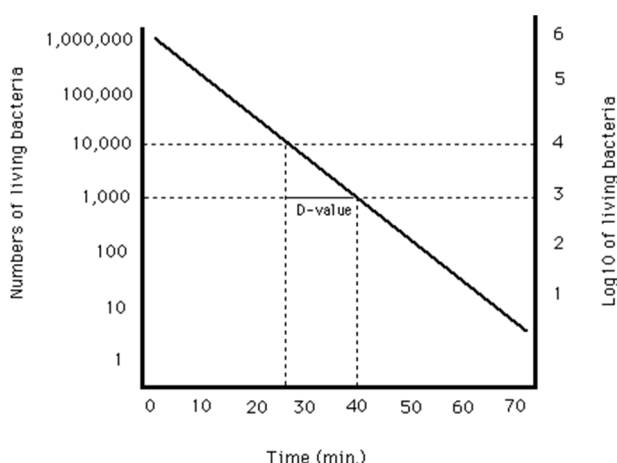


## ΘΕΡΜΙΚΗ ΘΑΝΑΤΩΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

### 1. Εισαγωγή

Η θέρμανση είναι μια μορφή επεξεργασίας, ίσως η πιο ευρέως διαδεδομένη, που χρησιμοποιείται για να θανατώσει ή αδρανοποιήσει τους μικροοργανισμούς (βλαστικές μορφές και σπόρια) στα τρόφιμα, αλλά και σε αντικείμενα, όπως επιφάνειες κοπής τροφίμων, νυστέρια, ρούχα. Ο μηχανισμός αδρανοποίησης ή θανάτωσης πιθανά να οφείλεται στη αλλαγή της δομής των πρωτεϊνών, στη διάσπαση του DNA και του RNA, ή/και στην καταστροφή των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των μικροοργανισμών.

Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που μπορεί να φέρει ένα τρόφιμο, όπως για παράδειγμα το μη θερμικά επεξεργασμένο γάλα, συνήθως είναι υψηλός, και για αυτό το λόγο εφαρμόζεται θερμική επεξεργασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα για τη μείωση του. Έχει παρατηρηθεί πως η θανάτωση ενός πληθυσμού μικροοργανισμών λόγω της θέρμανσης, σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από το ανώτερο όριο ανάπτυξης, δεν επιφέρει ταυτόχρονη θανάτωση των μικροοργανισμών, αλλά σταδιακή. Αυτή η συμπεριφορά οφείλεται στη διαφορετική θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων του μικροοργανισμού. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η θανάτωση των μικροοργανισμών είναι λογαριθμική, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1, όπου παρουσιάζεται η μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο σε μία σταθερή θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας καθώς περνάει ο χρόνος. Η θερμική θανάτωση, δηλαδή είναι μια λογαριθμική διαδικασία, πράγμα που σημαίνει ότι σε ίσα χρονικά διαστήματα και σε μια δεδομένη σταθερή θερμοκρασία, το ίδιο ποσοστό του βακτηριακού πληθυσμού θα καταστραφεί ανεξαρτήτως του υπάρχοντος πληθυσμού.

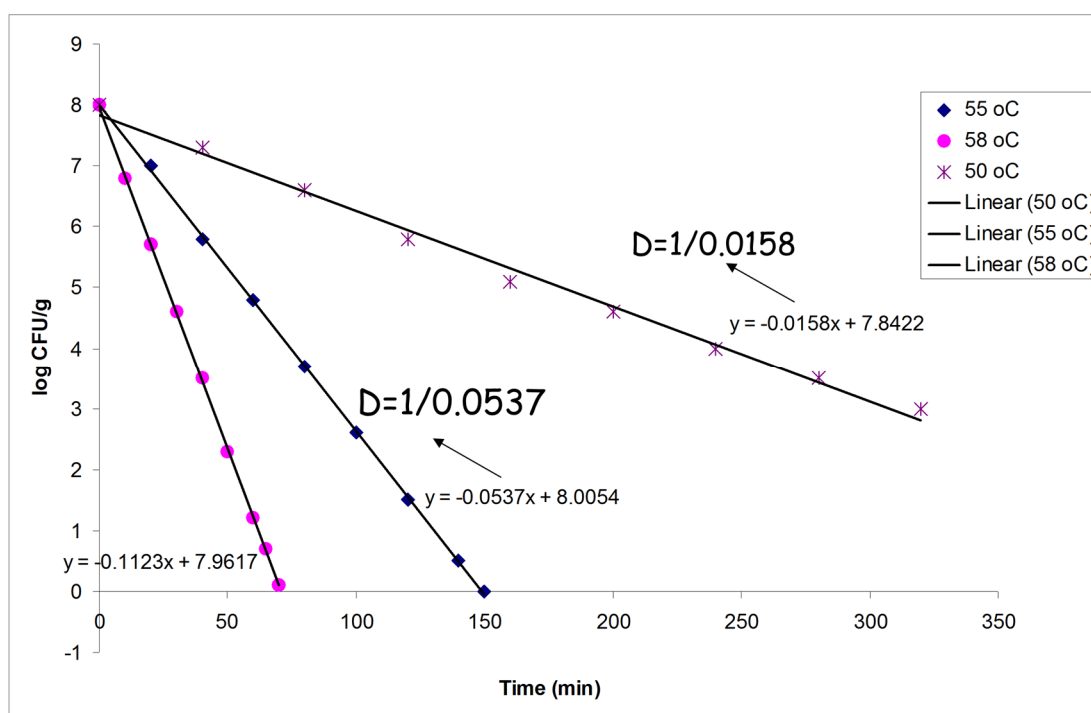


**Σχήμα 1.** Γραφική απεικόνιση επιζώντων μικροοργανισμών σε γάλα ως συνάρτηση του χρόνου στους 72°C. Στον πρώτο άξονα y ο πληθυσμός του μικροοργανισμού δίνεται σε αριθμό κυττάρων, ενώ στο δεύτερο άξονα y δίνεται σε δεκαδικό λογάριθμο του αριθμού των κυττάρων.

Πολλές παράμετροι μας βοηθούν να κάνουμε υπολογισμούς για τη θερμική επεξεργασία και το ρυθμό θερμικής θανάτωσης. Η **τιμή D** (*Decimal reduction*) είναι ένα μέτρο της θερμικής αντοχής ενός μικροοργανισμού. Είναι ο χρόνος που απαιτείται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για να θανατωθεί το 90% των μικροοργανισμών. Έτσι, μετά από μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών κατά ένα D, μόνο το 10% του αρχικού πληθυσμού παραμένει ζωντανό. Είναι, δηλαδή, ο χρόνος σε μία δεδομένη θερμοκρασία που απαιτείται για να καταστρέψει 1 λογαριθμικό κύκλο (το 90%) τον πληθυσμό των μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, μια τιμή D στους 72°C ίση με 1 min, σημαίνει ότι για κάθε λεπτό της επεξεργασίας στους 72°C ο πληθυσμός του μικροοργανισμού στόχου θα μειώνεται κατά 90%. Για παράδειγμα, στο Σχήμα 1 η τιμή  $D_{72^{\circ}\text{C}}$  είναι 14 min (40-26), άρα κάθε 14min ο πληθυσμός του μικροοργανισμού θα μειώνεται κατά 1 log.

**“D-τιμή:** Ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού κατά ένα λογάριθμο”

Η τιμή D εξαρτάται από την θερμοκρασία, το είδος του μικροοργανισμού και τη σύνθεση του μέσου που περιέχει τον μικροοργανισμό.



**Σχήμα 2.** Γραφική απεικόνιση θανάτωσης ενός πληθυσμού μικροοργανισμών σε γάλα σε διάφορες θερμοκρασίες θερμικής επεξεργασίας (50°C, 55°C, 58°C).

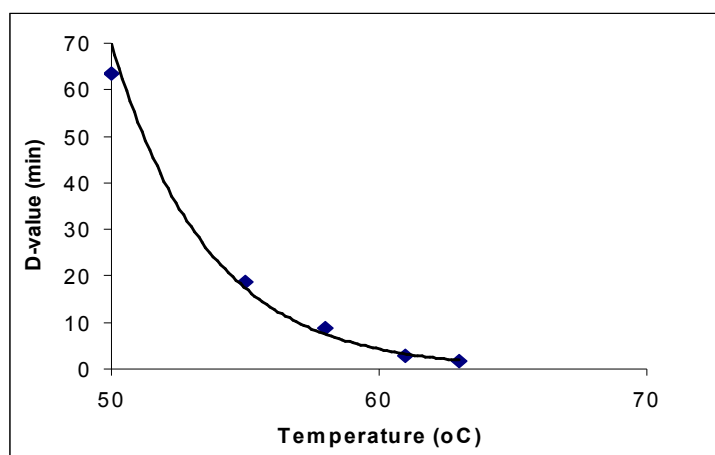
Όπως βλέπουμε στο Σχήμα 2, ο ρυθμός θανάτωσης των μικροοργανισμών δεν είναι ίδιος για κάθε θερμοκρασία. Όσο πιο μεγάλη είναι η θερμοκρασία, τόσο πιο γρήγορη

είναι η θανάτωση των μικροοργανισμών, δηλαδή τόσο πιο μικρή είναι η τιμή D. Η τιμή D μπορεί να υπολογιστεί γραφικά όπως φαίνεται στα Σχήματα 1 και 2 ή και από την εξίσωση:

$$D = t / (\log N_0 - \log N_t) \quad (1)$$

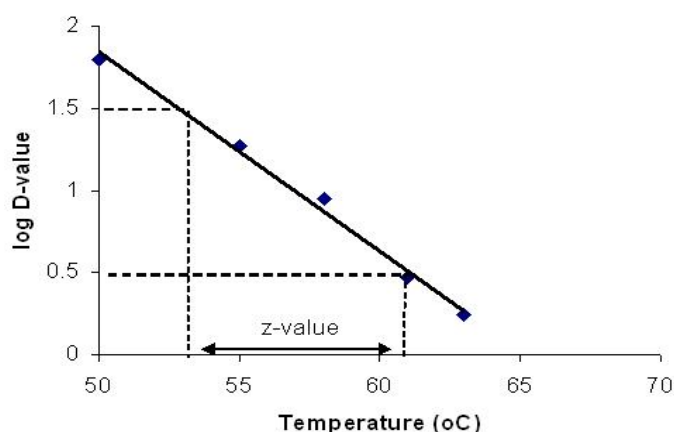
όπου:  $\log N_0$  είναι ο αρχικός πληθυσμός των μικροοργανισμών,  $\log N_t$  ο είναι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο χρόνο t.

Αν υπολογίσουμε τις τιμές D για διαφορετικές θερμοκρασίες και τις εκφράσουμε ως συνάρτηση της θερμοκρασίας θα πάρουμε ένα γράφημα της μορφής του Σχήματος 3.



**Σχήμα 3.** Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην τιμή D για ένα είδος μικροοργανισμού.

Εάν πάρουμε το λογάριθμο της τιμή D ως συνάρτηση της θερμοκρασίας τότε η γραφική παράσταση που προκύπτει είναι αυτή του Σχήματος 4.



**Σχήμα 4.** Γραφική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας στο λογάριθμο της τιμής D.

Η **τιμή Z** αντανακλά την εξάρτηση της αντίδρασης θανάτωσης από τη θερμοκρασία. Ορίζεται ως η μεταβολή της θερμοκρασίας που απαιτείται για την αλλαγή της τιμής

D κατά έναν παράγοντα 10, δηλαδή ένα λογάριθμο. Στην απεικόνιση στο Σχήμα 4 η τιμή Z είναι 8°C.

“Z-τιμή: Η θερμοκρασία που απαιτείται για τη μείωση/αύξηση της D-τιμής κατά ένα λογαριθμικό κύκλο”

## 2. Πειραματικό μέρος

### Υπολογισμός της τιμής D

#### Υλικά

Γάλα

Καλλιέργεια *Escherichia coli*

Αραιωτικά υγρά

Θρεπτικό υπόστρωμα PCA (plate count agar)

Τρίγωνα επίστρωσης

Υδατόλουτρο

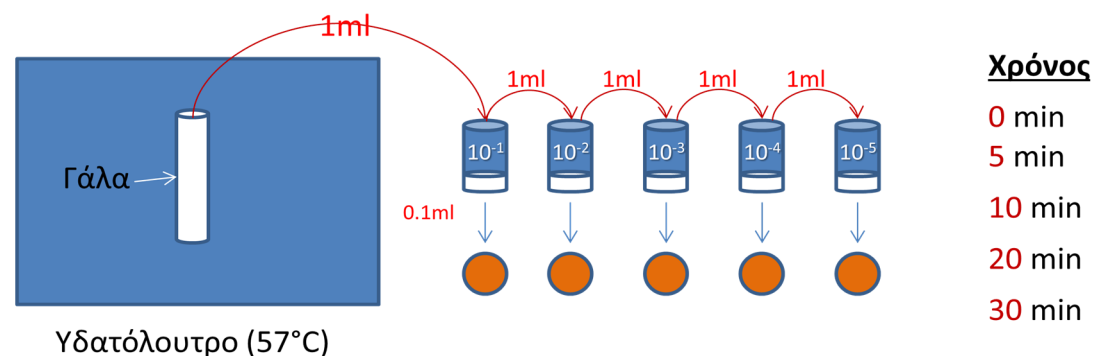
Μηχανικές πιπέτες

Ρύγχη

Επωαστικός κλίβανος (30°C)

Χρονόμετρο

#### Μέθοδος



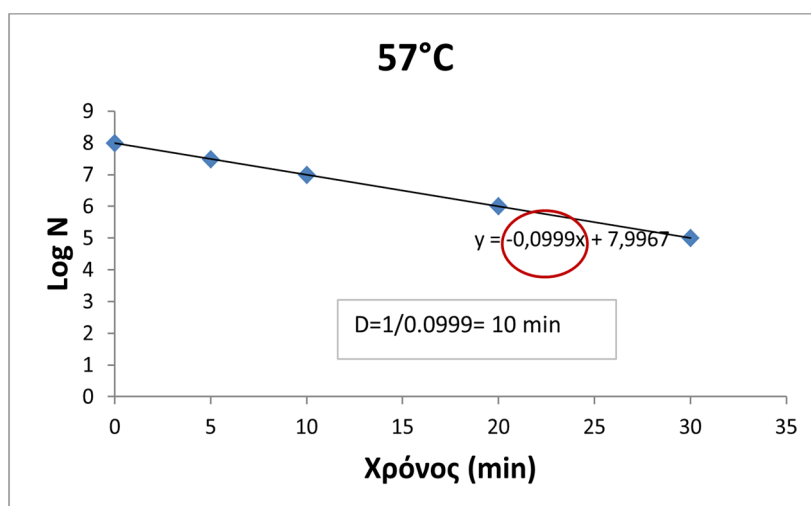
Στο συγκεκριμένο πείραμα θέλουμε να υπολογίσουμε την τιμή D του μικροοργανισμού *E. coli* σε γάλα στους 57°C. Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει να θερμάνουμε το γάλα, στο οποίο έχουμε ρίξει κύτταρα του υπό εξέταση μικροοργανισμού σε πληθυσμό 10<sup>7</sup>cfu/ml, στους 57°C. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθούμε είναι η εξής:

Παίρνουμε δείγμα (**Χρόνος 0 min**) από το γάλα με το μικροοργανισμό για να υπολογίσουμε ποιο είναι το μικροβιολογικό φορτίο του γάλακτος πριν τη θέρμανση του και στη συνέχεια τοποθετούμε το γάλα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 57°C. Σε **5, 10, 20, 30 min** μετά την τοποθέτηση του γάλακτος στους 57°C για τη θερμική

καταστροφή του *E. coli*, παίρνουμε ξανά δείγμα από το γάλα για να προσδιορίσουμε τον πληθυσμό του μικροοργανισμού. Επειδή δε γνωρίζουμε ποιος είναι ο πληθυσμός του *E. coli* σε κάθε χρονική στιγμή (τα κύτταρα πεθαίνουν λόγω της θέρμανσης), σε κάθε δείγμα που παίρνουμε κάνουμε 5 αραιώσεις σε αραιωτικά υγρά και κατόπιν επιστρώνουμε από κάθε αραιώση 0,1 ml σε τρυβλία με PCA. Στα τρυβλία πρέπει να γράφουμε το χρόνο που πήραμε το δείγμα και την αραιώση. Επώάζουμε τα τρυβλία για 3 ημέρες στους 30°C και μετά καταμετρούμε τις αποικίες στα τρυβλία που φέρουν από 30-300 αποικίες. Καταγραφούμε τα αποτελέσματα και υπολογίζουμε για κάθε χρονικό διάστημα ποιος είναι ο πληθυσμός (N) του γάλακτος και περνάμε τα δεδομένα σε ένα φύλλο Excel

Χρόνος (min)	N (Πληθυσμός μικροοργανισμών)	Λογάριθμος N
0	100000000	=LOG(G9)
5	30990000	7.5
10	10000000	7
20	1000000	6
30	100000	5

κάνουμε ένα γράφημα έως εξής:



και υπολογίζουμε την τιμή D, όπως φαίνεται παραπάνω. Εναλλακτικά, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την εξίσωση (1) έως εξής:

Αν  $t = 30 \text{ min}$  (δηλαδή από την αρχή του πειράματος έως το τέλος), τότε:

$$D = t/(\log N_0 - \log N_t) = 30/(8-5) = 10 \text{ min.}$$

### Ερωτήσεις κατανόησης

1. Αν ο μικροοργανισμός Α έχει  $D_{65^\circ\text{C}} 32\text{sec}$  και ένας μικροοργανισμός Β  $D_{65^\circ\text{C}} 1\text{min}$ , ποιος μικροοργανισμός πεθαίνει πιο γρήγορα στους  $65^\circ\text{C}$ ;
2. Αν ένας μικροοργανισμός Α έχει τιμή  $Z 1^\circ\text{C}$  και ένας μικροοργανισμός Β έχει τιμή  $Z 10^\circ\text{C}$ , ποιος μικροοργανισμός είναι πιο θερμοευαίσθητος;