

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΙΙΙ

(ΚΩΔ. ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ: ΕΤΔΑ 3434)

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ: Οι φοιτητές να εξοικειωθούν με τις αναλύσεις που υπαγορεύονται από τα Μικροβιολογικά κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας των διαφορετικών εμπορικών τύπων γάλακτος.

Διδάσκοντες:

Λέκτορας Ακτύπης Α, (Υπεύθυνος Μαθήματος)

μέλη ΕΔΙΠ: PhD Αναστασίου Ρ., PhD Γεωργάλα Α., PhD Γεωργαλάκη Μ., PhD Ζουμποπούλου Γ., Msc Μανωλοπούλου Ε.

1^η ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ: ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ: Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που θα γίνουν στους διαφορετικούς τύπους γάλακτος βασίζονται στα **Μικροβιολογικά κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας**⁽³⁾.

Σε ότι αφορά τα **Μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας** σε όλους τους πιο πάνω τύπους γάλακτος επιβάλλεται, για την ασφάλεια των καταναλωτών, η απουσία παθογόνων μικροοργανισμών

(*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*).

ΓΑΛΑ ΝΩΠΟ ΟΛΙΚΗ ΜΕΣΟΦΙΛΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ (ΟΜΧ)⁽⁴⁾, ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ (7^ο ΕΧΑΜΗΝΟ)⁽¹⁾

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ
Δείγμα 1: ΓΑΛΑ ΦΡΕΣΚΟ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ	ΟΜΧ (Βλαστικές μορφές βακτηρίων που επιβιώνουν της παστερίωσης) ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ
Δείγμα 2: ΓΑΛΑ ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ (Extended Shelf Life- ESL)	ΟΜΧ (Θερμοανθεκτικά σπόρια βακτηρίων που επιβιώνουν της παστερίωσης, μετά από επώαση της συσκευασίας στους 20 °C για 24 ώρες) ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ
Δείγμα 3: ΓΑΛΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ (Ultra-High Temperature-UHT)	ΟΜΧ (Αρίθμηση ολικής μικροβιακής χλωρίδας που ενδέχεται να βλαστήσει, μετά από επώαση της συσκευασίας στους 30 °C για 14 ημέρες) ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΑ ΣΠΟΡΟΓΟΝΑ (Αρίθμηση σπορογόνων θερμοάντοχων βακτηρίων μετά από επώαση της συσκευασίας στους 30 °C για 14 ημέρες)
Δείγμα 4: ΓΑΛΑ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ- (Εβαπορέ)	ΟΜΧ (Αρίθμηση ολικής μικροβιακής χλωρίδας που ενδέχεται να βλαστήσει, μετά από επώαση της συσκευασίας στους 30 °C για 14 ημέρες) ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΑ ΣΠΟΡΟΓΟΝΑ (Αρίθμηση σπορογόνων θερμοάντοχων βακτηρίων μετά από επώαση της συσκευασίας στους 30°C για 14 ημέρες)
Δείγμα 5: ΓΑΛΑ ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΟ	ΟΜΧ ΖΥΜΕΣ-ΜΥΚΗΤΕΣ ⁽⁵⁾ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ

Δείγμα 6: ΓΑΛΑ ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΜΕΝΟ (Σκόνη γάλακτος)	ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ (<i>S. aureus, Staphylococcus spp.</i>) ⁽⁶⁾
-----------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------

ΔΕΙΓΜΑ 1: ΦΡΕΣΚΟ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το γάλα είναι ακατάλληλο όταν περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου (*Salmonella spp., Shigella spp., Brucella spp., E. coli, Staphylococcus aureus*). Επίσης όταν περιέχει τοξικές ουσίες που αθροιστικά θέτουν σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών.

Οι μικροοργανισμοί που περιλαμβάνονται στα κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι τα Εντεροβακτήρια, το *E. coli*, οι θετικοί στη πηκτάση σταφυλόκοκκοι, ο *Bacillus cereus* και ο *E. Sakazaki*. Καλής ποιότητας παστεριωμένο γάλα προϋποθέτει καλής ποιότητας νωπό γάλα.

Το γάλα πρέπει να εξυγιάνεται πριν δοθεί στη κατανάλωση. Αυτό επιτυγχάνεται με τη θερμική επεξεργασία κατά την οποία διασφαλίζεται η υγεία του καταναλωτή. Για τα μη στείρα προϊόντα, μειώνεται ο πληθυσμός των μη παθογόνων μικροοργανισμών ώστε το προϊόν να έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής.

Ως **ΓΑΛΑ ΦΡΕΣΚΟ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟ** ⁽⁷⁾ νοείται το γάλα που:

- έχει υποβληθεί σε επεξεργασία που περιλαμβάνει την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία για μικρό χρονικό διάστημα (71,7 °C τουλάχιστον για 15 δευτερόλεπτα, High Temperature Short Time-HTST) ή σε χαμηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα (63 °C τουλάχιστον για 30 λεπτά) ή σε διαδικασία παστερίωσης που χρησιμοποιεί διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας μεταξύ των δύο παραπάνω συνθηκών για την επίτευξη ισοδύναμου αποτελέσματος
- παρουσιάζει αρνητική αντίδραση στη δοκιμή της φωσφατάσης και θετική στη δοκιμή της υπεροξειδάσης
- ψύχεται το συντομότερο δυνατόν μετά την παστερίωση, σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 6 °C
- συντηρείται στην παραπάνω θερμοκρασία, η συντήρησή του διαρκεί μέχρι 7 ημέρες και καθορίζεται με ευθύνη του παρασκευαστή
- υπόκειται σε έλεγχο των αρμόδιων αρχών του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

Με την παστερίωση δεν καταστρέφονται τα σπόρια των μυκήτων και των βακτηρίων. Επιβίωση αναφέρεται για τον ιό του αφθώδους πυρετού και για τα *Coxiella burnetti, Listeria monocytogenes, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) κ.α. εάν υπάρχουν σε υψηλό αρχικό πληθυσμό. Τα υπόλοιπα βακτήρια θανατώνονται σε ποσοστό 90-99% ανάλογα με τη θερμοαντοχή και τον αρχικό πληθυσμό τους. Σωστή εφαρμογή της HTST προκαλεί μείωση του μικροβιακού φορτίου κατά 99%. Επομένως όσο μικρότερο είναι το αρχικό μικροβιακό φορτίο (καλής ποιότητας νωπό γάλα) τόσο λιγότεροι είναι οι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν. Επιβιώνουν σε μεγάλο ποσοστό (έως 50%) οι Εντερόκοκκοι, *Streptococcus thermophilus* και ορισμένοι γαλακτοβάκιλλοι (*Lb. bulgaricus* & *Lb. lactis*).

Τα Εντεροβακτήρια και κυρίως τα κολοβακτηρίδια είναι θερμοευαίσθητα και καταστρέφονται με την παστερίωση.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

ΟΜΧ: Ετοιμάζουμε 2 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (-1,-2). Από το γάλα (μηδενική αραιώση) και από τις αραιώσεις (-1 και -2), εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count agar (PCA). Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C /72 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ: Από το γάλα (μηδενική αραιώση) και την (-1) εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα VRBL άγαρ. Μόλις το υπόστρωμα στερεοποιηθεί προσθέτουμε δεύτερο στρώμα υποστρώματος. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C /24 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση όλων των αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

Κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας

Σύμφωνα με τα Μικροβιολογικά κριτήρια υγιεινής της διαδικασίας παραγωγής⁽³⁾ στο παστεριωμένο γάλα, σε κανένα από 5 εξεταζόμενα δείγματα δεν επιτρέπεται ο προσδιορισμός *Enterobacteriaceae* 10 cfu/ml, στο τέλος της διαδικασίας παρασκευής. Σε περίπτωση που αυτό συμβαίνει θα πρέπει να ελεγχθεί η αποδοτικότητα της θερμικής επεξεργασίας, να παρεμποδισθεί πιθανή επιμόλυνση και να ελεγχθεί και η ποιότητα του νωπού γάλακτος.

ΔΕΙΓΜΑ 2: ΓΑΛΑ ΜΑΚΡΑΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ως «γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας»⁽⁷⁾ (Extended Shelf Life-ESL) νοείται το γάλα που:

- έχει υποβληθεί σε επεξεργασία που περιλαμβάνει την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία στους 85 έως 127 °C σε τέτοιες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου ώστε η δοκιμή της υπεροξειδάσης να είναι αρνητική
- ψύχεται, το συντομότερο δυνατόν μετά τη θερμική του επεξεργασία, σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 6 °C.
- η συντήρησή του γίνεται σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 6 °C, η δε διάρκεια συντήρησής του καθορίζεται με ευθύνη του παρασκευαστή
- υπόκειται σε ελέγχους των αρμόδιων αρχών του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων

Δεν θεωρείται στείρο. Η θερμική επεξεργασία αποσκοπεί στη καταστροφή των επικίνδυνων για τη Δημόσια υγεία μικροοργανισμών και στη μείωση και μερική αδρανοποίηση των σπορίων των βακτηρίων. Η πιθανή επικρατούσα χλωρίδα είναι σπορογόνες μορφές βακίλλων που προκαλούν σφάλματα στο προϊόν και τροφικές δηλητηριάσεις (*Bacillus cereus*), σπόρια αερόβιων βακτηρίων *Bacillus* spp. ή αναερόβιων βακτηρίων *Clostridium* spp. Ενδέχεται κατά την συσκευασία να υπεισέλθουν ως επιμόλυνση θερμοανθεκτικά, ψυχρότροφα και πρωτεολυτικά βακτήρια.

Πριν την διανομή και κατανάλωση αυτού του γάλακτος γίνεται δοκιμαστική επώαση στους 20°C για 24 ώρες και ελέγχεται μακροσκοπικά και μικροβιολογικά.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Χειρισμός δειγματος: Άθικτες συσκευασίες γάλακτος τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 20°C για 24 ώρες

ΟΜΧ: Ετοιμάζουμε 2 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (-1,-2). Από το γάλα (μηδενική αραιώση) και από τις αραιώσεις (-1 και -2), εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count agar (PCA). Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C /72 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ: Από το γάλα (μηδενική αραιώση) και την (-1) αραιώση, εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα VRBL άγαρ. Μόλις το υπόστρωμα στερεοποιηθεί προσθέτουμε δεύτερο στρώμα υποστρώματος. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C /24 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

Κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας:

Τα Μικροβιολογικά κριτήρια δεν αναφέρονται στο προϊόν αυτό. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία⁽²⁾ κατά τη μικροβιολογική εξέταση αυτού του τύπου γάλακτος θα πρέπει η **Ολική Μεσόφιλη Μικροχλωρίδα (ΟΜΧ)** να είναι μικρότερη από 10³ cfu/ml και τα **Εντεροβακτήρια** και ο ***Bacillus cereus*** να είναι σε **πληθυσμό μικρότερο από 1 cfu/ml**, που στην ουσία είναι απουσία.

ΔΕΙΓΜΑ 3: ΓΑΛΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το αποστειρωμένο Γάλα (UHT) είναι το προϊόν υπέρ-υψηλής-θερμικής επεξεργασίας (127-135°C/2-4 s), κατά την οποία καταστρέφονται όλοι οι μικροοργανισμοί και όλα τα σπόρια και μπορεί να διατηρηθεί στο «ράφι» για τουλάχιστον ένα έτος. Θεωρείται «εμπορικά στείρο» προϊόν και είναι συσκευασμένο με ασηπτική συσκευασία. Το νωπό γάλα πρέπει να έχει όσο το δυνατόν μικρότερο αριθμό θερμοάντοχων σπορίων βακτηρίων για να καταστεί δυνατή η αποτελεσματική αποστείρωσή του. Παράλληλα και το ολικό μικροβιακό φορτίο του (ΟΜΧ), πρέπει να είναι χαμηλό γιατί ο μεγάλος πληθυσμός βακτηρίων οδηγεί στη παραγωγή ενζύμων, πολλά από τα οποία είναι θερμοάντοχα, δεν καταστρέφονται κατά την αποστείρωση και αλλοιώνουν το έτοιμο προϊόν κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (π.χ. πήξη, τάγγιση, πρωτεόλυση).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Χειρισμός δείγματος: Άθικτες συσκευασίες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 30°C για 14 ημέρες (αρίθμηση βακτηρίων-αρίθμηση θερμοάντοχων σπορογόνων βακτηρίων)

ΟΜΧ: Κάνουμε 2 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (-1,-2). Από το γάλα (μηδενική αραιώση) και από τις αραιώσεις (-1 και -2), εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count agar (PCA). Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C /48 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

ΣΠΟΡΟΓΟΝΑ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ: Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρουμε 10ml από το προεπωασθέν δείγμα. Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80 °C και παραμένει για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, ψύχεται και αναλύεται. Από το ψυχθέν γάλα προετοιμάζουμε δύο αραιώσεις (-1, -2). Από τις (-1) και (-2) αραιώσεις, εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Reinforced Clostridium Medium agar (RCM). Τα τρυβλία επωάζονται αναερόβια στους 30 °C /72 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

Κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας

Ελέγχεται με βάση τη μικροβιολογική του σταθερότητα ύστερα από δοκιμαστική επώαση συσκευασιών στους 30 °C για 14 ημέρες ή/και στους 55 °C για 7 ημέρες. Στη μικροβιολογική εξέταση, αναμενόμενο αποτέλεσμα σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 853/2004⁽⁸⁾ είναι η απουσία μικροοργανισμών και η απουσία σπορίων.

ΔΕΙΓΜΑ 4: ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΓΑΛΑ (Εβαπορέ)

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Συμπυκνωμένο γάλα είναι το προϊόν που προέρχεται από το πλήρες, μερικώς αποβουτυρωμένο ή αποβουτυρωμένο γάλα ύστερα από εξάτμιση μέρους του νερού, ομογενοποίηση, εγκυτίωση και αποστείρωση. Το γάλα εβαπορέ, πρέπει να πληροί τις προϋποθέσεις «εμπορικής στείρωσης». Το συγκεκριμένο προϊόν προϋποθέτει πολύ καλής ποιότητας νωπό γάλα με πολύ χαμηλό αριθμό θερμοάντοχων βακτηρίων, διότι αν αυτό δε συμβαίνει ενδέχεται κατά τη συμπύκνωση που συμβαίνει στους 55-65°C να δημιουργηθούν προβλήματα. Η θερμική επεξεργασία του εβαπορέ (αποστείρωση) αποσκοπεί στη θανάτωση όλων των μικροοργανισμών ακόμα και των θερμοάντοχων και των σπορίων και στην αδρανοποίηση των ενζύμων (πρωτεολυτικών και λιπολυτικών) αλλά και στη βελτίωση του ιξώδους. Η ανεύρεση μη σπορογόνων βακτηρίων υποδηλώνει επιμόλυνση μετά την αποστείρωση λόγω κακής στεγανότητας των περιεκτών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Χειρισμός δείγματος: Άθικτες συσκευασίες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 30 °C για 14 ημέρες- **προεπώαση** και αρίθμηση μεσόφιλων και θερμοφίλων,σπορογόνων θερμοανθεκτικών βακτηρίων.

ΟΜΧ: Κάνουμε 2 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (-1, -2). Από τις αραιώσεις (-1 και -2), εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count agar (PCA). Τα τρυβλία επωάζονται στους 30°C/48 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

ΣΠΟΡΟΓΟΝΑ ΘΕΡΜΟΑΝΤΟΧΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ: Σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα μεταφέρουμε 10ml από το προ-επωασθέν δείγμα. Ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80 °C και παραμένει για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, ψύχεται και αναλύεται. Από το ψυχθέν γάλα προετοιμάζουμε δύο αραιώσεις (-1, -2). Από το γάλα (μηδενική αραιώση) και τις (-1) και (-2) αραιώσεις, εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Reinforced Clostridium Medium agar (RCM). Τα τρυβλία επωάζονται αερόβια στους 30 ή 37 °C /72 ώρες για μεσόφιλους και στους 55 °C/72 ώρες για θερμοφίλους μικροοργανισμούς Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

Κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας

Ελέγχεται με βάση τη μικροβιολογική του σταθερότητα ύστερα από δοκιμαστική επώαση συσκευασιών στους 30 °C για 14 ημέρες και στους 55 °C για 7 ημέρες. Στη μικροβιολογική εξέταση, αναμενόμενο αποτέλεσμα σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό 853/2004, είναι η απουσία μικροοργανισμών και η απουσία σπορίων.

ΔΕΙΓΜΑ 5: ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΟ ΣΑΚΧΑΡΟΥΧΟ ΓΑΛΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ως συμπυκνωμένο σακχαρούχο γάλα χαρακτηρίζεται το γάλα που προέρχεται από μερική αφυδάτωση του γάλακτος και προσθήκη σακχάρων. Κύρια διαφορά του από το εβαπορέ είναι η φάση προσθήκης της ζάχαρης και η έλλειψη αποστείρωσης. Δεν είναι στείρο προϊόν και η ικανότητα συντήρησής του οφείλεται κυρίως στο χαμηλό συντελεστή ενεργότητας νερού ($a_w < 0,83$) και την υψηλή ωσμωτική πίεση που στην υδάτινη φάση φθάνει τις 140 Atm. Στο περιβάλλον αυτό η πιθανή αλλοιογόνος χλωρίδα που δύναται να αναπτυχθεί είναι κυρίως οσμόφιλες ζύμες και μύκητες. Η θερμική επεξεργασία που δέχεται είναι εντονότερη από την παστερίωση (100-120 °C για 3-1 λεπτά), απαλλάσσει το γάλα από επικίνδυνους για τη Δημόσια υγεία μικροοργανισμούς, ελαττώνει το μικροβιακό φορτίο σε λιγότερο από 10^3 cfu/g αλλά δεν το αποστειρώνει. Επιβιώνουν εάν υπάρχουν θερμοάντοχα σπόρια (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) αλλά δεν μπορούν να βλαστήσουν. Στο τελικό προϊόν μπορεί να ανευρισκονται και μη σπορογόνοι μικροοργανισμοί των γενών *Micrococcus*, *Streptococcus* και *Lactococcus*. Επίσης μπορεί να υπάρξουν Gram(-) βακτήρια κυρίως κολοβακτηρίδια αλλά και ζύμες και μύκητες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί ενδέχεται να υπεισέλθουν στα διαφορετικά στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, που μεσολαβούν μεταξύ της θέρμανσης του γάλακτος και της εγκυτίωσης του έτοιμου προϊόντος.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Χειρισμός δείγματος: Άθικτες συσκευασίες τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο στους 30 °C για 14 ημέρες- προεπώαση και αρίθμηση μεσόφιλων και σπορογόνων θερμοανθεκτικών βακτηρίων.

ΟΜΧ: Κάνουμε 2 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (-1,-2). Από τις αραιώσεις (-1 και -2), εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count agar (PCA). Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C /48 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑ: Από την (-1) αραιώση, εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα VRBL άγαρ. Μόλις το υπόστρωμα στερεοποιηθεί προσθέτουμε

δεύτερο στρώμα υποστρώματος. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37 °C /24 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

ΖΥΜΕΣ-ΜΥΚΗΤΕΣ: Από τη μηδενική και τη (-1) εμβολιάζουμε 100 μl σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της επιφανειακής εξάπλωσης στο θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) άγαρ. Τα τρυβλία επωάζονται στους 25 °C /3-5 ημέρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/ml).

Κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας

Τα Μικροβιολογικά κριτήρια δεν αναφέρονται στο προϊόν αυτό. Συνήθης μικροβιολογική εξέταση αναφέρεται στην αρίθμηση της ΟΜΧ, των Κολοβακτηριδίων και των ζυμών και μυκήτων και αναμενόμενο αποτέλεσμα⁽²⁾ είναι η ΟΜΧ να είναι μικρότερη από 10^3 cfu/ml και απουσία των κολοβακτηριδίων και των ζυμών και μυκήτων.

ΔΕΙΓΜΑ 6: ΚΟΝΙΟΠΟΙΜΕΝΟ ΓΑΛΑ (Γάλα σκόνη)

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Το γάλα σκόνη είναι προϊόν αφυδάτωσης του γάλακτος σε βαθμό αποξήρανσης. Η σκόνη γάλακτος δεν είναι στείρο προϊόν και η μικροβιακή της χλωρίδα εξαρτάται από την μέθοδο παρασκευής της και τις συνθήκες υγιεινής κατά την παρασκευή και συσκευασία της. Η μικροβιακή χλωρίδα της γαλακτόσκονης απαρτίζεται από θερμοάντοχα (κυρίως είδη *Micrococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.), από θερμοφιλά (*S. thermophilus*, *S. bovis*, *E. faecalis*), *Corynebacterium* spp. και *Microbacterium* spp. Επίσης σε μικρούς πληθυσμούς βρίσκονται σπόροι βακίλλων (*B. subtilis*, *B. licheniformis*) και μη θερμοάντοχα είδη (π.χ κολοβακτηρίδια), τα οποία αποτελούν δείκτη επιμόλυνσης. Εάν βρεθούν ζύμες και μύκητες αποτελούν δείκτη αερογενούς μόλυνσης της γαλακτόσκονης. Συνήθης μικροβιολογική εξέταση αναφέρεται στην αρίθμηση της ΟΜΧ, των κολοβακτηριδίων και των ζυμών και μυκήτων.

Από άποψη Δημόσιας Υγείας ο κίνδυνος προέρχεται κυρίως από τους σταφυλοκόκκους και τις σαλμονέλλες. Πολλά είδη σταφυλόκοκκων μπορούν να απομονωθούν από τρόφιμα συμπεριλαμβανομένων και των γαλακτοκομικών, ως αποτέλεσμα επιμόλυνσής τους κυρίως από τον άνθρωπο, δευτερευόντως από τα ζώα (σταφυλοκοκκικές μαστίτιδες στα γαλακτοπαραγωγά ζώα), ακόμα και από το περιβάλλον, δεδομένου ότι οι σταφυλόκοκκοι εμφανίζουν μεγάλη αντοχή στη ξηρασία. Ο *S. aureus* είναι ένα από τα πολλά αναγνωρισμένα είδη του γένους *Staphylococcus* (Gram(+), Catalase (+)) που ανήκουν στην οικογένεια Micrococcaceae. Αναπτύσσεται στο θερμοκρασιακό εύρος 7-48°C, ενώ η παραγωγή εντεροτοξινών έχει διαπιστωθεί στο θερμοκρασιακό εύρος από 10 έως 48 °C και συμβαίνει όταν η πληθυσμιακή πυκνότητά του ξεπερνάει τα 10⁵ κύτταρα ανά γρ. ή ml. Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός αδρανοποιείται στη παστερίωση, αλλά οι εντεροτοξίνες είναι θερμοάντοχες σε όλα τα χρονο-θερμοκρασιακά εύρη που εφαρμόζονται στην επεξεργασία του γάλακτος. Η γρήγορη ψύξη του νωπού γάλακτος σε θερμοκρασίες μικρότερες των 7 °C, εμποδίζει την αύξηση του πληθυσμού του συγκεκριμένου μικροοργανισμού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Χειρισμός δείγματος: Από το δείγμα σκόνη γάλακτος ζυγίζουμε 10 g με αποστειρωμένη σπάτουλα και το προσθέτουμε σε 90 ml αποστειρωμένο. διάλυμα Ringer σε θα 50 °C. Αναμειγνύουμε το φιαλίδιο μέχρι πλήρους διαλυτοποίησης, αραίωση (-1)

ΟΜΧ: Στη συνέχεια κάνουμε άλλη μία αραίωση(-2). Από τις αραιώσεις (-1) και (-2) εμβολιάζουμε 1ml σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της ενσωμάτωσης με το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count agar (PCA). Τα τρυβλία επωάζονται στους 30 °C/72 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/g).

ΖΥΜΕΣ-ΜΥΚΗΤΕΣ: Από αραιώση (-1) εμβολιάζουμε 100μl (0,1 ml) σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της επιφανειακής εξάπλωσης στο θρεπτικό υπόστρωμα Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) άγαρ. Τα τρυβλία επάγονται στους 25 °C /3-5 ημέρες. Μετά την επώαση γίνεται αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/g).

ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΙ: Από τη (-1) εμβολιάζουμε 100μl σε τρυβλίο και εφαρμόζουμε τη διαδικασία της επιφανειακής εξάπλωσης στο θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker egg yolk agar. Τα τρυβλία επάγονται στους 37 °C /24-48 ώρες. Μετά την επώαση γίνεται παρατήρηση και αρίθμηση αποικιών. Υπολογισμός αποτελέσματος σε (cfu/g). Στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να αναπτυχθούν διαφορετικών μεγεθών και διαφορετικής μορφής αποικίες

Εμφάνιση αποικιών	Μικροοργανισμοί
Μαύρες γυαλιστερές αποικίες διαμέτρου 1-5 mm, που περιβάλλονται από διαυγή ζώνη (άλω) πλάτους 2 - 5 mm. Αδιαφανής δακτύλιος μέσα στη διαυγή ζώνη, εμφανίζεται μόνο μετά από 48 ώρες επώαση	Πιθανά <i>S. aureus</i>
Μαύρες, γυαλιστερές, ακανόνιστες αποικίες με αδιαφανή ζώνη που εμφανίζεται μετά από 24 ώρες επώασης.	<i>S. epidermidis</i>
Περιστασιακή ανάπτυξη: πολύ μικρές αποικίες με χρώμα καφετί προς μαύρο χωρίς διαυγή ζώνη	Micrococci
Σκούρες, γλοιώδεις, με διαυγή ζώνη μετά από 48 ώρες επώαση	<i>Bacillus species</i>
Λευκές αποικίες χωρίς διαυγή ζώνη	Ζύμες

	Βιοχημικές δοκιμές	
Μικροοργανισμοί	B-haemolysis	Plasma coagulase
<i>S. aureus</i>	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-

Η τυπική σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος είναι πεπτόνη από καζεΐνη, εκχύλισμα κρέατος, εκχύλισμα ζύμης, πυροσταφυλικό νάτριο, γλυκίνη, χλωριούχο λίθιο και άγαρ. Προστίθεται μετά την αποστείρωση Egg-yolk tellurite emulsion 50ml/l).

Θρεπτικά συστατικά είναι: η πεπτόνη, το εκχύλισμα κρέατος, το εκχύλισμα ζύμης

Επιλεκτικοί παράγοντες ανάπτυξης είναι: το πυροσταφυλικό νάτριο και η γλυκίνη

Παρεμποδιστικοί παράγοντες ανάπτυξης είναι: το χλωριούχο λίθιο και το tellurite (για την υπόλοιπη χλωριδα)

Η ανάπτυξη σε αυτό το αδιαφανές υλικό (λόγω του περιεχομένου egg-yolk) μπορεί να δώσει τις εξής πληροφορίες:

Χαρακτηριστικές ζώνες και δακτύλιοι: Δημιουργία λιπόλυσης ή πρωτεόλυσης

Μαύρο χρώμα στις αποικίες: Αναγωγή του tellurite σε tellurium

Επιβεβαίωση ύποπτων αποικιών: Οι μαύρες αποικίες με θετική τη παραγωγή λεκιθινάσης (σχηματίζουν αδιαφανή ζώνη γύρω από την αποικία) εξετάζονται ως προς την θετική αντίδραση στη Plasma coagulase.

Δοκιμή πηκτάσης ή κοαγκουλάσης: Οι αποικίες που έχουν τα χαρακτηριστικά του *S. aureus* μεταφέρονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 0,3 ml Brain Heart Infusion και αναμειγνύονται καλά. Επώζονται στους 35 – 37 °C για 18- 24 ώρες. Στις καλλιέργειες που έχουν επωαστεί προστίθεται 0,5 ml πλάσμα αίματος (Coagulase Plasma) και γίνεται καλή ανάδευση. Ακολουθεί επώαση στους 35–37 °C για 6 ώρες. Σε περίπτωση σχηματισμού πηγματος η δοκιμή θεωρείται θετική.



Κριτήριο υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας

Σύμφωνα με τα Μικροβιολογικά κριτήρια 2073/2005 για τη γαλακτόσκηνη στα κριτήρια υγιεινής σε κανένα από τα πέντε εξεταζόμενα δείγματα δεν επιτρέπεται ο προσδιορισμός *Enterobacteriaceae* 10 cfu/g, στο τέλος της διαδικασίας παρασκευής. Σε περίπτωση που αυτό συμβαίνει θα πρέπει να ελεγχθεί η αποδοτικότητα της θερμικής επεξεργασίας και να παρεμποδισθεί πιθανή επιμόλυνση.

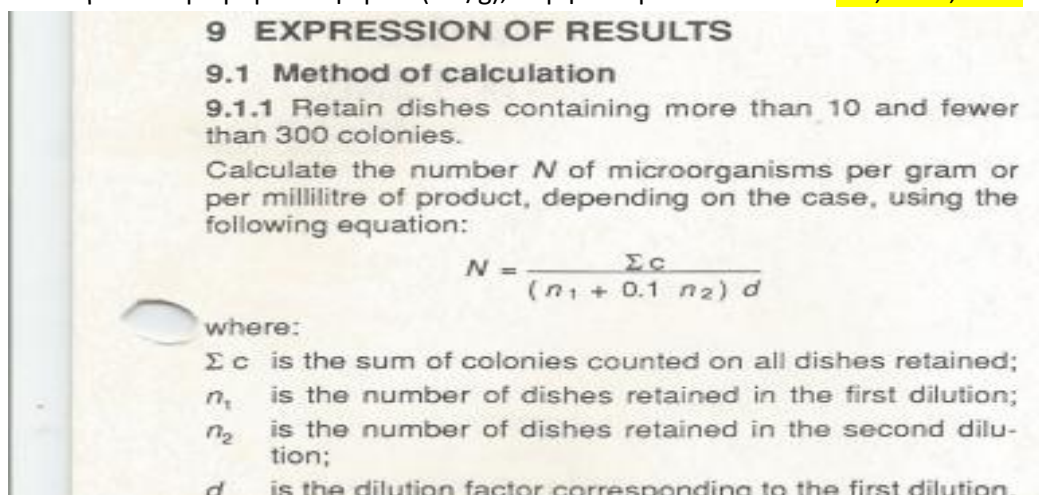
Επίσης, μόνο σε 2 από 5 εξεταζόμενα δείγματα επιτρέπεται ο προσδιορισμός των coagulase-positive *Staphylococcus* να κυμαίνεται από 10 μέχρι 100 cfu/g, στο τέλος της διαδικασίας παρασκευής. Σε περίπτωση που αυτό συμβαίνει θα πρέπει να βελτιωθούν οι συνθήκες υγιεινής της επεξεργασίας.

Τέλος, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα⁽²⁾ που απορρέουν από την νομοθεσία πολλών χωρών, η ΟΜΧ μπορεί να κυμαίνεται από $1 \cdot 10^4$ cfu/g* μέχρι $5 \cdot 10^4$ cfu/g, ανάλογα με τη ποιότητα της σκόνης γάλακτος.

Ακολουθούν **ερωτήσεις** από θέματα που συζητήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της εργαστηριακής άσκησης και από τις παραπάνω σημειώσεις

Ερωτήσεις Εμπέδωσης

- Ποιος είναι ο ορισμός των Μικροβιολογικών Κριτηρίων
- Τι είναι και που εφαρμόζονται τα Μικροβιολογικά κριτήρια Υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας ενός τροφίμου
- Τι είναι και που εφαρμόζονται τα Μικροβιολογικά κριτήρια ασφάλειας ενός τροφίμου
- Ποιο γάλα ονομάζουμε νωπό
- Ποιο γάλα ονομάζουμε φρέσκο
- Πως εξυγιάζεται το γάλα πριν δοθεί στη κατανάλωση
- Ποιοι εμπορικοί τύποι γάλακτος θεωρούνται «Εμπορικά στείροι»
- Με την παστερίωση καταστρέφονται τα σπόρια των βακτηρίων και των μυκήτων;
- Το παστεριωμένο HTST γάλα ή το γάλα μακράς διάρκειας (ESL) έχει δεχτεί εντονότερη θερμική επεξεργασία
- Γιατί τα εντεροβακτήρια θεωρούνται δείκτες μόλυνσης
- Σε παστεριωμένο γάλα, προσδιορίστηκε μικροβιακό φορτίο της οικογένειας Enterobacteriaceae. Που το αποδίδεται. Δικαιολογήστε την απάντησή σας
- Από κακής ποιότητας νωπό γάλα μπορούμε να παρασκευάσουμε καλής ποιότητας γαλακτοκομικό προϊόν; Δικαιολογήστε την απάντησή σας
- Η ανεύρεση μη σπορογόνων βακτηρίων σε συμπυκνωμένο γάλα (εβαπορέ) τι υποδηλώνει; Δικαιολογήστε την απάντησή σας
- Γιατί το σακχαρούχο γάλα δεν θεωρείται εμπορικά στείρο
- Γιατί μας ενδιαφέρει η παρουσία του *S. aureus* στα τρόφιμα
- Στη μικροβιολογική εξέταση ενός δείγματος σκόνης γάλακτος, πριν τη συσκευασία, προσδιορίστηκαν
- Στην αραίωση (10^{-2}) 115 και 100 και στη (10^{-3}) 15 και 12 αποικίες
- Υπολογίστε το μικροβιακό φορτίο (cfu/g), σύμφωνα με τον τύπο του **IDF, 100B, 1991**



Το αποτέλεσμα είναι εντός των προβλεπομένων κριτηρίων υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας της σκόνης γάλακτος; Δικαιολογήστε την απάντησή σας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Καμιναρίδης Εργαστηριακές σημειώσεις 7^{ου} Εξαμήνου
2. Μάντης Α., Παπαγεωργίου Δ., Φλετούρης Δ., Αγγελίδης Α. Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη Α.Ε.
3. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs and amending Regulation 365/2010
4. ISO 8553 IDF 131 Milk-Enumeration of microorganisms-Plate loop Technique at 30°C
5. ISO 6611 IDF 94 Milk and milk products-Enumeration of colony forming units of yeasts and/or moulds-Colony count technique at 25 °C
6. ISO 6888-1:1999(en)Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium
7. Νόμος 4254/2014. Υποπαράγρ. ΣΤ.8. Άρση εμποδίων στον ανταγωνισμό στο κλάδο των τροφίμων. Ρυθμίσεις γαλακτοκομικών προϊόντων. ΦΕΚ 85 7/4/2014. Σελ 1412-1413
8. Regulation (EC) NO 853/2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin

