε σχέση με την επεξεργασία με ΠΗΠ όπου δεν υπήρχε η εφαρμογή της προθέρμανσης. Αναλυτικά, για τον πουρέ ροδάκινο ο ρυθμός απενεργοποίησης παίρνει τιμές από 0,48 έως 1,76 ms^{-1} , ενώ χωρίς προθέρμανση οι τιμές κυμαίνονταν από 0,16 έως 0,75 ms^{-1} και αντίστοιχα για τον χυμό καρότο ο ρυθμός απενεργοποίησης λαμβάνει τιμές από 0,25 έως 0,33 ms^{-1} , ενώ χωρίς προθέρμανση οι τιμές κυμαίνονταν από 0,09 έως 0,20 ms^{-1} . Η προθέρμανση δρα συνεργιστικά στην απενεργοποίηση του *B. coagulans* και μας επιτρέπει να πετυχαίνουμε απενεργοποίηση του μικροοργανισμού αυτού χωρίς να χρησιμοποιούμε ακραίες συνθήκες επεξεργασίας με ΠΗΠ. Η διαφορά αυτή φαίνεται και από τα διαγράμματα 5.22 και 5.23 όπου απεικονίζεται η επίδραση της προθέρμανσης στην απενεργοποίηση του *B. coagulans*.



Διάγραμμα 5.22: Σύγκριση απενεργοποίησης του *B. coagulans* με και χωρίς προθέρμανση στα 15 kV/cm στον πουρέ ροδάκινο. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.

Χυμός καρότο σύγκριση



*Διάγραμμα 5.23: Σύγκριση απενεργοποίησης του *B. coagulans* με και χωρίς προθέρμανση στα 11 kV/cm στον χυμό καρότο. Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση τριών μετρήσεων. Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν την προσαρμογή της Εξ. 4.3 στα πειραματικά δεδομένα.*

Οι Zimmerman (2013) και Daryaei (2012) μελέτησαν την απενεργοποίηση του *B. coagulans* μέσω της συνδυαστικής επεξεργασίας της Υπερυψηλής Πίεσης και της θερμικής μεθόδου σε πελτέ και χυμό τομάτας αντίστοιχα. Οι έρευνες αυτές έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός είναι πολύ πιο ευαίσθητος στην συνδυαστική επεξεργασία των δύο μεθόδων και ο συνδυασμός αυτός των δύο μεθόδων είναι αποτελεσματικός για την αποστείρωση όξινων τροφίμων, όπως ο χυμός τομάτας (pH=4,3). Με αυτόν τον τρόπο απέδειξαν ότι η προθέρμανση σε συνδυασμό με μία μη θερμική μέθοδο επεξεργασίας λειτουργεί θετικά στην απενεργοποίηση του *B. coagulans* και γενικότερα στην παστερίωση τροφίμων. Αντίστοιχα, παρόλο που στην βιβλιογραφία δεν υπάρχει ακόμα η συνδυαστική επίδραση ΠΗΠ και προθέρμανσης για την απενεργοποίηση του *B. coagulans*, έχει αποδειχθεί με άλλους μικροοργανισμούς ότι και τα ΠΗΠ μαζί με προθέρμανση μπορούν να αποτελέσουν έναν εναλλακτικό τρόπο παστερίωσης των τροφίμων χωρίς να εφαρμόζονται μεγάλες θερμοκρασίες που αλλοιώνουν τα χαρακτηριστικά των τροφίμων. Για παράδειγμα, οι M. Walking-Ribeiro et al. (2008) έφτασαν στο παραπάνω συμπέρασμα μελετώντας την απενεργοποίηση της *E. coli* σε εμπορικό χυμό τροπικών φρούτων (ανανά, μπανάνα, μήλο και πορτοκάλι) μέσω της επεξεργασίας με ΠΗΠ με την παρουσία προθέρμανσης. Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε για θερμοκρασίες προθέρμανσης 45 – 55 °C και για ένταση ηλεκτρικού πεδίου μέσω των ΠΗΠ 24 – 34 kV/cm. Συνολικά παρατηρούμε ότι οι μη θερμικές μέθοδοι επεξεργασίας με την βοήθεια της προθέρμανσης μπορούν να αποτελέσουν έναν εναλλακτικό τρόπο παστερίωσης τροφίμων και μελλοντικά μπορούν να διεισδύσουν στην βιομηχανία των τροφίμων.

Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η κινητική ανάπτυξης του μικροοργανισμού *B. coagulans* και η επίδραση δύο μεθόδων, της θερμικής και των παλμικών ηλεκτρικών πεδίων, στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού αυτού σε πρότυπα διαλύματα με pH 4,5 – 6,5, ενώ έγινε εφαρμογή και σε δύο τρόφιμα, στον πουρέ ροδάκινο, ο οποίος είχε pH=4,5 και στον χυμό καρότο, ο οποίος είχε pH=6,0. Επίσης, εξετάστηκε και η χρήση των ΠΗΠ με την βοήθεια της προθέρμανσης και τέλος έγινε σύγκριση των δύο μεθόδων για να διαπιστωθεί αν τα ΠΗΠ, τα οποία είναι μία μη θερμική μέθοδος επεξεργασίας, μπορούν να λειτουργήσουν ως ένας εναλλακτικός τρόπος παστερίωσης των τροφίμων.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ο *B. coagulans* για να αναπτυχθεί πλήρως χρειάζεται περίπου 22 ώρες στους 45°C, αφού σε εκείνο το χρονικό σημείο ο μικροοργανισμός αποκτάει το μέγιστο δυνατό μικροβιακό φορτίο (8,0 logCFU/g) και εισέρχεται στην φάση της στασιμότητας. Επιπλέον, έγινε ένας συσχετισμός της ανάπτυξης του μικροβιακού φορτίου με την απορρόφηση, καθώς όταν ο *B. coagulans* είχε το μέγιστο μικροβιακό φορτίο, παρατηρήθηκε ότι η απορρόφηση του ήταν περίπου 1,9 στα 600 nm.

Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων μελετήθηκε η επίδραση του pH στην ανάπτυξη του *B. coagulans*. Από τα αποτελέσματα προέκυψε το συμπέρασμα ότι το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη του *B. coagulans* έχει τιμές 5 – 6, το οποίο έρχεται σε πλήρη συνάφεια με την βιβλιογραφία (Misiou et al. 2021). Στην συνέχεια μελετήθηκε η θερμική απενεργοποίηση του *B. coagulans* και η απενεργοποίηση με ΠΗΠ σε πρότυπα διαλύματα με pH 4,5 – 6,5 και σε δύο τρόφιμα, στον πουρέ ροδάκινο και στον χυμό καρότο. Η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού σε όλες τις περιπτώσεις εκφράστηκε μαθηματικά μέσω του πολυπαραμετρικού μοντέλου Gompertz, από το οποίο υπολογίστηκαν και οι ρυθμοί απενεργοποίησης k . Επιπλέον, η σύγκριση για την επίδραση των διαφόρων συνθηκών στην απενεργοποίηση του *B. coagulans* πραγματοποιήθηκε μέσω του χρόνου υποδεκαπλασιασμού του μικροβιακού φορτίου D-value και της σταθεράς θερμικής αντίστασης z-value.

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε πως όσο αυξανόταν η θερμοκρασία, αυξανόταν και ο ρυθμός απενεργοποίησης του *B. coagulans*. Όσον αφορά τα πρότυπα διαλύματα ο μικροοργανισμός έδειξε την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο pH=5,5, όπου η απενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε με πιο αργό ρυθμό. Συγκεκριμένα, για το pH=5,5 οι ρυθμοί απενεργοποίησης έφταναν μέχρι $1,24 \text{ min}^{-1}$ στην θερμοκρασία των 90°C, την ώρα που στις ίδιες συνθήκες για τα pH<5 και pH>6, οι ρυθμοί απενεργοποίησης έφταναν σε τιμές μεγαλύτερες των 5 min^{-1} . Κατά την θερμική απενεργοποίηση του μικροοργανισμού στον πουρέ ροδάκινο και στον χυμό καρότο παρατηρήθηκαν μικρότεροι ρυθμοί απενεργοποίησης σε σχέση με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα στα ίδια pH. Πιο αναλυτικά, η απενεργοποίηση και των δύο τροφίμων πραγματοποιήθηκε δύο με τρεις φορές πιο αργά σε σχέση με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στα δύο τρόφιμα υπήρχαν και άλλες χημικές ουσίες, όπως υδατάνθρακες, βιταμίνες κ.α., οι

οποίες δημιουργούσαν ένα περιβάλλον πιο ευνοϊκό για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και καθιστούσαν την απενεργοποίηση πιο δύσκολη. Συνολικά, η θερμική επεξεργασία θεωρείται αποτελεσματική για την απενεργοποίηση του *B. coagulans*, αν και απαιτούνται σχετικά μεγάλες θερμοκρασίες επεξεργασίας και αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε διάφορες αλλοιώσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Η απενεργοποίηση του *B. coagulans* με ΠΗΠ εξετάστηκε επίσης στα πρότυπα διαλύματα με pH 4,5 και 6,0 και στα δύο τρόφιμα σε εντάσεις ηλεκτρικού πεδίου 11, 15 και 20 kV/cm, σε διαφόρους χρόνους επεξεργασίας. Η επίδραση των ΠΗΠ στο pH ίσο με 4,5 ήταν πολύ έντονη, καθώς η απενεργοποίηση του μικροοργανισμού επιτεύχθηκε σε χρόνους επεξεργασίας έως 15 ms ακόμα και στη χαμηλότερη ένταση ηλεκτρικού πεδίου των 11 kV/cm, ενώ οι ρυθμοί απενεργοποίησης λάμβαναν τιμές έως και $3,22 \text{ ms}^{-1}$. Αντίθετα, στο πρότυπο διάλυμα με pH=6,0, ο μικροοργανισμός έδειξε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα με σημαντικά μικρότερους ρυθμούς απενεργοποίησης, όπου οι τιμές έφταναν μέχρι τα $0,22 \text{ ms}^{-1}$ στην πιο ακραία συνθήκη επεξεργασίας των 20 kV/cm. Η εφαρμογή των ΠΗΠ στα δυο τρόφιμα έδωσε, επίσης, σημαντικά μικρότερους ρυθμούς απενεργοποίησης σε σχέση με τους αντίστοιχους στα πρότυπα διαλύματα με τα ίδια pH. Συγκεκριμένα για τον πουρέ ροδάκινο οι ρυθμοί απενεργοποίησης έφταναν μέχρι $0,75 \text{ ms}^{-1}$, ενώ για τον χυμό καρότο έπαιρναν τιμές έως και $0,20 \text{ ms}^{-1}$. Παρόλα αυτά υπήρχε επίδραση των ΠΗΠ στην απενεργοποίηση του *B. coagulans*, αφού σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε μείωση του μικροβιακού φορτίου τουλάχιστον $3 \log(N/N_0)$. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι για να απενεργοποιηθεί πλήρως ο *B. coagulans*, και κυρίως σε τρόφιμα που έχουν pH 5 – 6 το οποίο είναι το βέλτιστο για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, χρειάζεται εφαρμογή πιο ακραίων συνθηκών ($E > 20 \text{ kV/cm}$).

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη συνδυαστική επεξεργασία των δύο μεθόδων για να διερευνηθεί αν έχουν συνεργιστική δράση στην απενεργοποίηση του *B. coagulans*. Έτσι, πραγματοποιήθηκε προθέρμανση των δειγμάτων σε θερμοκρασίες 50 και 60 °C και στην συνέχεια ακολούθησε η επεξεργασία με ΠΗΠ στις ίδιες συνθήκες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προθέρμανση στους 60°C έχει σημαντική επίδραση στην απενεργοποίηση του μικροοργανισμού, η οποία πραγματοποιούταν με μεγαλύτερη ευκολία και σε αρκετά μικρότερους χρόνους επεξεργασίας. Χαρακτηριστικά, στο πρότυπο διάλυμα με pH=6,0, ο ρυθμός απενεργοποίησης πενταπλασιάστηκε, ενώ στα δύο τρόφιμα αυξήθηκε κατά δύο με τρεις φορές. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η προθέρμανση βοήθησε ώστε η ηλεκτροδιάτρηση των κυττάρων να πραγματοποιηθεί με μεγαλύτερη ευκολία, οδηγώντας έτσι σε πιο γρήγορη απενεργοποίηση του μικροοργανισμού, χωρίς να χρησιμοποιούνται ακραίες συνθήκες επεξεργασίας, οι οποίες θα αλλοίωναν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των διαφόρων τροφίμων.

Λαμβάνοντας υπόψη τα συνολικά αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η μικροβιακή απενεργοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί το ίδιο αποτελεσματικά τόσο με την θερμική επεξεργασία, όσο και με τα ΠΗΠ. Η δε συνδυαστική επεξεργασία των δύο

μεθόδων αποδείχθηκε ότι ήταν η πιο αποτελεσματική, αφού η απενεργοποίηση πραγματοποιούταν σε μικρότερους χρόνους, το οποίο σημαίνει μικρότερη κατανάλωση της ενέργειας, αλλά και μικρότερη υποβάθμιση των ποιοτικών και οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων. Συνολικά, κρίθηκε ότι τα ΠΗΠ μπορούν να αποτελέσουν έναν εναλλακτικό τρόπο παστερίωσης των τροφίμων, έχοντας πολλαπλά οφέλη τόσο στα ίδια τα τρόφιμα, όσο και στις βιομηχανίες, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να μελετηθούν οι ακριβείς συνθήκες επεξεργασίας που χρειάζονται για να επιτευχθεί η απαραίτητη μικροβιακή απενεργοποίηση για τα τελικά προϊόντα.

Βιβλιογραφία

- Ade-Omowaye, B. I. O., Angersbach, A., Taiwo, K. A., & Knorr, D. (2001). Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science & Technology*, 12(8), 285-295.
- Ahmed, J., Shivhare, U. S., Sandhu, K. S. (2002). Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *Journal of Food Science*, 67(7), 2692–2695.
- Altun, G. K., & Erginkaya, Z. (2021). Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety. *LWT*, 151, 112233.
- Alvarez, I., Condon, S., & Raso, J. (2006). Microbial inactivation by pulsed electric fields. In *Pulsed electric fields technology for the food industry* (pp. 97-129). Springer, Boston, MA.
- Álvarez, I., Pagán, R., Condón, S., & Raso, J. (2003). The influence of process parameters for the inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 87-95.
- Amiali, M., Ngadi, M. O., Smith, J. P., & Raghavan, G. S. V. (2007). Synergistic effect of temperature and pulsed electric field on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg yolk. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 689-694.
- Aronsson, K., Lindgren, M., Johansson, B. R., & Rönner, U. (2001). Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(1), 41-54.
- Asavasanti, S., Ristenpart, W.D., & Stroeve, P. (2010). Pulsed electric field (PEF) processing: A review. *Journal of Food Science*, 75(3), R77-R87.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Gongora-Nieto, M. M., & Swanson, B. G. (1999). *Preservation of foods with pulsed electric fields*. Elsevier.
- Batra, N., Singh, J., Banerjee, U. C., Patnaik, P. R., & Sobti, R. C. (2002). Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans* RCS3. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36(1), 1.
- Bigelow, W.D., Bohart, G.S., Richardson, A.C. and Ball, C.O. (1920). Heat penetration in processing. *Canned Foods Bulletin* No. 16-L. Washington DC: National Canners Association 101, 73-81.
- Cosentino, S., Mulargia, A. F., Pisano, B., Tuveri, P., & Palmas, F. (1997). Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus flora* in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*.

Daryaei, H., & Balasubramaniam, V. M. (2013). Kinetics of *Bacillus coagulans* spore inactivation in tomato juice by combined pressure–heat treatment. *Food Control*, 30(1), 168-175.

De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N. A., & DeVos, P. (2004). Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species. *Systematic and Applied Microbiology*.

De Vito, F., Ferrari, G., Lebovka, N. I., Shynkaryk, N. V., & Vorobiev, E. (2008). Pulse duration and efficiency of soft cellular tissue disintegration by pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 1(4), 307- 313.

Dunn, J. E., & Pearlman, J. S. (1987). U.S. Patent No. 4,695,472. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

El-Bisi, H. M., & Ordal, Z. J. (1956). The effect of certain sporulation conditions on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. *Journal of Bacteriology*, 71(1), 1-9.

Elhariry, Hesham. 2008. Biofilm Formation by Endospore-Forming Bacilli on Plastic Surface under Some Food-Related and Environmental Stress Conditions.

Esty, J.R. and Meyer, K.F. (1922). The heat resistance of spores of *Bacillus botulinus* and allied anaerobes XI. *J. Infectious Dis.* 31, 650–663.

FDA. (2014). Pulsed Electric Fields (PEF) - A New Food Processing Technology. Retrieved from <https://www.fda.gov/files/food/published/Pulsed-Electric-Fields-%28PEF%29---A-New-Food-Processing-Technology.pdf>

Foster T., Vasavada P.C. (2003). Beverage quality and safety. CRC Press LLC, ISBN 0- 58716-011-0 (chapters 5, 7).

Gao, Y., and X. Ju. 2011. Inactivation of *Bacillus coagulans* spores subjected to combinations of high-pressure processing and nisin. *Trans. ASABE* 54:385–392.

Garner, A. L. (2019). Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(19), 7917-7929.

Guderjan, M., Töpfl, S., Angersbach, A., & Knorr, D. (2005). Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plant oils. *Journal of Food Engineering*, 67(3), 281-287.

Hammer, B. W. 1915. Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. *Iowa Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 19:119-131

Harrison, S. L., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* structural Changes Induced by Pulsed Electric Field Treatment. *LWT-Food Science and Technology*, 30(3), 236-240.

- Ho, S. Y., & Mittal, G. S. (1996). Electroporation of cell membranes: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 16(4), 349-362.
- Huang, K., Jiang, T., Wang, W., Gai, L., & Wang, J. (2014). A comparison of pulsed electric field resistance for three microorganisms with different biological factors in grape juice via numerical simulation. *Food and Bioprocess technology*, 7, 1981-1995.
- Hui T. H., Barta J. (2006). *Handbook of fruits and fruit processing*, Wiley-Blackwell Publishing, ISBN: 0813819814, (page 95).
- Hulsheger, H., Potel, J., & Niemann, E. G. 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiation and Environmental Biophysics* 22, 149-162.
- Igwemmar, N.C., Kolawole, S.A. and Imran, I.A. (2013). 'Effect of Heating on Vitamin C Content of Some Selected Vegetables'. *International Journal of Scientific & Technology Research*. 2(11), pp. 209-212.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D. S., & Holley, R. A. (1999). Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of food protection*, 62(9), 1088-1096.
- Klonowski, I., Heinz, V., Toepfl, S., Gunnarsson, G., & Porkelsson, G. (2006). Applications of pulsed electric field technology for the food industry. *Iceland Fishes Laboratory Report* 06, 6.
- Knorr, D., & Angersbach, A. (1998). Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 185-191.
- Lebovka, N. I., Praporscic, I., & Vorobiev, E. (2004). Combined treatment of apples by pulsed electric fields and by heating at moderate temperature. *Journal of Food Engineering*, 65(2), 211-217.
- Lebovka, N. I., Praporscic, I., & Vorobiev, E. (2004). Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 9-16.
- Lebovka, N. I., Praporscic, I., & Vorobiev, E. (2004). Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(1), 9-16.
- Leskova, E., Kubikova, J., Kovacikova, M., Porubska, P. and Holcikova, K. (2006). 'Vitamin losses: Retention during heat treatment and continual changes expressed by mathematical models'. *J. Food Compos. Anal.* 19(4), pp. 252-276.
- Lund D. B. (1975) 'Heat processing', in *Principles of Food Science, Part II: Physical Principles of Food Preservation*, Karel M, Fennema O R and Lund D B, New York, Marcell Dekker.

Mallidis, C. G., Frantzeskakis, P., Balatsouras, G., & Katsaboxakis, C. (2007). Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *International Journal of Food Science & Technology*, 25(4), 442–448.

Mallidis, C., P. Frantzeskakis, G. Balatsouras, and G. Katsabotxakis. 1990. Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25:442–448.

Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. In *Infection, Genetics and Evolution*.

Mazurek, B., Lubicki, P., & Staroniewicz, (1995). Effect of short HV pulses on bacteria and fungi. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 2 (3), 418-425.

Min, S., Jin, Z. T., & Zhang, Q. H. (2003). Commercial scale pulsed electric field processing of tomato juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3338-3344.

Mohamed, M. E., & Eissa, A. H. A. (2012). Pulsed electric fields for food processing technology. *Structure and function of food engineering*, 11, 275-306.

Muhammed Majeed, D. R., Natarajan, D. S., Sivakumar, D. A., Ali, D. F., Pande, D. A., Suresh, M. R., & Karri, K. (2016). Evaluation of anti-diarrhoeal activity of *Bacillus coagulans* mtcc 5856 and its effect on gastrointestinal motility in wistar rats. *Int J Pharm Bio Sci*, 311(1), 316.

NAKAJO, M., & MORIYAMA, Y. (1993). Effect of pH and water activity on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans*. *NIPPON SHOKUHIN KOGYO GAKKAISHI*, 40(4), 268-271.

Nakamura, L. K., Blumenstock, I., & Dieter, A. N. D. (1988). Taxonomic Study of *Bacillus coagulans* Hammer 1915 with a Proposal for *Bacillus srnithii* sp. nov. In *International Journal of Systematic Bacteriology*

Ourania Misiou, Christina Zourou, Konstantinos Koutsoumanis (2021). Development and validation of a predictive model for the effect of temperature, pH and water activity on the growth kinetics of *Bacillus coagulans* in non-refrigerated ready-to-eat food products.

Palop, A., J. Raso, R. Paga'n, S. Condo'n, and F. J. Sala. 1999. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *Int. J. Food Microbiol.* 46:243–249.

Palop, A., J. Raso, S. Condo'n, and F. J. Sala. 1996. Heat resistance of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*: effect of sporulation temperature in foods with various acidulants. *J. Food Prot.* 59:487–492.

Parkar, S., Flint, S., Palmer, J., & Brooks, J. (n.d.). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel.

Parte, A. C. (n.d.). LPSN-List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on.

Payot, T., Chemaly, Z., & Fick, M. (1998). Lactic acid production by *Bacillus coagulans*-Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations.

Peng, J., Mah, J. H., Somavat, R., Mohamed, H., Sastry, S., & Tang, J. (2012). Thermal inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato juice. *Journal of food protection*, 75(7), 1236-1242.

Pothakamury, U. R., Vega, H., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G. V., & Swanson, B. G. (1996). Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of *E. coli* by pulsed electric fields. *Journal of Food Protection*, 59(11), 1167-1171.

Qin, B. L., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B. G., & Pedrow, P. D. (1994). Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 1(6), 1047-1057.

Raso, J., Calderón, M. L., Góngora, M., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1998). Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices by heat, high hydrostatic pressure and pulsed electric fields. *Journal of food science*, 63(6), 1042-1044.

Rastogi, N. K., Eshtiaghi, M. N., & Knorr, D. (1999). Accelerated mass transfer during osmotic dehydration of high intensity electrical field pulse pretreated carrots. *Journal of Food Science*, 64(6), 1020-1023.

Resende, R., Francis, F. J., Stumbo, C. R. (1969). Thermal destruction and regeneration of enzymes in green bean and spinach puree. *Food Technology*, 23, 63-66.

Richardson P. S. (2001). *Thermal technologies in food processing*, CRC Press, ISBN185573558X, 9781855735583 (Chapters 3, 9, 10, 11 13).

Richardson, A.C. and Ball, C.O. (1920) *Heat Penetration in Processing Canned Foods Bulletin No. 16-L*. Washington DC: National Cannery Association.

Sale, A. J. H., & Hamilton, W. A. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms. I Killing bacteria and yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 148, 781-788.

Saulis, G. (2010). Pulsed electric field processing of foods: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 541-549.

Selman, J. D. (1988) 'The blanching process', in *Developments in Food Preservation – 4*, ed Thorne S, Barking, UK, Elsevier Applied Science Publishers.

- Siemer, C., Toepfl, S., & Heinz, V. (2014). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by pulsed electric fields (PEF) in combination with thermal energy—I. Influence of process-and product parameters. *Food Control*, 39, 163-171.
- Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., & Martín-Belloso, O. (2009). Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11-12), 544-556.
- Stanojević-Nikolić, Slobodanka, Gordana Dimić, Ljiljana Mojović, Jelena Pejin, Aleksandra Djukić-Vuković, and Sunčica Kocić-Tanackov. 2016. "Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms." *Journal of Food Processing and Preservation* 40(5):990–98.
- Stumbo, C. R. 1973. *Thermobacteriology in food processing*, 2nd ed. Academic Press, New York
- Sun D-W., *Thermal food processing- New technologies and quality issues*, CRC Press Taylor & Francis Group 2006, ISBN 1574446282, 9781574446289 (chapter 13).
- Toepfl, S., Heinz, V., & Knorr, D. (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical engineering and processing: Process intensification*, 46(6), 537-546.
- Toepfl, S., Siemer, C., Saldaña-Navarro, G., & Heinz, V. (2014). Overview of pulsed electric fields processing for food. In *Emerging technologies for food processing* (pp. 93-114). Academic Press.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2008). *Electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials* (Vol. 5996). New York: Springer.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. I. (2006). Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In *Pulsed electric fields technology for the food industry* (pp. 153-193). Springer, Boston, MA.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. I. (2006). Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In *Pulsed electric fields technology for the food industry* (pp. 153-193). Springer, Boston, MA.
- Vos, P., G. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, Shleifer K.H. & Whitman W. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology. The firmicutes*, vol. 3, Springer, Springer-Verlag New York.
- Walkling-Ribeiro M., Noci F., Cronin D. A., Lyng J. G. & Morgan D. J. (2008). Inactivation of *Escherichia coli* in a tropical fruit smoothie by a combination of heat and pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 73(8), M395-M399.
- Wang, B., B. Li, Q. Zeng, J. Huang, Z. Ruan, Z. Zhu, and L. Li. 2009. Inactivation kinetics and reduction of *Bacillus coagulans* spores by the combination of high pressure and moderate heat. *J. Food Process Eng.* 32:692–708.

- Weaver, J. C., & Chizmadzhev, Y. A. (1996). Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 41(2), 135-160.
- Yan, Z., Yin, L., Hao, C., Liu, K., & Qiu, J. (2021). Synergistic effect of pulsed electric fields and temperature on the inactivation of microorganisms. *AMB Express*, 11(1), 1-16.
- Yoon, H. G., Lee, K. H., Kim, H. Y., Kim, H. K., Shin, D. H., Hong, B. S., & Cho, H. Y. (2002). Gene cloning and biochemical analysis of thermostable chitosanase (tch-2) from *Bacillus coagulans* ck108. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(5), 986–995.
- Zhang, Q., Qin, B. I., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (1995). Inactivation of *E. coli* for food pasteurization by high-strength pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation*, 19(2), 103-118.
- Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., & Li, W. (2010). Effect of dietary probiotic, *Bacillus coagulans*, on growth performance, chemical composition, and meat quality of Guangxi Yellow chicken. *Poultry Science*, 89(3), 588–593.
- Zhou, Xingding, Ye, L., & Wu, J. C. (2013). Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4309–4314.
- Zimmermann, M., Schaffner, D. W., & Aragão, G. M. (2013). Modeling the inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato pulp from the combined effect of high pressure and moderate temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 53(1), 107-112.
- Zimmermann, U. (1996). Electric-field-induced fusion and related electrical phenomena. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1286(2-3), 213-233.
- Ανδρέου, Β. Ν. (2020). Έρευνα και εφαρμογή των τεχνολογιών υπερυψηλής πίεσης και παλμικών ηλεκτρικών πεδίων στην παραγωγή υψηλής ποιότητας φυτικών προϊόντων και στην αξιοποίηση των παραπροϊόντων τους.
- Γιαννόγλου, Μ. (2016). Έλεγχος της Δομής και της Δράσης Ενζύμων με Υπερυψηλή Πίεση: Εφαρμογή στην Παραγωγή και Ωρίμανση Γαλακτοκομικών Προϊόντων.
- Δημόπουλος, Γ. (2021). Έρευνα των μη θερμικών διεργασιών παλμικών ηλεκτρικών πεδίων και υπερυψηλής πίεσης στην επεξεργασία βιομάζας ζυμομυκήτων για την αξιοποίηση βιολειτουργικών συστατικών με εφαρμογή στα τρόφιμα.
- Οικονόμου, Ν (ed) (2005). *Brock Biology OF Microorganisms*. 10th Edition. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.

Ιστοσελίδες

<https://food-physics.com/>

<https://www.elea.at/>

<https://www.pulsemaster.us/>