



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
Με κατεύθυνση
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Διπλωματική εργασία:
«ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΤΗΣ
ΛΑΡΙΣΑΣ»

ΤΣΙΩΤΑ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ , ΤΕΙ ΛΑΡΙΣΑΣ (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ)

Επιβλέπων καθηγητής:
Επικ. Καθηγητής Απόστολος Σ. Αγγελίδης

ΛΑΡΙΣΑ, 2016

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ:
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
Με κατεύθυνση
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΩΝ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Διπλωματική εργασία:
«ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ
ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΓΟΡΑ ΤΗΣ
ΛΑΡΙΣΑΣ»

ΤΣΙΩΤΑ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ , ΤΕΙ ΛΑΡΙΣΑΣ (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΚΑΡΔΙΤΣΑΣ)

Επιβλέπων καθηγητής:
Επικ. Καθηγητής Απόστολος Σ. Αγγελίδης

ΛΑΡΙΣΑ, 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:

Α. ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης

ΜΕΛΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:

Α. ΓΚΟΒΑΡΗΣ, Καθηγητής

Πρόεδρος Τμήματος Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Α. ΠΕΞΑΡΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια

Εργαστήριο Υγιεινής των Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Τμήμα Κτηνιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ όλα θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου προς τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, επικ. καθηγητή κ. Απόστολο Αγγελίδη για τη καθοδήγησή του, τη συνεχή επίβλεψη καθώς και την άμεση και ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας για την παρούσα διπλωματική εργασία.

Επίσης είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς μου Επιτροπής, τον καθηγητή κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη και την επικ. καθηγήτρια κ. Ανδρεάνα Πεξαρά για την προσεκτική ανάγνωση της εργασίας μου, τις πολύτιμες υποδείξεις τους και την άριστη συνεργασία μας.

Τέλος, οφείλω τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω το εργαστηριακό κομμάτι της διπλωματικής μου εργασίας στο Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άρτια φιλοξενία και καθοδήγηση τους στο χώρο του εργαστηρίου καθώς και την πολύτιμη βοήθεια τους.

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	6
1.1.1. Φυσικές ιδιότητες του γάλακτος	6
1.1.2. Χημική σύσταση του γάλακτος.....	8
1.1.3. Θρεπτική αξία του γάλακτος.....	10
1.2.1. Παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορεί να υπάρχουν στο νωπό γάλα	13
1.2.2. Μικροβιολογικά κριτήρια για το νωπό γάλα	15
1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	17
1.3.1. Νομοθεσία για το παστεριωμένο γάλα	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	21
2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ	21
2.2.1. Φυσικοχημικές εξετάσεις (Προσδιορισμός της τιμής του pH)	22
2.2.2.1. Αρίθμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X) (Total Aerobic Count, TAC)....	23
2.2.2.2. Αρίθμηση Ολικών Ψυχρότροφων Μικροβίων (Total Psychrotrophic Count, TPC)....	23
2.2.2.3. Αρίθμηση Αερόβιων Μεσόφιλων Σπόρων (Mesophilic Aerobic Bacterial Spore Count, MABSC).....	23
2.2.2.4. Αρίθμηση Αερόβιων Ψυχρότροφων Σπόρων (Psychrotrophic Aerobic Bacterial Spore Count, PABSC)	24
2.2.2.5. Αρίθμηση Εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae Count, EC)	24
2.2.2.6. Ανίχνευση της <i>Listeria monocytogenes</i>	24
2.3. ΧΡΟΝΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ.....	25
2.3.1. Ημέρα «0».....	25
2.3.2. Τέλος της διάρκειας ζωής, ύστερα από συντήρηση στους 4°C.....	25
2.3.3. Τέλος της διάρκειας ζωής, ύστερα από συντήρηση στους 8°C.....	26
2.3.4. Δύο ημέρες μετά το τέλος της διάρκειας ζωής, ύστερα από συντήρηση στους 4°C	26
2.4. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ – ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	26
2.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΠΩΛΗΤΕΣ ..	28
3.2. ΠΡΟΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΛΙΑΝΙΚΗΣ ΠΩΛΗΣΗΣ	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	32
4.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΠΩΛΗΤΕΣ ..	33
4.2. ΠΡΟΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΛΙΑΝΙΚΗΣ ΠΩΛΗΣΗΣ	34
Βιβλιογραφία	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν δείγματα γάλακτος που λήφθηκαν από τρεις συγκεκριμένους αυτόματους πωλητές παστεριωμένου γάλακτος στην πόλη της Λάρισας και δείγματα που λήφθηκαν από καταστήματα λιανικής και αφορούσαν βιομηχανικές συσκευασίες παστεριωμένου γάλακτος δύο γαλακτοβιομηχανιών. Όλα τα δείγματα κατά τη μέρα της συλλογής τους εξετάστηκαν ως προς την θερμοκρασία τους και το pH. Επίσης, κατά τη μέρα συλλογής (ημέρα «0»), αλλά και ύστερα από συντήρησή τους στους 4 ή 8°C μέχρι τη λήξη της διάρκειας ζωής τους εξετάστηκαν μικροβιολογικά ως εξής: αρίθμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X.), αρίθμηση των Ολικών Ψυχρότροφων Μικροβίων, αρίθμηση των Αερόβιων Μεσόφιλων Σπόρων, αρίθμηση των Αερόβιων Ψυχρότροφων Σπόρων, αρίθμηση των Εντεροβακτηριοειδών και ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*.

Στα δείγματα παστεριωμένου γάλακτος από αυτόματους πωλητές, οι μικροβιολογικές αναλύσεις σχετικά με την O.M.X. κατά την ημέρα «0» έδειξαν μέσες τιμές που κυμάνθηκαν από 3,6 έως 3,7 log cfu/mL χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των αυτόματων πωλητών. Αυξήσεις έως και περίπου 1 log cfu/ml παρατηρήθηκαν στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4°C, ενώ αυξήσεις πάνω από 2 log cfu/ml καταγράφηκαν κατά την διατήρησή τους στους 8°C. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς των ολικών ψυχρότροφων. Οι πληθυσμοί των μεσόφιλων αερόβιων σπόρων κατά την ημέρα «0» ήταν σε χαμηλά επίπεδα που κυμάνθηκαν από 1,5 έως 1,8 log cfu/mL. Οι πληθυσμοί των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης (1 cfu/mL) σε 27 από τα 39 δείγματα (69,2 %) που εξετάστηκαν στο χρόνο «0». Τα υπόλοιπα 12 δείγματα περιείχαν χαμηλούς πληθυσμούς, συνήθως μικρότερους των 10 cfu/mL. Σε αναλύσεις των ίδιων δειγμάτων γάλακτος μετά από τρεις ημέρες συντήρησης υπό ψύξη παρατηρήθηκαν μετρήσιμοι πληθυσμοί βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae, ιδιαίτερα όταν τα δείγματα γάλακτος συντηρήθηκαν στους 8°C. Όλα τα δείγματα βρέθηκαν αρνητικά στους ελέγχους αναφορικά με την ανίχνευση της *L. monocytogenes*.

Στα προσυσκευασμένα δείγματα (συσκευασίες) παστεριωμένου γάλακτος, ο μέσος πληθυσμός της O.M.X. κατά την ημέρα «0» (3,4 και 3,3 log cfu/mL) ήταν ελαφρώς χαμηλότερος, ωστόσο όχι σημαντικά διαφορετικός σε σχέση με το μέσο πληθυσμό της O.M.X. των δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές. Ωστόσο, μετά από τη συντήρηση των δειγμάτων στους 8°C για επτά ημέρες, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς της O.M.X. μεταξύ των δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές και των προσυσκευασμένων δειγμάτων. Η μέσες τιμές του πληθυσμού των ολικών ψυχρότροφων κατά την ημέρα «0» (1,6 και 1,7 log cfu/mL) ήταν χαμηλότερες (κατά 0,5-1 log cfu/mL) από εκείνες των δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές. Σε αντίθεση με τα δείγματα των αυτόματων πωλητών, οι αυξήσεις στους πληθυσμούς των ολικών ψυχρότροφων στα προσυσκευασμένα δείγματα παστεριωμένου γάλακτος ήταν πολύ μικρότερες κατά τη συντήρησή τους στους 4 ή 8°C μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής τους. Οι πληθυσμοί των ψυχρότροφων αερόβιων βακτηριακών σπόρων καθώς και οι πληθυσμοί των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae ήταν κάτω από το όριο καταμέτρησης (1 cfu/mL) σε όλα τα δείγματα και τους χρόνους δειγματοληψίας. Παρόμοια με τα δείγματα των αυτόματων πωλητών, ο μέσος όρος του πληθυσμού των σπόρων μεσόφιλων αερόβιων βακτηρίων κατά την ημέρα «0» ήταν χαμηλός (1,6 και 1,2 log cfu/mL).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το γάλα είναι ένα θρεπτικό, λευκό ή ελαφρώς κιτρινωπό υγρό, που αποτελεί βιολογικό έκκριμα των μαστών των θηλαστικών, που προορίζεται για τη διατροφή των νεογνών τους. Σύμφωνα με το FAO/WHO (1973), «γάλα είναι το φυσιολογικό έκκριμα του μαστού που παίρνεται μετά από μία ή δύο αμέλξεις χωρίς να προστεθεί ή να αφαιρεθεί τίποτε και προορίζεται για κατανάλωση σε υγρή μορφή ή για περαιτέρω επεξεργασία».

Γενικά με τον όρο γάλα απλά χωρίς να συνδέεται με κάποιο επίθετο νοείται αποκλειστικά και μόνο το γάλα το οποίο προέρχεται από αγελάδα, είναι νωπό, πλήρες, δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση και δεν περιέχει άλλες πρόσθετες ουσίες. Τα διάφορα είδη γάλακτος διαφέρουν στη σύστασή τους. Τα κυριότερα συστατικά του γάλακτος είναι το νερό, το λίπος, οι πρωτεΐνες, η λακτόζη και κάποια άλατα. Το γάλα που προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση, εκτός από τις αγελάδες, μπορεί να προέρχεται και από προβατίνες, κατσίκες αλλά και άλλα θηλαστικά ζώα (Ανυφαντάκης, 1992).

1.1.1. Φυσικές ιδιότητες του γάλακτος

Το γάλα γενικά μπορεί να περιγραφεί ως ένα κολλοειδές εναιώρημα που περιέχει γαλακτωματοποιημένα σφαιρίδια λίπους, μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών, τον υδατάνθρακα λακτόζη, άλατα, βιταμίνες και ένζυμα (Kaminaridis et al., 2007). Οι κυριότερες φυσικές ιδιότητες του γάλακτος περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω (Μάντης, 2000).

Η οσμή και η γεύση. Η οσμή είναι ιδιάζουσα και η γεύση ευχάριστη, ελαφρώς υπόγλυκη, εξ' αιτίας της λακτόζης.

Το χρώμα του γάλακτος. Το χρώμα είναι λευκωπό, λευκοκίτρινο ή κυανόλευκο, ανάλογα με το είδος του ζώου, τη φυλή και την ύπαρξη χρωστικών (καροτίνη, ριβοφλαβίνη κ.ά.).

Οξύτητα - Ρυθμιστική ικανότητα. Το γάλα αγελάδας, μετά την άμελξή του, έχει ελαφρώς όξινη αντίδραση. Η αρχική αυτή οξύτητα του γάλακτος εκφρασμένη σε γαλακτικό οξύ, είναι 0,12-0,15 g/100 ml (ή 7-8 °S.H.).

Δυναμικό οξειδο-αναγωγής. Το γάλα περιέχει αρκετά οξειδο-αναγωγικά συστήματα (ασκορβικό, γαλακτικό, πυροσταφυλικό, ριβοφλαβίνη, οξυγόνο) η σχετική συγκέντρωση των οποίων καθορίζει και το δυναμικό οξειδο-αναγωγής του (Eh) σε δεδομένη στιγμή.

Ειδικό βάρος. Το ειδικό βάρος του γάλακτος είναι το βάρος ανά μονάδα όγκου αυτού και διαμορφώνεται από το ειδικό βάρος των επιμέρους συστατικών του. Συνεπώς εξαρτάται από τη συγκέντρωση των συστατικών, το βαθμό ενυδάτωσης των πρωτεϊνών και τον ειδικό όγκο της λιπαρής φάσης του γάλακτος. Για το γάλα αγελάδας κυμαίνεται από 1,029 έως 1,032.

Ιξώδες. Το ιξώδες του γάλακτος κυμαίνεται μεταξύ 0,9 και 2,1 (μ.ό. 2,0) centipoise και επηρεάζεται κυρίως από τη συγκέντρωση και τη διασπορά των κολλοειδών (μικκυλίων καζεΐνης) και τον αριθμό των λιποσφαιρίων. Η ομοιογενοποίηση αυξάνει τον αριθμό των λιποσφαιρίων και αυτό επιφέρει αύξηση του ιξώδους. Το ιξώδες επηρεάζεται επίσης από τη θερμοκρασία και είναι μεγαλύτερο σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Επιφανειακή τάση. Η επιφανειακή τάση του γάλακτος μετρείται με ειδικά όργανα (ζυγοί De Nouy). Στους 0°C για το γάλα αγελάδας είναι από 55 έως 60 dynes/cm, ενώ με την άνοδο της θερμοκρασίας μειώνεται. Έτσι, στους 20°C είναι 50 dynes/cm και στους 60°C 40-45 dynes/cm. Οι καζεΐνες, η α- λακταλβουμίνη, η β-γαλακτοσφαιρίνη, τα φωσφολιπίδια, οι πρωτεΐνες του λιποσφαιρίου και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα είναι τα κύρια συστατικά που διαμορφώνουν την επιφανειακή τάση του γάλακτος.

Σημείο πήξης. Το σημείο πήξης στο γάλα προσδιορίζεται με ειδικές συσκευές (κρυοσκόπια) και για το γάλα αγελάδας κυμαίνεται από -0,530°C έως -0,570°C με μέση τιμή τους -0,547°C.

Σημείο ζέσεως. Το γάλα βράζει στους 100,15°C έως 100,17°C και αυτό οφείλεται στα υδατοδιαλυτά συστατικά του.

Ηλεκτρική αγωγιμότητα. Στο γάλα η αγωγιμότητα εξαρτάται από τη συγκέντρωση των ιόντων των διαφόρων αλάτων του και κυρίως του χλωριούχου νατρίου. Σε θερμοκρασία 25°C η ηλεκτρική αγωγιμότητα του γάλακτος κυμαίνεται από 0,004 έως 0,006 Ohm⁻¹ cm⁻¹.

1.1.2. Χημική σύσταση του γάλακτος

Τα κυριότερα συστατικά του γάλακτος είναι το νερό, το λίπος, οι πρωτεΐνες, η λακτόζη, τα διάφορα άλατα κ.ά. (Ανυφαντάκης & Καλατζόπουλος, 1993).

Νερό. Είναι το συστατικό που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο γάλα και αποτελεί μέσο διασποράς όλων των άλλων. Ένα μικρό ποσοστό απ' αυτό είναι δεσμευμένο στις πρωτεΐνες και στη λακτόζη του (Ανυφαντάκης, 2004).

Λίπος. Τρεις κατηγορίες λιπαρών ενώσεων εμπεριέχονται στο γάλα, τα ουδέτερα λίπη (τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια), τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια) και τα ασαπωνοποιητα συστατικά (στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, καροτενοειδή), τα οποία βρίσκονται σε αναλογία περίπου 98%, 1% και 1%, αντίστοιχα. Το λίπος του γάλακτος, που είναι το κυρίαρχο συστατικό της λιπαρής φάσης του, αποτελεί μίγμα τριγλυκεριδίων (97 έως 98%), διγλυκεριδίων (1 έως 2%) και μονογλυκεριδίων (ίχνη). Το λίπος του γάλακτος είναι μίγμα εστέρων γλυκερόλης με διάφορα λιπαρά οξέα (Ανυφαντάκης, 2004).

Αποτελεί σημαντικότερη πηγή ενέργειας και γι' αυτό το λόγο παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον από διατροφική άποψη, γιατί είναι φορέας των λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E και K), ενώ περιέχει και αξιόλογη ποσότητα απαραίτητων λιπαρών οξέων. Στη δομή του λίπους του γάλακτος συμμετέχουν περισσότερα από 150 λιπαρά οξέα, από τα οποία αλλά βρίσκονται σε σημαντική αναλογία και άλλα σε ίχνη. Η φύση και η αναλογία των οξέων αυτών προσδιορίζουν τις ιδιότητές του (Ανυφαντάκης, 2004).

Στο πρόβειο και στο γίδινο γάλα βρίσκονται σε μεγαλύτερη αναλογία λιπαρά οξέα με 6-10 άτομα άνθρακα όπως το καπροϊκό, καπρυλικό και καπρικό. Αυτά τα λιπαρά οξέα έχουν δριμύτερη γεύση από τα οξέα με C₂ έως C₄ ή C₁₂ έως C₁₈. Στο γεγονός αυτό οφείλεται και η χαρακτηριστική διαφορά στη γεύση των τυριών που παρασκευάζονται από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα σε σύγκριση με εκείνα τα οποία παρασκευάζονται από αγελαδινό γάλα (Belitz et al, 2006).

Πρωτεΐνες του γάλακτος. Το γάλα περιέχει μεγάλη ποικιλία αζωτούχων ενώσεων από τις οποίες το 95% περίπου είναι πρωτεϊνικής φύσης. Το υπόλοιπο 5% αποτελείται από μη πρωτεϊνικής φύσης αζωτούχες ουσίες, δηλαδή αζωτούχα συστατικά μικρού μοριακού βάρους. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος αποτελούν ένα πολύπλοκο μίγμα, του οποίου τα επιμέρους συστατικά απομονώνονται δύσκολα. Η περιεκτικότητα του γάλακτος σε πρωτεΐνες εξαρτάται από το είδος του ζώου π.χ. στο

πρόβειο είναι κατά μέσο όρο 5,6% και στο γίδινο 3,6% (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).

Καζεΐνες. Αποτελούν τις χαρακτηριστικές πρωτεΐνες του γάλακτος, στο οποίο συναντώνται με τη μορφή κολλοειδούς φωσφοροκαζεϊνικού ασβεστίου. Τα κλάσματα της καζεΐνης διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη δομή, την ηλεκτοφορητική κινητικότητα και τις τυροκομικές ιδιότητες. Έχει διαπιστωθεί και η ύπαρξη γενετικών παραλλαγών τους, από τις οποίες, στο γάλα συναντώνται σε μεγαλύτερη αναλογία οι as_1 -, as_2 -, β - και κ -καζεΐνες (Ανυφαντάκης, 2004).

Το μεγαλύτερο ποσοστό της καζεΐνης βρίσκεται στο γάλα υπό μορφή μικροσκοπικών σφαιρικών τεμαχίων, των μικκυλίων, που απαρτίζονται από τις as_1 -, as_2 -, β - και κ -καζεΐνες, πεπτίδια που προέρχονται από τη δράση της πλασμίνης του γάλακτος επί της β -καζεΐνης (γ - καζεΐνης) και ανόργανα συστατικά, μεταξύ των οποίων δεσπόζουν το ασβέστιο και ο φώσφορος. Τα μικκύλια περιέχουν περίπου 70% νερό και 30% στερεά συστατικά από τα οποία το 92% είναι οι καζεΐνες και το 8% διαλυτά άλατα. Σε μορφή μικκυλίων βρίσκονται στο γάλα το 90% περίπου των καζεϊνών του. Το υπόλοιπο 10% είναι σε διαλυτή μορφή. Μεταξύ των δύο μορφών υπάρχει μια δυναμική σχέση, η οποία επηρεάζεται από την ποσότητα των ιόντων ασβεστίου και φωσφόρου του γάλακτος. Με αυξομείωση των τελευταίων είναι δυνατόν να αυξομειωθεί η μία μορφή καζεΐνης έναντι της άλλης, επειδή η δράση είναι αντιστρεπτή. Εάν μειωθεί η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, για παράδειγμα, το μέγεθος των μικκυλίων μειώνεται και αυξάνεται η περιεκτικότητα του γάλακτος σε διαλυτή καζεΐνη. Το αντίθετο συμβαίνει με την αύξησή του (Ανυφαντάκης, 2004). Το μέγεθος των μικκυλίων κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 80-100 μm (Ανυφαντάκης, 1994).

Πρωτεΐνες του ορού. Το κλάσμα αυτό περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες του γάλακτος που δεν καταβυθίζονται και παραμένουν διαλυτές σε pH 4,6 και θερμοκρασία 20°C. Οι σημαντικότερες από τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος είναι οι ομάδα των πρωτεοζών-πεπτόνων, η β -γαλακτογλοβουλίνη, η α -λακτοαλβουμίνη, η αλβουμίνη του ορού και οι ανοσοσφαιρίνες (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).

Λακτόζη. Είναι ο κύριος υδατάνθρακας του γάλακτος των περισσότερων θηλαστικών και ο μόνος που υπάρχει ελεύθερος και σε σημαντικές ποσότητες σ' αυτό. Είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται από τους μονοσακχαρίτες D-γλυκόζη και D-γαλακτόζη. Η λακτόζη στο κανονικό γάλα υπάρχει συνήθως σε αναλογία 4.4% έως 5.2%. Αντιπροσωπεύει το 50-52% των στερεών συστατικών του

άπαχου γάλακτος. Αποτελεί πηγή ενέργειας, πλην όμως, για να χρησιμοποιηθεί, πρέπει πρώτα να διασπαστεί σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συμβολή του ένζυμου της λακτάσης, που αφθονεί στο πεπτικό σύστημα των νεογνών (Ανυφαντάκης 2004).

Άλατα. Το γάλα περιέχει ανόργανα και οργανικά άλατα, τα οποία βρίσκονται ή μπορούν να βρεθούν στο γάλα ως ιόντα ή σε ισορροπία με ιόντα. Το σύνολο των αλάτων του γάλακτος βρίσκεται στον ορό και τα καζεϊνικά μικκύλια, ενώ μικρές ποσότητες βρίσκονται στα λιποσφαίρια (Καμιναρίδης & Μοάτσου, 2009).

Δευτερεύοντα συστατικά του γάλακτος. Πέραν από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, το γάλα περιέχει μεγάλη ποικιλία και άλλων συστατικών. Από αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν από διατροφικής πλευράς οι βιταμίνες, οι στερόλες και τα φωσφολιπίδια, ενώ από τυροκομική άποψη οι χρωστικές, οι αντιβακτηριακές ουσίες, τα σωματικά κύτταρα και τα ένζυμα (Ανυφαντάκης, 1994).

1.1.3. Θρεπτική αξία του γάλακτος

Το γάλα είναι ακρογωνιαίος λίθος της βρεφικής και παιδικής διατροφής, αλλά εξίσου πολύτιμο και για τους ενήλικες. Παρά τη χαμηλή ενεργειακή του απόδοση (10% -13% της ενέργειας), το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα συνεισφέρουν το 47% του ασβεστίου, το 42% της ρετινόλης, και το 65% της βιταμίνης D στη διατροφή των παιδιών και των ενηλίκων. Επιπρόσθετα, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν καλή πηγή ριβοφλαβίνης, φωσφόρου και βιταμίνης B12. Το ασβέστιο, ο φώσφορος και το μαγνήσιο είναι απαραίτητα για την υγεία και την ανάπτυξη των οστών σε βρέφη και παιδιά, αλλά και στους ενήλικες, τους οποίους προστατεύουν από οστεοπόρωση. Επιπρόσθετα, το ασβέστιο και ο φώσφορος κάνουν καλό στην υγεία των δοντιών (Drewnowski, 2011).

Ορισμένα πεπτίδια που προέρχονται από τις καζεΐνες του γάλακτος έχουν αντιυπερτασικές ιδιότητες μέσω αναστολής της δραστηριότητας του ένζυμου ACE (μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης), που μετατρέπει την αγγειοτενσίνη I σε αγγειοτενσίνη II. Η πρωτεολυτική δραστηριότητα των βακτηρίων του γάλακτος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης του γάλακτος παράγει επίσης πεπτίδια με αντιυπερτασικές ιδιότητες (casokinins και lactokinins) (Ebringer et al., 2008).

Η κατανάλωση αποβουτυρωμένου ή μειωμένης λιποπεριεκτικότητας γάλακτος βοηθά στον έλεγχο της παχυσαρκίας, ενώ το ασβέστιο, το μαγνήσιο και ο χαμηλός γλυκαιμικός δείκτης των γαλακτοκομικών προϊόντων, μειώνουν την πιθανότητα

εμφάνισης διαβήτη τύπου II (Boor, 2001). Το ασβέστιο και το μαγνήσιο, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία στην ινσουλίνη και στην ανοχή της γλυκόζης. Επίσης, οι οροπρωτεΐνες του γάλακτος, λόγω της επίδρασής τους στις ορμόνες χολοκυστοκινίνη και γλυκαγόνη, μπορούν να ασκήσουν θετική επίδραση στο γλυκαιμικό έλεγχο και στην απόκριση στην ινσουλίνη, καθώς επίσης και στο αίσθημα κορεσμού, γεγονός που βοηθάει στη μείωση της υπερβολικής πρόσληψης τροφής και επομένως της αύξησης του βάρους (Pereira, 2014).

1.2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΝΩΠΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Το νωπό γάλα είναι ανθυγιεινό όταν (Μάντης, 2000):

- Περιέχει παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στην ανθρώπινη υγεία.

- Περιέχει τοξίνες μικροοργανισμών ή διάφορες τοξικές χημικές ουσίες, οι οποίες υπάρχουν σε μικρές συγκεντρώσεις, αλλά που η συνεχής λήψη τους εγκυμονεί χρόνιας μορφής κινδύνους της υγείας.

- Παρουσιάζει αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να είναι μόνο ακατάλληλο χωρίς να είναι ανθυγιεινό.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB), αποτελούν τον κυρίαρχο πληθυσμό του νωπού γάλακτος βοοειδών, αιγών, προβάτων και βουβαλών. Τα πιο συχνά γένη LAB στο γάλα περιλαμβάνουν τα *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* και *Enterococcus*.

Η οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών περιλαμβάνει πολλά γένη. Όσο αφορά το γάλα, συγκεκριμένα είδη ή ορότυποί τους μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά νοσήματα όπως όπως οι σαλμονέλλες, οι σιγγέλλες, η *Yersinia enterocolitica* και τα εντεροπαθογόνα στελέχη της *Escherichia coli*. Από τεχνολογική άποψη έχουν ενδιαφέρον γιατί πολλά είδη και ιδιαίτερα αυτά που απαρτίζουν την ομάδα των κολοβακτηριοειδών (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* και *Aerobacter*) προκαλούν ανώμαλες αεριογόνες ζυμώσεις (ζύμωση λακτόζης) και αλλοιώνουν το γάλα. Η αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών στο νωπό γάλα χρησιμεύει ως δείκτης εκτίμησης των συνθηκών υγιεινής της παραγωγής του, ενώ στο παστεριωμένο γάλα ως δείκτης εκτίμησης των συνθηκών υγιεινής που επικρατούν στο κύκλωμα παραγωγής κυρίως μετά το στάδιο εξυγίανσης (π.χ. παστερίωση).

Τα *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* spp. αποτελούν τα πιο συχνά αναφερόμενα παθογόνα σε δεξαμενές νωπού γάλακτος που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες (Oliver et al., 2009). Στην μελέτη των Jayarao et al. (2006) σε 32 από 248 δεξαμενές νωπού γάλακτος ανιχνεύτηκαν τα *L. monocytogenes* (2,8%), *Salmonella* (6%) και *Y. enterocolitica* (1,2%).

Οι συνθήκες κατά την αποθήκευση και τη μεταφορά σε ψυχόμενες δεξαμενές έχουν σαν αποτέλεσμα να κυριαρχήσουν στο νωπό γάλα τα Gram-αρνητικά βακτήρια, τα οποία αποτελούνται κυρίως από ψυχρότροφα είδη (Raats et al., 2011; Nikolic et al., 2008), των οποίων οι πληθυσμοί αυξάνονται ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης του γάλακτος. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν είδη των γενών *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium* και *Enterobacter* (Martin et al., 2006).

Άλλοι οργανισμοί που μπορούν να ανιχνευτούν είναι τα *Enterococcus*, *Proteus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium* (Torkar και Teger, 2008).

Οι ψυχρότροφοι οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες ψύξης κάτω των 7°C, παράγοντας ένζυμα και άλλους μεταβολίτες, γεγονός που δυσχεραίνει τις προσπάθειες για την αύξηση της διάρκειας ζωής του παστεριωμένου γάλακτος (Munsch–Alatossava & Alatossava, 2006). Αυτά τα βακτήρια παράγουν εξωκυττάρια πρωτεολυτικά και λιπολυτικά ένζυμα που εκκρίνονται στο το γάλα. Πολλά από αυτά τα ένζυμα δεν απενεργοποιούνται με παστερίωση στους 72°C για 15 s, με αποτέλεσμα να μειώνουν την οργανοληπτική ποιότητα και διάρκεια ζωής των μεταποιημένων γαλακτοκομικών προϊόντων (De Oliveira et al., 2015). Η παστερίωση δεν μπορεί να εγγυηθεί την απουσία αυτών των μικροοργανισμών, όταν είναι παρόντες σε μεγάλους αριθμούς στο νωπό γάλα (Salmeron et al., 2002).

Στα θετικά κατά Gram ψυχρότροφα ανήκουν σπορογόνα βακτήρια του γένους *Bacillus* (π.χ. κάποια στελέχη του *B. cereus*) και *Paenibacillus*. Τα ψυχρότροφα στελέχη των σπορογόνων βακτηρίων αναπτύσσονται βραδύτερα σε παστεριωμένο γάλα που συντηρείται υπό ψύξη σε σχέση με τα Gram–αρνητικά ψυχρότροφα βακτήρια. Ο πολλαπλασιασμός τους κατά τη συντήρηση του παστεριωμένου γάλακτος υπό ψύξη είναι αυτός που κατά κύριο λόγο περιορίζει τη διάρκεια ζωής του υψηλής ποιότητας παστεριωμένου γάλακτος στη σύγχρονη γαλακτοβιομηχανία και ιδιαίτερα σε χώρες όπως οι ΗΠΑ όπου ο χρόνος ζωής του παστεριωμένου γάλακτος είναι 21 ημέρες (Fromm & Boor, 2004) Στην ομάδα των ψυχρότροφων βακτηρίων ανήκουν

και τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Y. enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* καθώς και μη πρωτεολυτικά στελέχη του είδους *Clostridium botulinum* (De Oliveira et al., 2015).

Τέλος, στο νωπό γάλα συχνά ανιχνεύονται διάφοροι ζυμοειδείς και μυκητηλιακοί μύκητες.

Οι κυριότερες πηγές μικροοργανισμών του νωπού γάλακτος είναι οι θηλές των γαλακτοπαραγωγών ζώων, ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται για την άμελη μεταφορά και συντήρηση του νωπού γάλακτος, ο αέρας, το νερό, οι ζωοτροφές, το χρώμα και γενικότερα το περιβάλλον της εκτροφής των γαλακτοπαραγωγών ζώων (Quigley et al., 2013). Οι μικροοργανισμοί αυτοί επηρεάζουν αρνητικά την ποιότητα του γάλακτος και τη διάρκεια ζωής του.

1.2.1. Παθογόνοι μικροοργανισμοί που μπορεί να υπάρχουν στο νωπό γάλα

Σε περιπτώσεις παρουσίας παθογόνων μικροοργανισμών στο νωπό γάλα, η κατανάλωσή του χωρίς την υποβολή του σε κάποια διεργασία εξυγιάνσης (π.χ. παστερίωση) μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή (Hantsis-Zacharon & Halpern, 2007). Από νωπό γάλα έχουν ανιχνευτεί πολλά είδη και γένη παθογόνων βακτηρίων. Οι κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί του νωπού γάλακτος (Γκόβαρης, 2007) παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω.

Mycobacterium spp. Η φυματίωση στα βοοειδή προκαλείται συνήθως από το *M. bovis*. Ο μολυσματικός παράγοντας απεκκρίνεται με τον εκπνεόμενο αέρα, με τα πτύελα και τα κόπρανα, με το γάλα, τα ούρα, τα εκκρίματα του κόλπου και της μήτρας, όπως επίσης και με τα εκκρίματα ανοικτών πληγών από μολυσμένους λεμφαδένες. Τα γαλακτοπαραγωγά ζώα όταν πάσχουν από φυματίωση του μαστού εκκρίνουν το μικρόβιο με το γάλα σε συχνότητα πάνω από 90% και σε πληθυσμό που υπερβαίνει συχνά τους 5×10^6 βακίλλους/ml (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης, 2010).

Brucella spp. Η βρουκέλωση είναι μια χρόνια λοίμωξη από ενδοκυτταρικά Gram (-) βακτήρια. Η λοίμωξη μεταδίδεται στον άνθρωπο από προσβεβλημένα ζώα, κυρίως οικόσιτα θηλαστικά, με την κατανάλωση μολυσμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Το γάλα μολύνεται είτε πρωτογενώς από τις βρουκέλλες που κυκλοφορούν στο αίμα ή εντοπίζονται στα οπισθομαστικά λεμφογάγγλια, είτε δευτερογενώς από τις βρουκέλλες που βρίσκονται στις εκκρίσεις της λοχείας ή στην σκόνη του περιβάλλοντος του στάβλου. Οι βρουκέλλες καταστρέφονται με το

βρασμό ή και την παστερίωση του γάλακτος, αλλά είναι ανθεκτικές στην κατάψυξη και την ξήρανση (Αποστόλου και συν., 2010).

Salmonella spp. Όλοι οι γνωστοί ορότυποι σαλμονέλων είναι δυνατόν να φτάσουν στο γάλα έμμεσα από τα κόπρανα των ζώων, το περιβάλλον του στάβλου (έντομα, σκόνη, φωλιές πουλιών) ή από το νερό. Οι σαλμονέλλες μπορούν να αποτελέσουν και αιτία μαστίτιδας σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Η κατανάλωση απαστερίωτου γάλακτος ή προϊόντων αυτού έχει αποτελέσει σε πολλές περιπτώσεις αίτιο σαλμονέλωσης του ανθρώπου. Εκτός από το γάλα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα και ιδιαίτερα τα τυριά και το παγωτό έχουν προκαλέσει ομαδικά κρούσματα της νόσου. Οι σαλμονέλες θανατώνονται κατά την παστερίωση του γάλακτος ή με ισοδύναμη θερμική επεξεργασία. Η ανεπαρκής παστερίωση όμως μπορεί να προσκαλέσει κρούσματα σαλμονέλωσης (Ruegg, 2011). Η επιβίωση των *Salmonella spp.* του κατά την αποθήκευση του γάλακτος στο ψυγείο είναι μακροχρόνια (Δημητράκη & Βελονάκης, 2007).

Listeria monocytogenes. Η λιστερίωση είναι μια σοβαρή λοίμωξη, η οποία προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν υψηλούς πληθυσμούς του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Η νόσος είναι ιδιαίτερα επικίνδυνη στα νεογνά, στους ενήλικες με αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα και στους ηλικιωμένους. Στις έγκυες μπορεί να προκαλέσει αποβολή (Swaminathan & Gerner-Smith, 2007). Το νωπό γάλα αποτελεί συχνή πηγή του μικροοργανισμού. Οι γαλακτογενείς λοιμώξεις του ανθρώπου είναι αποτέλεσμα είτε της χρήσης νωπού ή πλημμελώς θερμοασμένου γάλακτος, είτε της επιμόλυνσης του γάλακτος μετά τη θερμική επεξεργασία. Στη χώρα μας η μόλυνση του νωπού γάλακτος αφορά κυρίως στο νωπό πρόβειο και κατσικίσιο (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2007).

Πρόκειται για παθογόνο μικροοργανισμό που μπορεί να αναπτύσσεται αργά σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως οι θερμοκρασίες ψύξης. Επιβιώνει για αρκετές εβδομάδες στους -18°C σε ποικίλα είδη τροφίμων. Παρατηρήθηκε ελάχιστη μείωση των πληθυσμών του παθογόνου κατά την αποθήκευσή του σε συνθήκες κατάψυξης (-18 °C έως -198 °C) για ένα μήνα (Δημητράκη & Βελονάκης, 2007).

Παθογόνα στελέχη *Escherichia coli*. Την οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών απαρτίζουν διάφορα γένη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, αερόβιων ή προαιρετικώς αναερόβιων και ασπορογόνων. Τα κολοβακτηριοειδή συνιστούν μια ομάδα της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών και χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να ζυμώνουν την λακτόζη με παραγωγή οξέος και αερίου. Τα *E.coli*

βρίσκονται φυσιολογικά στο έντερο του ανθρώπου και των ζώων και αποβάλλονται με τα κόπρανα. Έτσι διασπείρονται στο περιβάλλον και μπορούν να επιμολύνουν τα τρόφιμα. Αποτελούν δείκτη υγιεινής των τροφίμων και του νερού. Τα περισσότερα στελέχη καταστρέφονται στους 60°C για 15 λεπτά και παρουσιάζουν ευαισθησία στα συνήθη απολυμαντικά (Kornacki & Johnson, 2001). Κάποια από τα στελέχη της *E. coli* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής η *E. coli* μπορεί να προκαλέσει οξείας ή υπεροξείας μορφής μαστίτιδα.

Τα παθογόνα στελέχη της *E. coli* διακρίνονται σε διάφορους τύπους (παθογονότυπους) ανάλογα με τις τοξίνες που παράγουν και το μηχανισμό παθογόνου δράσης τους. Ένας μεγάλος αριθμός των στελεχών (π.χ. οι οροομάδες O26, O91, O103, O111, O118, O145, O166) προκάλεσαν κρούσματα που κυμαίνονταν από ήπια διάρροια μέχρι αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Hussein & Sakuma, 2005).

***Staphylococcus aureus*.** Οι λοιμώξεις του μαστού των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων με *Staphylococcus aureus* προκαλούν σοβαρές οικονομικές επιπτώσεις (Burvenich et al., 2003). Σε μια οξεία μαστίτιδα, ο *S. aureus* αποβάλλεται με το γάλα από το ένα τεταρτημόριο του μαστού σε ποσότητες της τάξης 10^8 βακτηριακά κύτταρα/ml, ενώ σε περίπτωση υποκλινικής μαστίτιδας ο αριθμός τους ανέρχεται στα 10^4 - 10^5 κύτταρα/ml. Το γάλα μολύνεται είτε από τον μολυσμένο μαστό των γαλακτοπαραγωγών ζώων ή από τους ανθρώπους και το περιβάλλον. Η παραγωγή εντεροτοξίνης στο γάλα πριν την παστερίωση είναι η κύρια αιτία των κρουσμάτων σταφυλοκοκκικής τροφικής τοξίνωσης στη χώρα μας. Αυτό συμβαίνει γιατί, ενώ ο σταφυλόκοκκος καταστρέφεται στην παστερίωση, οι εντεροτοξίνες του είναι θερμοάντοχες (Angelidis, 2015).

Οι τοξινώσεις από γαλακτοκομικά προϊόντα προέρχονται κυρίως από διάφορους χειρισμούς του νωπού γάλακτος μετά τη άμελξη και τη συλλογή του, κατά τους οποίους δε λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα υγιεινής και σωστής συντήρησης του γάλακτος (Fotou et al, 2011; Burvenich et al., 2003). Ο πολλαπλασιασμός του βακτηρίου στο γάλα ευνοείται όταν αυτό δε συντηρείται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Lindqvist et al., 2002).

1.2.2. Μικροβιολογικά κριτήρια για το νωπό γάλα

Τα κριτήρια του Κανονισμού 853/2004 για το νωπό γάλα εφαρμόζονται στο πλαίσιο ειδικότερης νομοθεσίας σχετικά με την ποιότητα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων. Θα πρέπει να εξετάζεται αντιπροσωπευτικός αριθμός

δειγμάτων νωπού γάλακτος που λαμβάνονται με τυχαία δειγματοληψία από γάλα το οποίο συλλέγεται από εγκαταστάσεις γαλακτοπαραγωγής. Οι έλεγχοι μπορούν να γίνονται από ή για λογαριασμό: (α) του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, η οποία παράγει το γάλα, (β) του υπευθύνου της επιχείρησης τροφίμων, η οποία συλλέγει ή μεταποιεί το γάλα, (γ) μιας ομάδας υπευθύνων επιχειρήσεων τροφίμων, ή (δ) στο πλαίσιο εθνικού ή περιφερειακού προγράμματος ελέγχου. Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να κινούν διαδικασίες, ώστε το νωπό γάλα να ανταποκρίνεται στα ακόλουθα κριτήρια:

(i) για το νωπό γάλα αγελάδας:

Περιεκτικότητα σε μικρόβια στους 30° C (ανά ml) $\leq 100\ 000$ (*)

Περιεκτικότητα σε σωματικά κύτταρα (ανά ml) $\leq 400\ 000$ (**)

(ii) για το νωπό γάλα άλλων ειδών:

Περιεκτικότητα σε μικρόβια στους 30° C (ανά ml) $\leq 1\ 500\ 000$ (*)

(β) Ωστόσο, εάν το νωπό γάλα από άλλα είδη εκτός των αγελάδων προορίζεται για την παρασκευή προϊόντων, τα οποία παρασκευάζονται από νωπό γάλα με διαδικασία η οποία δεν απαιτεί θερμική επεξεργασία, οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να λαμβάνουν μέτρα, ώστε να διασφαλίζουν ότι το χρησιμοποιούμενο νωπό γάλα ανταποκρίνεται στα ακόλουθα κριτήρια:

Περιεκτικότητα σε μικρόβια στους 30° C (ανά ml) $\leq 500\ 000$ (*)

(*) Κυλιόμενος διμηνιαίος γεωμετρικός μέσος όρος, με τουλάχιστον δύο δείγματα μηνιαίως.

(**) Κυλιόμενος τριμηνιαίος γεωμετρικός μέσος όρος, με τουλάχιστον μία δειγματοληψία μηνιαίως, εκτός εάν η αρμόδια αρχή καθορίσει άλλη μεθοδολογία για να λαμβάνονται υπόψη οι εποχικές διακυμάνσεις των επιπέδων παραγωγής.

Με την επιφύλαξη της Οδηγίας 96/23/EK, οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων κινούν διαδικασίες, ώστε να διασφαλίζουν ότι το νωπό γάλα δεν διατίθεται στην αγορά, εφόσον: (α) περιέχει κατάλοιπα αντιβιοτικών (Κανονισμός ΕΟΚ αριθ. 2377/901) ή (β) το σύνολο των διαφόρων καταλοίπων αντιβιοτικών ουσιών υπερβαίνει κάποια μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή.

Τα κριτήρια του Κανονισμού 853/2004 για το νωπό γάλα αγελάδας, είναι τα εξής:

1. Οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων που παρασκευάζουν γαλακτοκομικά προϊόντα κινούν διαδικασίες, ώστε να εξασφαλίζουν ότι, αμέσως πριν τη μεταποίηση: (α) το νωπό γάλα αγελάδων που χρησιμοποιείται για την παρασκευή

γαλακτοκομικών προϊόντων έχει περιεκτικότητα σε μικρόβια σε θερμοκρασία 30°C μικρότερη από 300000 ανά ml, και (β) το μεταποιημένο γάλα αγελάδων που χρησιμοποιείται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων έχει περιεκτικότητα σε μικρόβια σε θερμοκρασία 30°C μικρότερη από 100000 ανά ml.

2. Όταν το γάλα δεν πληροί τα κριτήρια της παραγράφου 1, οι υπεύθυνοι επιχειρήσεων τροφίμων ενημερώνουν την αρμόδια αρχή και λαμβάνουν μέτρα για τη διόρθωση της κατάστασης.

1.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Παστεριωμένο είναι το γάλα που παστεριώθηκε με μια από τις αναγνωρισμένες μεθόδους και διατίθεται σε στεγανά δοχεία που έχουν την ημερομηνία παρασκευής. Κατά την παστερίωση σκοτώνεται το 95-99% των βακτηρίων του νωπού γάλακτος. Το παστεριωμένο γάλα πρέπει να πληροί τους όρους του νωπού και μέχρι την παστερίωσή του να συντηρείται σε ψυγείο. Οι χαρακτηριστικές ιδιότητες και σταθερές του είναι ίδιες με εκείνες νωπού γάλακτος (Τζουβάρα- Καραγιάννη, 1986).

Γενικά, με την παστερίωση, οι αναμενόμενοι πληθυσμοί των μυκήτων, των ζυμών και η πλειοψηφία των αλλοιογόνων βακτηρίων του νωπού γάλακτος θανατώνονται, ενώ πολλά ενδογενή ένζυμα μετουσιώνονται και αδρανοποιούνται (Schröder, 1984). Οι θερμοκρασίες και οι χρόνοι παστερίωσης έχουν επιλεγεί έτσι ώστε να εξασφαλίζουν την καταστροφή και των θερμοάντοχων, μη σπορογόνων παθογόνων μικροοργανισμών κυρίως του *Mycobacterium tuberculosis*, αλλά πιο πρόσφατα και της *Coxiella burnetii* (βακτήριο που προκαλεί τον πυρετό Q). Άλλα λιγότερο θερμοάντοχα παθογόνα, όπως είναι τα *Brucella*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Campylobacter* και *Escherichia coli* O157:H7, μπορεί να αδρανοποιηθούν και σε χαμηλότερες της παστερίωσης θερμοκρασίες. Όμως, κάποια θερμοάντοχα μη σπορογόνα βακτήρια (π.χ. *Lactobacillus* spp. και *Streptococcus* spp.) αλλά και οι σπόροι κάποιων σπορογόνων βακτηρίων (π.χ. *Bacillus* και *Clostridium*) μπορεί να επιζήσουν της παστερίωσης (Κονδύλη & Παππά, 2007). Πέραν από την ελαχιστοποίηση των πιθανών κινδύνων για τη δημόσια υγεία, με την παστερίωση αυξάνεται και ο χρόνος ζωής του γάλακτος κατά ορισμένες ημέρες χωρίς να παρατηρούνται ουσιαστικές μεταβολές στη διατροφική αξία και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Η διατήρηση του παστεριωμένου γάλακτος είναι εφικτή μόνο σε συνθήκες ψύξης (Angelidis, 2015).

Υπάρχουν δυο ισοδύναμοι τρόποι θερμικής επεξεργασίας για την παστερίωση του γάλακτος: α) η εφαρμογή χαμηλής θερμοκρασίας (63°C) για χρονικό διάστημα 30 λεπτών (Low-Temperature Long-Time, LTLT) που γίνεται σε δεξαμενές με διπλά τοιχώματα, και β) η εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (71,7°C) για χρονικό διάστημα περίπου 15 δευτερολέπτων (High-Temperature Short-Time, HTST), που γίνεται συνήθως σε πλακοειδείς εναλλάκτες θερμότητας. Τα εργοστάσια και οι μικρές βιοτεχνίες, που παράγουν παστεριωμένο γάλα, συνήθως επιλέγουν τη δεύτερη μέθοδο παστερίωσης αφού είναι εξοπλισμένα με τους κατάλληλους πλακοειδείς εναλλάκτες. Βέβαια, είναι δυνατόν να εφαρμοστεί και διαφορετικός συνδυασμός χρόνου και θερμοκρασίας για την παστερίωση του γάλακτος, θα πρέπει όμως να επιτευχθεί ισοδύναμο αποτέλεσμα (Κιοσέογλου & Μπλέκας, 2009).

Σε γενικές γραμμές η LTLT παστερίωση του γάλακτος συνοδεύεται από εντονότερες μεταβολές στη γεύση και το άρωμα και ελαφρώς πιο έντονες μεταβολές στα επίπεδα των βιταμινών σε σχέση με την HTST παστερίωση. Επειδή η αλκαλική φωσφατάση του γάλακτος εμφανίζει ανάλογη θερμοανθεκτικότητα με αυτή την οποία εμφανίζουν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που πρέπει να θανατωθούν και επειδή για την εκτίμηση της ενεργότητάς της απαιτείται πολύ μικρότερη προσπάθεια από αυτήν που απαιτείται για την καταμέτρηση του πληθυσμού των πιο πάνω μικροοργανισμών, για την εκτίμηση της επάρκειας της παστερίωσης προσδιορίζεται η ενεργότητα της αλκαλικής φωσφατάσης (Κιοσέογλου & Μπλέκας, 2009).

Οι εναλλάκτες θερμότητας με πλάκες αποτελούνται από πολύ μεγάλο αριθμό λεπτών κατακόρυφων χαλύβδινων φύλλων με αυλακώσεις, που είναι τοποθετημένα σε χαλύβδινο πλαίσιο. Ανάμεσα στα χαλύβδινα φύλλα τοποθετούνται φύλλα συνθετικού ελαστομερούς (φλάντζες) με τα οποία εξασφαλίζεται η στεγανότητα των χαλύβδινων φύλλων και παρεμποδίζεται η ανάμιξη του τροφίμου με το μέσο θέρμανσης ή το μέσο ψύξης. Οι αυλακώσεις των χαλύβδινων φύλλων δίνουν στη ροή του υγρού τροφίμου χαρακτηριστικά στροβιλισμού που βελτιώνει τη μεταφορά θερμότητας (Κονδύλη & Παππά, 2007).

1.3.1. Νομοθεσία για το παστεριωμένο γάλα

Η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία που διέπει διάφορες πτυχές (π.χ. ασφάλεια, συσκευασία) του παστεριωμένου γάλακτος αναφέρεται παρακάτω:

- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90 ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 26^{ης} Ιουνίου 1990 για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 852/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 29^{ης} Απριλίου 2004 για την υγιεινή των τροφίμων.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 853/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 29^{ης} Απριλίου 2004, για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1935/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 27^{ης} Οκτωβρίου 2004 σχετικά με τα υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα και με την κατάργηση των οδηγιών 80/590/ΕΟΚ και 89/109/ΕΟΚ.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 396/2005 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 23^{ης} Φεβρουαρίου 2005 για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα η πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1895/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ, της 18^{ης} Νοεμβρίου 2005, για περιορισμό της χρήσης ορισμένων εποξεικών παραγώγων σε υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τρόφιμα.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα, όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 19^{ης} Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΙΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 16^{ης} Δεκεμβρίου 2008 που αφορά στα πρόσθετα τροφίμων.

- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 37/2010 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 22ας Δεκεμβρίου 2009 σχετικά με φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 10/2011 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 14^{ης} Ιανουαρίου 2011 για τα πλαστικά υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα.
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1169/2011 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 25^{ης} Οκτωβρίου 2011 σχετικά με την παροχή πληροφοριών για τα τρόφιμα στους καταναλωτές, την τροποποίηση των κανονισμών του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου (ΕΚ) αριθ. 1924/2006 και (ΕΚ) αριθ. 1925/2006 και την κατάργηση της οδηγίας 87/250/ΕΟΚ της Επιτροπής, της οδηγίας 90/496/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της οδηγίας 1999/10/ΕΚ της Επιτροπής, της οδηγίας 2000/13/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, των οδηγιών της Επιτροπής 2002/67/ΕΚ και 2008/5/ΕΚ και του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 608/2004 της Επιτροπής.
- ΟΔΗΓΙΑ 86/363/ΕΟΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 24^{ης} Ιουλίου 1986 που αφορά τον καθορισμό των ανωτάτων περιεκτικοτήτων για τα κατάλοιπα φυτοφαρμάκων πάνω και μέσα στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
- Ν. 4254/2014 (ΦΕΚ 85/Τεύχος Α' /07 Απρ 2014), «Μέτρα στήριξης και ανάπτυξης της ελληνικής οικονομίας στο πλαίσιο εφαρμογής του Ν. 4046/2012 και άλλες διατάξεις.».
- ΠΔ 79/2007 (ΦΕΚ 95/Τεύχος Β' /03 Μαΐου 2007), «Αναγκαία συμπληρωματικά μέτρα εφαρμογής των Κανονισμών (ΕΚ) υπ' αριθμ. 178/2002, 852/2004, 853/2004, 854/2004 και 882/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου όσον αφορά τους κανόνες υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, των επίσημων ελέγχων στα προϊόντα αυτά που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο και τους κανόνες υγείας και καλής διαβίωσης των ζώων και εναρμόνιση της κτηνιατρικής νομοθεσίας προς την υπ' αριθμ. 2004/41/ΕΚ Οδηγία του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.».
- Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και αντικειμένων κοινής χρήσεως (ΚΤΠ).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ

Η λήψη δειγμάτων ξεκίνησε την 01/09/2014 και συνεχίστηκε για 13 συνεχόμενες εβδομάδες. Στο χρονικό αυτό διάστημα το πρωί κάθε Δευτέρας (μεταξύ 9-10 π.μ.) λαμβανόταν πέντε δείγματα παστεριωμένου γάλακτος. Τα τρία προέρχονταν από τρεις συγκεκριμένους αυτόματους πωλητές παστεριωμένου γάλακτος (automatic vending machines, AVMs) στην πόλη της Λάρισας και λαμβάνονταν χρησιμοποιώντας τις πλαστικές φιάλες μιας χρήσης που διατίθενται από τους αυτόματους πωλητές. Για κάθε δειγματοληψία χρησιμοποιούνταν νέες πλαστικές φιάλες. Τα υπόλοιπα δύο δείγματα λαμβάνονταν από καταστήματα λιανικής και αφορούσαν βιομηχανικές συσκευασίες παστεριωμένου γάλακτος (προ-συσκευασμένο παστεριωμένο γάλα). Και τα πέντε δείγματα είχαν όγκο 1 λίτρο. Τα δείγματα γάλακτος των δύο γαλακτοβιομηχανιών που λαμβάνονταν από καταστήματα λιανικής είχαν παραληφθεί από τα καταστήματα την εκάστοτε ημέρα της δειγματοληψίας, είχαν δηλαδή ημερομηνία παραγωγής (παστερίωσης) της προηγούμενης μέρας.

Τη στιγμή της δειγματοληψίας γίνονταν μετρήσεις ή και καταγραφές θερμοκρασίας. Η πρώτη αφορούσε την ένδειξη θερμοκρασίας που αναγράφονταν στην ειδική ένδειξη του εκάστοτε αυτόματου πωλητή ή της ψυχόμενης βιτρίνας του καταστήματος λιανικής πώλησης (super market). Οι άλλες δύο αφορούσαν μετρήσεις θερμοκρασίας του πλαστικού (αυτόματοι πωλητές) ή του χαρτοκιβωτίου (εμπορικές συσκευασίες) της συσκευασίας του γάλακτος με χρήση ειδικής συσκευής (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Ειδική συσκευή υπέρυθρης καταμέτρησης θερμοκρασίας.

Αμέσως μετά τη λήψη των δειγμάτων, αυτά τοποθετούνταν σε ισοθερμικούς περιέκτες που περιείχαν παγοκύστες ($\sim 5^{\circ}\text{C}$) και μεταφέρονταν στο εργαστήριο εντός το πολύ 2 ωρών από τη λήψη του πρώτου δείγματος.

Η διάρκεια ζωής του παστεριωμένου γάλακτος, κατά τη διάρκεια των πειραματισμών (Φθινόπωρο 2014) όπως αυτή προσδιορίζονταν από τους αντίστοιχους παρασκευαστές ήταν 3 ημέρες για το γάλα από τους αυτόματους πωλητές, 7 ημέρες για το γάλα της πρώτης εταιρίας και 8 ημέρες για το γάλα της δεύτερης εταιρίας.

2.2. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

2.2.1. Προσδιορισμός της τιμής του pH

Η τιμή του pH του γάλακτος προσδιορίζονταν με χρήση συσκευής μέτρησης του pH (Consort, model C830, Turnhout, Belgium) εφοδιασμένης με ηλεκτρόδιο Hanna FC-100 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA).

2.2.2. Μικροβιολογικές εξετάσεις

Όλα τα δείγματα εξετάζονται για την παρουσία και τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών που παρατίθενται παρακάτω.

2.2.2.1. Αρίθμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X.) (Total Aerobic Count, TAC)

Η αρίθμηση της O.M.X. γίνονται με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης δεκαδικών αραιώσεων των δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος σε τρυβλία. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το Plate Count Agar (PCA) με την προσθήκη 0.1 % αποβουτυρωμένης σκόνης γάλακτος (Biolife, Italy) σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 4833-1:2013 (ISO, 2013). Η τιμή του pH ρυθμίστηκε με διάλυμα καυστικού νατρίου (1M) στο $7,0 \pm 0,2$. Το υπόστρωμα αποστειρώνεται στους 121°C για 20 λεπτά. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονται στους 30°C για 72 ώρες.

2.2.2.2. Αρίθμηση Ολικών Ψυχρότροφων Μικροβίων (Total Psychrotrophic Count, TPC)

Η αρίθμηση των ολικών ψυχρότροφων μικροοργανισμών του παστεριωμένου γάλακτος γίνονται με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία. Ως θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το Plate Count Agar (PCA) με την προσθήκη 0.1 % αποβουτυρωμένης σκόνης γάλακτος (Biolife, Italy) σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 6730:2005 (ISO, 2005). Η αποστείρωση του υποστρώματος και η ρύθμιση της τιμής του pH έγιναν όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.2.1. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονται στους 7°C για 10 μέρες.

2.2.2.3. Αρίθμηση Αερόβιων Μεσόφιλων Σπόρων (Mesophilic Aerobic Bacterial Spore Count, MABSC)

Η αρίθμηση των ολικών μεσόφιλων σπόρων του παστεριωμένου γάλακτος γίνονται με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία PCA με την προσθήκη 0.1 % διαλυτού αμύλου σύμφωνα με το πρωτόκολλο 8.090 της American Public Health Association (APHA, 2004). Η αποστείρωση του υποστρώματος και η ρύθμιση της τιμής του pH έγιναν όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.2.1. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονται στους 32°C για 48 ώρες.

2.2.2.4. Αρίθμηση Αερόβιων Ψυχρότροφων Σπόρων (*Psychrotrophic Aerobic Bacterial Spore Count, PABSC*)

Η αρίθμηση των ολικών ψυχρότροφων σπόρων του παστεριωμένου γάλακτος γίνονταν με την με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία PCA με την προσθήκη 0.1 % διαλυτού αμύλου σύμφωνα με το πρωτόκολλο 8.090 της American Public Health Association (APHA, 2004). Η αποστείρωση του υποστρώματος και η ρύθμιση της τιμής του pH έγιναν όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.2.1. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονταν στους 7°C για 10 μέρες.

2.2.2.5. Αρίθμηση Εντεροβακτηριοειδών (*Enterobacteriaceae Count, EC*)

Για την εξέταση των δειγμάτων αναφορικά με τους πληθυσμούς βακτηρίων της οικογένειας των εντεροβακτηριοειδών ο ενοφθαλμισμός των τρυβλίων γίνονταν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης και επιστοιβάδευσης χρησιμοποιώντας υπόστρωμα Violet Red Bide Glucose Agar (VRBGA) (LAB M) σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 21528:2 2004 (ISO, 2004). Η τιμή του pH ρυθμίστηκε με διάλυμα καυστικού νατρίου (1M) στο $7,4 \pm 0,2$. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επωάζονταν στους 37°C για 24 ώρες. Τυπικές αποικίες εντεροβακτηριοειδών υποβάλλονταν σε έλεγχο με τη δοκιμή της οξειδάσης (Bactident Oxidase, Merck).

Για την αρίθμηση όλων των παραπάνω ομάδων μικροοργανισμών, εκτός της μηδενικής αραιώσης (γάλα) χρησιμοποιήθηκαν και οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις (συνήθως $10^0 - 10^{-3}$), ώστε οι μικροοργανισμοί να φτάνουν σε επιθυμητό εύρος συγκέντρωσης, προκειμένου να είναι δυνατή η καταμέτρησή τους σύμφωνα με τις προδιαγραφές της ISO. Χρησιμοποιήθηκαν δύο τρυβλία για κάθε αραιώση (διπλή σειρά τρυβλίων). Οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των υπό εξέταση δειγμάτων έγιναν σε Maximum Recovery Diluent (Biolife).

2.2.2.6. Ανίχνευση της *Listeria monocytogenes*

Η ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* σε 25 mL γάλακτος από κάθε δείγμα πραγματοποιούνταν σύμφωνα με τη μέθοδο ISO 11290-1 (ISO, 2004), ύστερα από άσηπτη ανάμιξη 25 mL γάλακτος από κάθε συσκευασία. Ο συνολικός εξεταζόμενος όγκος γάλακτος (125 mL) εβδομαδιαίως, αναμιγνύονταν με 9-πλάσιο όγκο (1125 mL) προεμπλουτιστικού ζωμού. Ωστόσο, επιπρόσθετα, άλλα 25 mL γάλακτος από κάθε μια από τις 5 συσκευασίες γάλακτος λαμβάνονταν άσηπτα και φυλάσσονταν στους

4°C, προκειμένου να εξεταστούν ατομικά (ως μεμονωμένα δείγματα) σε περίπτωση λήξης θετικού αποτελέσματος στο σύνθετο δείγμα γάλακτος.

Ο προεμπλουτιστικός ζωμός *Listeria* Fraser Broth Base Half concentration, ο εμπλουτιστικός ζωμός *Listeria* Fraser Broth Base, τα αντίστοιχα απαραίτητα πρόσθετα συστατικά (supplements), αλλά και τα εκλεκτικά στερεά υποστρώματα Agar *Listeria* Ottaviani Agosti (ALOA) και *Listeria* Oxford Agar ήταν όλα της εταιρίας Biolife.

2.3. ΧΡΟΝΟΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ

2.3.1. Ημέρα «0»

Όπως προαναφέρθηκε, σε κάθε δειγματοληψία συλλεγόταν 5 δείγματα παστεριωμένου γάλακτος. Αμέσως μετά τη δειγματοληψία και μεταφορά τους στο εργαστήριο, τα 5 δείγματα εξεταζόταν (ημέρα «0») για τις μικροβιολογικές παραμέτρους που αναφέρθηκαν στην ενότητα 2.2.2., αλλά και για την παρουσία της *L. monocytogenes*.

Πριν την έναρξη των αναλύσεων, τα δείγματα αναδεύονταν ήπια με το χέρι με 5 αργές κινήσεις αναστροφής του εκάστοτε περιέκτη και διανοίγονταν άσηπτα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Αρχικά, ποσότητες των 100 mL από κάθε δείγμα μεταφέρονταν άσηπτα και εις διπλούν (ή εις τριπλούν για τα προσυσκευασμένα δείγματα) σε γυάλινους αποστειρωμένους περιέκτες των 100 mL οι οποίοι κλείνανε αεροστεγώς με βιδωτό πώμα. Τα δύο αυτά δείγματα χρησιμοποιούνταν για μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις ύστερα από συντήρησή τους υπό ψύξη για κάποιες μέρες (βλέπε ενότητες 2.3.2. και 2.3.3.).

2.3.2. Τέλος της διάρκειας ζωής, ύστερα από συντήρηση στους 4°C

Τα πρώτα υποσύνολα υποδειγμάτων των 100 mL από κάθε αρχικό δείγμα εξετάζονταν για τις παραμέτρους 2.2.2.1., 2.2.2.2., 2.2.2.4. και 2.2.2.5. ύστερα από συντήρησή τους στους $4 \pm 1^\circ\text{C}$ μέχρι την ημέρα της αναγραφόμενης ημερομηνίας λήξης τους. Στα δείγματα των αυτόματων πωλητών η δεύτερη αυτή εξέταση πραγματοποιούνταν 3 ημέρες μετά την αρχική ανάλυση οπότε και οριζόταν η ημερομηνία λήξης τους. Στα δείγματα των εταιριών, η δεύτερη αυτή εξέταση πραγματοποιούνταν 7 ημέρες μετά την αρχική ανάλυση (για πρακτικούς λόγους και

παρά τη διαφορά στη διάρκεια ζωής τους κατά μια μέρα). Η εξέταση ξεκινούσε στις 14:00 της εκάστοτε ημέρας/ημερομηνίας λήξης.

2.3.3. Τέλος της διάρκειας ζωής, ύστερα από συντήρηση στους 8°C

Τα δεύτερα υποσύνολα υποδειγμάτων των 100 mL από κάθε αρχικό δείγμα εξετάζονταν για τις παραμέτρους 2.2.2.1., 2.2.2.2., 2.2.2.4. και 2.2.2.5 ύστερα από συντήρησή τους στους $8 \pm 1^\circ\text{C}$ μέχρι την ημέρα της αναγραφόμενης ημερομηνίας λήξης τους. Όπως αναφέρθηκε στην ενότητα 2.3.2., στα δείγματα των αυτόματων πωλητών η εξέταση αυτή πραγματοποιούνταν 3 ημέρες μετά την αρχική ανάλυση δηλαδή κατά την ημερομηνία λήξης τους. Στα δείγματα των εταιριών η εξέταση αυτή πραγματοποιούνταν 7 ημέρες μετά την αρχική τους ανάλυση.

2.3.4. Τρεις ημέρες μετά το τέλος της διάρκειας ζωής, ύστερα από συντήρηση στους 4°C

Τα τρίτα υποσύνολα υποδειγμάτων των 100 mL από κάθε αρχικό δείγμα προσυσκευασμένου παστεριωμένου γάλακτος εξετάζονταν για τις παραμέτρους 2.2.2.1., 2.2.2.2., 2.2.2.4. και 2.2.2.5. τρεις ημέρες μετά την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης τους ύστερα από συντήρησή τους στους $4 \pm 1^\circ\text{C}$, δηλαδή συνολικά 10 ημέρες μετά τη δειγματοληψία και αρχική ανάλυσή τους.

2.4. ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΑΠΟΙΚΙΩΝ – ΕΚΦΡΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αναφορικά με την καταμέτρηση των αποικιών και την έκφραση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκαν τρυβλία που περιείχαν 10-300 αποικίες σε δύο διαδοχικές αραιώσεις χρησιμοποιώντας τον παρακάτω μαθηματικό τύπο:

$$N = \frac{\sum C}{[n_1 + (0,1 \cdot n_2)] \cdot d_1 \cdot V}$$

Σc : είναι το άθροισμα των αποικιών από όλα τα τρυβλία ανάμεσα σε δύο αραιώσεις που περιέχουν 10-300 αποικίες.

n_1 : ο αριθμός των τρυβλίων της μικρότερης αραιώσης

n_2 : ο αριθμός των τρυβλίων της μεγαλύτερης αραιώσης

d_1 :είναι ο συντελεστής αραιώσης των τρυβλίων n_1

V :είναι ο όγκος του ενοφθαλμίσματος σε κάθε τρυβλίο, σε mL

Τα αποτελέσματα στρογγυλοποιήθηκαν σε δύο σημαντικά ψηφία και μια δύναμη του 10 (ISO 7218). Εάν τα τρυβλία κάποιων δειγμάτων δεν περιείχαν καθόλου αποικίες, το αποτέλεσμα εκφραζόταν ως μικρότερο του ορίου αρίθμησης της εκάστοτε μεθόδου.

Αναφορικά με την ανίχνευση της *L. monocytogenes*, το αποτέλεσμα εκφράζονταν ως παρουσία ή απουσία του παθογόνου σε 25 mL γάλακτος.

2.5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Λόγω της μη κανονικής κατανομής τους οι τιμές cfu/mL μετασχηματίστηκαν χρησιμοποιώντας το λογάριθμο στη βάση 10 (\log_{10} cfu/mL). Η τυχόν ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των πέντε «πηγών» γάλακτος που εξετάστηκαν αναφορικά με τις μέσες μετρήσεις για τις επιμέρους μικροβιολογικές παραμέτρους αξιολογήθηκαν με την εκτέλεση ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (1-way ANOVA) χρησιμοποιώντας το λογισμικό Minitab (έκδοση 14, Minitab Inc., State College, PA, USA) και τη μέθοδο των λιγότερο σημαντικών διαφορών κατά Tukey. Όλες οι συγκρίσεις έγιναν σε συνολικό επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Η τυχόν ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των μέσων όρων των μετρήσεων (\log cfu/ml) για τα δείγματα γάλακτος που εξετάστηκαν τρεις ημέρες μετά την ημερομηνία λήξης τους (DC-1 και DC-2), εξετάστηκε με τη χρήση του Student's t-test διπλής όψης (two-sided) υποθέτοντας ίσες διακυμάνσεις. Όλες οι συγκρίσεις έγιναν σε $\alpha = 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΠΩΛΗΤΕΣ

Η μέση θερμοκρασία (\pm τυπικό σφάλμα) (σε $^{\circ}\text{C}$) σύμφωνα με τις ενδείξεις θερμοκρασίας των αυτόματων πωλητών ήταν $2,2 \pm 0,4$, $2,5 \pm 0,5$ και $4,9 \pm 1,0$, για τους αυτόματους πωλητές A, B και C, αντίστοιχα. Η αντίστοιχη μέση θερμοκρασία της επιφάνειας των δειγμάτων γάλακτος ήταν $5,4 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$, $5,8 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ και $6,5 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$, για τα δείγματα που λήφθηκαν από τους αυτόματους πωλητές A, B και C, αντίστοιχα.

Οι μέσες τιμές (\pm τυπικό σφάλμα) του pH των δειγμάτων γάλακτος κατά την ημέρα «0» ήταν πρακτικά ίδιες για όλους τους αυτόματους πωλητές: 6.67 ± 0.07 (VM-A και VM-B) και $6,69 \pm 0,06$ (VM-C).

Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων των δειγμάτων του παστεριωμένου γάλακτος από τους αυτόματους πωλητές φαίνονται στο Σχήμα 1 και στον Πίνακα 1. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις σχετικά με την O.M.X. (TAC) κατά την ημέρα «0» (Σχήμα 1A) έδειξαν μέσες τιμές που κυμαίνονται από 3,6 έως 3,7 log cfu/mL χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των αυτόματων πωλητών. Στα ασηπτικά ληφθέντα υποσύνολα αυτών των δειγμάτων γάλακτος που αποθηκεύονταν στο εργαστήριο υπό ψύξη (4 ή 8°C) για τρεις ημέρες (72 ώρες μετά τη δειγματοληψία), παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις σε πληθυσμούς της O.M.X., ιδιαίτερα όταν τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 8°C (Σχήμα 1A, Πίνακας 1). Έτσι, ενώ αυξήσεις έως και περίπου 1 log cfu/ml παρατηρήθηκαν όταν τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 4°C , αυξήσεις πάνω από 2 log cfu/ml καταγράφηκαν κατά την αποθήκευσή τους στους 8°C .

Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς των ολικών ψυχρότροφων. Συγκεκριμένα, οι μέσοι πληθυσμοί των ολικών ψυχρότροφων κατά την ημέρα «0» (Σχήμα 1A) κυμαινόταν από 2,3 έως 2,6 log cfu/mL, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των αυτόματων πωλητών. Όταν τα δείγματα γάλακτος αποθηκεύτηκαν υπό ψύξη για τρεις ημέρες, σημαντικές αυξήσεις παρατηρήθηκαν στους πληθυσμούς των ψυχρότροφων, ιδιαίτερα όταν τα δείγματα γάλακτος αποθηκεύτηκαν στους 8°C (Σχήμα 1B, Πίνακας 2). Ειδικότερα, παρατηρήθηκαν αυξήσεις έως και 1,5 log cfu/ml όταν τα δείγματα φυλάχθηκαν στους 4°C , ενώ καταγράφηκε έως και 3 log cfu/ml

αύξηση στους πληθυσμούς των ολικών ψυχρότροφων μετά από 3 ημέρες αποθήκευσης στους 8°C.

Οι πληθυσμοί των ψυχρότροφων αερόβιων σπόρων (PABSC) ήταν συνήθως σε μη μετρήσιμα επίπεδα. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στην μικρή διάρκεια της υπό ψύξη αποθήκευσης των δειγμάτων (3 ημέρες). Προηγούμενη έρευνα έχει δείξει ότι οι αρνητικές επιπτώσεις της ανάπτυξης σπορογόνων ψυχρότροφων βακτηρίων στην ποιότητα του παστεριωμένου γάλακτος αρχίζουν να γίνονται αντιληπτές μόνο μετά από παρατεταμένη αποθήκευση παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων υπό ψύξη (> 14 ημέρες) και μόνο σε περιπτώσεις απουσίας μεταπαστεριωτικής επιμόλυνσης με Gram- αρνητικά ψυχρότροφα βακτηρία (Fromm & Boor, 2004).

Οι πληθυσμοί των μεσόφιλων αερόβιων σπόρων (MABSC) κατά την ημέρα «0» ήταν σε χαμηλά επίπεδα που κυμάνθηκαν από 1,5 έως 1,8 log cfu/mL (Σχήμα 3).

Οι πληθυσμοί των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae ήταν κάτω από το όριο αρίθμησης (1 cfu/mL) σε 27 από τα 39 δείγματα (69,2 %) που εξετάστηκαν στο χρόνο «0» (Σχήμα 2A-C). Τα υπόλοιπα 12 δείγματα περιείχαν χαμηλούς πληθυσμούς, συνήθως μικρότερους των 10 cfu/mL (Σχήμα 2A-C). Σε αναλύσεις των ίδιων δειγμάτων γάλακτος μετά από τρεις ημέρες παρατηρήθηκαν μετρήσιμοι (ή ακόμη και υψηλοί) πληθυσμοί βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae, ιδιαίτερα όταν τα δείγματα γάλακτος συντηρήθηκαν στους 8°C. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία ψυχρότροφων στελεχών βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae σε αυτά τα δείγματα γάλακτος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε τέσσερα δείγματα από τον αυτόματο πωλητή A (VM-A), υψηλοί (3-4 log cfu/mL) πληθυσμοί βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae καταμετρήθηκαν μετά από τρεις ημέρες συντήρησης στους 8°C (Σχήμα 2A).

Όλα τα δείγματα βρέθηκαν αρνητικά στους ελέγχους αναφορικά με την ανίχνευση της *L. monocytogenes*. Αυτό ήταν ένα αναμενόμενο εύρημα, δεδομένου ότι τα αναμενόμενα επίπεδα της *L. monocytogenes* σε νωπό γάλα (όταν υπάρχουν) μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά με κατάλληλη εφαρμογή παστερίωσης του γάλακτος.

3.2. ΠΡΟΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΛΙΑΝΙΚΗΣ ΠΩΛΗΣΗΣ

Προσυσκευασμένα δείγματα (συσκευασίες) παστεριωμένου γάλακτος που παρασκευάζονται από δύο από τις μεγαλύτερες εταιρείες γαλακτοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα λήφθηκαν από καταστήματα λιανικής πώλησης και εξετάστηκαν ως μάρτυρες.

Ο μέσος όρος (\pm τυπικό σφάλμα) της θερμοκρασίας των προθηκών λιανικής πώλησης ήταν $9,3 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$. Η αντίστοιχη μέση θερμοκρασία της επιφάνειας των συσκευασιών των δειγμάτων γάλακτος ήταν $8,2 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ και $8,3 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, για τα DC-1 και DC-2 δείγματα, αντίστοιχα.

Ο μέσος όρος (\pm τυπικό σφάλμα) των τιμών του pH των δειγμάτων DC-1 και DC-2 την ημέρα «0» ήταν ουσιαστικά ίδιος [$6,57 \pm 0,10$ (DC-1) και $6,56 \pm 0,08$ (DC-2)]. Αυτές οι μέσες τιμές pH ήταν ελαφρώς χαμηλότερες από εκείνες των δειγμάτων γάλακτος από τους αυτόματους πωλητές.

Ο μέσος πληθυσμός της O.M.X. κατά την ημέρα «0» ($3,4$ και $3,3 \log \text{cfu/mL}$) ήταν ελαφρώς χαμηλότερος, ωστόσο όχι σημαντικά διαφορετικός σε σχέση με το μέσο πληθυσμό της O.M.X. των δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές (Πίνακας 1 και Σχήμα 1A). Ωστόσο, ακόμη και μετά από συντήρηση στους 4°C για επτά ημέρες, ο μέσος πληθυσμός της O.M.X. ήταν ελαφρώς (DC-1), ή ακόμη και σημαντικά (DC-2) χαμηλότερος από εκείνον των δειγμάτων των αυτόματων πωλητών. Οι διαφορές στους πληθυσμούς της O.M.X. μεταξύ των δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές και των δειγμάτων DC-1/DC-2 ήταν σαφώς εμφανείς μετά από τη συντήρηση των δειγμάτων στους 8°C για επτά ημέρες (Πίνακας 1 και Σχήμα 1A).

Η μέση τιμή του πληθυσμού των ολικών ψυχρότροφων την ημέρα «0» ($1,6$ και $1,7 \log \text{cfu/mL}$) ήταν χαμηλότερη (κατά $0,5$ - $1 \log \text{cfu/mL}$) από εκείνες των δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές (Σχήμα 1B και Πίνακας 2). Σε αντίθεση με τα δείγματα των αυτόματων πωλητών, οι αυξήσεις στους πληθυσμούς των ολικών ψυχρότροφων των δειγμάτων γάλακτος DC-1/DC-2 ήταν πολύ μικρότερες κατά την αποθήκευση στους 4 ή 8°C μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής τους (Σχήμα 1 και Πίνακας 2).

Με εξαίρεση μερικών δειγμάτων που περιείχαν πληθυσμούς κάτω των 10cfu/mL , οι πληθυσμοί των ψυχρότροφων αερόβιων βακτηριακών σπόρων (PABSC) καθώς και οι πληθυσμοί των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (EC) ήταν κάτω από

το όριο καταμέτρησης (1 cfu/mL) σε όλα τα δείγματα και τους χρόνους δειγματοληψίας (Σχήμα 2D και 2E) .

Παρόμοια με τα δείγματα των αυτόματων πωλητών, ο μέσος όρος του πληθυσμού των σπόρων μεσόφιλων αερόβιων βακτηρίων (MABSC) κατά την ημέρα «0» ήταν χαμηλός και ίσος με 1,6 (DC- 1) και 1,2 (DC - 2) log cfu/mL (Εικόνα 3).

Οι προαναφερθείσες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές και των προσυσκευασμένων δειγμάτων από πλευράς πληθυσμών Ο.Μ.Χ. και ολικών ψυχρότροφων ύστερα από συντήρησή τους υπό ψύξη μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής των προϊόντων είναι αξιοσημείωτες, λαμβάνοντας υπόψη την κατά 2,3 φορές μεγαλύτερη διάρκεια επώασης των προσυσκευασμένων δειγμάτων σε θερμοκρασίες ψύξης (τρεις ημέρες για τα δείγματα από τους αυτόματους πωλητές και επτά ημέρες για τα δείγματα DC-1 και DC-2).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη χώρα μας το παστεριωμένο γάλα διακινούταν παραδοσιακά προσσκευασμένο. Τα τελευταία ωστόσο χρόνια εγκαταστάθηκαν στη πόλη της Λάρισας αρχικά και στην συνέχεια και στη Θεσσαλονίκη αυτόματοι πωλητές παστεριωμένου γάλακτος. Το γάλα συλλέγεται από τα αγροκτήματα στις περιοχές της Θεσσαλίας και της κεντρικής Μακεδονίας, παστεριώνεται σε «πιστοποιημένες εγκαταστάσεις», και στη συνέχεια μεταφέρεται μέσα σε μικρές κλειστές δεξαμενές στα τελικά σημεία πώλησης (αυτόματους πωλητές). Καθώς δεν υπάρχουν δημοσιευμένα στοιχεία για τη μικροβιολογική ποιότητα και την ασφάλεια αυτού του τροφίμου, που εμφανίστηκε στην ελληνική αγορά τα τελευταία χρόνια, η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να χαρακτηρίσει το προϊόν αυτό από την άποψη μικροβιολογικών δεικτών που είναι σημαντικοί την ποιότητα και την ασφάλεια του παστεριωμένου γάλακτος.

Ο Κανονισμός 2073/2005 (ΕΚ, 2005), δεν περιέχει ειδικά κριτήρια ασφάλειας για το παστεριωμένο γάλα. Ωστόσο, ως ένα έτοιμο για κατανάλωση τρόφιμο, το παστεριωμένο γάλα με διάρκεια ζωής μεγαλύτερη από 5 μέρες πρέπει να πλήρη το κριτήριο σχετικά με την *L. monocytogenes* για την κατηγορία τροφίμων «Έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς». Ως εκ τούτου, το παθογόνο δεν θα πρέπει να ανιχνεύεται σε 25 ml ($n = 10; c = 0$) των παστεριωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους. Μεταξύ των κριτηρίων υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας του Κανονισμού για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το μοναδικό κριτήριο που ισχύει για το παστεριωμένο γάλα είναι αυτό που αφορά τους πληθυσμούς των Εντεροβακτηριοειδών ($n = 5; c = 0; m = M = 10$ cfu/mL), κατά το «τέλος της διαδικασία παραγωγής των προϊόντων».

4.1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΑΠΟ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥΣ ΠΩΛΗΤΕΣ

Σύμφωνα με τις ενδείξεις της θερμοκρασίας τόσο των θαλάμων των αυτόματων πωλητών όσο και των επιφανειών των δειγμάτων, τα δείγματα από τους αυτόματους πωλητές παρέχονταν σε αποδεκτές θερμοκρασίες ψύξης. Οι ενδείξεις του αυτόματου πωλητή C, ωστόσο, ήταν πάντα αισθητά υψηλότερες από τις αντίστοιχες ενδείξεις αυτόματων πωλητών A και B και στις 13 ημερομηνίες δειγματοληψίας, γεγονός που αποτυπώνεται και στον υψηλότερο μέσο όρο των θερμοκρασιών επιφάνειας των αντίστοιχων δειγμάτων.

Οι μέσες τιμές πληθυσμών της O.M.X. στο τέλος της διάρκειας ζωής ήταν κάτω από 5 log cfu/mL όταν τα δείγματα γάλακτος από τους αυτόματους πωλητές συντηρήθηκαν στους 4°C και *ca.* 6 log cfu/mL όταν τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 8°C. Όλες αυτές οι μέσες τιμές πληθυσμών O.M.X. είναι κάτω από την προτεινόμενη τιμή O.M.X. των 7 log cfu/mL, η οποία θεωρείται ως το κατώτατο όριο αλλοίωσης του παστεριωμένου γάλακτος (<https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/documents/CU-DFScience-Notes-Bacteria-Milk-Shelf-Life-Evaluaton-06-09.pdf>). Με εξαίρεση ορισμένων δειγμάτων από τους αυτόματους πωλητές που παρουσίασαν έντονη «οσμή γάλακτος» ύστερα από συντήρησή τους στους 8°C για 3 ημέρες, κανένα άλλο δείγμα (που συντηρήθηκε στους 4 ή στους 8°C) δεν παρουσίασε οργανοληπτικές ή μακροσκοπικές ενδείξεις αλλοίωσης. Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι δεν διενεργήθηκαν χημικές αναλύσεις ή οργανωμένες δοκιμές οργανοληπτικής αξιολόγησης στα δείγματα της παρούσας μελέτης.

Στην παρούσα μελέτη, οι πληθυσμοί των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που καταμετρήθηκαν κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας (ημέρα «0») στην ουσία αποτελούν μετρήσεις που λήφθηκαν αρκετές ώρες μετά από το «τέλος της παραγωγικής διαδικασίας». Αυτή η χρονική περίοδος (δηλαδή το ακριβές χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ της παστερίωσης/συσκευασίας και της δειγματοληψίας κατά την ημέρα «0») δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ακρίβεια για τις τρεις εταιρείες παστεριωμένου γάλακτος που εξετάστηκαν σε αυτή τη μελέτη. Ωστόσο, με βάση το γεγονός ότι και οι τρεις εταιρείες παστεριώνουν γάλα σε καθημερινή βάση και με βάση την απόσταση μεταξύ των εγκαταστάσεων επεξεργασίας και των καταστημάτων λιανικής πώλησης (αυτόματοι πωλητές ή υπεραγορές) από όπου λήφθηκαν τα δείγματα, εκτιμάται ότι ο χρόνος που

μεσολαβούσε θα πρέπει να ήταν περίπου 12 ώρες ή λιγότερο. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός αυτό, μόνο δύο από τα 39 δείγματα γάλακτος (5,1%), των αυτόματων πωλητών που εξετάστηκαν υπερέβη τα 10 cfu/mL όριο στην ημέρα «0». Ωστόσο, μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασίες ψυγείου για τρεις ημέρες, σε ένα μικρό υποσύνολο των δειγμάτων μετρήθηκαν πληθυσμοί των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae που ξεπερνούσαν τα 100 ή ακόμη και τα 1000 cfu/mL, ιδιαίτερα όταν τα δείγματα είχαν συντηρηθεί στους 8°C.

Στην παρούσα έρευνα δεν εξετάστηκαν 10 μονάδες γάλακτος από την εκάστοτε παρτίδα παραγωγής για τους αυτόματους πωλητές ούτε η διάρκεια ζωής του προϊόντος (3 ημέρες) ξεπερνούσε τις 5 ημέρες. Παρόλα αυτά, με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης, δηλαδή την απουσία της *L. monocytogenes* σε 25 ml 39 δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος που εξετάστηκαν κατά την ημέρα «0» όπως επίσης και στο τέλος της διάρκειας ζωής, μπορεί να προταθεί ότι το γάλα των αυτόματων πωλητών πληροί τα κριτήρια ασφάλειας που προαναφέρθηκαν για την *L. monocytogenes*.

4.2. ΠΡΟΣΥΣΚΕΥΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΑΣΤΕΡΙΩΜΕΝΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΛΙΑΝΙΚΗΣ ΠΩΛΗΣΗΣ

Όλα τα προσυσκευασμένα δείγματα παστεριωμένου γάλακτος [προσυσκευασμένο παστεριωμένο γάλα από δύο από τις κορυφαίες σε πωλήσεις εταιρείες γαλακτοκομικών προϊόντων στην Ελλάδα (DC-1 και DC-2)] ήταν, επίσης, αρνητικά στις δοκιμές για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* καθόλη τη διάρκεια ζωής τους, ενώ κατά την ημέρα «0» περιείχαν πληθυσμούς βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae σε επίπεδα < 10 cfu/mL. Οι πληθυσμοί της O.M.X. παρέμειναν πολύ κάτω από το όριο αλλοίωσης των 7-log cfu/mL ακόμα και μετά από επτά ημέρες συντήρησης στους 4 ή 8°C. Προηγούμενες μελέτες που διεξάχθηκαν πριν από πάνω από μια δεκαετία αναφέρουν σημαντικά υψηλότερες αρχικές και τελικές τιμές O.M.X. (μετά από 7 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C) σε προσυσκευασμένα, πλήρη (Zygoura et al., 2004) ή χαμηλής λιποπεριεκτικότητας (Moyssiadi et al., 2004) δείγματα παστεριωμένου γάλακτος μιας εταιρείας γαλακτοκομικών προϊόντων στην περιοχή της Ηπείρου. Αυτή η διαφορά στους πληθυσμούς της O.M.X. μπορεί να οφείλεται σε διαχρονικές διαφορές αναφορικά με την ποιότητα του νωπού γάλακτος, στην τεχνολογία και αποτελεσματικότητα των παλαιότερων και τωρινών μεθόδων παστερίωσης, ή σε διαφορές αναφορικά με

συνθήκες υγιεινής κατά τη διάρκεια της εμφιάλωσης του παστεριωμένου γάλακτος μεταξύ των διαφόρων γαλακτοβιομηχανιών, ή απλά να οφείλονται στη γενικότερη βελτίωση των συνθηκών και πρακτικών που εφαρμόζονται κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής παστεριωμένου γάλακτος τα τελευταία χρόνια στην Ελλάδα.

Παρόλο που οι μέσες τιμές των πληθυσμών της O.M.X. στα δείγματα DC-1/ DC-2 κατά την ημέρα «0» ήταν πρακτικά ίδιες με εκείνες των δειγμάτων που λήφθηκαν από αυτόματους πωλητές, οι μέσες τιμές O.M.X. μετά από συντήρηση των δειγμάτων DC-1/ DC-2 στους 8°C για 7 μέρες ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων των αυτόματων πωλητών κατά 1 τουλάχιστο λογάριθμο (Σχήμα 1A). Αυτή η διαφορά είναι σημαντική, λαμβάνοντας υπόψη τη χρονική διαφορά στη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη των δειγμάτων μεταξύ των δύο «κατηγοριών» γάλακτος. Οι διαφορές τους αναφορικά με τους πληθυσμούς των ολικών ψυχρότροφων μικροβίων ήταν ακόμη πιο έντονες, ιδιαίτερα στο τέλος της διάρκειας ζωής (Σχήμα 1B). Οι αιτίες των παρατηρηθέντων αυτών διαφορών, ιδιαίτερα σε ότι αφορά τους πληθυσμούς της O.M.X. και των ολικών ψυχρότροφων μεταξύ των δύο «κατηγοριών» παστεριωμένου γάλακτος ύστερα από συντήρησή τους μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής τους, παραμένουν άγνωστες. Οι παρατηρούμενες διαφορές μπορεί να οφείλονται σε διαφορές αναφορικά με την ποιότητα του νεπού γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, σε διαφορετικές συνθήκες επεξεργασίας (π.χ. συνδυασμούς χρόνου/θερμοκρασίας που χρησιμοποιούνται κατά την HTST παστερίωση, εφαρμογή ή όχι βακτηριοκάθαρσης), ή σε πιθανές μεταπαστεριωτικές επιμολύνσεις (αριθμός και είδη ψυχρότροφων βακτηρίων).

Τα προσυσκευασμένα δείγματα λιανικής πώλησης εξετάστηκαν επιπρόσθετα και τρεις ημέρες μετά την ημερομηνία λήξης τους, μετά από συνεχή συντήρησή τους στους 4°C. Αφορμή για τις «επιπλέον» αυτές εξετάσεις αποτέλεσαν οι συζητήσεις (στις αρχές του 2014) αναφορικά με την «πραγματική» διάρκεια του χρόνου ζωής του παστεριωμένου γάλακτος στο ελληνικό λιανεμπόριο. Σύμφωνα με τη νέα εθνική νομοθεσία που ψηφίστηκε το 2014 (ΦΕΚ, 2014), η διάρκεια ζωής του παστεριωμένου γάλακτος τέθηκε σε κατ' ανώτατο όριο επτά ημερών (υπό την ευθύνη του κατασκευαστή), όταν το παστεριωμένο γάλα αποθηκεύεται στους ή κάτω από τους 6°C. Σύμφωνα με τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, οι αυξήσεις στις μικροβιολογικούς πληθυσμούς (O.M.X., ολικά ψυχρότροφα, εντεροβακτηριοειδή και αερόβιοι ψυχρότροφοι σπόροι) που παρατηρήθηκαν στα προσυσκευασμένα παστεριωμένα δείγματα γάλακτος ύστερα από 3 επιπλέον ημέρες

(δηλαδή 10 ημέρες μετά την ημερομηνία παστερίωσης και συσκευασίας τους) συντήρησης στους 4°C ήταν πολύ μικρές. Η παρατήρηση αυτή στηρίζει την υπόθεση ότι ενδεχομένως να υπάρχει περιθώριο για περαιτέρω επέκταση της μέγιστης επιτρεπόμενης διάρκειας ζωής προσυσκευασμένου, παστεριωμένου γάλακτος που διακινούνται και συντηρούνται υπό καλές συνθήκες ψύξης (4°C). Από την άλλη πλευρά, τα δεδομένα αυτά θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή, επειδή τα DC-1 και DC-2 δείγματα που αξιολογήθηκαν στη μελέτη μας συντηρήθηκαν συνεχώς υπό σταθερές θερμοκρασίες ψύξης ($4 \pm 0,5^\circ\text{C}$) στο εργαστήριο. Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι έχουν καταγραφεί σημαντικές διακυμάνσεις στις θερμοκρασίες που επικρατούν κατά μήκος της ψυκτικής αλυσίδας του παστεριωμένου γάλακτος στην Ελλάδα, τόσο σε επίπεδο λιανικής πώλησης όσο και σε επίπεδο καταναλωτή (Koutsoumanis et al., 2010).

Πίνακας 1. Μέσες τιμές μετρήσεων Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X., Total Aerobic Count, TAC) ($n = 13$) σε δείγματα παστεριωμένου γάλακτος που λήφθηκαν από αυτόματους πωλητές (VM-A, VM-B, VM-C) και σε δείγματα προσυσκευασμένου γάλακτος που λήφθηκαν από καταστήματα λιανικής πώλησης (Εταιρεία DC-1 και Εταιρεία DC-2) και αναλύθηκαν την ημέρα της αγοράς («0»), στο τέλος της ημερομηνίας λήξης (end of shelf-life, «ESL») μετά από αποθήκευση στους 4 η 8°C και 3 ημέρες μετά το πέρας της ημερομηνίας λήξης («ESL+3») μετά από αποθήκευση στους 4°C.

Προέλευση γάλακτος	Μέση τιμή O.M.X. (log cfu/mL)			
	0*	ESL 4°C*	ESL 8°C*	ESL+3 4°C
VM-A	3.56 ^I	4.60 ^I	6.01 ^I	
VM-B	3.63 ^I	4.37 ^{I,II}	5.72 ^I	
VM-C	3.71 ^I	4.45 ^{I,II}	6.05 ^I	
DC-1	3.41 ^I	4.28 ^{I,II}	4.68 ^{II}	4.64 ^I
DC-2	3.27 ^I	3.91 ^{II}	4.38 ^{II}	4.73 ^I

* Μέσες τιμές με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά με επίπεδο σημαντικότητας 5% σε σχέση με όλες τις συγκρίσεις.

Πίνακας 2. Μέσες τιμές μετρήσεων ολικών ψυχρότροφων μικροοργανισμών ($n = 13$) σε δείγματα παστεριωμένου γάλακτος που λήφθηκαν από αυτόματους πωλητές (VM-A, VN-B, VM-C) και σε δείγματα προσυσκευασμένου γάλακτος που λήφθηκαν από καταστήματα λιανικής πώλησης (Εταιρεία DC-1 και Εταιρεία DC-2) και αναλύθηκαν την ημέρα της αγοράς («0»), στο τέλος της ημερομηνίας λήξης (end of shelf-life, «ESL») μετά από αποθήκευση στους 4 η 8°C και 3 ημέρες μετά το πέρας της ημερομηνίας λήξης («ESL+3») μετά από αποθήκευση στους 4°C.

Προέλευση γάλακτος	Μέση τιμή Ολικών Ψυχρότροφων (log cfu/mL)			
	0*	ESL 4°C*	ESL 8°C*	ESL+3 4°C
VM-A	2.35 ^{I,II}	3.95 ^I	4.67 ^I	
VM-B	2.64 ^I	3.51 ^I	4.43 ^I	
VM-C	2.28 ^{I,III}	3.70 ^I	4.97 ^I	
DC-1	1.62 ^{III}	1.98 ^{II}	2.20 ^{II}	2.35 ^I
DC-2	1.69 ^{II,III}	2.00 ^{II}	2.36 ^{II}	2.48 ^I

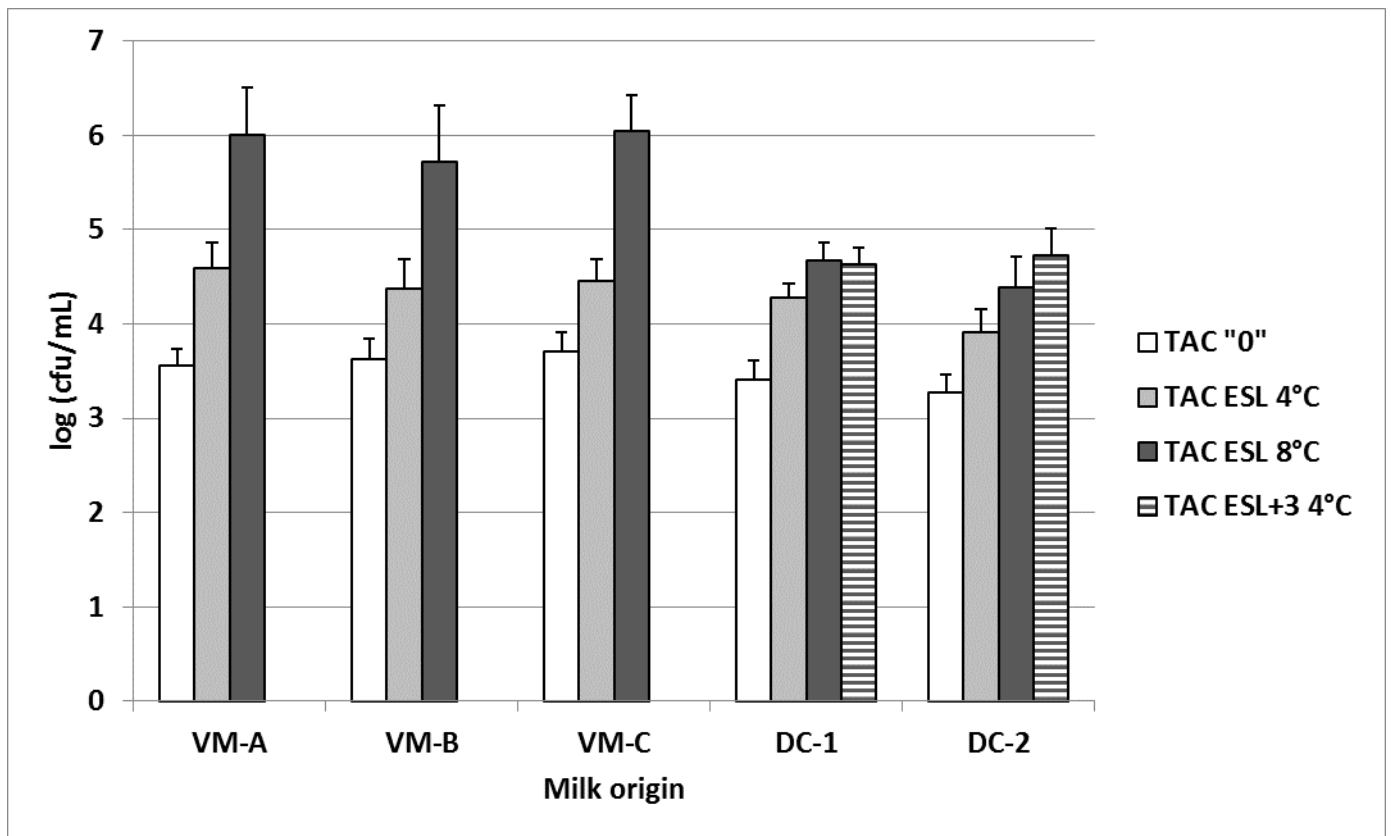
* Μέσες τιμές με κοινό εκθέτη δεν διαφέρουν σημαντικά με επίπεδο σημαντικότητας 5% σε σχέση με όλες τις συγκρίσεις.

Σχήμα 1. Μέσοι όροι ($n = 13$) μετρήσεων μικροβιακών παραμέτρων (log cfu/mL) δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος που λήφθηκαν από αυτόματους πωλητές (VM-A, VN-B, VM-C) και καταστήματα λιανικής πώλησης (DC-1 και DC-2) και αναλύθηκαν την ημέρα της αγοράς (“0”), στο τέλος της ημερομηνίας λήξης (end of shelf-life, ESL) μετά από συντήρηση στους 4 ή 8°C, και 3 ημέρες μετά το πέρας της ημερομηνίας λήξης (ESL+3) μετά από συντήρηση στους 4°C. **A.** Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Total Aerobic Counts, TAC); **B.** Ολικοί ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί (Total Psychrotrophic Counts, TPC). Υποδεικνύεται το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών.

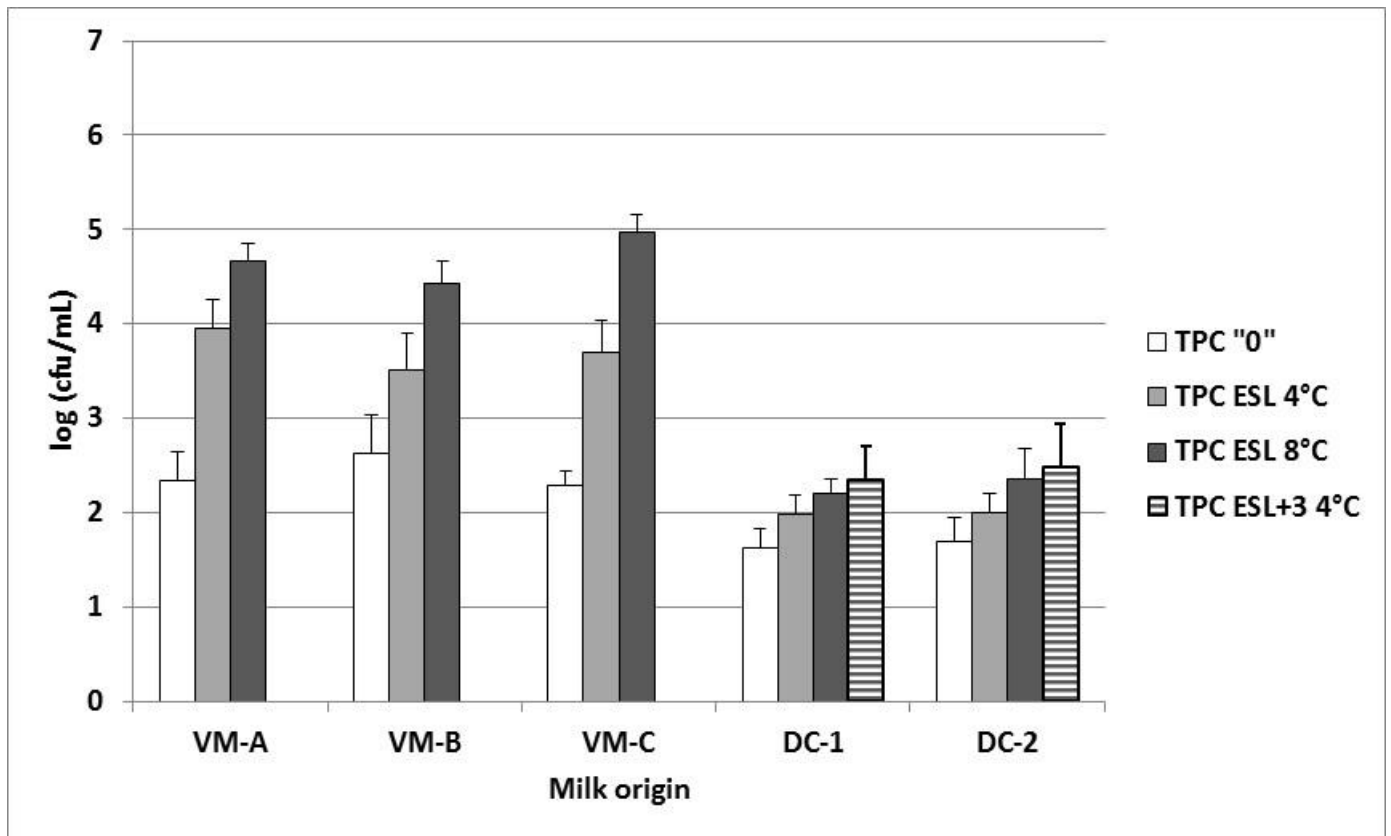
Σχήμα 2. Δεδομένα μετρήσεων (log cfu/mL; $n = 13$) των ψυχρότροφων σπόρων (Psychrotrophic Spores, PS) και των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (E) σε δείγματα παστεριωμένου γάλακτος που λήφθηκαν από αυτόματους πωλητές (VM-A, VN-B, VM-C) και καταστήματα λιανικής πώλησης (DC-1, DC-2) και αναλύθηκαν την ημέρα της αγοράς (“0”), στο τέλος της ημερομηνίας λήξης (end of shelf-life, ESL) μετά από συντήρηση στους 4 η 8°C, και 3 ημέρες μετά το πέρας της ημερομηνίας λήξης (ESL+3) μετά από συντήρηση στους 4°C. **A,** Αυτόματος πωλητής A (VM-A); **B,** Αυτόματος πωλητής B (VM-B); **C,** Αυτόματος πωλητής C (VM-C); **D,** Εταιρεία 1 (DC-1); **E,** Εταιρεία 2 (DC-2). Τα δείγματα γάλακτος κατηγοριοποιήθηκαν σύμφωνα με τις μετρήσεις των ψυχρότροφων σπόρων και των βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae σε διαφορετικές τάξεις log cfu/mL <0, λιγότερο από 1 cfu/mL; [0-1), 1-9 cfu/mL; [1-2), 10-99 cfu/mL; [2-3), 100-999 cfu/mL; [3-4), 1000-9999 cfu/mL.

Σχήμα 3. Μέσοι όροι μετρήσεων των αερόβιων μεσόφιλων σπόρων (log cfu/mL; $n = 13$) δειγμάτων παστεριωμένου γάλακτος που λήφθηκαν από αυτόματους πωλητές (VM-A, VM-B, VM-C) και καταστήματα λιανικής πώλησης (DC-1 και DC-2) και αναλύθηκαν την ημέρα της αγοράς. Υποδεικνύεται το τυπικό σφάλμα των μέσων τιμών.

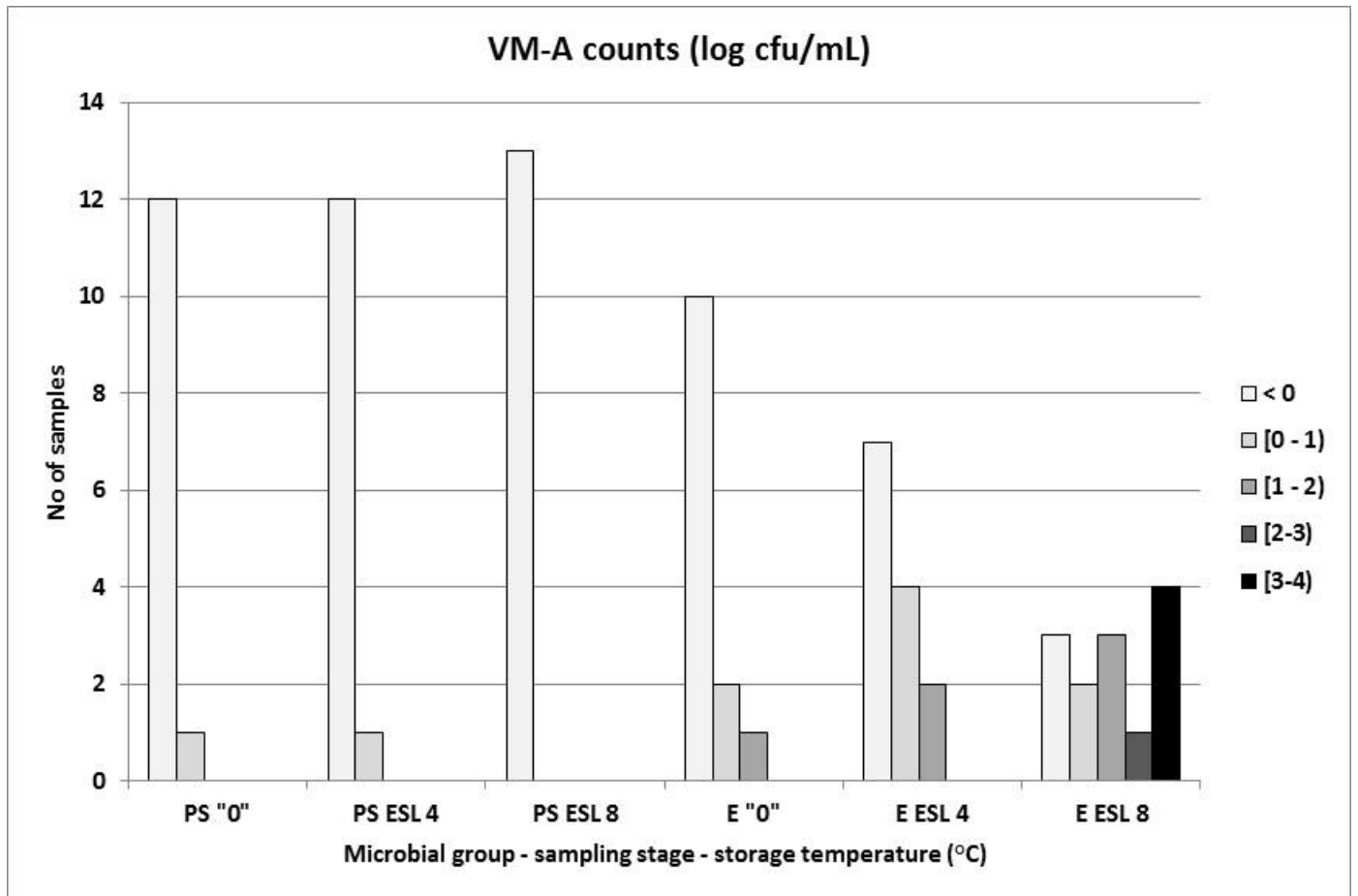
Σχήμα 1Α



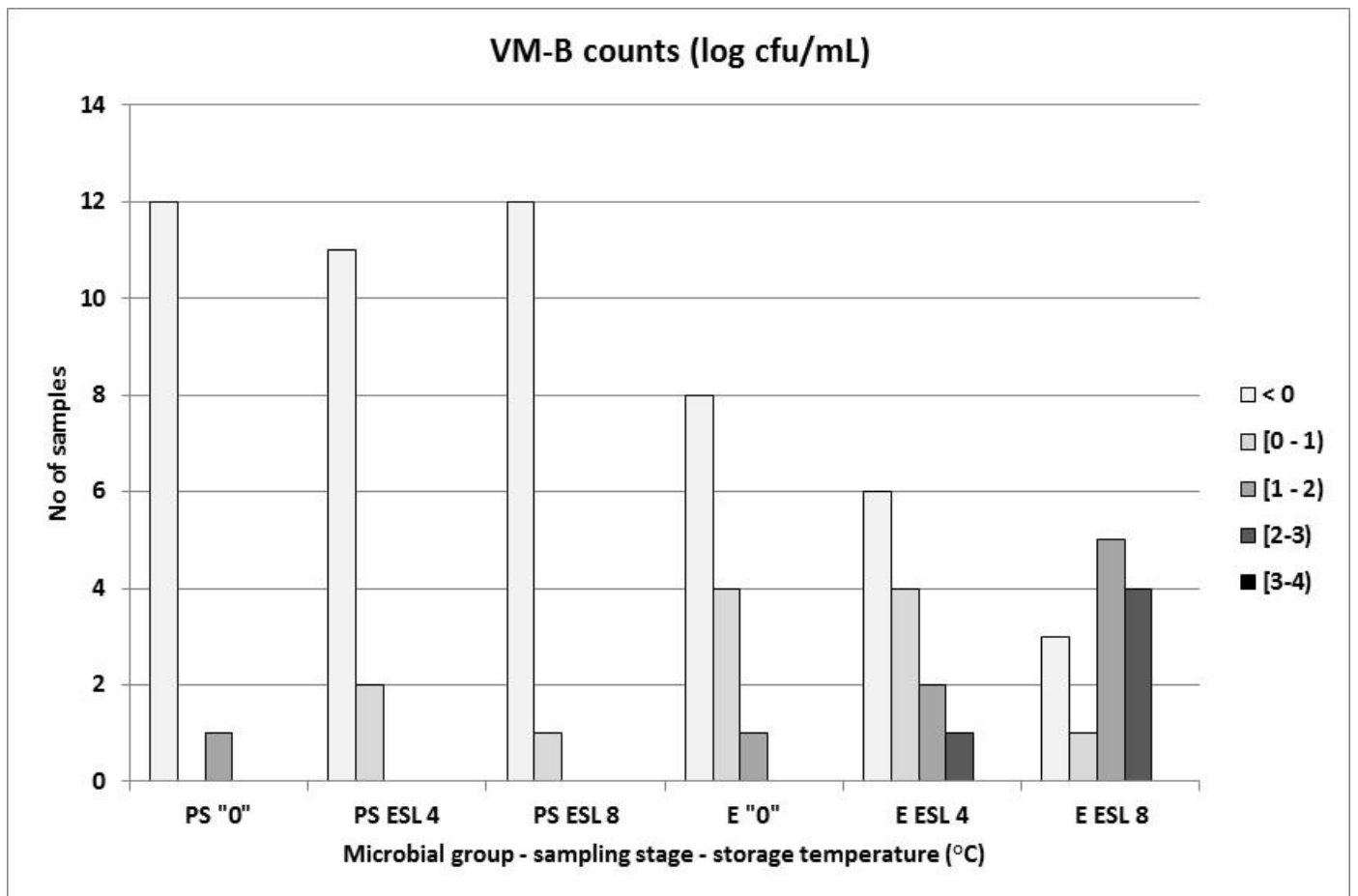
Σχήμα 1B



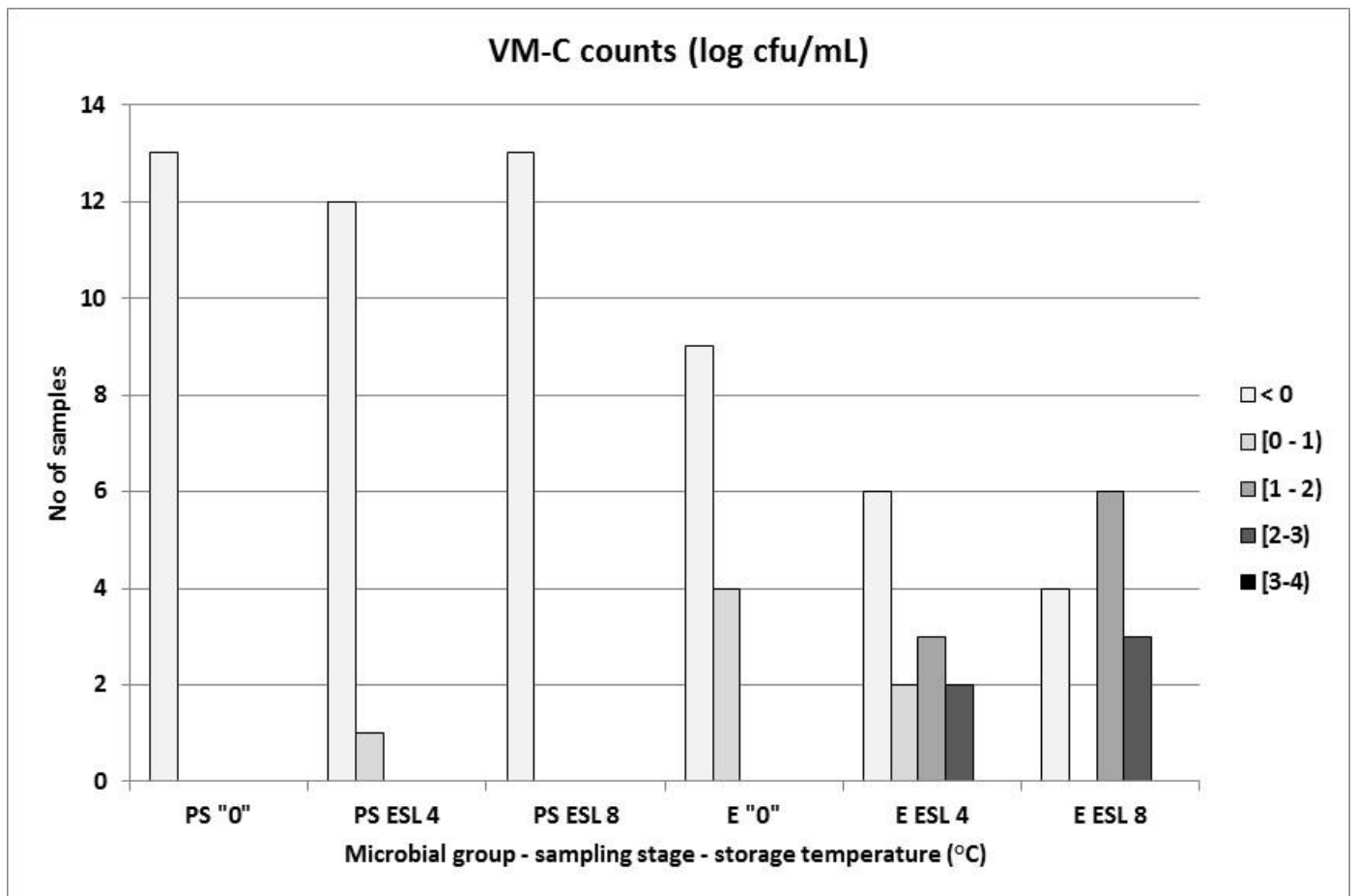
Σχήμα 2Α



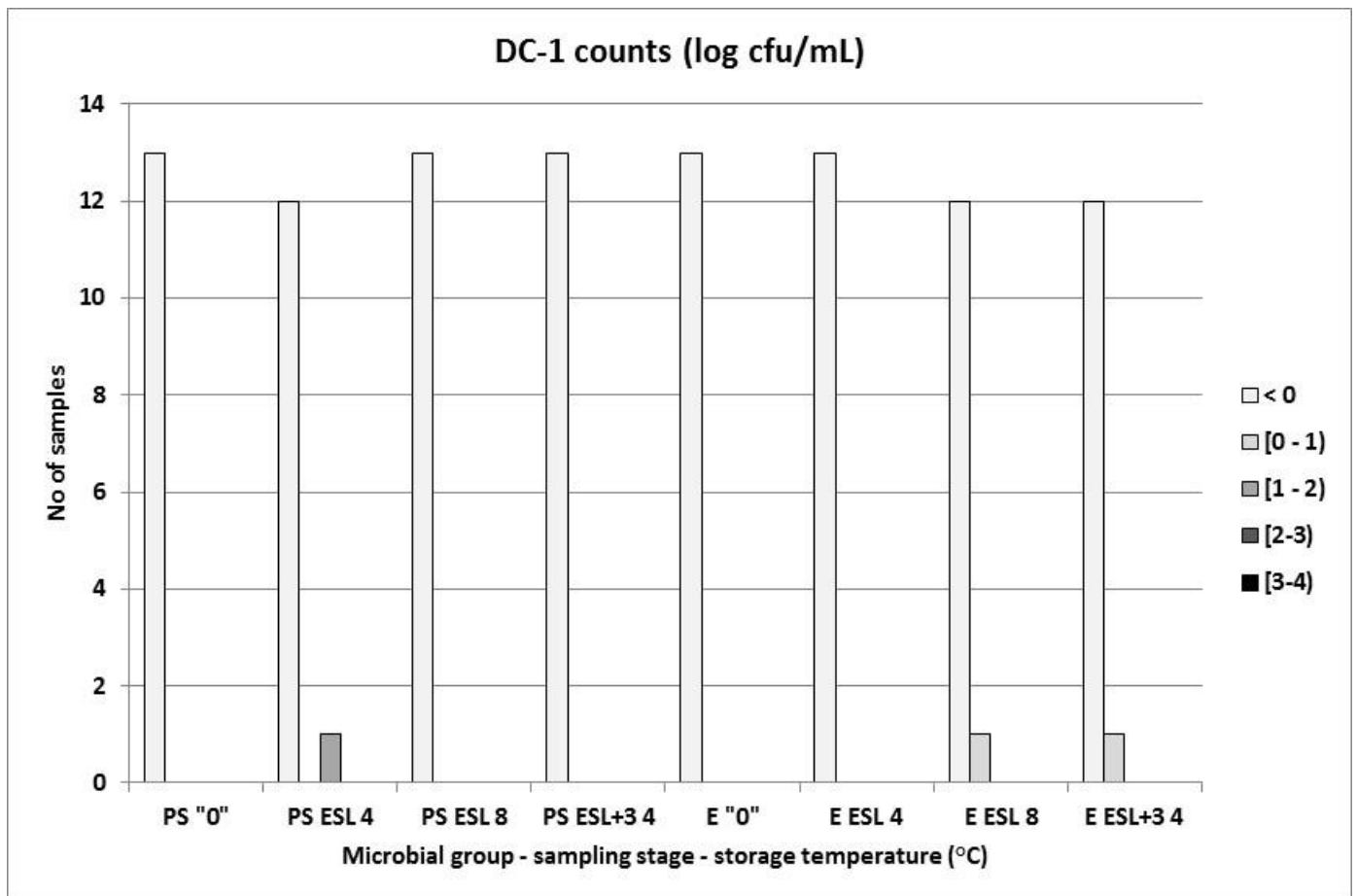
Σχήμα 2B



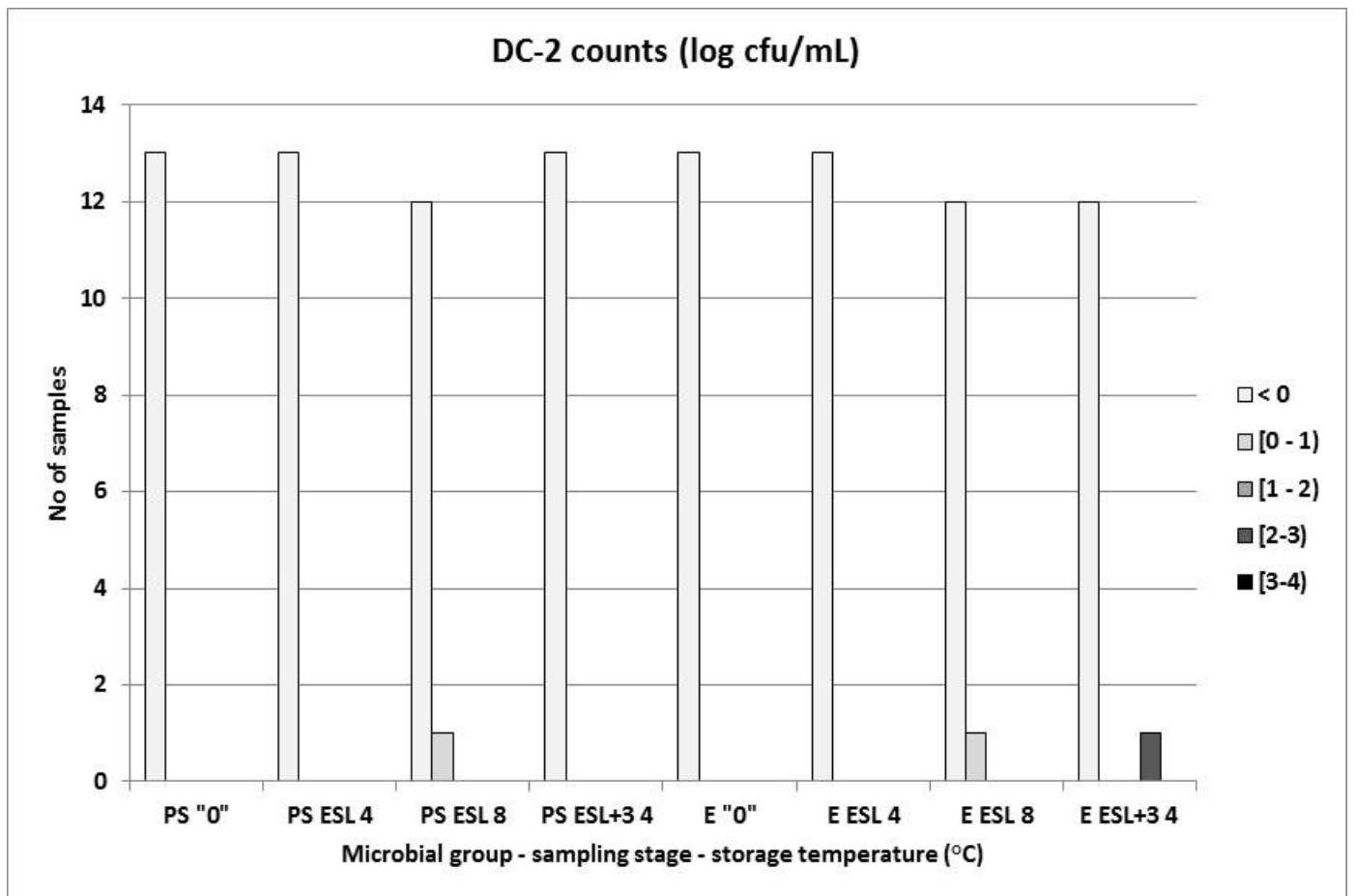
Σχήμα 2C



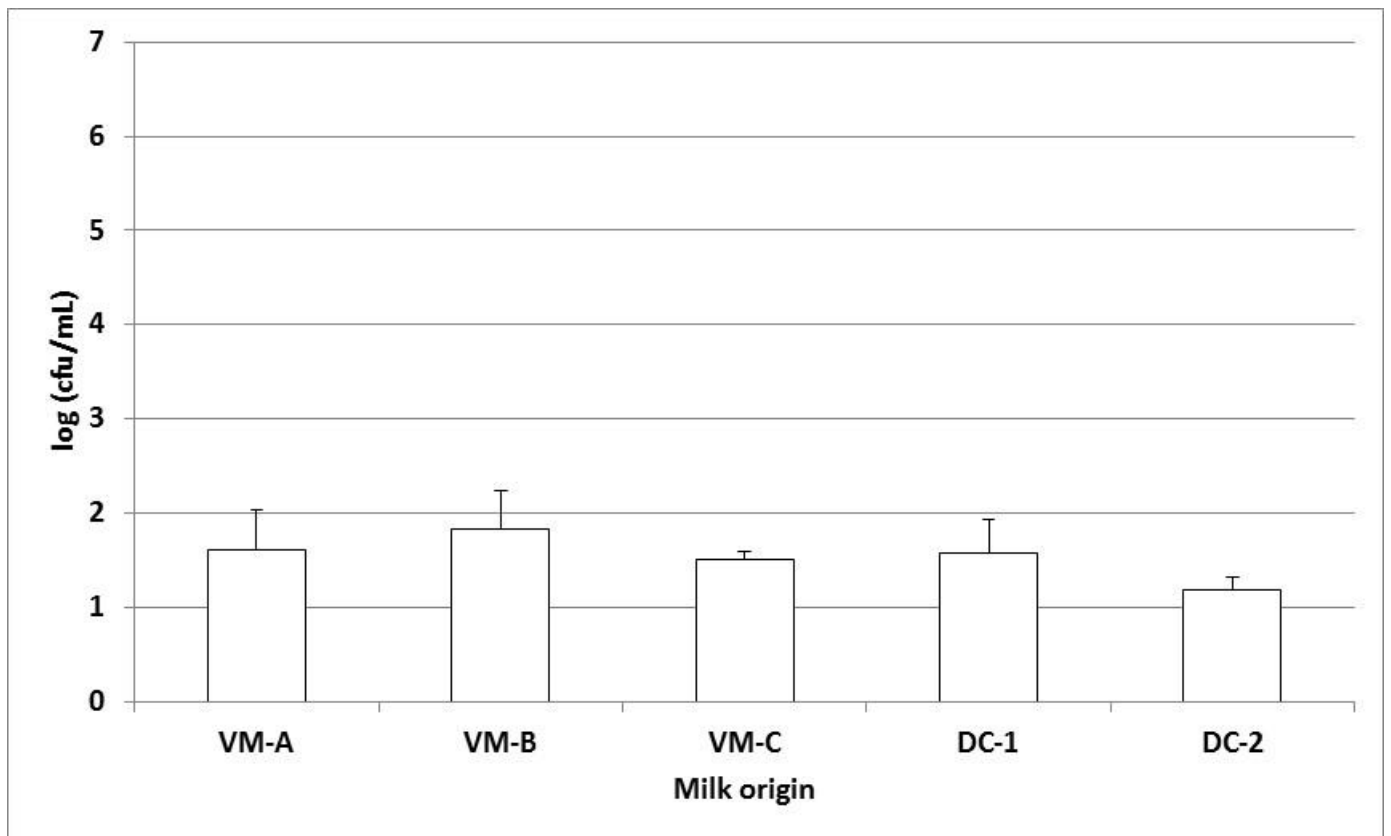
Σχήμα 2D



Σχήμα 2Ε



Σχήμα 3



Βιβλιογραφία

- Angelidis, A.S. 2015. The Microbiology of Raw Milk. In: P. Papademas (ed), Dairy Microbiology – A Practical Approach. CRC press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Angelidis, A.S., Smith, L.T. & Smith, G.M. (2002). Elevated carnitine accumulation by *Listeria monocytogenes* impaired in glycine betaine transport is insufficient to confer wild-type cryotolerance in milk whey. *International Journal of Food Microbiology* 5:1-9.
- Belitz, H.D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2006). Χημεία τροφίμων. Εκδόσεις Τζιόλα.
- Boor, K.J. 2001. Fluid dairy product quality and safety: looking to the future. *Journal of Dairy Science* 84:1–11.
- Burvenich, C., Van Merris, V., Mehrzad, J., Diez-Fraile, A. & Duchateau, L. (2003). Severity of *Escherichia coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research* 34:521-64.
- De Oliveira, G.B., Favarin, L., Luchese, R.H. & McIntosh, D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology* 46:313–321.
- Drewnowski, A. (2011). The contribution of milk and milk products to micronutrient density and affordability of the U.S. diet. *Journal of the American College of Nutrition* 30:422-428.
- Ebringer, L., Ferencik, M. & Krajcovic, J. (2008). Beneficial health effects of milk and fermented dairy products--review. *Folia Microbiology* 53:378-94.
- European Commission (EC), 2005. Commission Regulation (EC) no. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 338:1–26.
- Fotou, K., Tzora, A. & Voidarou, C. (2011). Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. *Anaerobe* 17:315–319.
- Frank, J.F. & Yousef, A.E. (2004). Test for groups of microorganisms. In: Wehr, H.M., Frank, J.F. (eds.), Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 17th edition, American Public Health Association, Washington, DC.
- Fromm, H.I. & Boor, K.J. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of Food Science* 69:207–214.

- Hantsis-Zacharov, E. & Halpern, M. (2007). *Chryseobacterium haifensesp.* nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:2344–2348.
- Hussein, H.S. & Sakuma, T. (2005). Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science* 88:450-65.
- International Organization for Standardization (ISO), 2004a. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method. ISO standard 21528-2:2004. ISO, Geneva.
- International Organization for Standardization (ISO), 2004b. Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method. ISO standard 11290-1:1996 and Amd. 1:2004. ISO, Geneva.
- International Organization for Standardization (ISO), 2005. Milk - Enumeration of colony-forming units of psychrotrophic microorganisms - Colony-count technique at 6.5 °C. ISO standard 6730:2005. ISO, Geneva.
- International Organization for Standardization (ISO), 2013. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. ISO standard 4833-1:2013. ISO, Geneva.
- Jayarao, B.M., Donaldson, S.C., Straley, B.A., et al. (2006). A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science* 89:2451–2458.
- Kaminarides S. E., Stamou P. and Massouras T. (2007). Changes of organic acids, volatile aroma compounds and sensory characteristics of Halloumi cheese kept in brine. *Food chemistry*. 100, 219-225.
- Kornacki, J.K. & Johnson, J.L. (2001). Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: F.P. Downers and K. Ito (ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods*, 4th Ed., APHA, 69-82.
- Koutsoumanis, K., Pavlis, A., Nychas, G.-J. E. & Xanthiakos, K. (2010). Probabilistic model for *Listeria monocytogenes* growth during distribution, retail storage, and domestic storage of pasteurized milk. *Applied and Environmental Microbiology* 76:2181–2191.
- Lindqvist, R., Sylvén, S. & Vågsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 78:155-170.
- Martin, N.H., Ranieri, M.L. & Murphy, S.C. (2011). Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf-life performance of commercially pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*. 94:1211–1222.

- Moyssiadi, T., Badeka, A., Kondyli, E., Vakirtzi, T., Savvaidis, I. & Kontominas, M.G. 2004. Effect of light transmittance and oxygen permeability of various packaging materials on keeping quality of low fat pasteurized milk: chemical and sensorial aspects. *International Dairy Journal* 14:429-436.
- Munsch–Alatossava, O. & Alatossava, T. (2006). Phenotypic characterization of raw milk–associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research* 161:334–346.
- Nikolic, M., Terzic-Vidojevic, A., Jovcic, B., Begovic, J., Golic, N. & Topisirovic, L. (2008). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat’s milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 122:162–170.
- Official Government Gazette (Greece), (2014). Greek law 4254/2014. FEK 85 A'
- Oliver, SP., Boor, K.J., Murphy, S.C. & Murinda, S.E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathogens and Disease* 6:793-806.
- Pereira, P.C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition* 30:619-27.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* 37:664-698.
- Raats, D., Offek, M., Minz, D. & Halpern, M. (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology* 28:465–471.
- Ruegg, P. (2011). *Salmonella, Listeria, Escherichia coli* and *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. Is there cause for concern? <http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/salmonella-listeria-e-coli-and-mycobacterium-paratuberculosis.pdf>
- Salmeron, J., De Vega, C., Perez-Elortondo, F.J., Albisu, M. & Barron, L.J.R. (2002). Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe’s milk for cheesemaking. *Food Microbiology* 19:167–174.
- Schröder, M.J.A. (1984). Origins and levels of post pasteurization contamination of milk in the dairy and their effects on keeping quality. *Journal of Dairy Research* 51:59–67.
- Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbiology and Infection* 9:1236-1243.
- Torkar, K.G. & Teger, S.G. (2008). The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Acta Agriculturae Slovenica* 92:61–74.
- Zygoura, P., Moyssiadi, T., Badeka, A., Kondyli, E., Savvaidis, I. & Kontominas, M.G. (2004). Shelf life of whole pasteurized milk in Greece: effect of packaging material. *Food Chemistry* 87:1-9.

- Ανυφαντάκης Ε. (2004): Τυροκομία (Εκδόσεις Σταμούλης).
- Ανυφαντάκης Ε. & Καλαντζόπουλος Γ. (1993): Γαλακτοκομία, Α΄ και Β΄ Τόμοι (Εκδόσεις Σταμούλης).
- Ανυφαντάκης Ε. (1992): Μέθοδοι εξέτασης του γάλακτος και των προϊόντων του (Εκδόσεις Σταμούλης).
- Αποστόλου, Φ., Λυμπερόπουλος, Ε. & Ελισάφ Μ. (2010). Νεότερα δεδομένα για τη διάγνωση και την αντιμετώπιση της βρουκέλλωσης. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 27:37-47
- Γκόβαρης, Α. (2007). Ασφάλεια Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Κτηνιατρικό Τμήμα, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης. http://library.tee.gr/digital/m2077/m2077_govaris.pdf
- Δημητράκη Π., Βελονάκης Ε.Γ. (2007) Η επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών σε συνθήκες κατάψυξης τροφίμων, ως παράγοντας κινδύνου για την υγεία ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ, 24(5), 432-439.
- Καμιναρίδης, Στ. και Μοάτσου, Γ., Γαλακτοκομία, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, 2009
- Κανονισμός (ΕΚ) Αριθ. 853/2004 του ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
- Κιοσέογλου, Β. & Μπλέκας, Γ. (2009). Αρχές τεχνολογίας τροφίμων. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις Άγιος Σάββας Γαρταγάνης.
- Κονδύλη, Ε. & Παππά Ε. (2007). Μέθοδοι θερμικής επεξεργασίας νωπού γάλακτος <http://www.nagref.gr/journals/dimitra/images/5/dmtr5p4-7.pdf>
- Μαντής, Α. (2000). Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. Εκδόσεις Αφοί Κυριακίδη.
- Τζουβάρα Καραγιάννη, Σ. (2010). Σύσταση, χημική ανάλυση και προδιαγραφές βασικών τροφίμων. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης. (2010). Οδηγίες από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων για το πρόγραμμα εκρίζωσης της φυματίωσης των βοοειδών Γενική διεύθυνση Κτηνιατρικής, Διεύθυνση Υγείας των Ζώων, Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων. www.minagric.gr