

**ΠΣΕ ΙΑΤΡΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

ΘΕΜΑ:

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΧΥΜΩΝ ΦΡΟΥΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ
ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΟΥ pH**

ΣΤΟΓΙΑΝΝΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ

ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερομ. 07/01/2003
Αριθ. Πρωτ. 2458

αρ. στο. 18/2003



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 1537/1

Ημερ. Εισ.: 3-2-2003

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ

2003

ΣΤΟ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
SUMMARY	3
ΣΚΟΠΟΣ	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
ΧΥΜΟΣ ΦΡΑΟΥΛΑΣ	4
ΧΥΜΟΣ ΜΗΛΟΥ	4
ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ	6
Μικροβιακή ανάπτυξη σε δομημένες τροφές	8
Πως η δομή της τροφής επηρεάζει τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών;	9
Η επιβίωση της Escherichia coli στο χυμό μήλου	10
Ανάπτυξη μικροοργανισμών	12
Escherichia coli	13
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	17
ΔΕΙΓΜΑ 1	17
ΔΕΙΓΜΑ 2	20
ΔΕΙΓΜΑ 3	23
ΔΕΙΓΜΑ 4	26
ΔΕΙΓΜΑ 5	29
ΔΕΙΓΜΑ 6	32
ΔΕΙΓΜΑ 7	37
ΔΕΙΓΜΑ 8	40
ΔΕΙΓΜΑ 9	43
ΔΕΙΓΜΑ 10	48
ΔΕΙΓΜΑ 11	53
ΔΕΙΓΜΑ 12	56
ΔΕΙΓΜΑ 13	59
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΙ ΠΙΝΑΚΕΣ	62
ΣΧΟΛΙΑ	63
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθούν χυμοί φρούτων σε όλα τα στάδια αλλοίωσής τους. Μελετήθηκαν δύο χυμοί φρούτων, μήλου και φράουλας και εκτέθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες διατήρησης και σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Κατά την αλλοίωση των χυμών, αναπτύσσονται μικροοργανισμοί που ευθύνονται για τις μεταβολές του pH. Ο κύριος μικροοργανισμός που αναπτύσσεται είναι η *Escherichia coli* και δη το στέλεχος O157:H7, ορότυπος που ανθίσταται στο όξινο pH. Ενοχοποιείται για ξεσπάσματα διάρροιας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου. Τα πειραματικά αποτελέσματα καταγράφηκαν, στις δε καμπύλες εφαρμόστηκε η διαφορική μέθοδος, όπου καταδεικνύονται τα ευρήματα.

Παρακολουθήθηκε η ανάπτυξη μικροοργανισμών, η παραγωγή οξέων και πως αυτά αλλοιώνουν τους χυμούς με συνέπεια τις αλλαγές στο pH, που συχνά ήταν μεγάλες.



SUMMARY

The aim of this work was to study the pH profile of fruit juices in different storage conditions. Two fruit juices were considered, those of apple and strawberry and they were exposed to different temperatures and conditions of preservation in different temperatures.

During the spoilage of juices, there is a growth of microorganisms that are responsible for changes in pH. The dominant microorganism which develops is *Escherichia coli*, especially the strain O157:H7, which is a serotype resisting the acidic pH. It is incriminated for outbreaks of diarrhea and hemolytic uremic syndrome. The differential method was applied on the curves, in order to demonstrate the findings.

The growth of microorganisms was monitored, by studying the production of acids via pH alterations. Arithmetical differentiations were carried out, in order to clarify the results.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη αλλοιωμένων χυμών φρούτων, οι οποίοι εκτέθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες διατήρησης και η μέτρηση του pH, όπως αυτό διαμορφώθηκε στα διαδοχικά στάδια της αλλοίωσης, σε συνέπεια της ανάπτυξης μικροοργανισμών και της παραγωγής οξέων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΧΥΜΟΙ ΦΡΟΥΤΩΝ

ΧΥΜΟΣ ΦΡΑΟΥΛΑΣ

Ο βίος των φραουλών μετά τη συγκομιδή τους περιορίζεται πολύ από μόλυνση με *Botrytis cinerea*. Πιθανολογείται ότι υπάρχουν δύο παράγοντες που επηρεάζουν τη διατήρηση της ποιότητας των παρτίδων φράουλας: η πίεση από την *Botrytis* και η αντίσταση της φράουλας. Το κόκκινο χρώμα εξελίσσεται σε συνάρτηση με το χρόνο. Σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζει το ένζυμο ανθοκυανίνη, η οξείδωση του οποίου ενοχοποιείται για το καφετί χρώμα των χαλασμένων φραουλών. Η διατήρηση της ποιότητας συσχετίζεται άμεσα με την κατανομή του χρώματος, τόσο στα φράσκα φρούτα, όσο και στους χυμούς αυτούς.

Η παράμετρος της μέτρησης του pH, δύναται να εκφράσει τη σχέση αυτής της αλλοίωσης.

ΧΥΜΟΣ ΜΗΛΟΥ

Η παραγωγή μήλου σε ότι αφορά την ποσότητα της σοδειάς παγκοσμίως, έρχεται δεύτερη μετά από αυτή των σταφυλιών. Το 25% σχεδόν της σοδειάς των

μήλων, οδηγείται σε βιομηχανική χρήση, κυρίως για χυμούς και συμπυκνώματα. Το συμπύκνωμα διαυγασμένου χυμού μήλου ένας από τους πιο καταναλώσιμους χυμούς μήλου στον κόσμο. Προβλήματα στη διαύγαση του χυμού μήλου προκαλούνται κυρίως από την παρουσία πτητικών ουσιών ως αιωρούμενα αδιάλυτα σωματίδια (πολτός).

Στην παρασκευή του συγκεκριμένου χυμού, χρησιμοποιούνται διάφορα εμπορικά πτητικά ένζυμα, οι λεγόμενες «πηκτινάσες». Αυτό γίνεται προκειμένου να αποπηκτινωθούν οι συμπιεσμένοι χυμοί, προκειμένου να αφαιρεθεί η θολερότητα και να προληφθεί ο σχηματισμός νέφους. Τα διαθέσιμα εμπορικά παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία του μήλου, περιέχουν συνήθως ένα μίγμα ενζύμων πηκτινестεράσης (PE), πολυγαλακτουρονάσης (PG) και πηκτινολυάσης (PL). Η πλήρης διάσπαση της πηκτίνης σε χυμούς μήλου, μπορεί να διασφαλιστεί μόνο αν και οι τρεις τύποι ενζύμου είναι παρόντες στις σωστές αναλογίες. Οι επεξεργαστές χυμού μήλου που χρησιμοποιούνται, γενικά δεν έχουν αξιόπιστες μεθόδους για τον έλεγχο των διαφόρων ενζυμικών δράσεων. Η εφαρμογή και η επιτυχία των προϊόντων πηκτινάσης, εξαρτώνται από τα υποστρώματα στα οποία δρουν. Τα προβλήματα στην εκτίμηση των πηκτινολυτικών δράσεων προκαλούνται από τη δυσκολία της τυποποίησης των υποστρωμάτων φρούτων.

Η οξύτητα, το pH και η παρουσία αναστολέων ή προαγωγέων της ενζυμικής αντίδρασης, εξαρτάται από την ποικιλία των μήλων που χυμοποιούνται. Η θερμοκρασία επίσης δύναται να επιδράσει στις ενεργότητες των αναλυόμενων ενζύμων.

Σημειώνεται ότι η διαύγαση του χυμού μήλου γίνεται στους 45 - 50°C. Από μελέτες που έγιναν, ξέρουμε πως τα εμπορικά ένζυμα είναι πιο θερμοάντοχα από τα καθαρά κλάσματα του χυμού. Αυτό αποδόθηκε στη θερμοπροστατευτική δράση των προσμίξεων⁹.

Εξάρτηση από το pH

Δοκιμάστηκαν οι ενεργότητες των ενζύμων έναντι του pH. Το βέλτιστο pH ήταν περίπου 4,6. Είναι αποδεδειγμένο πως τα συγκεκριμένα ένζυμα παρουσιάζουν μια μείωση της ενεργότητάς τους σε pH περίπου 5.

Βέβαια, πρέπει να σημειωθεί ότι οι τιμές pH του χυμού μήλου διαφέρουν ανάλογα με την ποικιλία μήλου απ' όπου προέρχεται.

Για παράδειγμα, η τιμή του pH του χυμού μήλου από τις ποικιλίες 'Red Delicious' είναι 4, ενώ η αντίστοιχη τιμή της ποικιλίας 'Granny Smith' είναι 3,5.

Αλλοίωση και pH

Σήμερα ξέρουμε ότι η αλλοίωση του χυμού έχει άμεση επίδραση στο pH. Οι μεταβολές αυτές, είναι αποτέλεσμα των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και της παραγωγής οξέων, λόγω των όξινων μεταβολιτών. Οι αλλοιώσεις αυτές ευθύνονται για τις μεταβολές του pH που οδηγούν ένζυμα του χυμού, όπως η πηκτίνη μεθυλεστεράση, να δρουν διαφορετικά σε pH 7,0 και σε pH 4,5¹¹.

ΟΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

Οι χυμοί φρούτων προέρχονται από το στύψιμο νωπών φρούτων και ανάλογα με την πηγή τους διακρίνονται: σε χυμούς εσπεριδοειδών, μήλων, σταφυλιών, βύσσινων και διαφόρων μιγμάτων τους.

Οι επεξεργασίες που επιτρέπονται κατά την παρασκευή τους είναι: η εκχύμωση (στύψιμο), η απαέρωση, η διαύγαση, η ψύξη, η διήθηση, η συμπίκνωση, η παστερίωση και η αποστείρωση¹.

Τα μέσα διαύγασης που επιτρέπονται και πρέπει να δηλώνονται είναι: η ζελατίνη, το λεύκωμα, η ταννίνη, η ιχθυόκολλα, αποχρωστικές γαίες, κυτταρίνη, αμιάντος, ενεργός ζωικός ή φυτικός άνθρακας.

Απαγορεύεται να διατίθενται χυμοί, οι οποίοι βρίσκονται σε οποιοδήποτε στάδιο εκχύμωσης ή χρωματίζονται τεχνητά. Το άρωμα και το χρώμα των χυμών πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από τα φρούτα, που χρωματίστηκαν για την παρασκευή τους.

Η όποια επιπρόσθετη ουσία είναι υποχρεωτικό να δηλώνεται. Ποσοστό αλάτων Cu μέχρι 0,01%, θεωρείται ανεκτό, δεδομένου ότι προέρχεται από τις μηχανικές εγκαταστάσεις που χρειάζονται για την παρασκευή τους.

Για τη συντήρηση των χυμών επιτρέπεται η προσθήκη, όπως του SO₂ μέχρι 0,75%, σορβικού και βενζοϊκού οξέως και των αλάτων τους μέχρι 1% και του μεθυλικού, αιθυλικού ή προπυλικού εστέρα του π - οξυβενζοϊκού οξέως. Τα εμπορικά τους ονόματα είναι αντίστοιχα Nipagin M ή Salbrol M, Nipagin A ή Salbrol A, Nipasol M ή Salbrol P μέχρι 0,5%.

Τα συντηρητικά είναι υποχρεωτικό να δηλώνονται στη συσκευασία των χυμών. Η δήλωση «χωρίς συντηρητικό» επιτρέπεται μόνο όταν η συντήρησή τους γίνεται αποκλειστικά με αποστείρωση.

Οι χυμοί πρέπει να διατίθενται αυτούσιοι και στη συσκευασία τους πρέπει να δηλώνεται καθαρά η προέλευσή τους. Απαγορεύεται η διάθεση τεχνητών χυμών φρούτων σε μορφή σκόνης ή σιροπιού.

Μικροβιακή ανάπτυξη σε δομημένες τροφές

Δομημένες θεωρούνται οι τροφές που έχουν υποστεί επεξεργασία, η οποία επηρεάζει τη δομή τους και οι χυμοί φρούτων ανήκουν σ' αυτή την κατηγορία τροφών.

Η επιβίωση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην τροφή επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Πρωταρχικό ρόλο παίζει η χημική σύνθεση της τροφής, αλλά και η δομή της, καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης. Όταν μιλούμε για επιδράσεις στη δομή της τροφής, εννοούμε την κατανομή του νερού, τη χημική ανακατανομή των οργανικών οξέων, συμπεριλαμβανομένων των συντηρητικών και των φυσικών περιορισμών στην κινητικότητα των μικροοργανισμών.

Η περιοχή της μικροβιακής ανάπτυξης στην τροφή είναι η υδατική φάση και τα δομικά χαρακτηριστικά αυτής της φάσης, είναι σχετικά με την κλίμακα ανάπτυξης των μικροοργανισμών, που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη.

Οι χυμοί των φρούτων είναι καθ' ολοκληρίαν μια υδατική φάση και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι τυπικά πλαγκτονική και μπορεί να συνοδευτεί από κινητικότητα, επιτρέποντας τον τακτισμό στις υδατικές περιοχές.

Η μεταφορά θρεπτικών ουσιών στα βακτήρια και των μεταβολιτών μακριά από αυτά, καταλήγει σε ένα τοπικά ομοιόμορφο περιβάλλον, μέχρις ότου μια υπολογίσιμη συσσώρευση βιομάζας και μεταβολιτών, προκαλέσει μαζικές χημικές αλλαγές. Και μια τέτοια αλλαγή είναι και μια πτώση στο pH, που οι διακυμάνσεις του άλλωστε είναι το κύριο θέμα της παρούσας εργασίας. Η υδατική φάση των τροφών είναι αυτή που συνηθέστερα δομείται. Είναι γνωστό ότι βακτήρια που αναπτύσσονται σε υδατικές φάσεις διαφέρουν στην ευαισθησία τους σε αντιμικροβιακά σκευάσματα, στον ενεργειακό μεταβολισμό και στα τελικά μεταβολικά προϊόντα.

Πως η δομή της τροφής επηρεάζει τη συμπεριφορά των μικροοργανισμών;

Αυτό διαφέρει τόσο από το είδος της τροφής, όσο και της δομής (κατεργασίας που έχει υποστεί). Υπάρχει ένας αριθμός περιπτώσεων, όπου η δομή της τροφής φαίνεται να καταλήγει σε διαφορετική συμπεριφορά. Πάντως οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται πιο αργά σε δομημένα συστήματα και αυτό ισχύει και για τους χυμούς φρούτων¹².

Από όσα προαναφέρθηκαν, είναι ευκρινές ότι μια από τις επιδράσεις – κλειδιά, είναι η ακινητοποίηση των μικροοργανισμών και η προκύπτουσα ανάπτυξη τους ως αποικίες. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τοπικές αλλαγές στη συγκέντρωση των υποστρωμάτων και ειδικά σε μια τοπική συσσώρευση όξινων μεταβολικών τελικών προϊόντων που οδηγούν σε μείωση του pH μέσα και γύρω από την αποικία με βαθμίδωση pH που εκτείνεται σε όλο το τροφικό περιβάλλον.

Η τοπική μείωση του pH είναι μεγαλύτερη από την αλλαγή που απαιτείται για να προκληθεί μια απόκριση ανοχής σε οξύ. Η απόκριση αυτή αποδίδεται σε de novo σύνθεση πρωτεϊνών, ή σε από πρόθεση μετατροπή του εξωκυττάριου pH. Τέτοιες βιοχημικές αλλαγές αποδίδουν σαφώς αντοχή στα οξέα στους οργανισμούς. Τα όξινα μεταβολικά προϊόντα έχουν ευθεία επίδραση στο τοπικό pH.

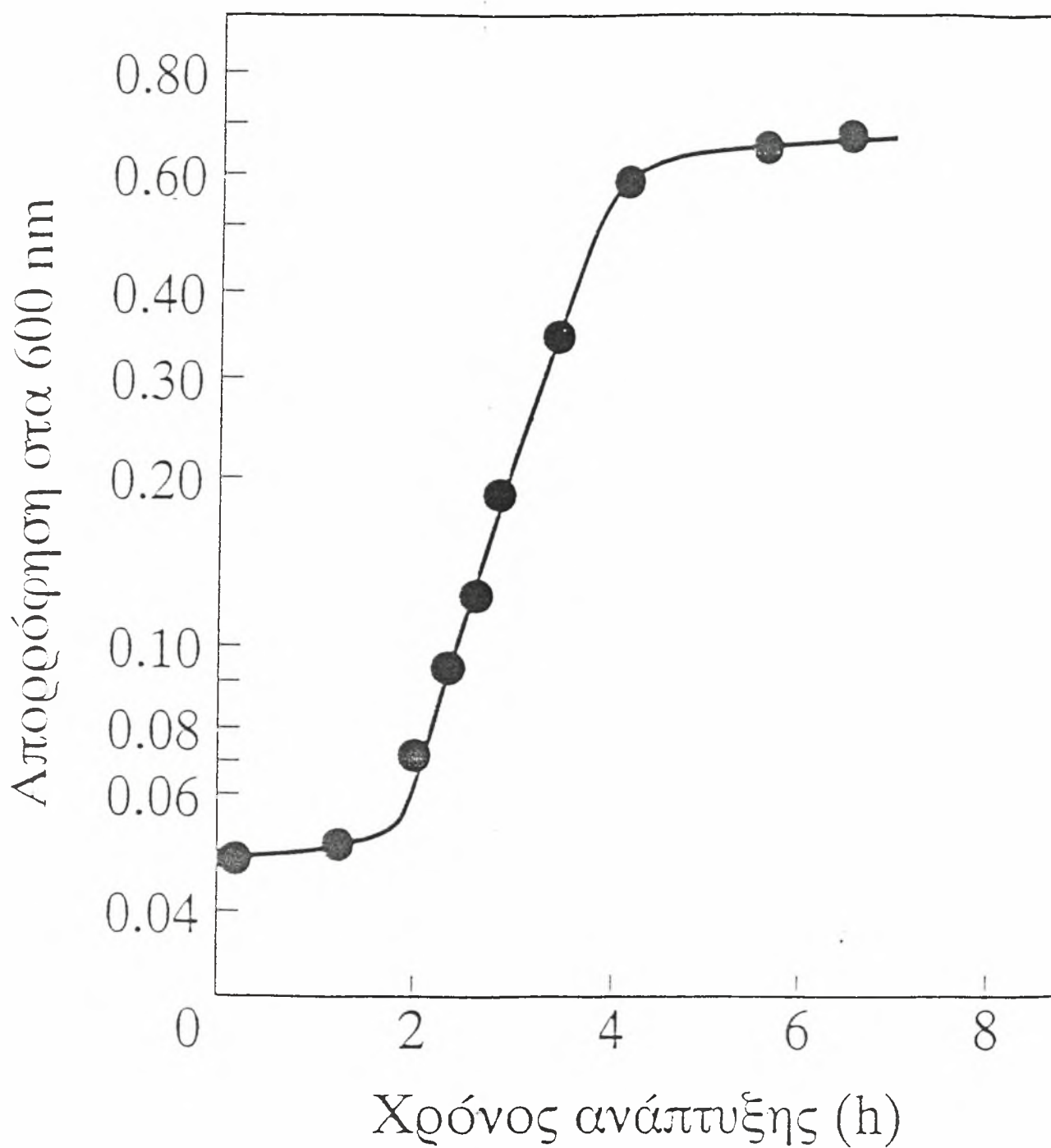
Χρησιμοποιώντας μια μέθοδο είναι δυνατό να δούμε τις τοπικές αλλαγές στο pH. Για υδατικά διαλύματα μπορούμε να επιλύσουμε τη διαφορική σχέση σε κάθε μοντέλο που θα χρησιμοποιήσουμε.

Η επιβίωση της *Escherichia coli* στο χυμό μήλου

Ιστορικά, οι χυμοί φρούτων δεν έχουν θεωρηθεί ως μέγιστος μικροβιακός κίνδυνος για την υγεία, χάρη στο χαμηλό τους pH και στα υψηλά επίπεδα οργανικών οξέων. Το pH των φρέσκων μήλων κυμαίνεται από 2,9 έως 5,1 εξαρτώμενο, όπως προαναφέρθηκε, από την ποικιλία και το χρόνο συγκομιδής.

Το pH του χυμού μήλου, εξαρτάται από την ανάπτυξη χυμών (προφανώς από διάφορες ποικιλίες μήλων), αλλά συνήθως είναι 3,3 – 3,4.

Αν και το pH δεν είναι υψηλό, ωστόσο δεν είναι σπάνιες οι φορές που υπήρξε ένας απρόσμενος αριθμός εμφανίσεων αλλοιωμένων χυμών, οφειλόμενες στην *Escherichia coli*. Υπάρχει μια ποικιλία παραγόντων [στέλεχος, σύνθεση του χυμού, συγκέντρωση οργανικών οξέων, pH, ρυθμός (ταχύτητα) κατάψυξης και συνθήκες τήξης] που επηρεάζουν την επιβίωση του *E. coli* O157:H7. Το pH είναι στους παράγοντες που σχετίζονται άμεσα¹³.



Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων E.coli.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ³

Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες (ή υδατικές φάσεις τροφών). Τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται σε ένα τέτοιο σύστημα, μέχρις ότου κάποιοι παράγοντες εξαφανιστούν. Παράγονται προϊόντα σε συγκέντρωση που παρεμποδίζεται η περαιτέρω ανάπτυξη, ή φθάνει ο αριθμός των κυττάρων το σημείο που δεν υπάρχει πλέον διαθέσιμος χώρος για να καταληφθεί από τα νέα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των κυττάρων, τα διάφορα συστατικά του κυττάρου μεταβάλλονται ποικιλοτρόπως. Πριν τη διαίρεση, τα κύτταρα αλλάζει μέγεθος.

Στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, όπως φαίνεται στο σχήμα της σελ. 11, τα κύτταρα αυξάνονται με μεγάλη ταχύτητα. Η συγκέντρωση του RNA αυξάνει ταχύτατα, καθώς και ο ρυθμός της πρωτεϊνικής σύνθεσης.

Η ταχύτητα με την οποία ένας μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται, εκφράζεται είτε με το χρόνο διπλασιασμού (dt, doubling time), είτε με την ταχύτητα ανάπτυξης (μ , growth rate), που είναι η ταχύτητα σύνθεσης των καινούριων πρωτεϊνών που συντίθενται, εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους των κυτταρικών ουσιών που υπάρχουν.

Η τιμή μ ποικίλλει, γιατί η συγκέντρωση των συστατικών στις καλλιέργειες (ή υδατικές φάσεις) δεν είναι σταθερή.

Δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις αερόβιων μικροοργανισμών, όπου η ταχύτητα παροχής O_2 κατευθύνει την ταχύτητα ανάπτυξης.

Οι παράγοντες που καθορίζουν τη μέγιστη ταχύτητα ανάπτυξης ενός οργανισμού, ποικίλουν από οργανισμό σε οργανισμό και συχνά είναι άγνωστοι.

Ίσως να είναι η ταχύτητα σύνθεσης του DNA, η ταχύτητα με την οποία κάποια ουσία εισέρχεται στα κύτταρα, ή η ταχύτητα βιοσύνθεσης και οργάνωσης κάποιων στοιχείων του κυττάρου, όπως το κυτταρικό τοίχωμα. Ο χρόνος διπλασιασμού μπορεί να είναι 10 λεπτά, ή και ώρες. Τα περισσότερα βακτήρια έχουν χρόνο διπλασιασμού 30 λεπτά.

Escherichia coli⁴

Αποτελεί το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας των Εντεροβακτηριακών.

Αποτελεί το τυπικό μοντέλο για μελέτες μοριακής βιολογίας, γενετικής, φαινομένων αντοχής στα αντιβιοτικά, πλασμιδιακών μελετών και ενζυμολογίας. Αποικίζει τον εντερικό σωλήνα των ανθρώπων. Ορισμένα στελέχη προκαλούν μεγάλη ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων.

Μορφολογία

Είναι Gram αρνητικό, άσπορο βακτηρίδιο με πάχος 0,5 μm και μήκος 1-5 μm. Τα κύτταρά του μερικές φορές παίρνουν μορφή κολοβακτηριδίου και άλλοτε νηματοειδή. Είναι περίτριχο κινητό μικρόβιο, υπάρχουν όμως και ακίνητα στελέχη. Παράγει ένα πολύ λεπτό έλυτρο που στα ακίνητα στελέχη είναι παχύτερο.

Αντιγονική δομή

Οι κυριότερες ομάδες αντιγόνων με τις οποίες διαχωρίζονται σε ορότυπους είναι:

1. Σωματικά αντιγόνα –O (160 τύποι).
2. Βλεφαριδικό αντιγόνο –H (60 τύποι).
3. Αντιγόνα ελύτρου ή K αντιγόνα (100 τύποι). Με τα τρία αυτά αντιγόνα O, K και H, προσδιορίζεται το αντιγονικό φάσμα της E. coli, π.χ. O26:K40:H12.

Οικολογία

Η E. coli αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της αερόβιας φυσιολογικής χλωρίδας του εντέρου των ανθρώπων. Χρησιμοποιείται ως μικροβιακός δείκτης για τον έλεγχο μόλυνσης του πόσιμου νερού και των τροφίμων από κόπρανα.

Παθογένεια

Είναι δυνητικό ή ευκαιριακά παθογόνο μικρόβιο. Προκαλεί εντερικές ή εξωεντερικές λοιμώξεις. Χαρακτήρες παθογονικότητας εκτός από τον λιποπολυσακχαρίτη και τι K-αντιγόνο, είναι η παραγωγή εντεροτοξινών, αιμολυσινών, προσκολλησινών, τοξικών αντιγονικών ουσιών.

Παθογόνος δράση

Η E. coli προκαλεί: γαστρεντερίτιδα, πνευμονία, μηνιγγίτιδα στα νεογνά, ουρολοιμώξεις, σηψαιμία, σηπτική αρθρίτιδα, λοιμώξεις του δέρματος και των

μαλακών μορίων, ενδοκοιλιακά αποστήματα, περιτονίτιδα, αποστήματα εγκεφάλου, ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα.

Ανοχή στα οξέα της *Escherichia coli* O157:H7 και επιβίωσή της στον χυμό του μήλου¹⁰

Ξεσπάσματα διάρροιας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου έχουν συσχετιστεί με την κατανάλωση μηλίτη και χυμού μήλου. Ο οργανισμός που εμπλέκεται σ' αυτά τα ξεσπάσματα είναι η *Escherichia coli* O157:H7, δείχνοντας την αντίσταση αυτού του ορότυπου στο όξινο pH.

Συγκρίνοντας την ανάπτυξη αυτού του ορότυπου με στέλεχος ελέγχου (μάρτυρα) της *E. coli*, βρέθηκε ότι το στέλεχος O157:H7 αυξανόταν καλά σε ζωμό σόγιας με θρυπτική σε επίπεδο pH που κυμαίνεται από 2,0 ως 9,0 ενώ τα στελέχη ελέγχου απέτυχαν να αναπτυχθούν σε επίπεδα pH κάτω από 4,0 και πάνω από 9,0. Η ανάπτυξη και των δύο στελεχών ανεστάλη με την πρόσθεση 0,05%, είτε βενζοϊκού, είτε σορβικού οξέος. Τα στελέχη ελέγχου της *E. coli* απέτυχαν να αναπτυχθούν και στους δύο τύπους του χυμού μήλου. Έχειδειχθεί ότι στελέχη της *E. coli* O157:H7 ποικίλουν την ικανότητά τους να προσαρμόζονται σε χαμηλό pH και να επιβιώνουν σε χυμό μήλου.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν χυμοί μήλου και φράουλας.

Ο χυμός μήλου είχε την εμπορική ονομασία 'Amita' και παρασκευάστηκε στην Ελλάδα για την εταιρεία 'HELLENIC BOTTLING COMPANY S.A., FRAGOKLISIAS STR, 15125 MAROUSSI, GREECE'. Ο χυμός περιείχε:

ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ/100ml		% της ΣΗΠ ανά μερίδα 330ml
NUTRITIONAL INFORMATION/100ml		% of RDA per portion 330ml
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	11,2g	
CARBOHYDRATES		
ΕΝΕΡΓΕΙΑ	45,8Kcal	
ENERGY		
ΕΝΕΡΓΕΙΑ	194,65Kj	
ENERGY		
ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	0,25g	
PROTEINS		
ΛΙΠΙΑ	0,0g	
FAT		
ΒΙΤΑΜΙΝΗ C	7,3mg	40%
VITAMIN C		

Ο χυμός φράουλας είχε την εμπορική ονομασία «Ασπίς» και παρασκευάστηκε για την 'ASPIS S.A. G. DE. DES.'. Τα συστατικά του ήταν νερό, χυμός φράουλας 20%, ζάχαρη, μέσο οξίνισης, κιτρικό οξύ, φυσικές αρωματικές ουσίες.

Αμφότεροι οι χυμοί έφεραν την ένδειξη «χωρίς συντηρητικά».

Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκαν 20ml χυμού μήλου και έγινε μέτρηση pH. Ακολούθησε προσθήκη HCl (0,15M) και μετά από κάθε προσθήκη γινόταν μέτρηση. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε με NaOH (0,099M).

Αποφασίστηκε να συνεχιστεί η πειραματική διαδικασία μόνο με NaOH, γιατί η προσθήκη του NaOH επέφερε μεταβολές του pH αξιοσημείωτες και μετρήσιμες.

Αντίθετα, η προσθήκη του HCl δεν πέτυχε να μεταβάλλει το pH σχεδόν καθόλου. Το pH του χυμού από 3,56 έφτασε το 3,18 μετά από 40ml HCl. Γρήγορα η μέθοδος εγκαταλείφθηκε ως μη δόκιμη για την ανάπτυξη της μεθόδου που μας ενδιέφερε.

Παρασκευάζονταν πρότυπα διαλύματα NaOH (0,1 M) κάθε 15 ημέρες.

Ανοίχτηκαν δύο χυμοί μήλου A, B και δύο χυμοί φράουλας A, B. Οι χυμοί A έμεναν στο ψυγείο ανοιχτοί, ενώ οι χυμοί B έμεναν ανοιχτοί στον πάγκο εργασίας. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, οι χυμοί διατηρήθηκαν στη συσκευασία τους.

Οι μετρήσεις γίνονταν σε τακτά διαστήματα. Οι χυμοί B εκτέθηκαν σε θερμοκρασίες υψηλότερες της θερμοκρασίας δωματίου, περίπου στους 35°, δεδομένου ότι τα πειράματα διεξάγοντο κατά τη διάρκεια του θέρους.

Μετά το πέρας των εργασιών και τη λήψη των πρώτων αποτελεσμάτων, επαναλήφθηκαν τα πειράματα σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας για τα σκευάσματα που θα έμεναν στον πάγκο εργασίας. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία ήταν 21° - 24°C και κάποτε έφθασε τους 15°C.

Σ' αυτή τη δεύτερη φάση του πειράματος, ανοίχτηκαν 4 χυμοί ΜΗΛΟΥ A₂, B₂, Γ, Δ και 3 χυμοί φράουλας. Οι χυμοί A₂ διατηρήθηκαν στο ψυγείο στη συσκευασία τους. Οι χυμοί B₂ έμειναν στον πάγκο ανοιχτοί στη συσκευασία τους επίσης, ενώ οι χυμοί Γ έμειναν ανοιχτοί στον πάγκο ζέσεως εκτεθειμένοι. Ο χυμός μήλου Δ ανοίχτηκε και τοποθετήθηκε σε γυάλινο δοχείο, κλειστό.

Οι χυμοί μήλου ονομάστηκαν ΜΗΛΟ A₂, ΜΗΛΟ B₂, ΜΗΛΟ Γ και ΜΗΛΟ Δ. Οι αντίστοιχοι χυμοί φράουλας ονομάστηκαν Φράουλα A₂, Φράουλα B₂, Φράουλα Γ και Φράουλα Δ. Οι μετρήσεις στους χυμούς A₂ και B₂ γίνονταν σε τακτά διαστήματα. Οι μετρήσεις ήταν καθημερινές στους χυμούς Γ και Δ.

Τέλος, ανοίχτηκαν δύο ακόμη χυμοί που ονομάστηκαν ΜΗΛΟ Ε και Φράουλα Ε. Οι χυμοί τοποθετήθηκαν σε ψυγείο σε ποτήρι ζέσεως ανοιχτοί και οι μετρήσεις ήταν εβδομαδιαίες.

Η διαδικασία ήταν η ίδια κάθε φορά. Λαμβάνονταν 20ml χυμού σε ποτήρι ζέσεως μετά από καλή ανάδευση. Ακολουθούσε μέτρηση του pH. Στη συνέχεια ακολουθούσε προσθήκη NaOH και γινότανε μέτρηση pH.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΔΕΙΓΜΑ 1 Διατήρηση χυμού στους 5°C.

Ο χυμός μήλου Α παραμένει ανοιχτός στο ψυγείο στη συσκευασία του.

Το pH του χυμού είναι 3,5.

Το pH του NaOH 0,099M βρέθηκε 12,82.

Προστίθενται 2ml NaOH κάθε φορά και ακολουθεί μέτρηση του pH. Παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του pH ήταν σταθερή ως τα 8ml NaOH. Προσθήκη άνω του παραπάνω όγκου οδηγεί όπως φαίνεται στο σχήμα 1, σε μια απότομη μεταβολή του pH που φτάνει περίπου την τιμή 9. Ακολουθεί πλατώ και αλεπάλληλη προσθήκη NaOH επηρεάζει ελάχιστα το pH.

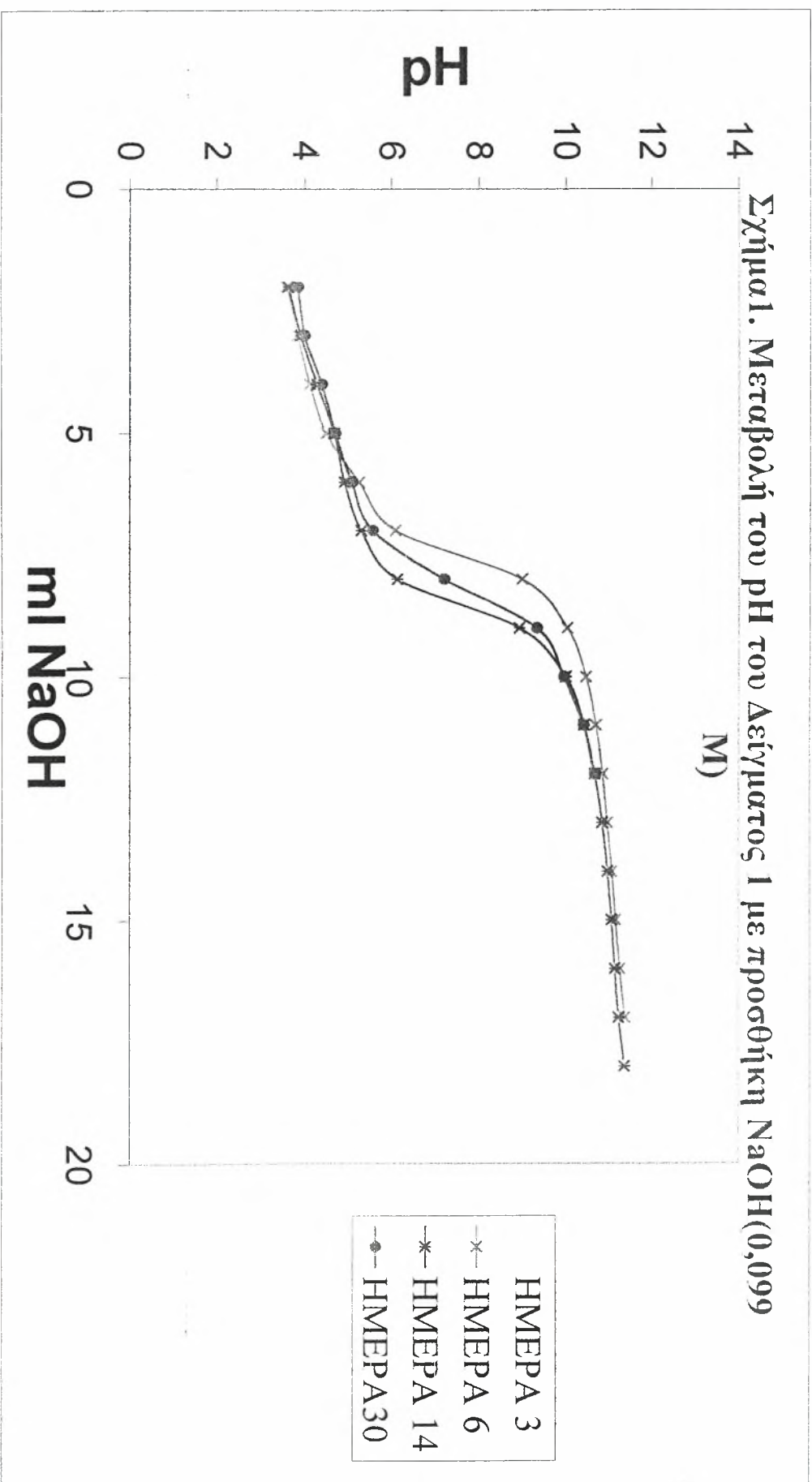
Στις μέρες που ακολουθούν ο χυμός παρουσιάζει την ίδια παρόμοια συμπεριφορά ως προς την ανταπόκρισή του στο NaOH.

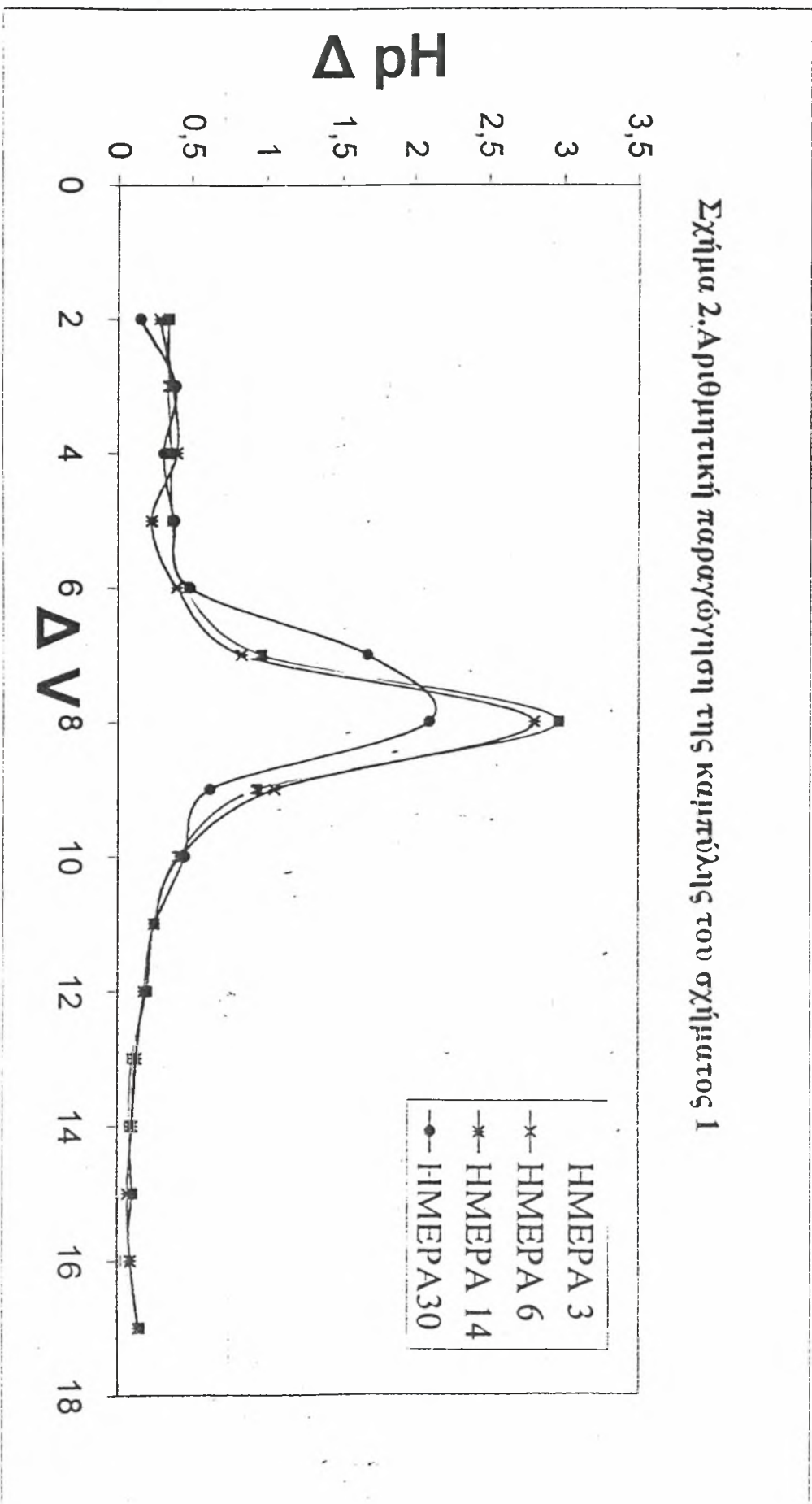
Οι αλλοιώσεις βέβαια είναι εμφανείς. Το χρώμα του σκουραίνει πολύ νωρίτερα από την επίδραση του NaOH και η δυσώδης οσμή γίνεται εντονότερη.

Ωστόσο, χρειάζεται πάντα ο ίδιος όγκος NaOH για να μεταβληθεί θεαματικά το pH.

Καθώς οι μέρες περνούν και ο χυμός παραμένει ανοιχτός, η απότομη αύξηση του pH παρατηρείται σταδιακά σε συντομότερο χρόνο. 30 ημέρες αργότερα η αύξηση του pH παρατηρείται μετά από προσθήκη 7ml NaOH (0,099M).

Στις καμπύλες του σχήματος 1 εφαρμόστηκε η διαφορική μέθοδος, όπως φαίνεται στο σχήμα 2. Αν και ο χυμός παρέμεινε μέρες ανοιχτός, αυτό δεν επηρέασε το pH, αφού οι μετρήσεις δεν έχουν διαφορές.





ΔΕΙΓΜΑ 2 Θερμοκρασία διατήρησης 30 - 33°C.

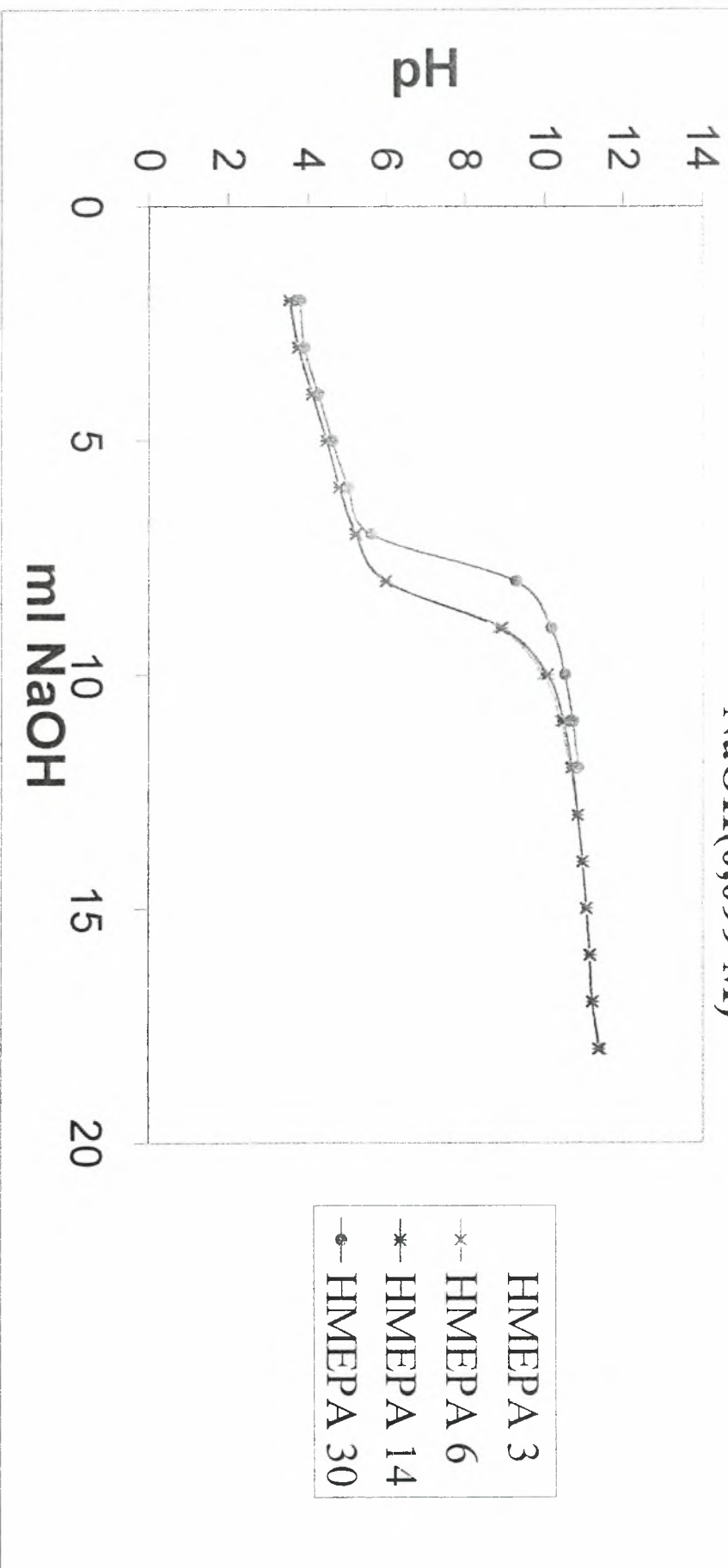
Ο χυμός μήλου Β που παραμένει ανοικτός στον πάγκο. Η συμπεριφορά του, αν και εκτέθηκε σε τελείως διαφορετικές συνθήκες, δεν παρουσίασε εντυπωσιακή διαφορά, συγκρινόμενη με αυτή του προηγούμενου χυμού. Η αύξηση του pH σημειώνεται μετά από προσθήκη 7ml NaOH. Βέβαια, ο χυμός παρουσιάζει αλλοιώσεις. Η οσμή είναι δυσάρεστη, το χρώμα σκουραίνει ωρύτερα απ' αυτό του χυμού Α.

Βέβαια, μετά από αξιοσημείωτο χρόνο 30 ημερών, χρειάστηκαν 3ml NaOH για να μεταβληθεί το pH.

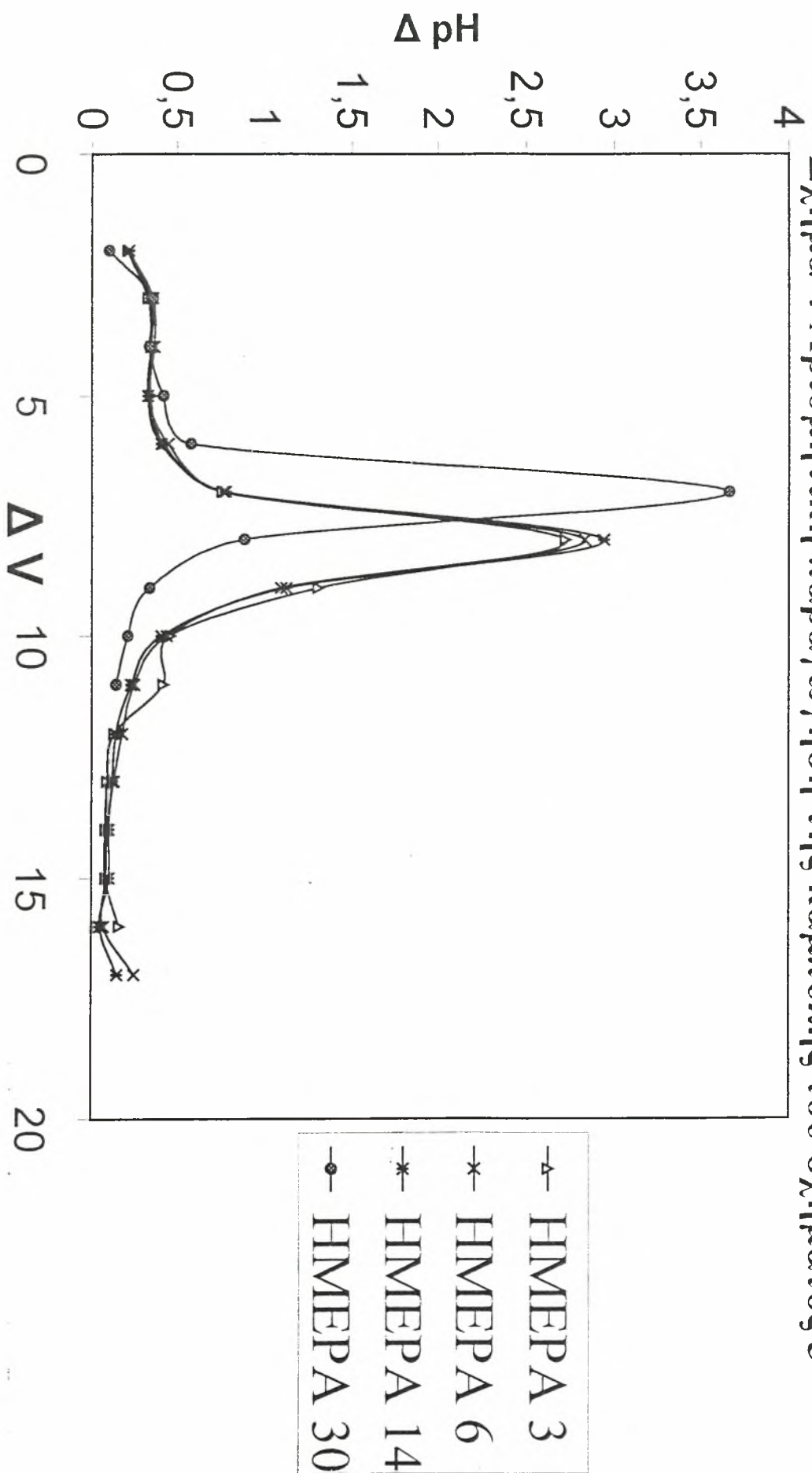
Σίγουρα ήταν αναμενόμενη μια διαφορετική συμπεριφορά του χυμού. Έτσι ο χυμός παρέμεινε για περισσότερο χρόνο στον πάγκο. Πράγματι, χρειάστηκαν μόλις 3ml NaOH για να σημειωθεί μια αξιοπρόσεκτη μεταβολή στο pH. Αυτό έγινε την 30^η ημέρα από αυτή που ανοίχτηκε ο χυμός. Υπενθυμίζεται ότι ο χυμός του ψυγείου μετά από το ίδιο χρονικό διάστημα χρειάστηκε 9ml NaOH.

Η συμπεριφορά του χυμού φαίνεται παραστατικά στο σχήμα 3. Στις καμπύλες του σχήματος εφαρμόστηκε και πάλι η διαφορική μέθοδος, όπως φαίνεται στο σχήμα 4. Η αλλοίωση του χυμού δεν είναι εμφανής μέσα στις πρώτες 30 ημέρες. Το πείραμα συνεχίστηκε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (χυμός μήλου Β₂, Δείγμα 6).

Σχήμα 3. Μεταβολή του pH του Δείγματος 2 με προσθήκη NaOH(0,099 M)



Σχήμα 4 Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 3



ΔΕΙΓΜΑ 3 Θερμοκρασία διατήρησης 5°C.

Ο χυμός φράουλας Α που παραμένει ανοικτός στο ψυγείο στη συσκευασία του. Από την αρχή έγινε αντιληπτό πως ο χυμός έχει ένα διαφορετικό προφίλ. Το αρχικό pH του χυμού είναι γύρω στο 2,9 – 3, σαφώς πιο χαμηλό από αυτό του μήλου. Χρειάζεται στην αρχή τουλάχιστον ο ίδιος όγκος NaOH για να μεταβληθεί το pH. Τώρα όμως η μεταβολή αυτή συνδυάζεται με ταυτόχρονη αλλαγή στο χρώμα. Το ροζ χρώμα του χυμού έγινε καφετί. Το ίδιο φαινόμενο συνεχίζεται. Μετά την παρέλευση 20 ημερών χρειάζεται λιγότερη ποσότητα NaOH για να επιτευχθεί η μεταβολή.

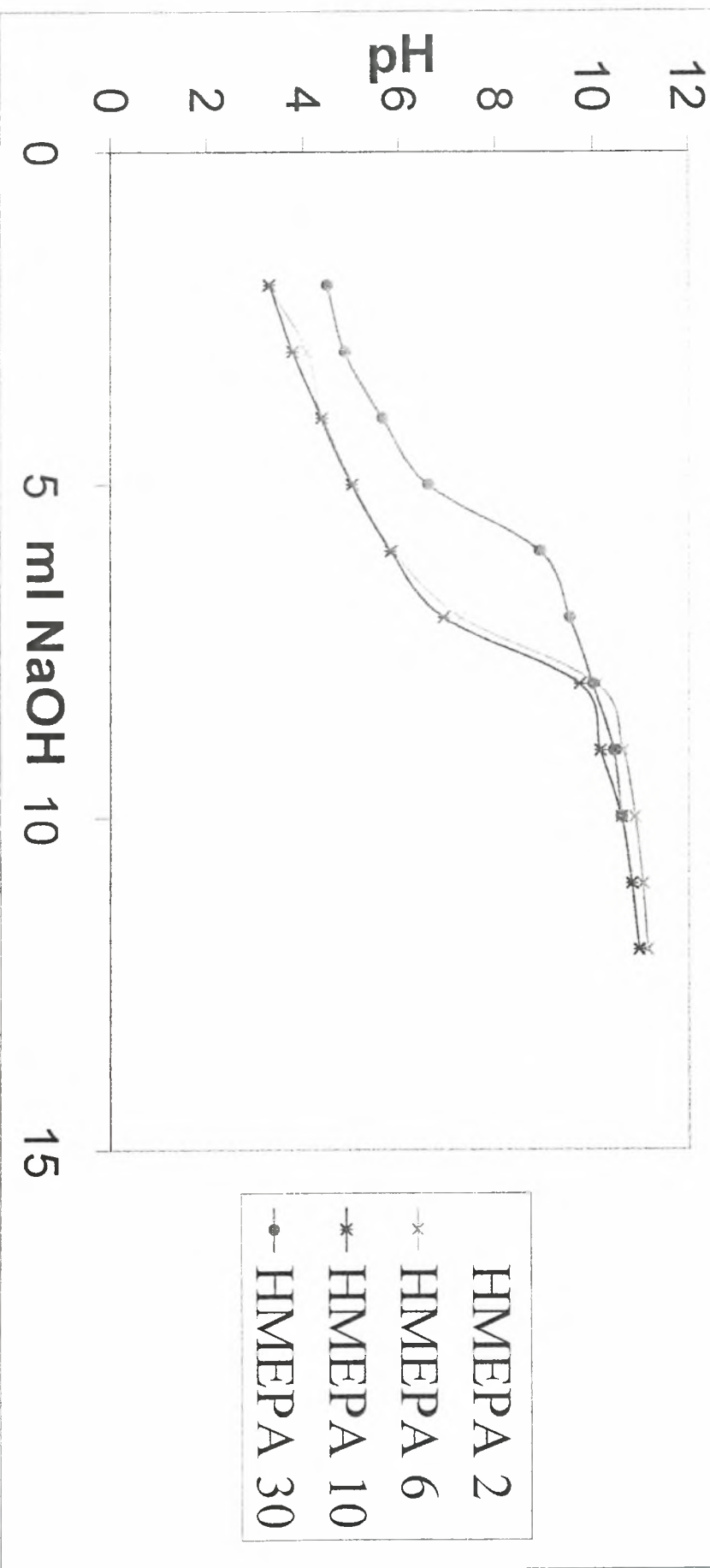
Ενώ στην αρχή ήταν απαραίτητα 7ml NaOH, την 30^η ημέρα 4ml ήταν αρκετά.

Μετά τη μεταβολή, η προσθήκη NaOH επηρέασε λίγο το pH του χυμού, αφού φτάνει σ' ένα συγκεκριμένο πλατώ.

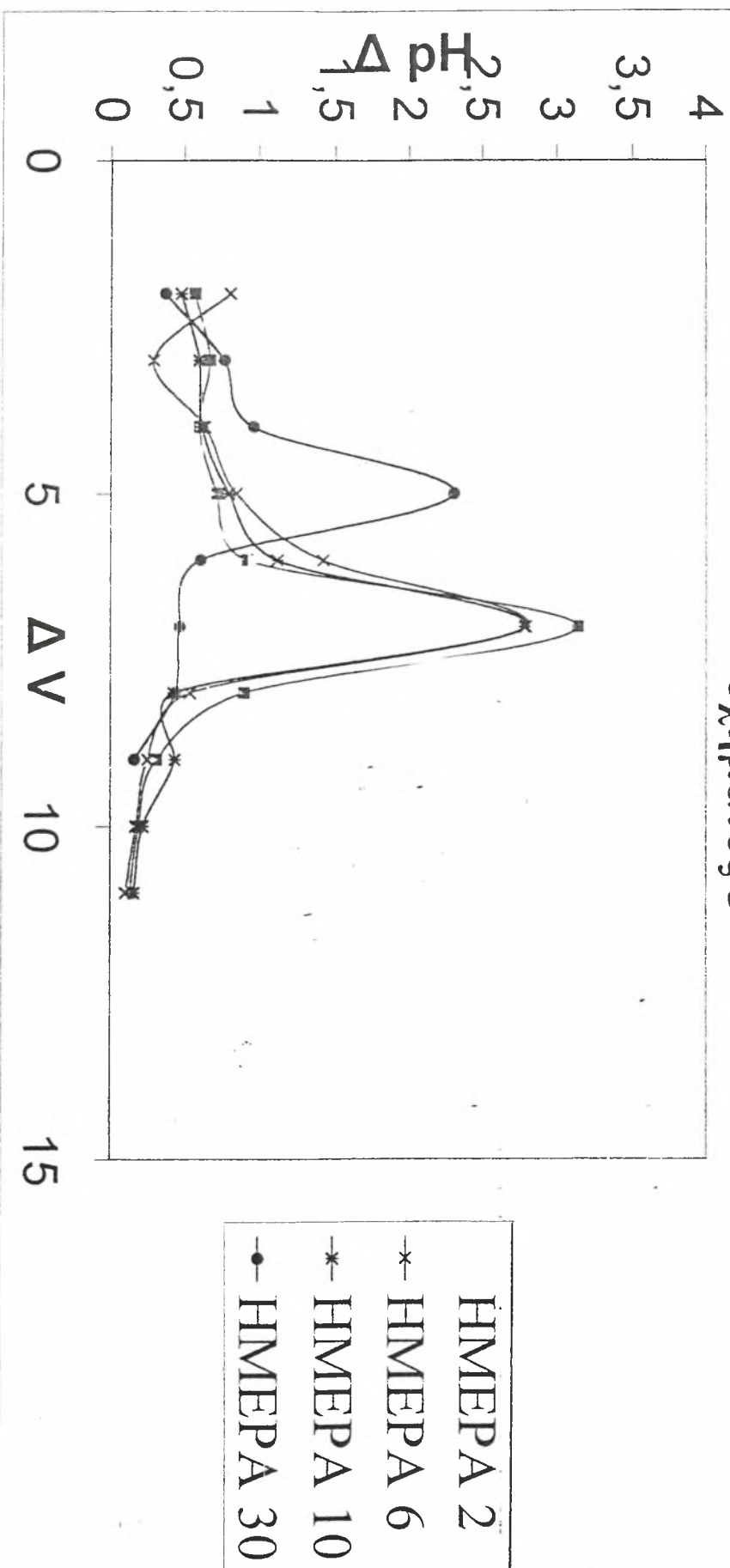
Τα διαγράμματα (σχήμα 5) δείχνουν με ευκρίνεια την πορεία του pH του χυμού και την ανταπόκρισή του στο NaOH.

Η διαφορική μέθοδος όπως φαίνεται στο σχήμα 6, κατέδειξε ότι η ταχύτερη μεταβολή του pH εμφανίστηκε ένα μήνα μετά το άνοιγμα του χυμού.

Σχήμα 5. Μεταβολή του pH του Δείγματος 3 με προσθήκη NaOH(0,099 M)



Σχήμα 6. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 5



ΔΕΙΓΜΑ 4 Θερμοκρασία διατήρησης 32,5 - 34°C.

Ο χυμός φράουλας Β που παραμένει ανοιχτός στον πάγκο στη συσκευασία του, σε θερμοκρασία 32,5 - 34°C.

Τις πρώτες ημέρες, η συμπεριφορά της και η αντίδραση στο NaOH είναι ανάλογη της φράουλας Α. Όσο όμως παραμένει στον πάγκο, τόσο περισσότερος V NaOH απαιτείται για να μεταβληθεί το pH.

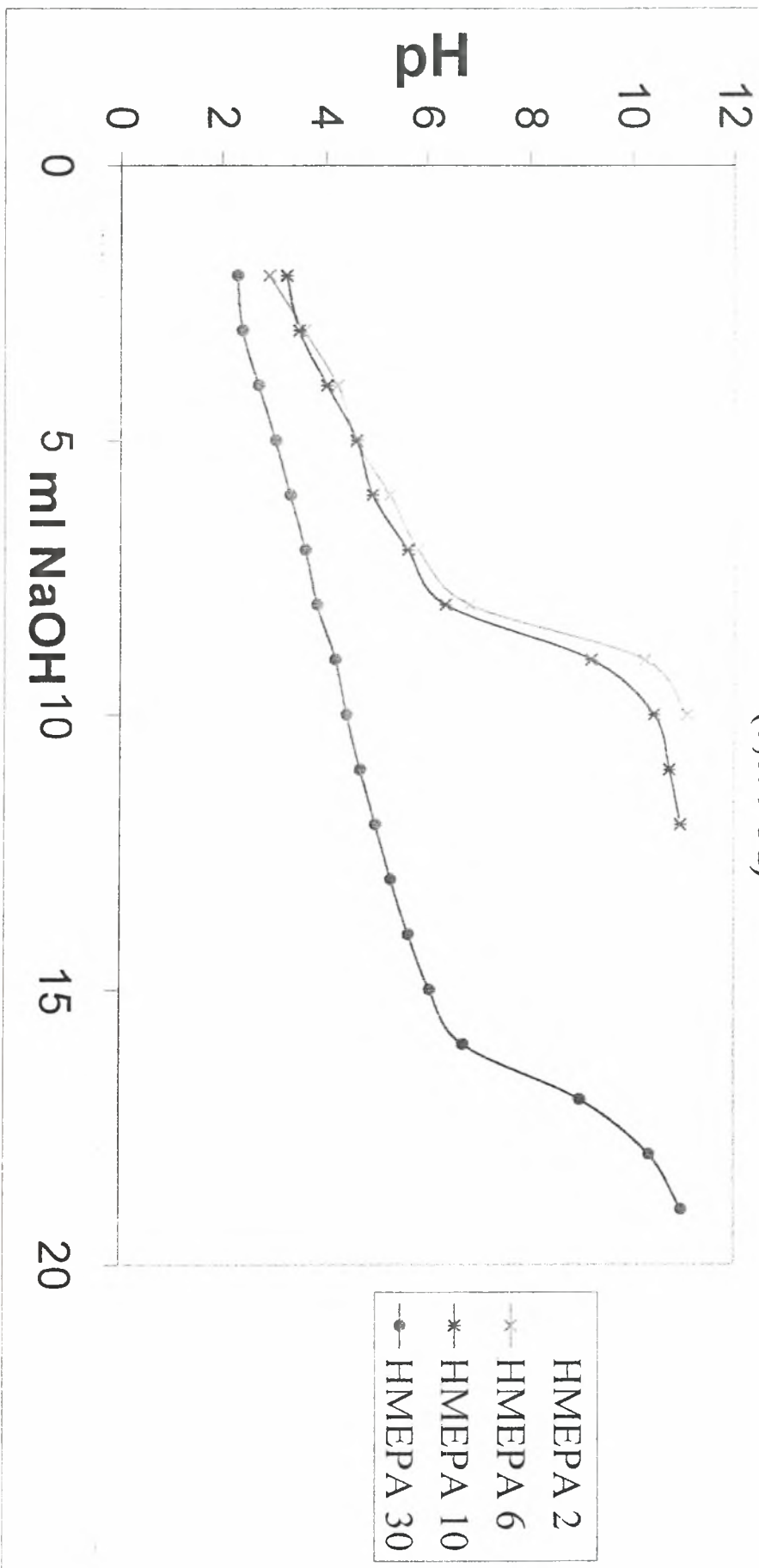
Πιο συγκεκριμένα, την 30^η ημέρα χρειάστηκαν 18ml NaOH για να αλλάξει θεαματικά το pH, ενώ στην αρχή χρειαζόνταν μόνο 9ml.

Συνέβη δηλαδή το αντίστροφο. Ενώ ο χυμός που διατηρείται στο ψυγείο είναι με την πάροδο του χρόνου πιο ευμετάβολος και «δεκτικός» στο NaOH, ο χυμός Β είναι πιο «ανθεκτικός».

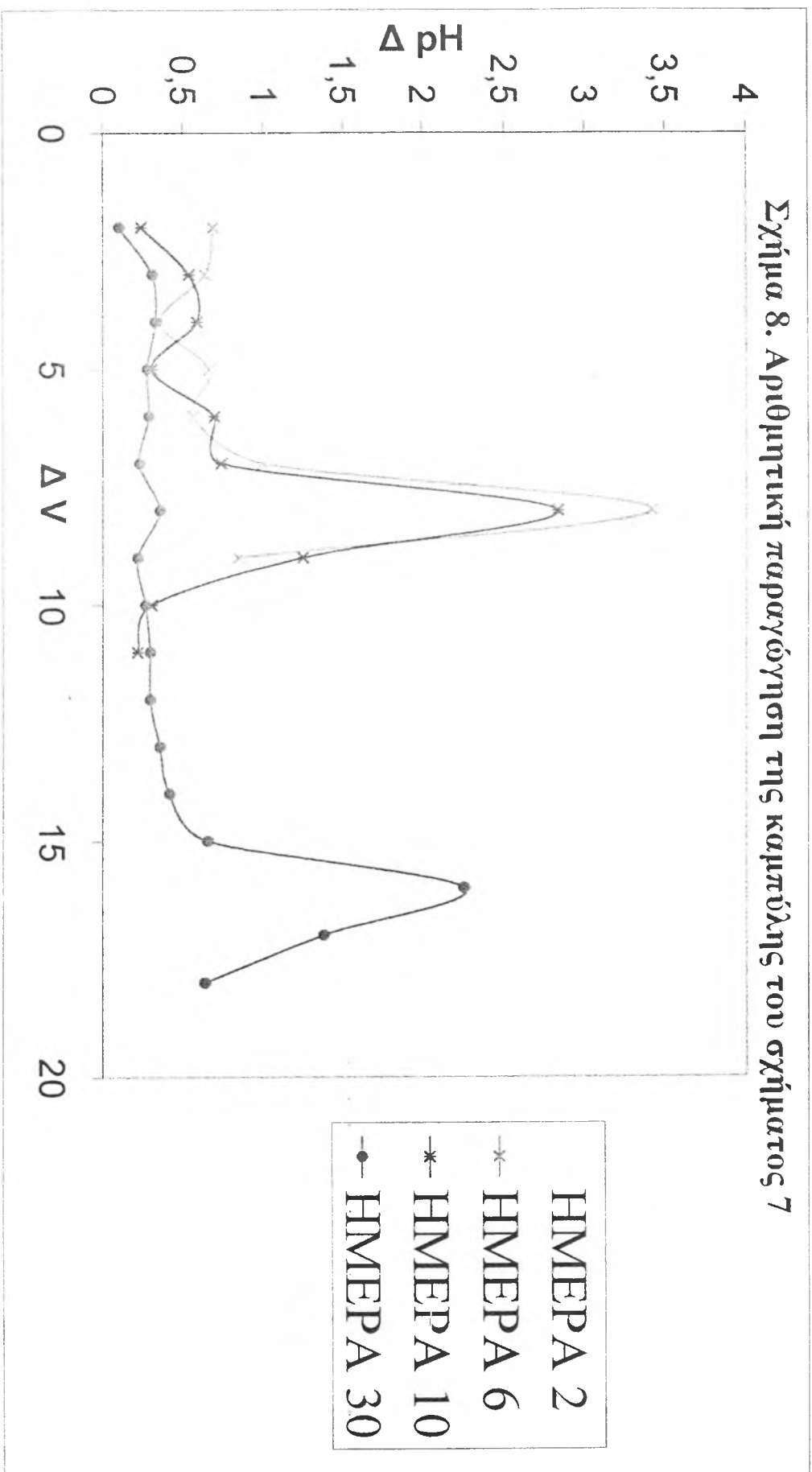
Στο χυμό Β επηρέασε αναμφίβολα η υψηλή θερμοκρασία και ευνοήθηκε περισσότερο η ανάπτυξη διαφορετικών μικροοργανισμών. Δεν είναι τυχαίο ότι η αρχική τιμή του pH στην τελευταία μέτρηση ήταν 2,29· μια τιμή ιδιαιτέρως χαμηλή.

Το σχήμα 7 δείχνει καθαρά αυτή τη συμπεριφορά του χυμού, ενώ η διαφορετική μέθοδος που εφαρμόστηκε, έκανε εμφανές ότι η πάροδος του χρόνου οδηγεί σε μεταβολή του pH με μεγάλη αύξηση του V του NaOH (σχήμα 8).

Σχήμα 7. Μεταβολή του pH του Δείγματος 4 με προσθήκη NaOH (0,099 M)



Σχήμα 8. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 7

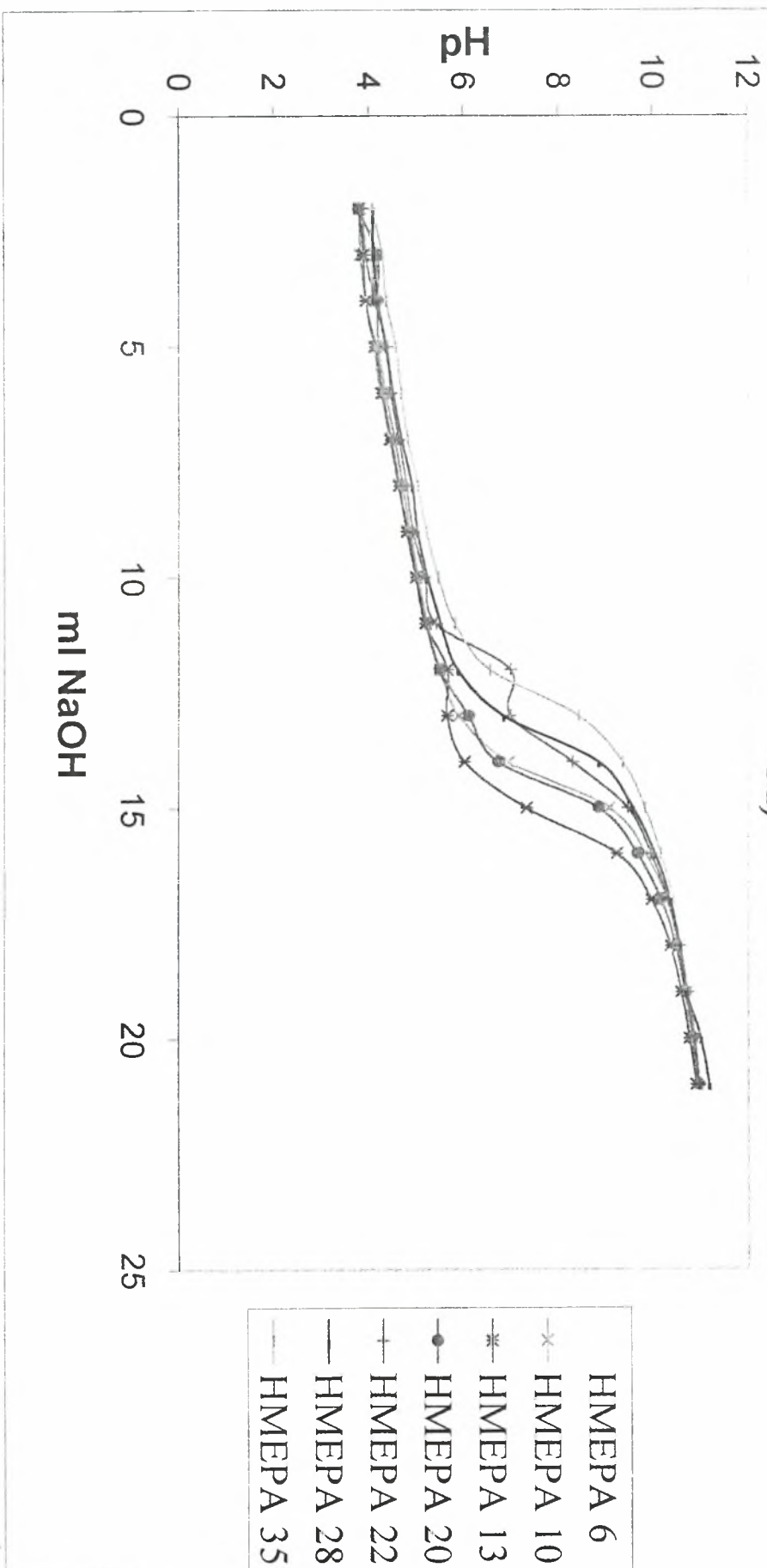


ΔΕΙΓΜΑ 5 Θερμοκρασία διατήρησης 5°C.

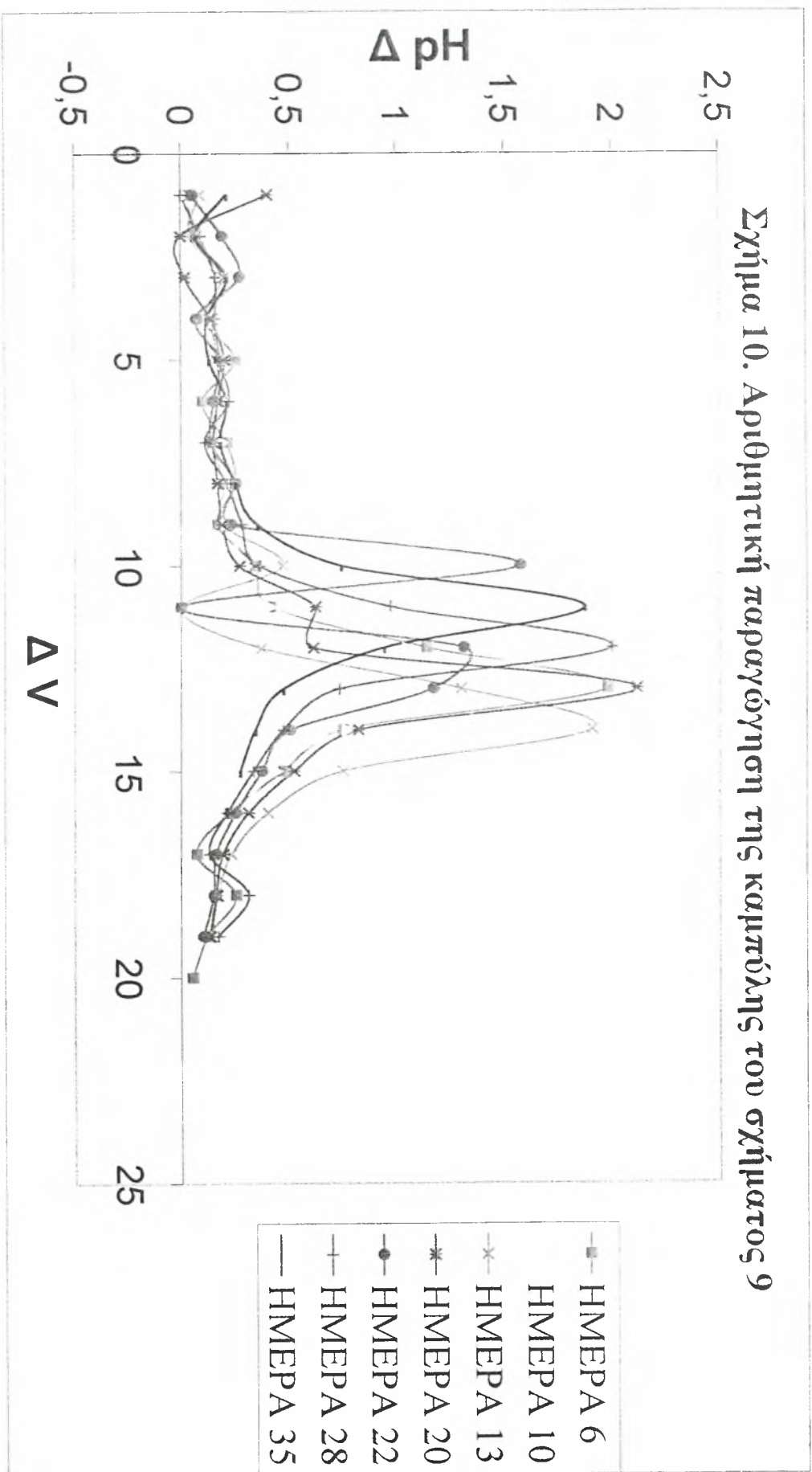
Ο χυμός μήλου A₂ παραμένει ανοικτός στη συσκευασία του στο ψυγείο. Στην ουσία, ο χυμός εκτίθεται στις ίδιες συνθήκες με το μήλο A. Αυτή τη φορά όμως, ο χυμός μελετήθηκε για περισσότερο χρονικό διάστημα. Περισσότερη ποσότητα οδηγεί σε απότομη αύξηση του pH. Αυτό συνεχίζεται για πολλές ημέρες. 35 ημέρες μετά ο χυμός αυξάνει το pH με προσθήκη 11ml NaOH. Το χρώμα του έχει γίνει ροζ, κάτι που είναι παράξενο, αφού κανένας άλλος χυμός δεν παρουσίασε τέτοια μεταβολή στο χρώμα. Οι μεταβολές δεν είναι βέβαια ιδιαίτερα μεγάλες και εντυπωσιακές.

Η συσκευασία του και η συντήρησή του στο ψυγείο προκαλούν μείωση στο ρυθμό αύξησης των οξέων. Ήταν αναμενόμενη αυτή η απόκριση του χυμού, αφού ήδη είπαμε την εμπειρία του ΜΗΛΟΥ A. Στο σχήμα 9 φαίνεται καλύτερα η πορεία του χυμού και η διαφορετική μέθοδος που εφαρμόστηκε κατέδειξε όσα προαναφέρθηκαν. Ο χυμός έχει μια ήπια συμπεριφορά, σχεδόν παρόμοια σε όλες τις μετρήσεις. Πρέπει να παρέλθει μεγάλο χρονικό διάστημα για να σημειωθεί μια διαφορετική μεταβολή.

Σχήμα 9. Μεταβολή του pH του Δείγματος 5 με προσθήκη NaOH (0,099 M)



Σχήμα 10. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 9



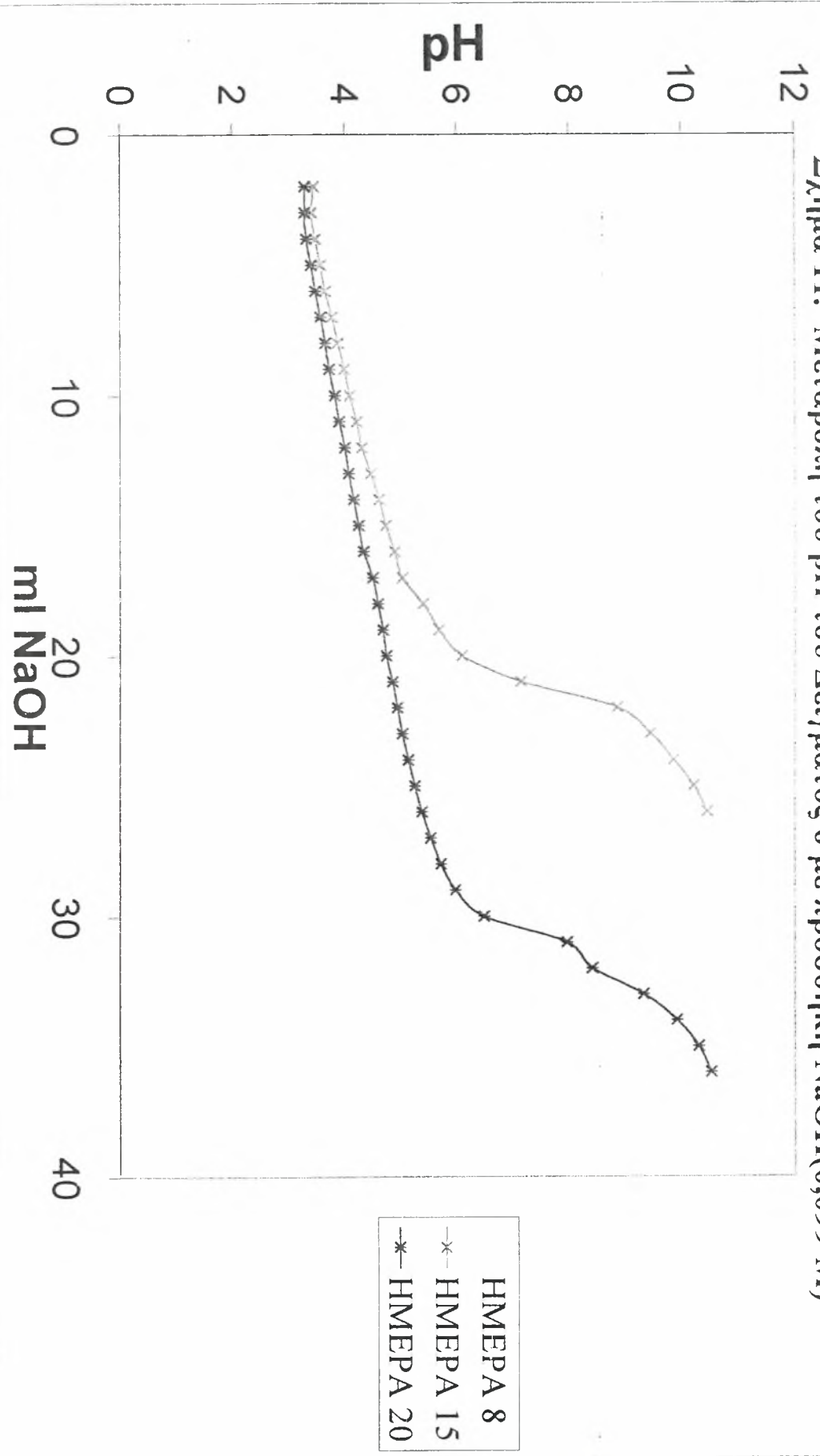
ΔΕΙΓΜΑ 6 Θερμοκρασία διατήρησης 15 - 22°C.

Ο χυμός μήλου B₂ παρέμεινε ανοικτός στη συσκευασία του στον πάγκο. Οι συνθήκες είναι ίδιες μ' αυτές του χυμού B. Αυτή τη φορά όμως, οι συνθήκες θερμοκρασίας είναι διαφορετικές. Τα πειράματα διεξάγοντο σε θερμοκρασίες 15 - 22°C και όχι 35 - 40°C, όπως στο χυμό B.

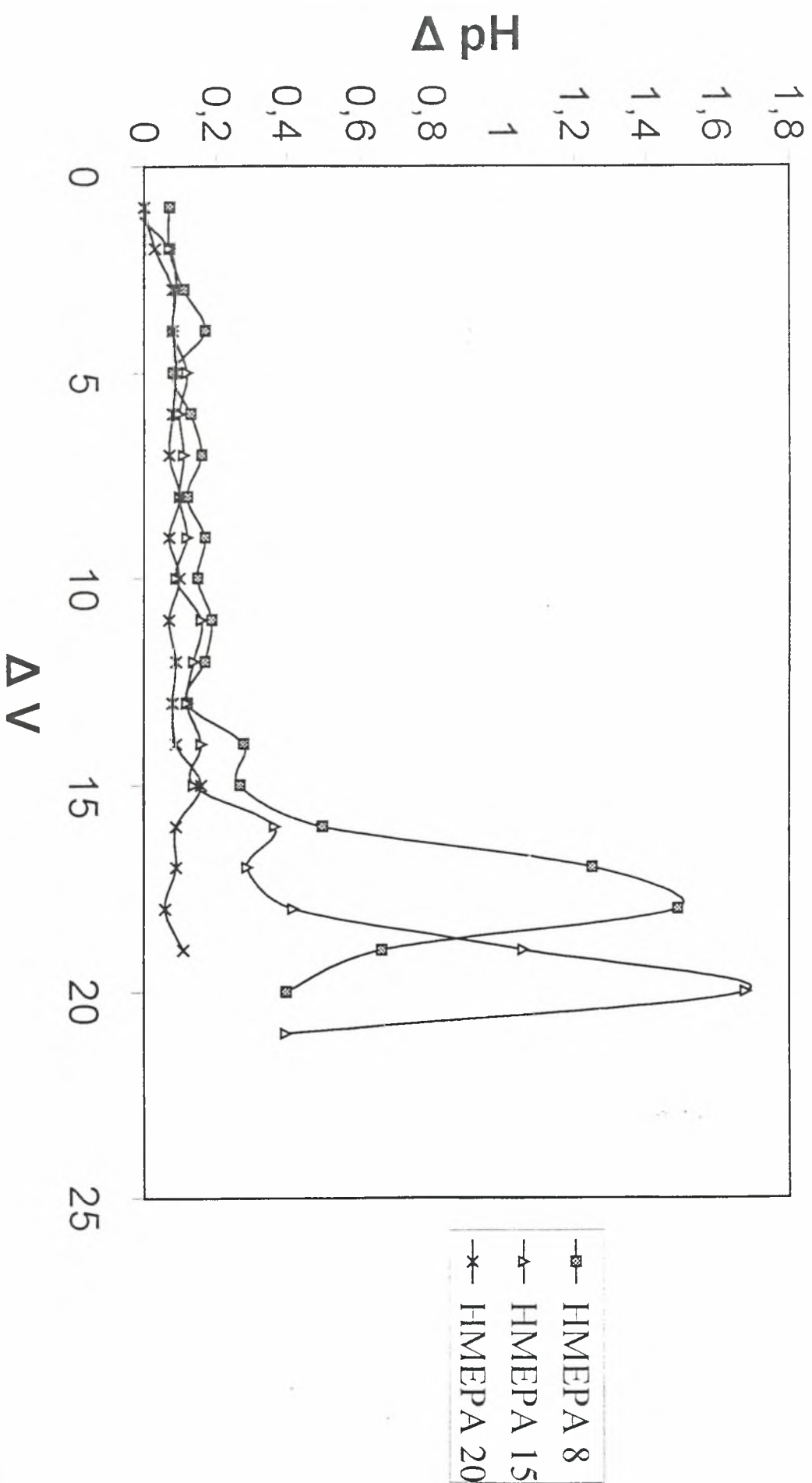
Στα σχήματα 11-13 και στις αντίστοιχες παραγωγίσεις, σχήματα 12, 14, φαίνονται οι μεταβολές στη συγκέντρωση των οξέων.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 11 απαιτείτο σταδιακά περισσότερο NaOH κάθε φορά. Όσο οι μέρες περνούν χρειάζονται περισσότερα ml NaOH για να επιτευχθεί μια μεγάλη μεταβολή στο pH. Την 8^η μέρα χρειάζονται 17ml NaOH, τη 15^η ημέρα 21ml. Την 35^η ημέρα χρειάζονται 31ml NaOH για το ίδιο αποτέλεσμα. Δηλαδή, τον διπλάσιο όγκο. Στην επόμενη μέτρηση, την 40^η ημέρα, χρειάζονται 51ml NaOH, ενώ την 45^η, 133ml (σχήμα 13-14).

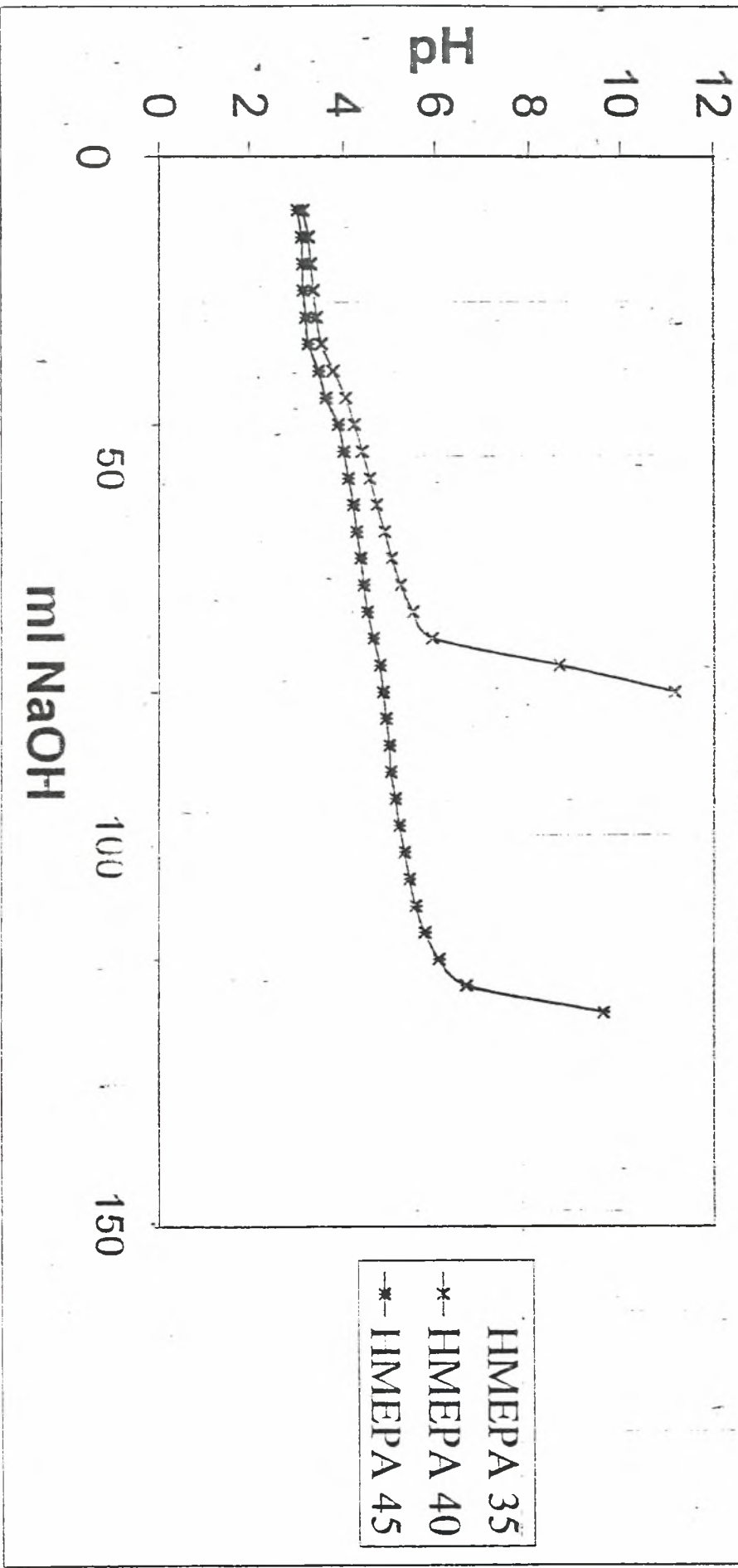
Σχήμα 11. Μεταβολή του pH του Δείγματος 6 με προσθήκη NaOH(0,099 M)



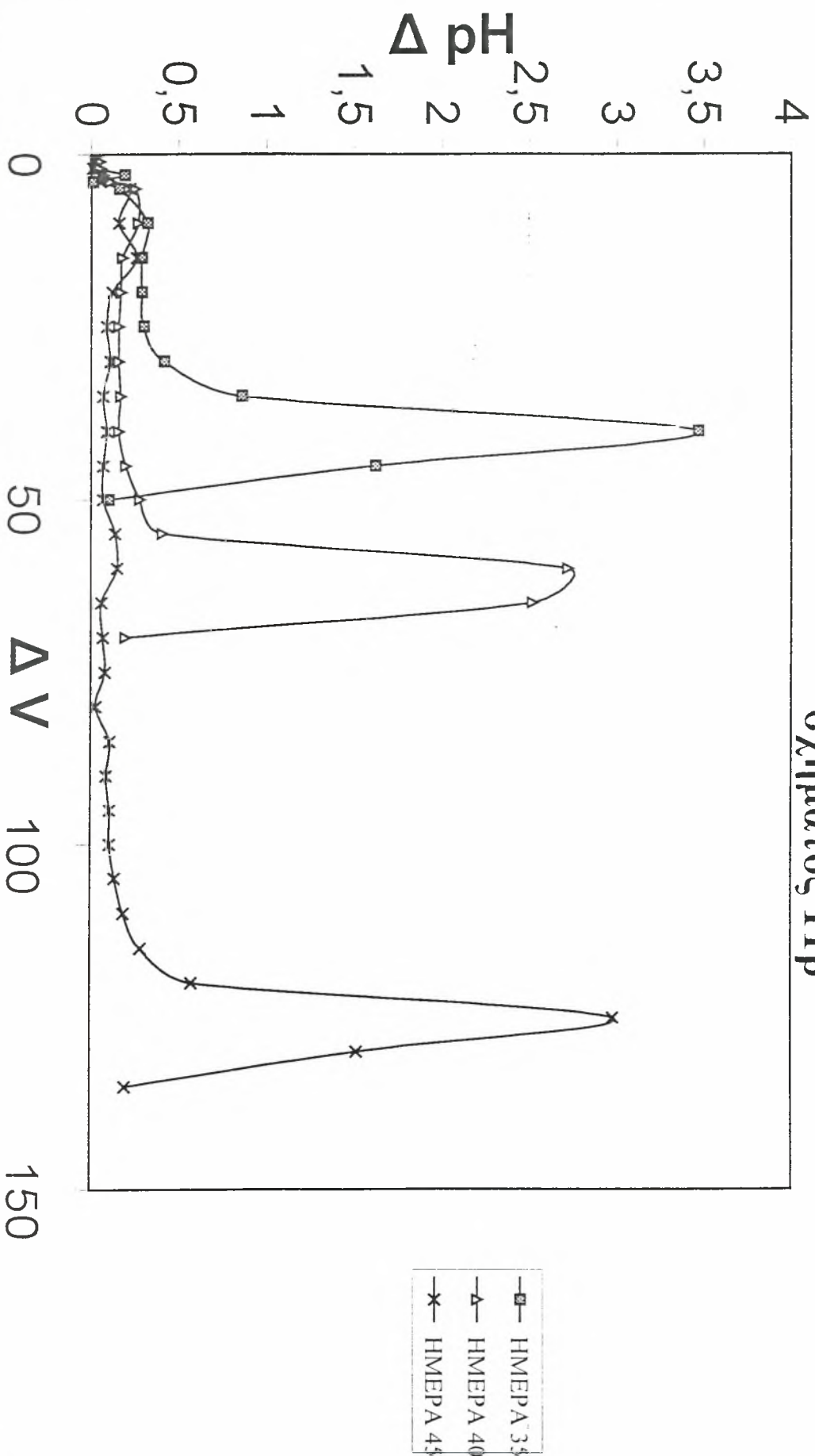
Σχήμα 12. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 11



Σχήμα 13. Μεταβολή του pH του Δεγμάτος 6 με προσθήκη NaOH (0,099 M)



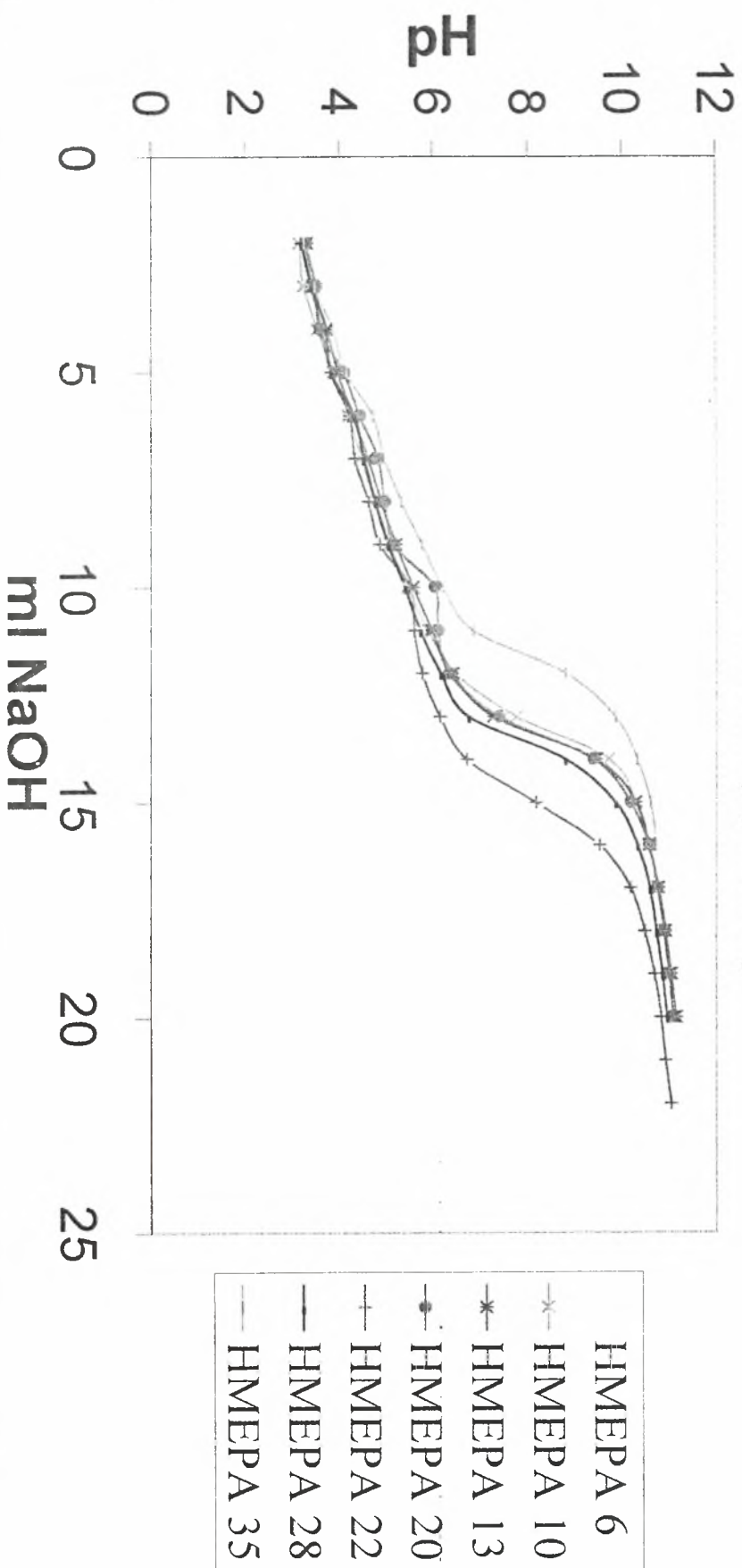
Σχήμα 14. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 11β



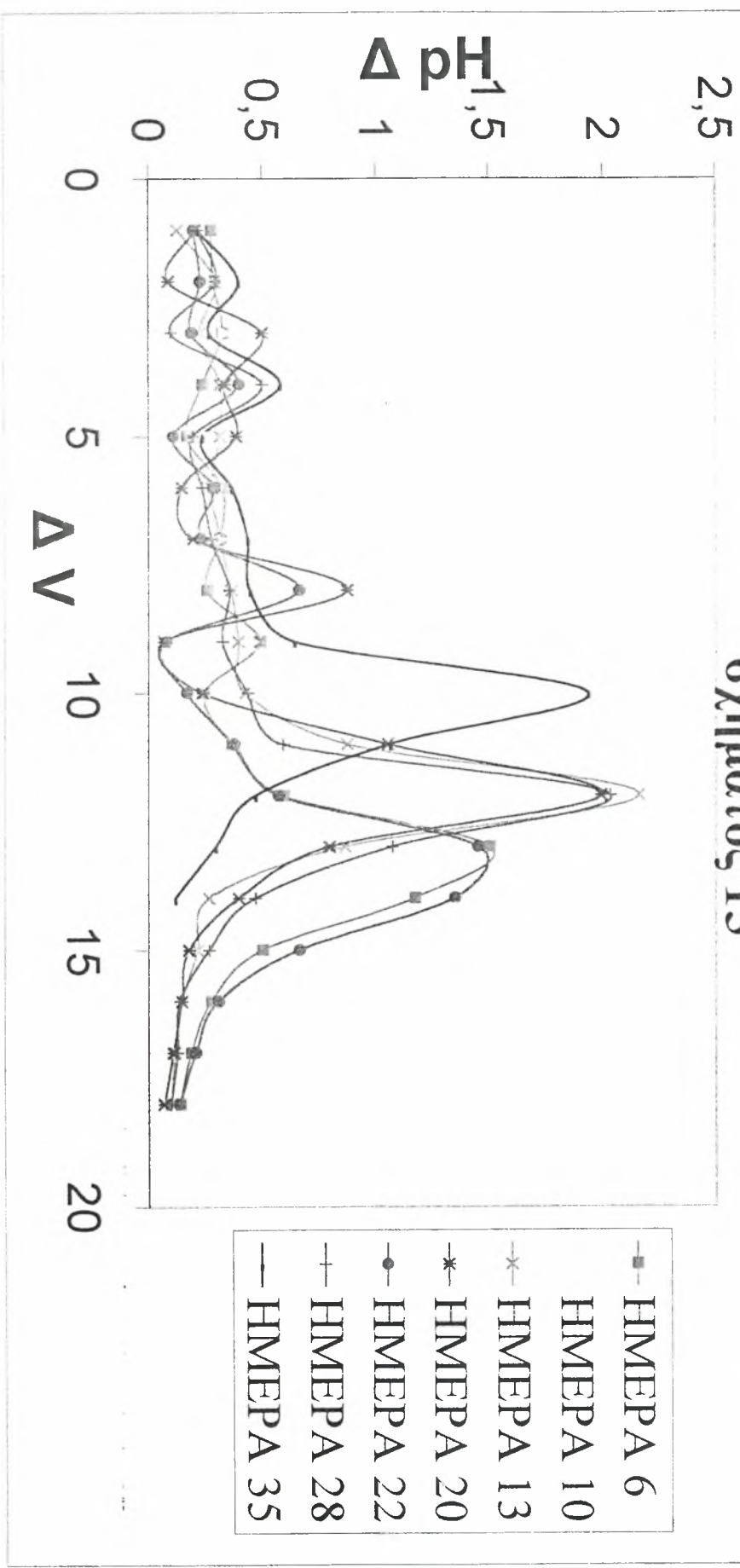
ΔΕΙΓΜΑ 7 Θερμοκρασία διατήρησης 5°C.

Ο χυμός φράουλας Α₂ μένει στο ψυγείο ανοικτός στη συσκευασία του. Επαναλήφθηκε το πείραμα στις ίδιες συνθήκες με τη φράουλα Α, όμως είχε περισσότερη διάρκεια. Το αρχικό pH είναι 2,98 και στις πρώτες μετρήσεις απαιτούνται 10ml NaOH για την εξουδετέρωση των οξέων. Αυτό, όπως φαίνεται και παρουσιάζεται στο σχήμα 15, συνεχίζεται κατά τρόπο σταθερό, καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων. Ακόμη και 35 ημέρες μετά το άνοιγμα του χυμού, δε φαίνονται σημαντικές μεταβολές. Στο σχήμα 16 εφαρμόστηκε η διαφορική μέθοδος στις καμπύλες του σχήματος 15.

**Σχήμα 15. Μεταβολή του pH του Δείγματος 7 με προσθήκη
NaOH(0,099 M)**



Σχήμα 16. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 15



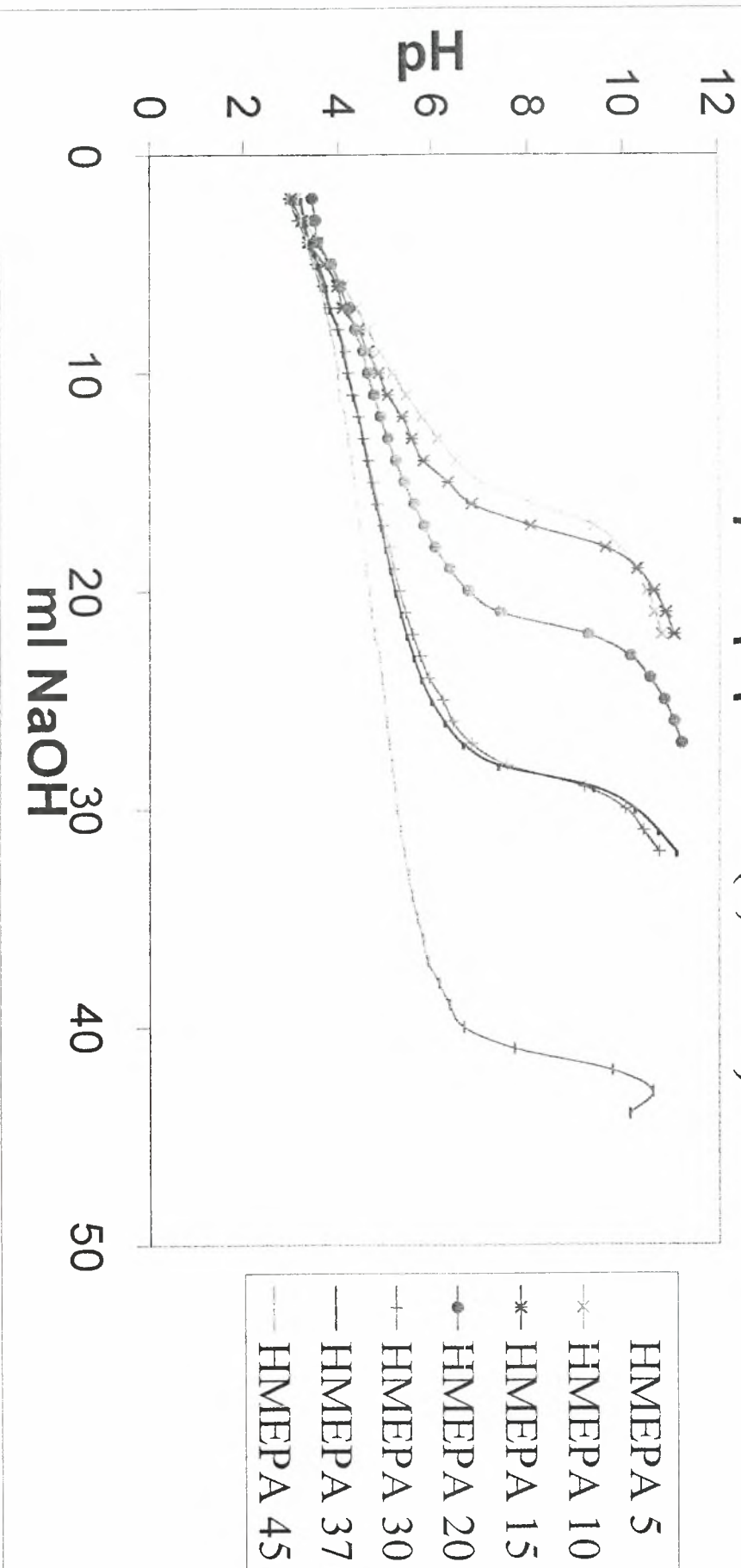
ΔΕΙΓΜΑ 8 Θερμοκρασία διατήρησης 15 - 22°C.

Ο χυμός φράουλας B₂ μένει ανοικτός στη συσκευασία του στον πάγκο. Η θερμοκρασία κυμαίνεται από 15°C έως 22°C.

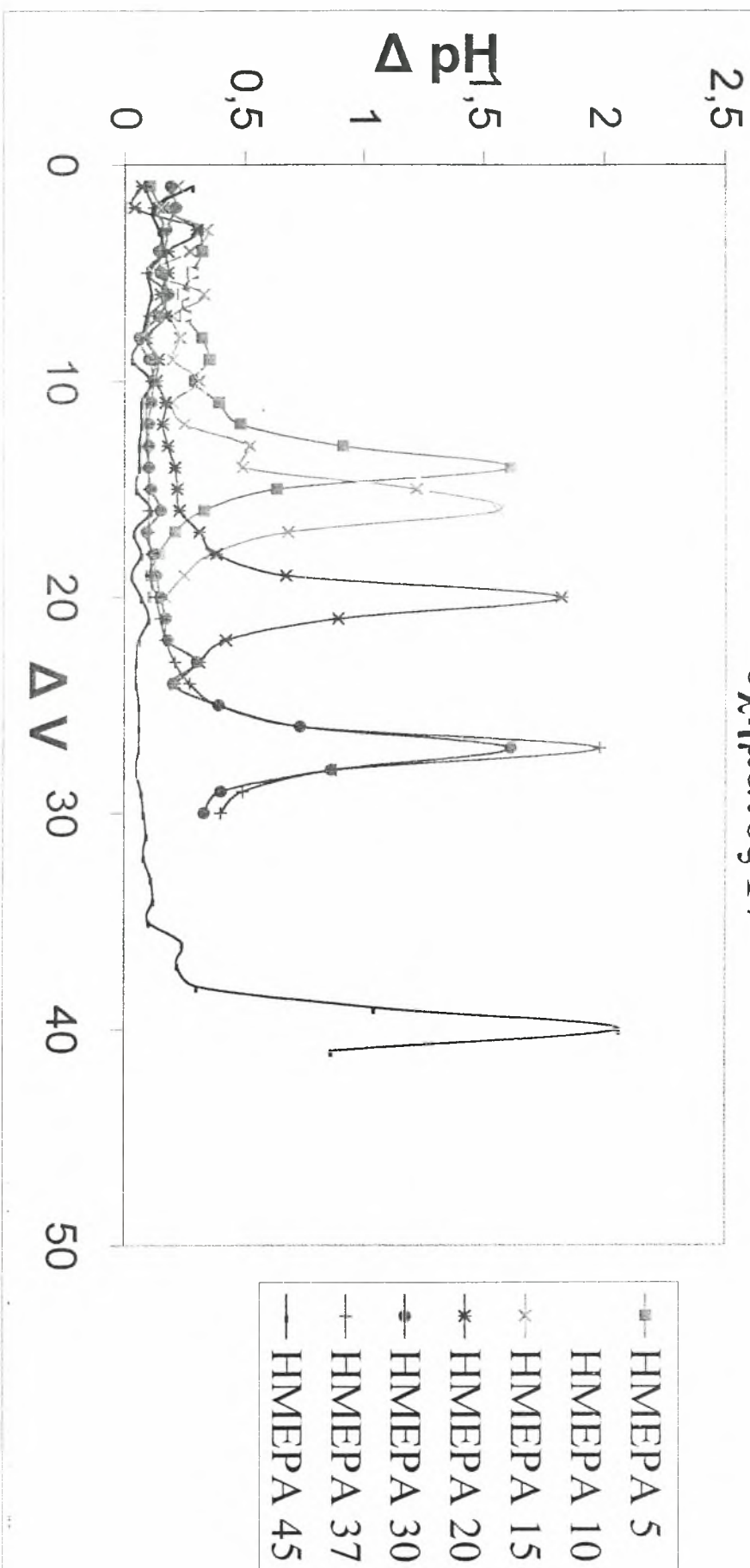
Στις πρώτες μετρήσεις, όπως φαίνεται και στο σχήμα 17, ο όγκος NaOH που απαιτείται για μεταβολή του pH είναι 12 – 13ml. Είκοσι ημέρες μετά, απαιτούνται 20 ml NaOH, ενώ στην τελευταία μέτρηση, 45 ημέρες μετά το άνοιγμα του χυμού, είναι απαραίτητα 40ml NaOH. Οι συνθήκες συντήρησης του χυμού επέτρεψαν την ανάπτυξη μικροοργανισμών που δεν επιτρέπουν την αύξηση του pH.

Στο σχήμα 18 όπου εφαρμόστηκε η διαφορική μέθοδος, φαίνεται καλύτερα η πορεία του χυμού και οι μεταβολές του στη διάρκεια των μετρήσεων. Όσο οι ημέρες περνούν, χρειάζεται περισσότερος όγκος NaOH για να επιτευχθεί σοβαρή μεταβολή στο pH.

Σχήμα 17. Μεταβολή του pH του Δείγματος 8 με προσθήκη NaOH (0,099 M)



Σχήμα 18. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 17

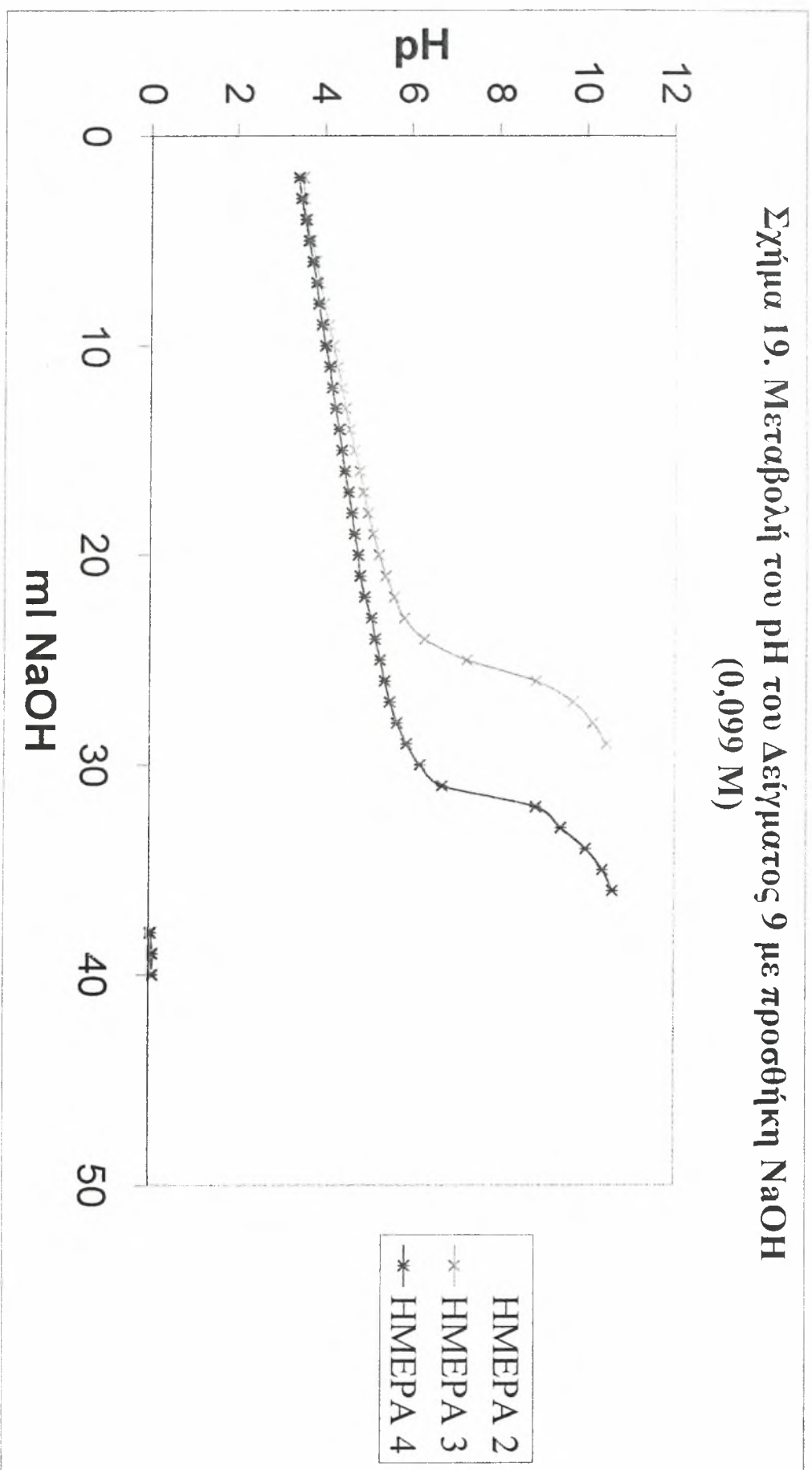


ΔΕΙΓΜΑ 9 Θερμοκρασία διατήρησης 28 – 21 °C.

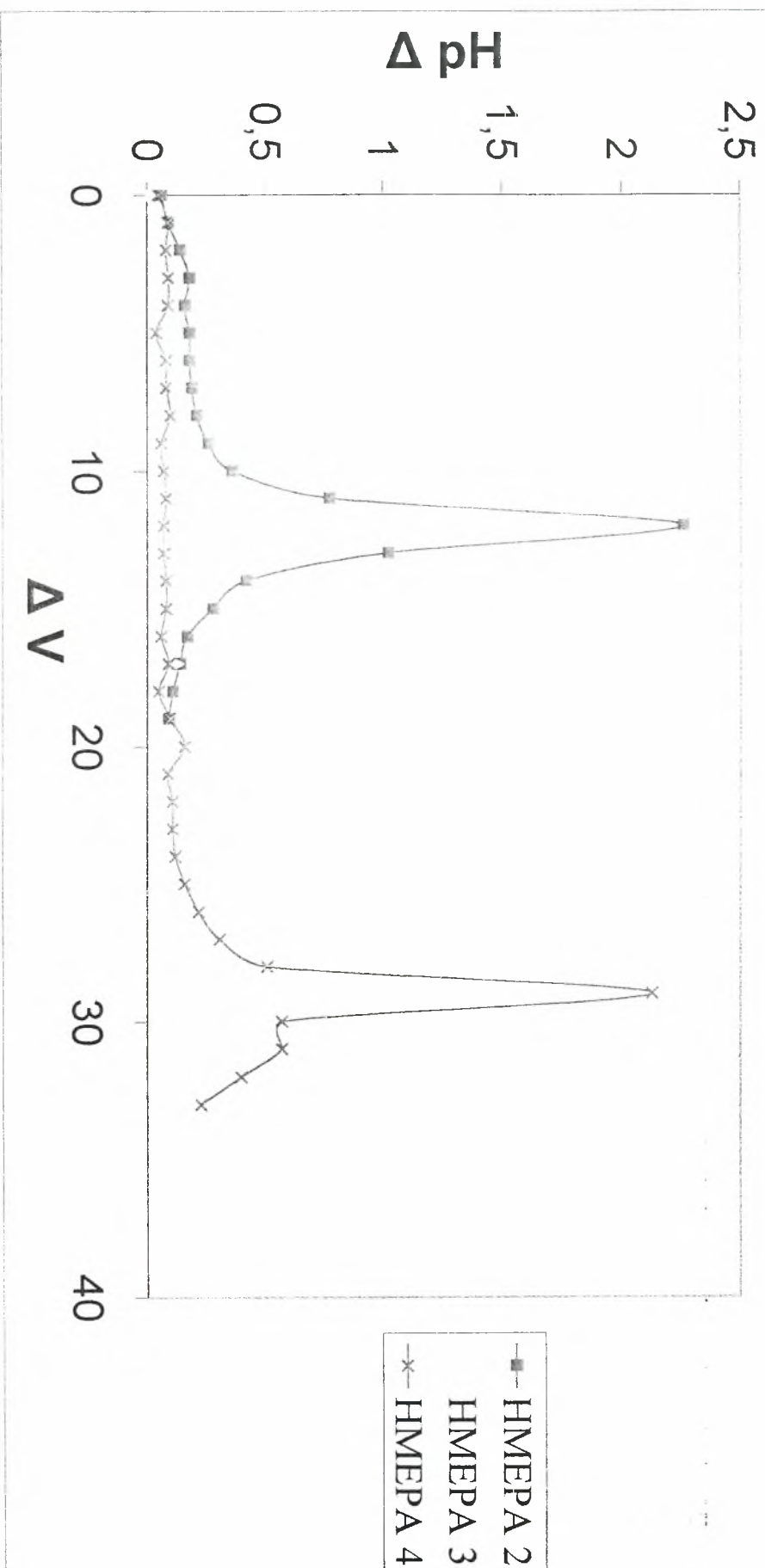
Ο χυμός μήλου Γ τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσης και παρέμεινε ανοικτός στον πάγκο. Η θερμοκρασία ήταν αρχικά 28°C, αλλά στις μέρες που ακολούθησαν, η θερμοκρασία κυμάνθηκε από 21°C με μέγιστη τιμή τους 28°C. Οι μετρήσεις γίνονταν καθημερινά. Τις δύο πρώτες ημέρες ο χυμός είχε συμπεριφορά ανάλογη του Μήλου Β που έμενε ανοικτός στον πάγκο στη συσκευασία του. Όμως, την 3^η κιόλας ημέρα, ο χυμός παρουσίασε τεράστιες διαφορές. Χρειάστηκαν 24ml NaOH για να φτάσουμε σε μια τιμή pH άνω του 8, δηλαδή ο διπλάσιος όγκος NaOH. Την αμέσως επόμενη ημέρα χρειάστηκαν 30ml για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα, ενώ την 8^η ημέρα χρειάστηκαν 63ml NaOH προκειμένου να φτάσουμε σε pH 9, όπως φαίνεται στα σχήματα 19/20. Μετά την 8^η μέτρηση και για τις επόμενες ημέρες, ήταν απαραίτητος όγκος 65ml NaOH για την αυτή μεταβολή του pH, ενώ στην τελευταία μέτρηση φτάνουμε τα 75ml NaOH (0,099 M). Έχουν παρέλθει 10 ημέρες από το άνοιγμα του χυμού.

Το σχήμα 21 δείχνει τις μεταβολές αυτές. Αναδεικνύονται όμως καλύτερα στη διαφορική μέθοδο που εφαρμόστηκε (σχήμα 22). Οι μεταβολές του pH είναι σημαντικές, αφού υπάρχει σταδιακή αύξηση του απαιτούμενου όγκου NaOH.

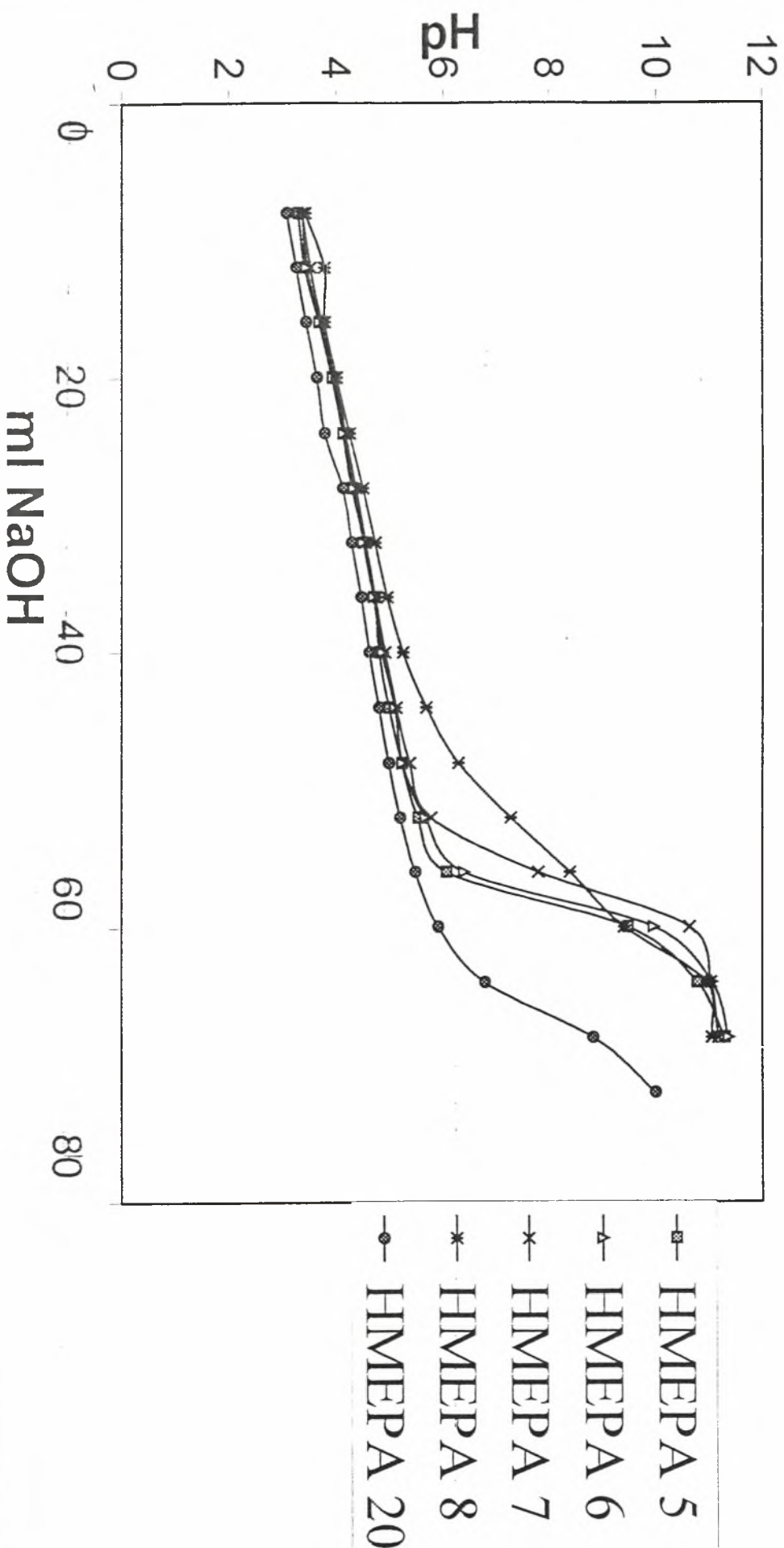
Σχήμα 19. Μεταβολή του pH του Δείγματος 9 με προσθήκη NaOH (0,099 M)



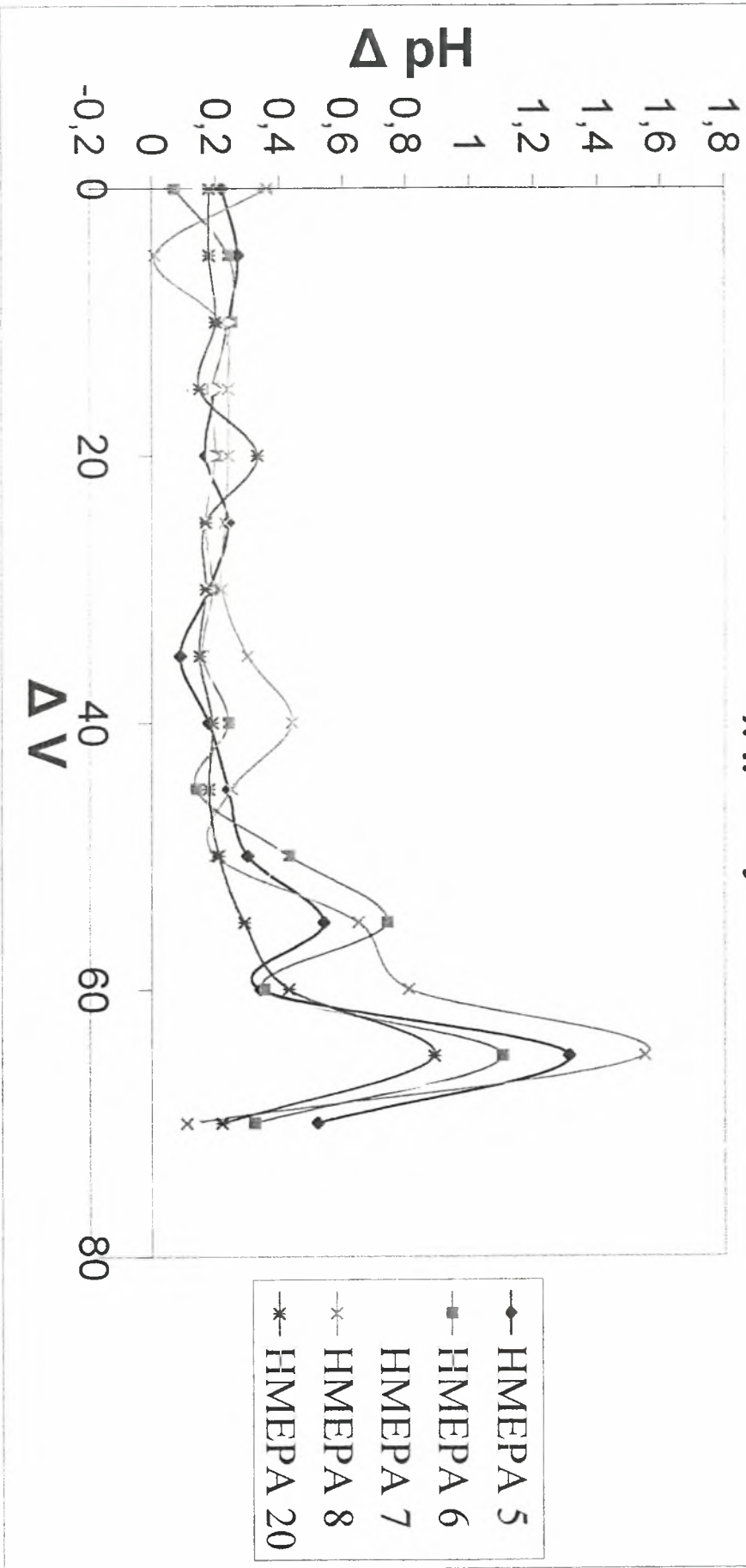
Σχήμα 20. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 19



Σχήμα 21. Μεταβολή του pH του Δεγμάτος 9 με προσθήκη NaOH (0,099M)



Σχήμα 22. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 21



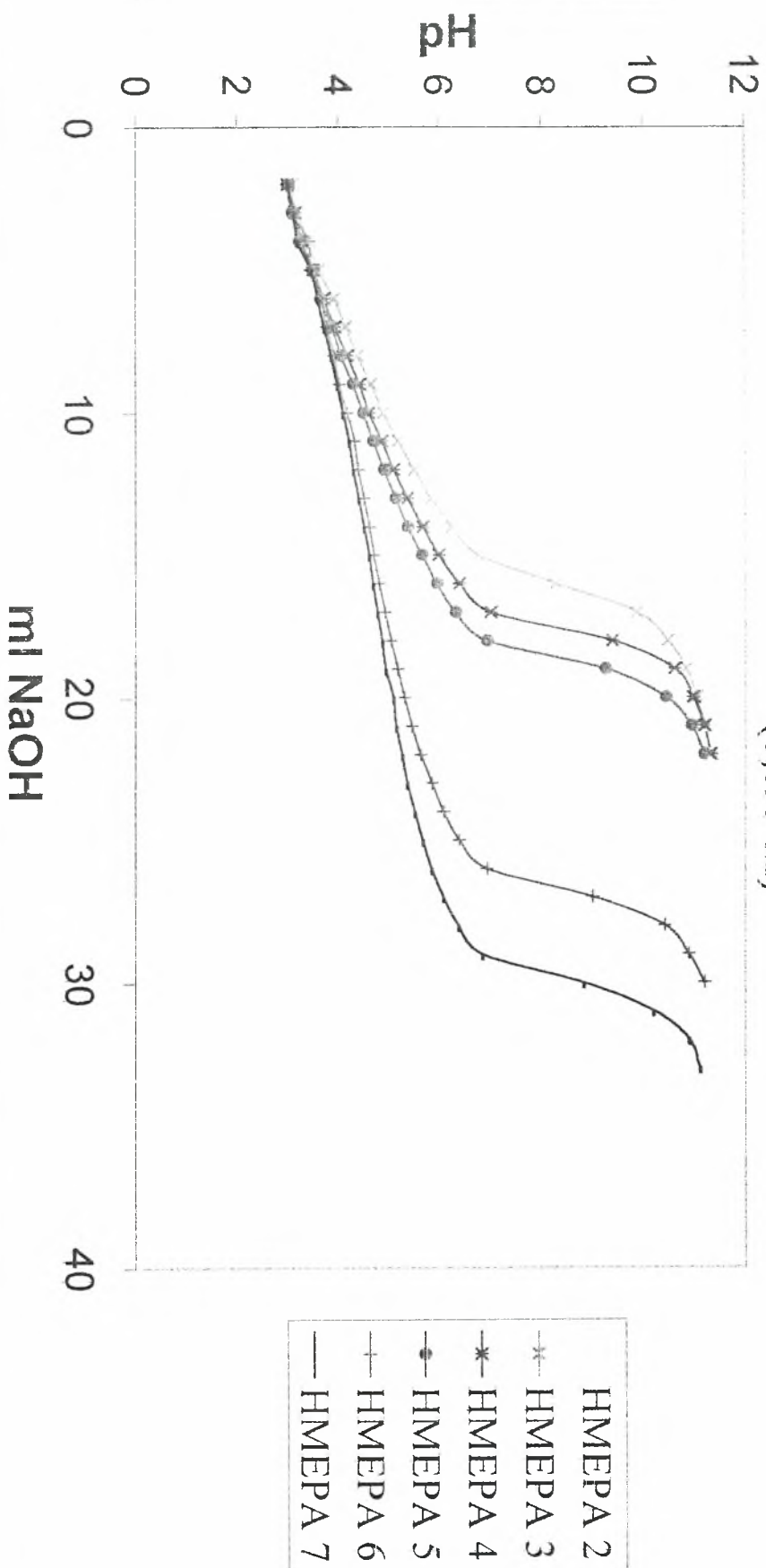
ΔΕΙΓΜΑ 10 Θερμοκρασία διατήρησης 28 - 21°C.

Ο χυμός φράουλας Γ παραμένει ανοικτός στον πάγκο σε ποτήρι ζέσεως. Η θερμοκρασία ξεκινά από 28°C και όσο οι ημέρες περνούν πέφτει μέχρι και τους 21°C.

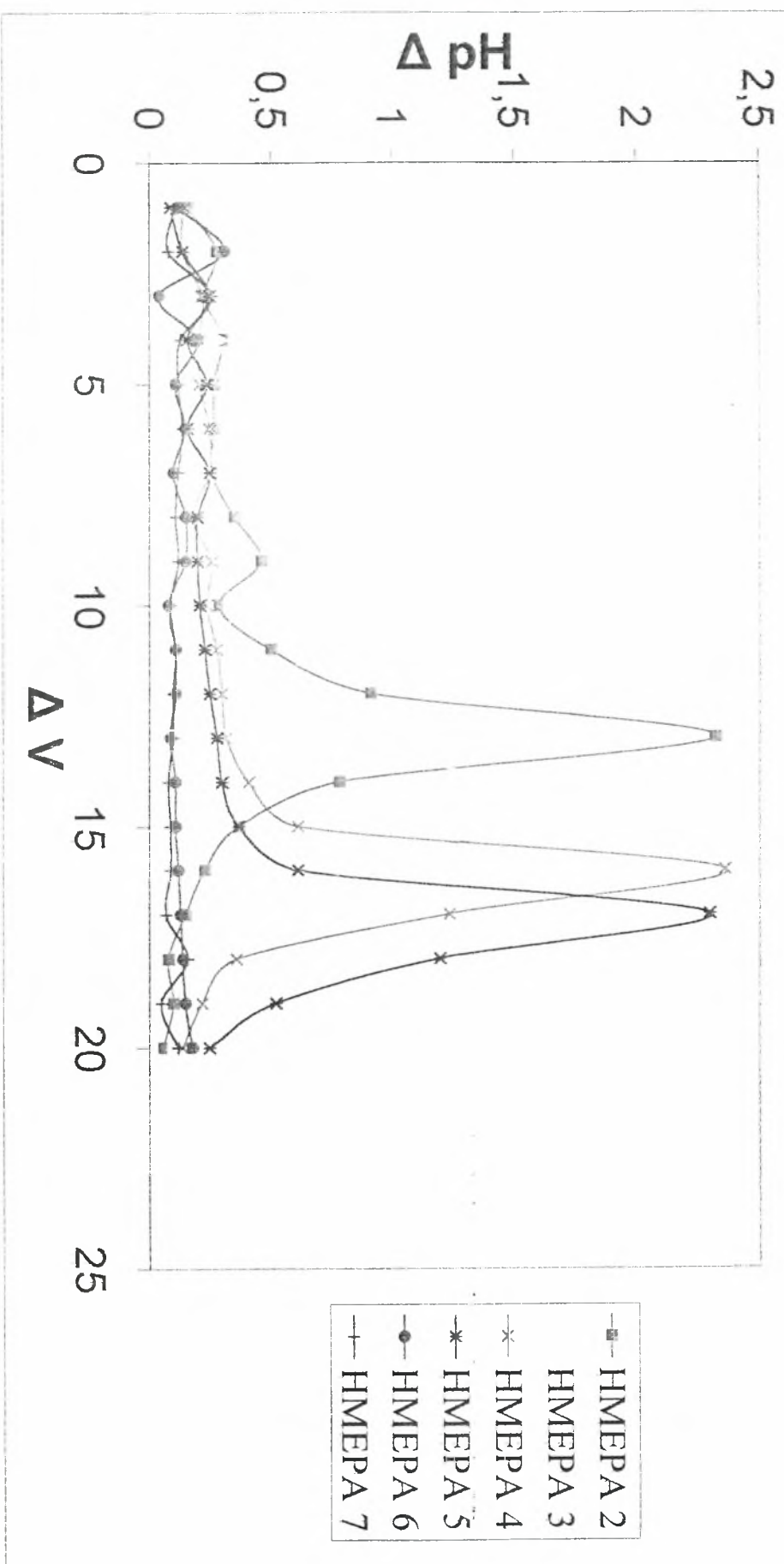
Τις πρώτες ημέρες ο χυμός παρουσιάζει μια αναμενόμενη συμπεριφορά. 13 – 14ml NaOH οδηγούν σε μεγάλη μεταβολή του pH για να ακολουθήσει πλατώ.

Την 4^η και 5^η ημέρα είναι απαραίτητα 17 – 18ml NaOH (σχήμα 23/24), κάτι που δεν είναι ιδιαίτερα υψηλό, συγκρινόμενο με τους όγκους NaOH που απαιτεί ο χυμός μήλου Γ. Την 6^η ημέρα όμως, σχήμα 23-24, ο όγκος του NaOH που απαιτείται είναι 25ml, ο οποίος σταδιακά αυξάνεται. Τις επόμενες ημέρες απαιτείται σταδιακά μεγαλύτερος όγκος NaOH (σχήμα 25-26) για να φτάσουμε τα 42ml την 20^η ημέρα.

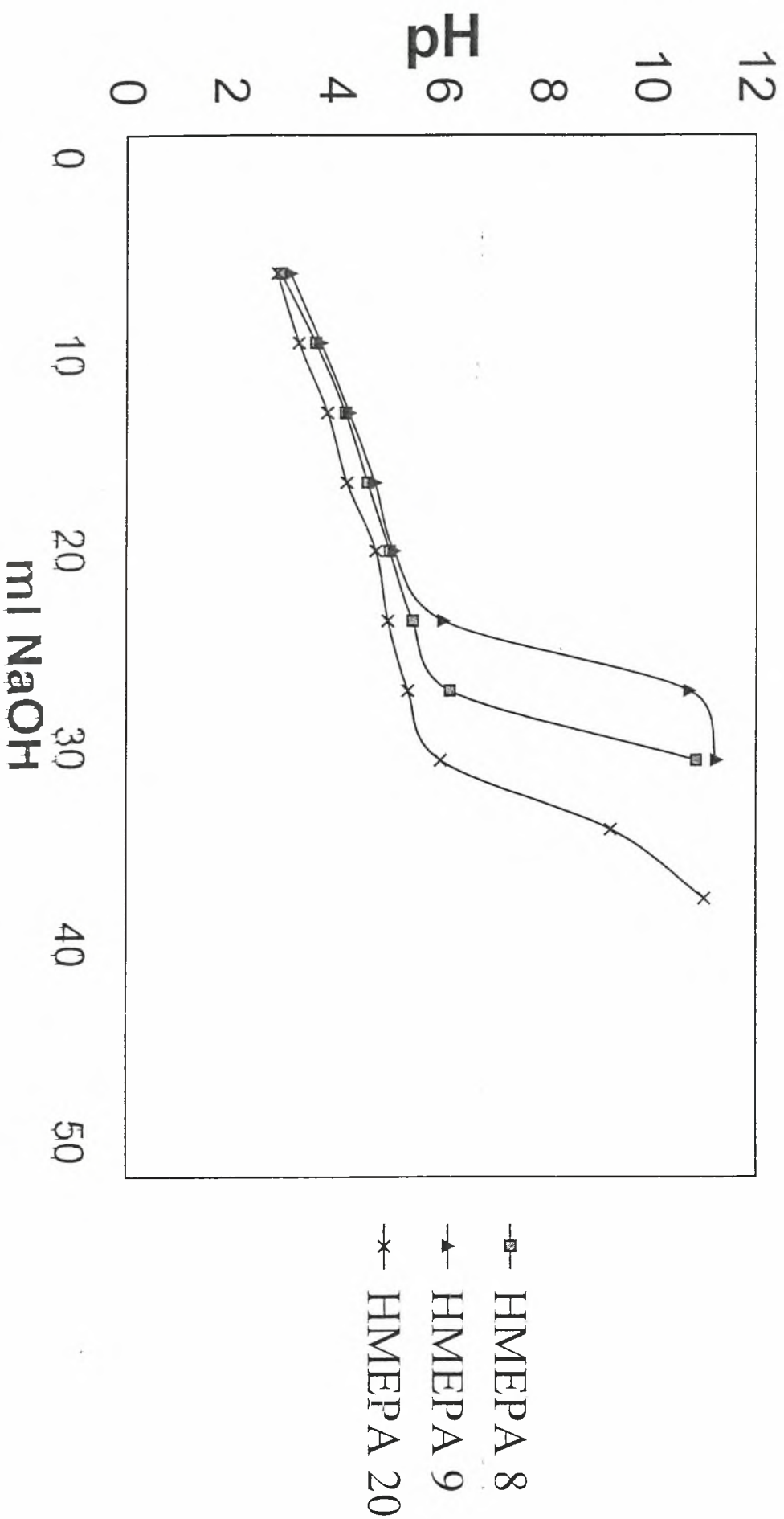
Σχήμα 23. Μεταβολή του pH του Δείγματος 10 με προσθήκη NaOH (0,099 M)



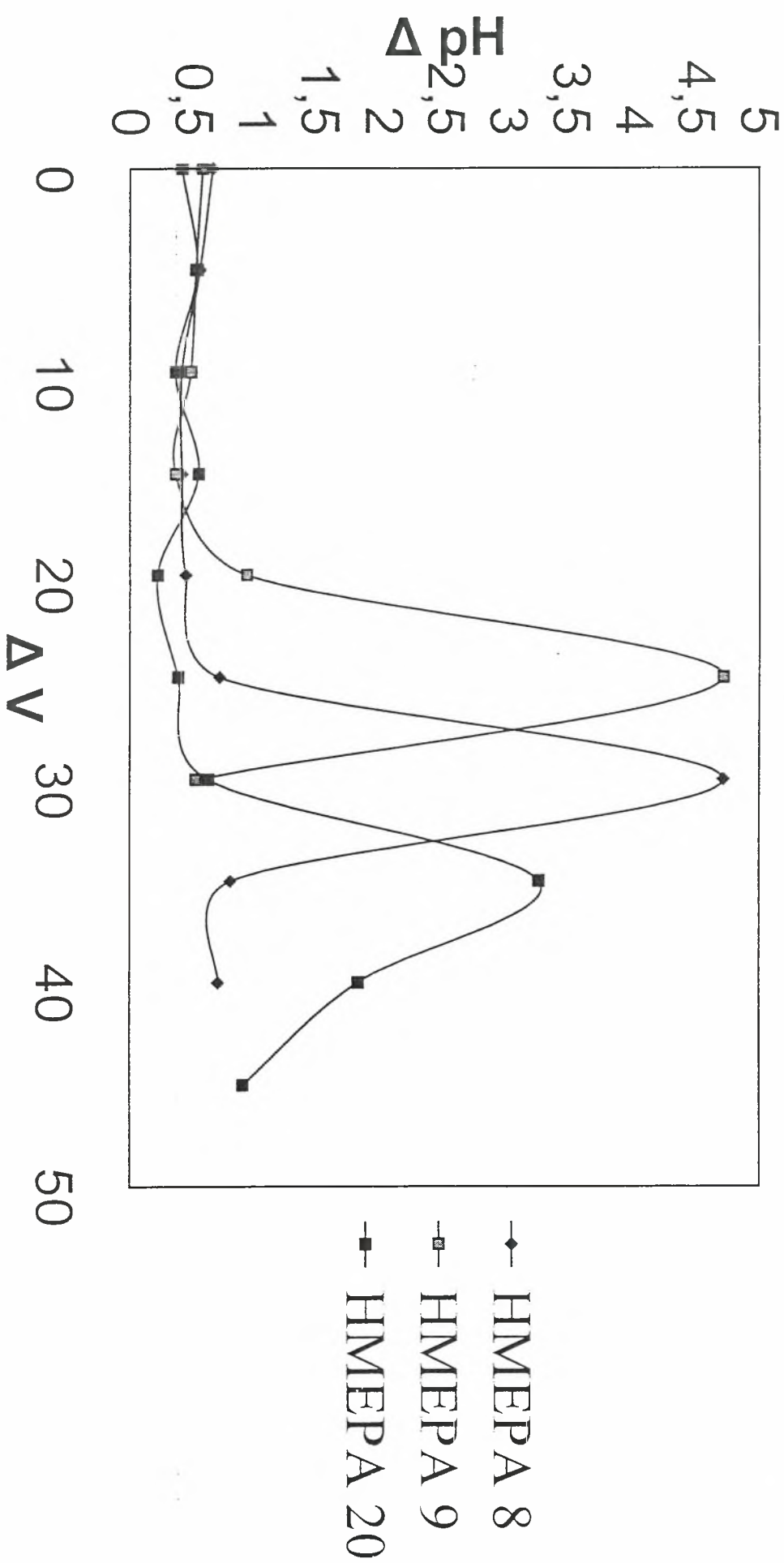
Σχήμα 24. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 23



Σχήμα 25. Μεταβολή του pH του Δείγματος 10 με προσθήκη NaOH(0,099 M)



Σχήμα 26. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 25

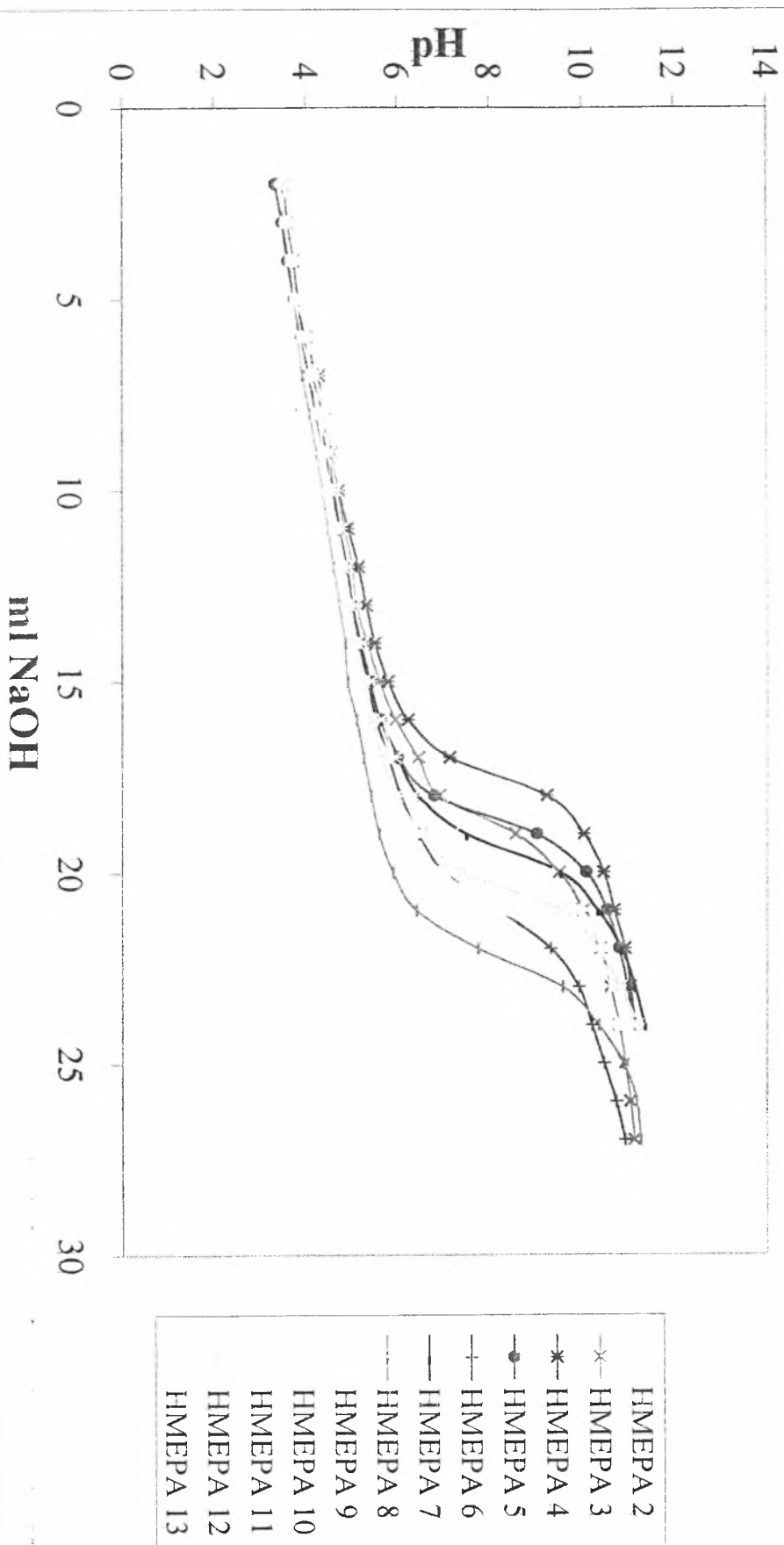


ΔΕΙΓΜΑ 11 Θερμοκρασία διατήρησης 20 - 21°C.

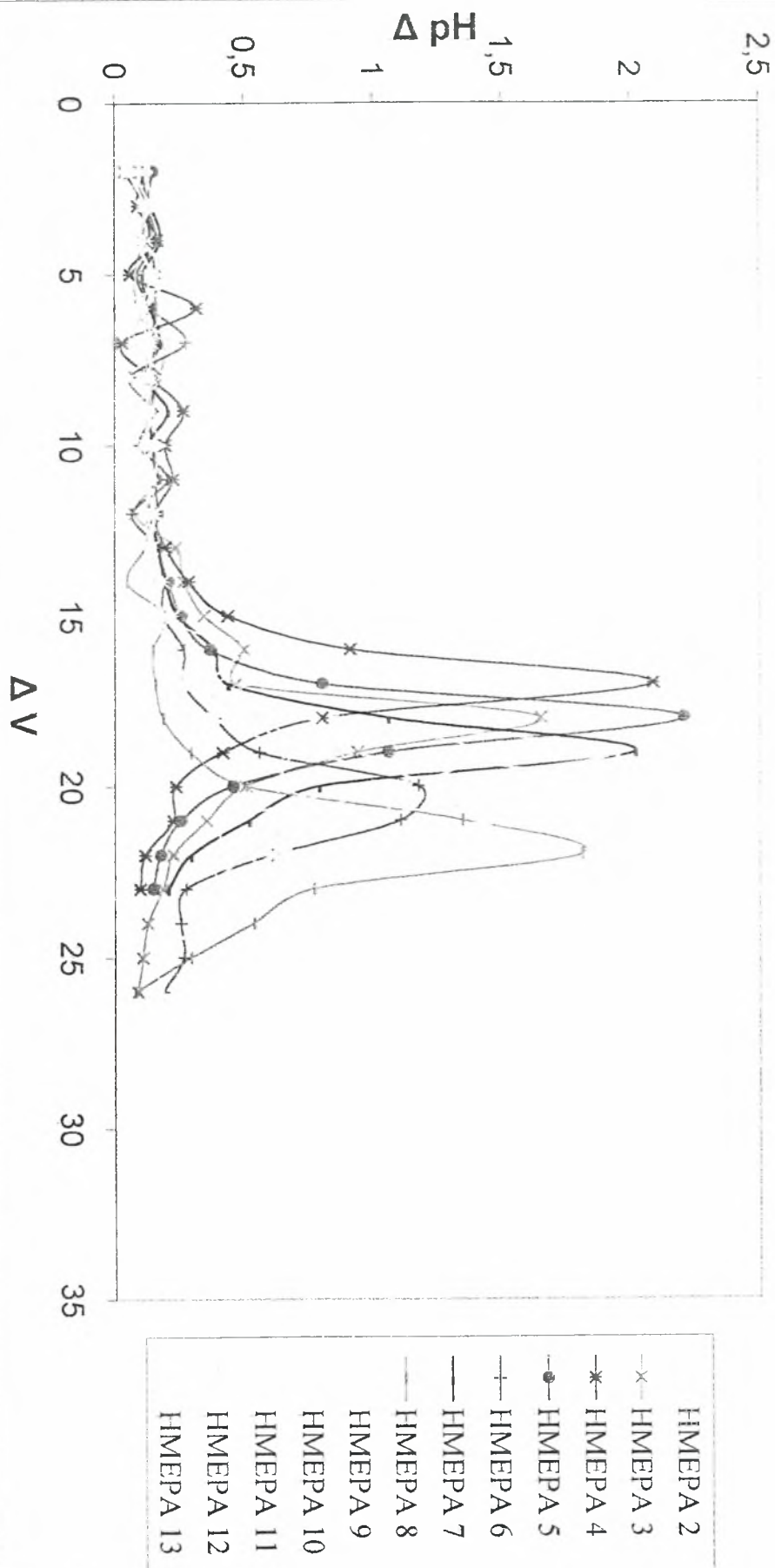
Ο χυμός μήλου Δ παραμένει στον πάγκο σε γυάλινη φιάλη κλειστή. Η θερμοκρασία κυμαίνεται από 20°C ως 21°C. Οι μετρήσεις είναι καθημερινές. Ο χυμός αρχικά χρειάζεται 12ml NaOH. Ο χυμός έχει μια εντελώς διαφορετική συμπεριφορά από τον αντίστοιχο χυμό μήλου Γ. Οι δύο χυμοί εκτέθηκαν στις ίδιες ακριβώς συνθήκες. Η μόνη διαφορά ήταν ότι στο χυμό Δ η φιάλη κλείστηκε με ένα καπάκι. Ωστόσο ο χυμός Δ έδειξε ένα διαφορετικό προφίλ, όπως άλλωστε φαίνεται και στο σχήμα 27.

Ακολουθώς στο σχήμα 28 όπου εφαρμόστηκε η διαφορική μέθοδος, είναι ευκρινές ότι ο χυμός παρουσιάζει μια παρόμοια συμπεριφορά. Δεν υπάρχει εμφανής ημέρα που να χαρακτηρίζει την αλλοίωση.

Σχήμα 27. Μεταβολή του pH του Δείγματος ΙΙ με προσθήκη NaOH(0,099M)



Σχήμα 28. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 27

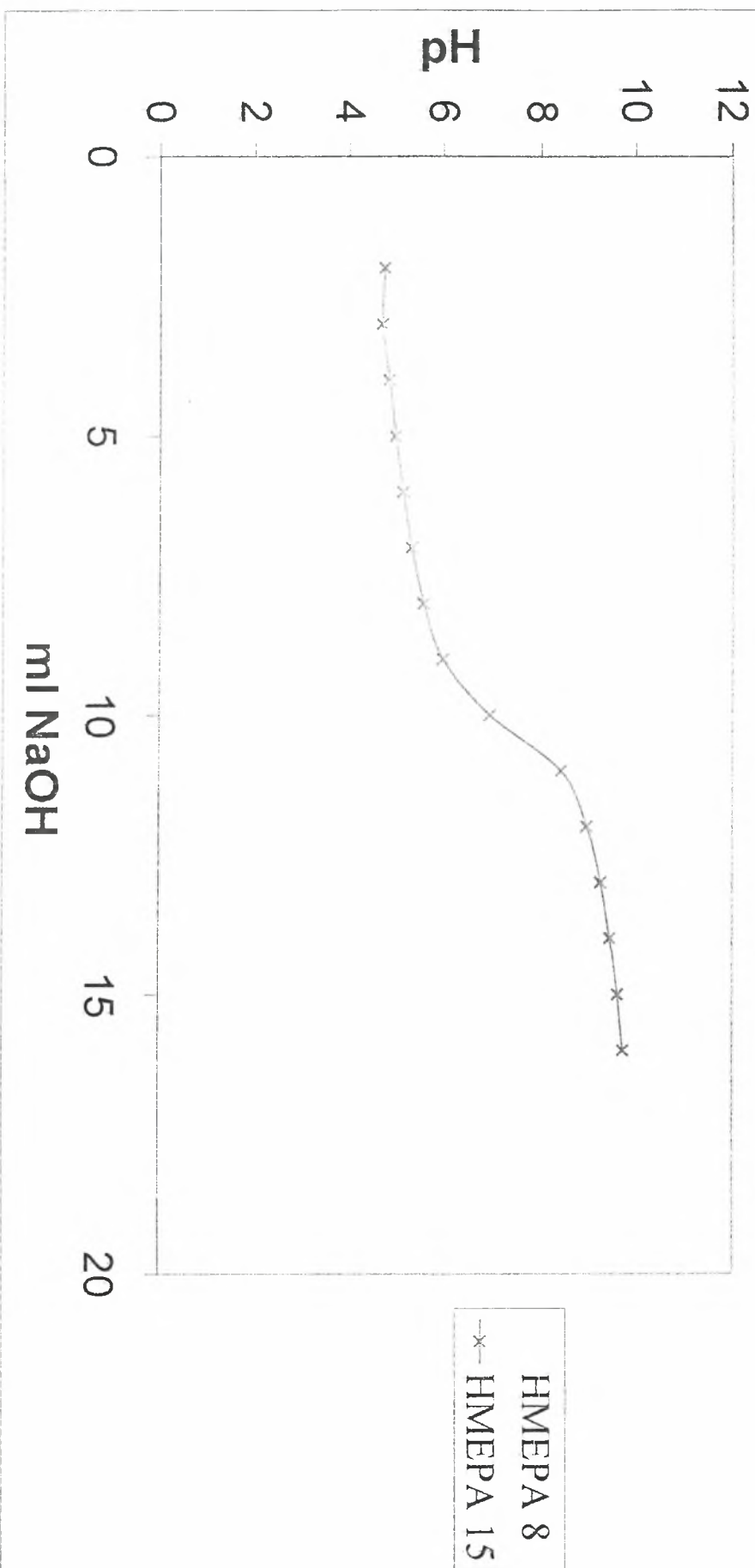


ΔΕΙΓΜΑ 12 Θερμοκρασία διατήρησης 5°C.

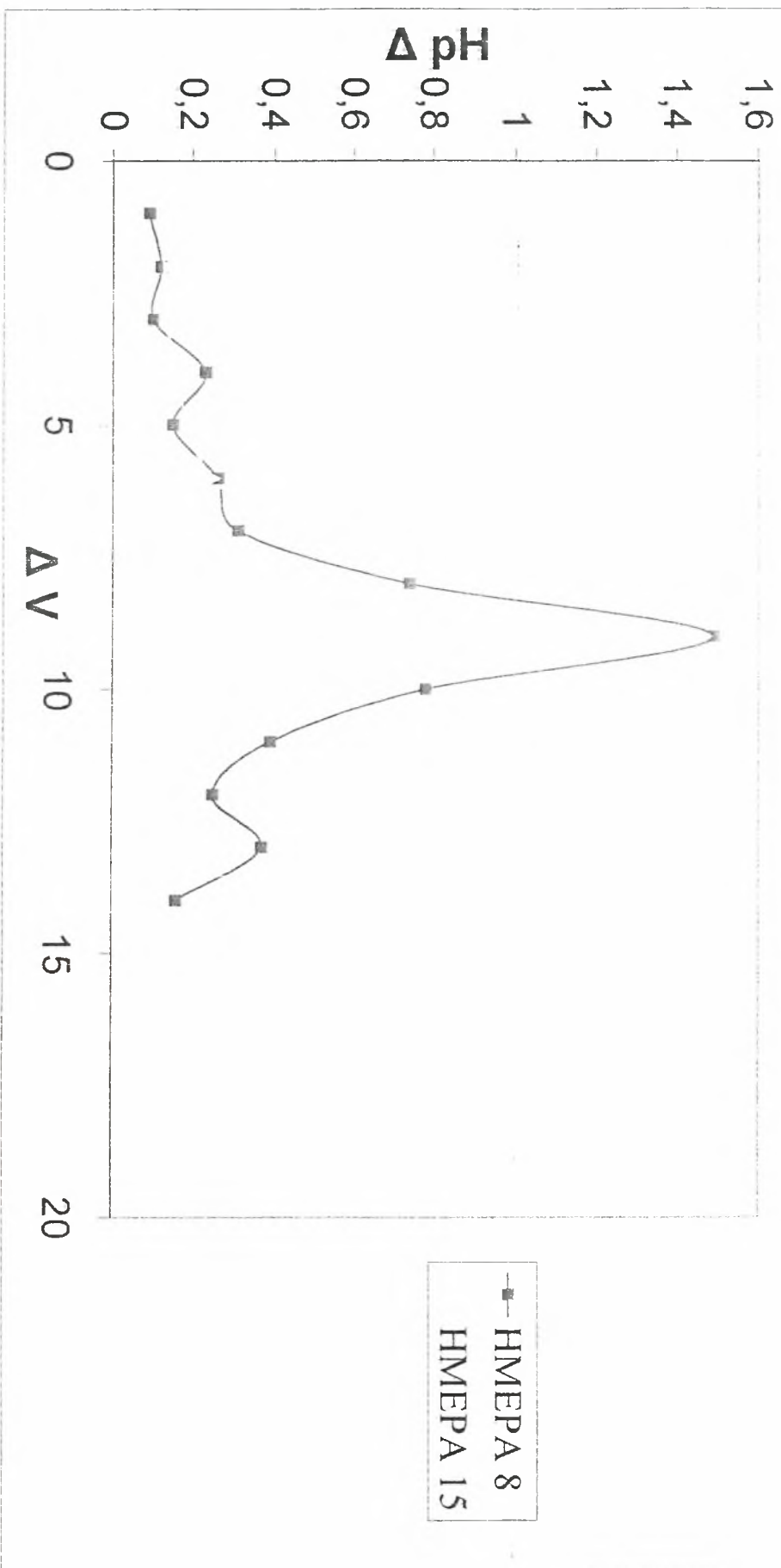
Ο χυμός μήλου Ε τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσεως και παρέμεινε στο ψυγείο ανοιχτός. Οι μετρήσεις γινόντουσαν κάθε εβδομάδα. Μια εβδομάδα μετά το άνοιγμα του χυμού, η πρώτη μέτρηση έδειξε μια τιμή του pH 4,19. Είναι μια υψηλή τιμή αν συγκριθεί με τους υπόλοιπους χυμούς και αν ληφθεί υπόψη ότι ο χυμός συντηρείται στο ψυγείο. Μετά την προσθήκη 9ml NaOH έχουμε απότομη μεταβολή στο pH και ακολουθεί πλατώ όπως φαίνεται και στο σχήμα 29. Η δεύτερη μέτρηση, μια εβδομάδα μετά την πρώτη, είχε τα ίδια περίπου αποτελέσματα, το ίδιο και η Τρίτη 15 ημέρες αργότερα. Το σημαντικό είναι πως το αρχικό pH του χυμού, είναι υψηλό και 8-9ml NaOH είναι αρκετά για τη μεταβολή του pH.

Στο σχήμα 30 εφαρμόστηκε η διαφορική μέθοδος. Φαίνεται ότι σε όλες τις μετρήσεις, η απόκριση του χυμού είναι παρόμοια. Η μέγιστη μεταβολή του pH δεν ξεπερνά τις δύο μονάδες.

Σχήμα 29. Μεταβολή του pH του Δείγματος 12 με προσθήκη NaOH (0,099 M)



Σχήμα 30. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 29

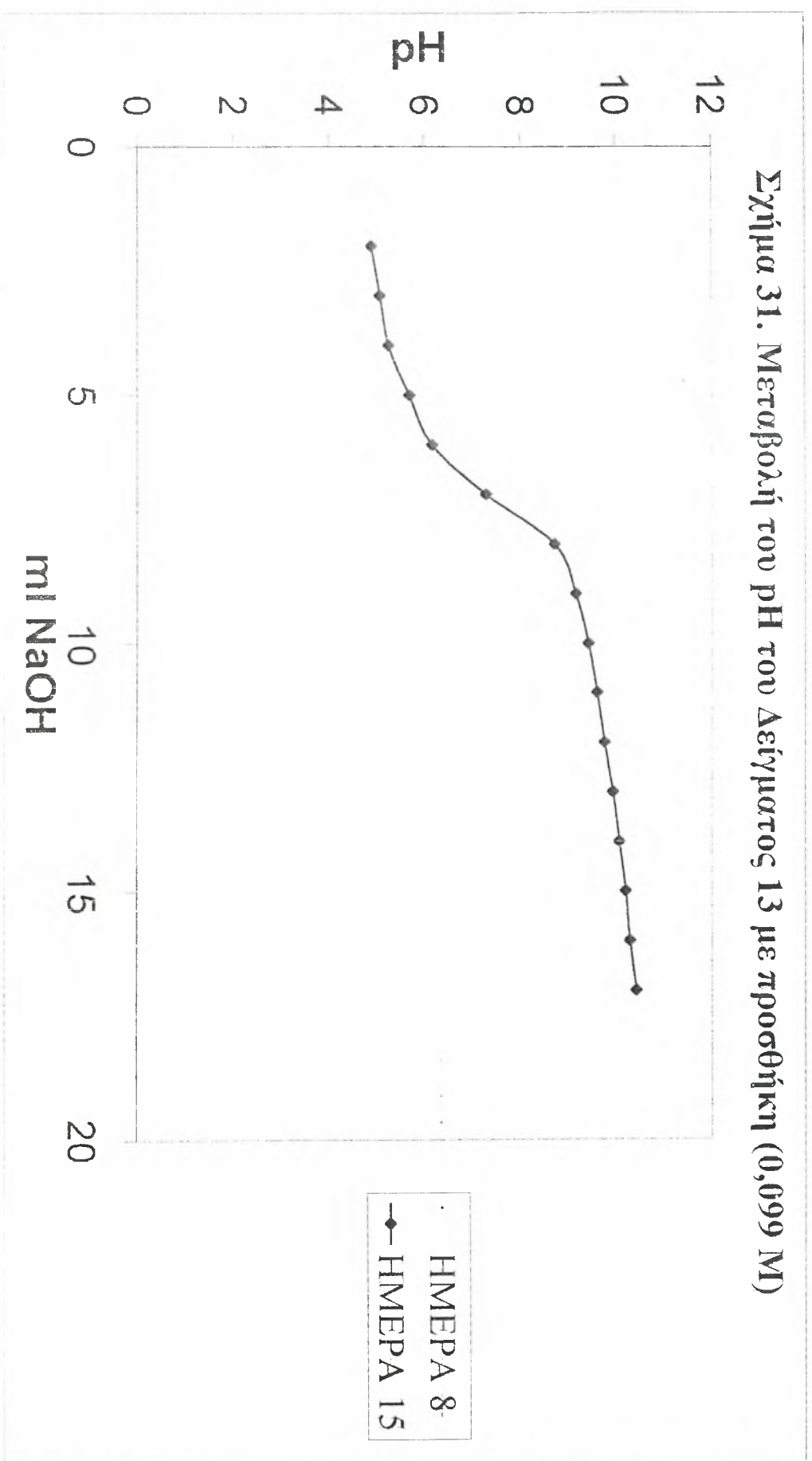


ΔΕΙΓΜΑ 13 Θερμοκρασία διατήρησης 5°C.

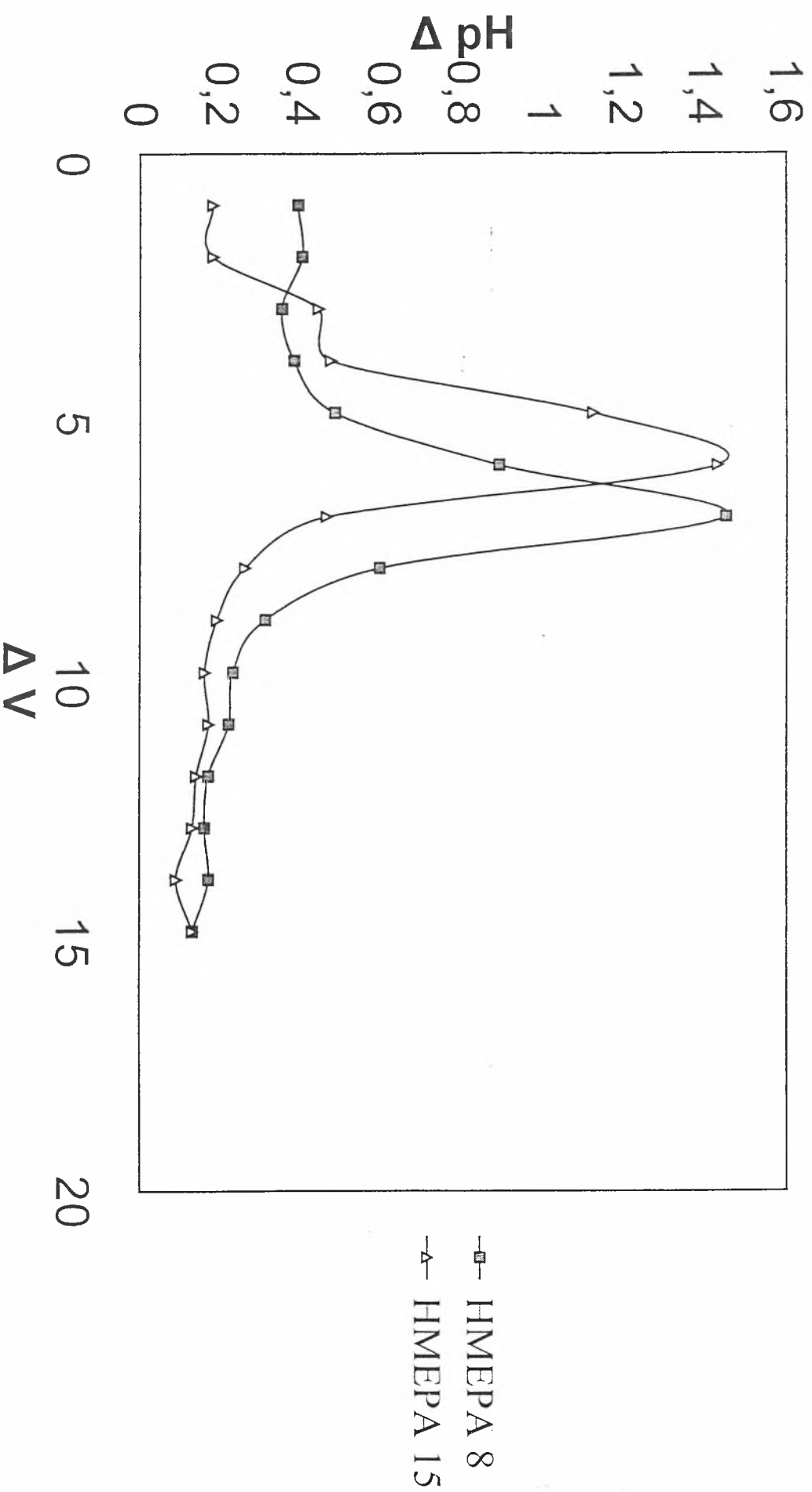
Ο χυμός φράουλας Ε παρέμεινε σε ποτήρι ζέσεως στο ψυγείο καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων, οι οποίες γινόντουσαν εβδομαδιαία. Στην πρώτη μέτρηση, όπως άλλωστε φαίνεται και στο σχήμα 31, η τιμή του pH είναι 3,95. Είναι υψηλή, δεδομένου ότι το pH του χυμού φράουλας είναι 2,9 – 3. Για να σημειωθεί μια απότομη μεταβολή στο pH, στην αρχή χρειάζονται 8ml NaOH, ενώ στην τελευταία μέτρηση χρειάζονται 5ml. Και στο σχήμα 32, όπου εφαρμόστηκε η διαφορική μέθοδος, φαίνεται καθαρά πως αλλάζει η συμπεριφορά του χυμού με το πέρασμα των ημερών και επίσης πως η μεταβολή του pH μειώνεται κι αυτή.

Σίγουρα δεν ήταν αναμενόμενη μια τόσο γρήγορη αλλοίωση του χυμού, εφ' όσον διατηρείται στο ψυγείο. Οι χυμοί που διατηρούνταν στο ψυγείο είχαν άλλη ανταπόκριση στο NaOH. Φαίνεται πως η αλλαγή της συσκευασίας και η μεταφορά του χυμού σε ποτήρι ζέσεως ήταν καθοριστική για την αλλοίωση του χυμού.

Σχήμα 31. Μεταβολή του pH του Δείγματος 13 με προσθήκη (0,099 M)



Σχήμα 32. Αριθμητική παραγωγή της καμπύλης του σχήματος 31



ΠΙΝΑΚΑΣ 1

Χρόνος αλλοίωσης δειγμάτων μήλου κάτω από διάφορες συνθήκες διατήρησης

Δείγμα	Θερμοκρασία	Χρόνος αλλοίωσης	Συγκέντρωση οξέων (eq)
Ανοιχτό στο ψυγείο	5°C	>35 ημέρες	-
Ανοιχτό στον πάγκο	15-22°C	8 ημέρες	$8,5 \times 10^{-2}$
Ποτήρι ζέσεως στον πάγκο	21-28°C	3 ημέρες	$1,2 \times 10^{-1}$
Γυάλινη φιάλη στον πάγκο	20-21°C	>13 ημέρες	-
Ποτήρι ζέσεως ψυγείο	5°C	8 ημέρες	$4,5 \times 10^{-2}$

ΠΙΝΑΚΑΣ 2

Χρόνος αλλοίωσης δειγμάτων φράουλας κάτω από διάφορες συνθήκες διατήρησης

Δείγμα	Θερμοκρασία	Χρόνος αλλοίωσης	Συγκέντρωση οξέων (eq)
Ανοιχτό στο ψυγείο	5°C	>35 ημέρες	-
Ανοιχτό στον πάγκο	15-22°C	30 ημέρες	9×10^{-1}
Ποτήρι ζέσεως στον πάγκο	21-28°C	5 ημέρες	9×10^{-1}
Ποτήρι ζέσεως ψυγείο	5°C	8 ημέρες	4×10^{-2}

Από τις τιτλοδοτήσεις που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ο ισοδύναμος V NaOH που απαιτείται για να εξουδετερωθούν τα οξέα που βρίσκονται στον αντίστοιχο χυμό. Εφαρμόζοντας την εξίσωση 1 μπορούμε να υπολογίσουμε τα γραμμοϊσοδύναμα (eq) όπως φαίνεται στους πίνακες 1 και 2.

Εξίσωση 1: $V_1 C_1 = V_2 C_2$ όπου:

V_1 : όγκος NaOH

C_1 : η κανονικότητα του NaOH

V_2 : ο όγκος του χυμού

C_2 : γραμμοϊσοδύναμα οξέων

Σχόλια

Οι χυμοί εκτέθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης και σε ποικίλες θερμοκρασίες. Συγκρίνοντας τους χυμούς Μήλου μεταξύ τους, διαπιστώνεται πως οι χυμοί που διατηρούνται στο ψυγείο μέσα στη συσκευασία τους, δεν είναι τόσο εύκολο να μεταβάλλουν το pH τους με την πάροδο των ημερών. Χρειάζονται 30 και 35 ημέρες (χυμός Α και Α₂) για να επιτευχθεί μια αξιόλογη μεταβολή στο pH.

Αν και ο χυμός είναι ακατάλληλος, αυτό δεν είναι δυνατό να διαπιστωθεί μόνο με τη μέτρηση του pH, τουλάχιστον τις πρώτες ημέρες.

Οι χυμοί που έμειναν ανοιχτοί στον πάγκο μέσα στη συσκευασία τους, είχαν εξ αρχής διαφορετική συμπεριφορά. Η θερμοκρασία δρα καταλυτικά στην ταχύτερη αλλοίωσή τους. Οι όγκοι NaOH που απαιτούνται για να επιτευχθεί μεταβολή στο pH είναι μεγαλύτεροι και αυτό έγινε εμφανές στο χυμό μήλου Β₂, που μελετήθηκε για μεγαλύτερο διάστημα.

Ο χυμός μήλου Γ ήταν αναμφίβολα ένα ξάφνιασμα. Διατηρήθηκε ανοικτός στον πάγκο σε ποτήρι ζέσης. Η αλλοίωση ήταν ταχύτατη. Σε 10 μόλις ημέρες χρειαζόνταν 75ml NaOH για να μεταβληθεί το pH. Συγκρινόμενο με το χυμό Δ που έμεινε στις ίδιες ακριβώς συνθήκες εκτεθειμένος, με μόνη διαφορά ότι ήταν κλειστός με ένα καπάκι, γίνεται αντιληπτό ότι ο χυμός Γ εκτέθηκε σε συνθήκες που ευνοούν την αλλοίωση, ενώ ο χυμός Δ προστατεύεται, αν και δε βρίσκεται στη συσκευασία του.

Ο χυμός Ε που τοποθετήθηκε σε ποτήρι ζέσης στο ψυγείο, αλλοιώθηκε γρήγορα, συγκρινόμενος με τους χυμούς Α και Α₂, που διατηρήθηκαν στο ψυγείο, αλλά στη συσκευασία τους.

Είναι φανερό πως η ψύξη, αλλά κυρίως η συσκευασία, παρέχουν στους χυμούς μια ασπίδα προστασίας. Η μεταφορά των χυμών σε άλλα σκεύη και η έκθεση στο περιβάλλον, επιτρέπουν τη γρηγορότερη αλλοίωσή τους λόγω των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και που έχουν ως συνέπεια τη μεταβολή του pH. Η παραγωγή των μεταβολιτών έχει άμεση επιρροή στο pH¹⁴.

Όσο αφορά τους χυμούς φράουλας, οι Α και Α₂ που διατηρούνται στο ψυγείο, ακολουθούν μια παρόμοια συμπεριφορά μ' αυτή του χυμού Μήλου. Χρειάζονται 30 περίπου ημέρες για να αλλοιωθούν τόσο, ώστε να χρειάζεται σχεδόν διπλάσιος (πίνακας 2) όγκος NaOH για την ίδια μεταβολή του pH.

Οι χυμοί Β που μένουν στον πάγκο, συγκρινόμενοι με τους ομόλογούς τους, δε χρειάζονται τόσο V NaOH για να μεταβάλλουν το pH (πίνακας 1).

Ακόμη και στη φράουλα Γ δεν παρατηρείται το ίδιο με το Μήλο Γ. Ο χυμός της Φράουλας Γ, αν και σε ποτήρι ζέσεως στον πάγκο, δεν απαιτεί τόσο μεγάλο V NaOH για να μεταβάλλει το pH, ενώ στο χυμό Ε τα αποτελέσματα είναι τα ίδια. Οι χυμοί που διατηρούνται στο ψυγείο, είτε φράουλας είτε μήλου, έχουν παράλληλη πορεία. Όταν οι χυμοί εκτεθούν σε θερμοκρασίες δωματίου, φαίνεται η συμπεριφορά του κάθε χυμού. Ο χυμός του μήλου αποτελεί σίγουρα πιο πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπως φαίνεται.

Συμπέρασμα

Οι χυμοί φρούτων διατηρούν τις ιδιότητές τους όσο παραμένουν στη συσκευασία και εφόσον δεν παραβιαστούν οι συνθήκες διατήρησης. Από τη στιγμή όμως που ο χυμός ανοιχτεί αρχίζει η ανάπτυξη μικροοργανισμών δηλαδή η αλλοίωσή του. Η αλλοίωση των χυμών φρούτων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που καθορίζεται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η συσκευασία, το είδος του χυμού, η παρουσία φωτός κ.λ.π. Η αλλοίωση μπορεί να μελετηθεί παρακολουθώντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών άμεσα ή έμμεσα μέσω των επιπτώσεών της. Σκοπός της παρούσας Διπλωματικής εργασίας ήταν να μελετηθεί η ανάπτυξη της χλωρίδας, παρακολουθώντας τη μεταβολή στο pH που προκαλείται λόγω της αύξησης στη συγκέντρωση των οξέων.

Μελετήθηκαν χυμοί μήλου και φράουλας κάτω από διαφορετικές συνθήκες διατήρησης. Αυξανόμενης της θερμοκρασίας διατήρησης βρέθηκε ότι η συγκέντρωση των οξέων μεταβάλλεται ανάλογα, δηλαδή ο χυμός αλλοιώνεται ταχύτερα. Ακόμα, όταν οι χυμοί εκτέθηκαν στο φως παρατηρήθηκε το ίδιο συμπέρασμα. Είναι εφικτή δηλαδή η παρακολούθηση της αλλοίωσης χυμών μέσω της παρακολούθησης του pH.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Τζουβάρα – Καραγιάννη Σ., Σύσταση, χημική ανάλυση και προδιαγραφές βασικών τροφίμων. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ιωαννίνων, 4^η έκδοση, Ιωάννινα 1992.
2. Ζεφυρίδη Γρηγόρη, Διατροφή του ανθρώπου. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Γεωπονίας, εκδόσεις Γιαχούλη – Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη 1998.
3. Κυριακίδη Δ. Α., Βιοτεχνολογία. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη 2000.
4. Αντωνιάδη Α., Αντωνιάδη Γρ., Λεγάκη Ν., Τσελέντη Ι., Ιατρική Μικροβιολογία, τόμος Β. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1999.
5. Φερτάκη Αρ., Παθολογική Φυσιολογία. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1998.
6. Γεωργιάτσου Ι. Γ., Αρζόγλου Π. Ι., Αρχές κλινικής χημείας. Εκδόσεις Γιαχούλη – Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη 1999.
7. Marshall, William, Κλινική Βιοχημεία. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα 1998.
8. Τρακατέλλη Αντώνη, Βιοχημεία Τόμος Β, 1^ο μέρος. Εκδόσεις Δεδούση, Θεσσαλονίκη 1992.
9. Liliana Ceci, Jorge Lozano PLAPIQUI (UNS-CONICET), Bahia Blanka, Argentina. Determination of enzymatic activities of commercial pectinases for the clarification of apple juice. Food Chemistry, Vol. 61, no 1/2, pp. 237 – 241, 4-4-1998.
10. Kodie L., Dhople A. M. Department of Biological Sciences, Florida Institute of Technology, Melbourne, usa. Acid Tolerance of Escherichia coli O157:H7 and its survival in apple juice. Microbios, Volume 104, Issue 409, Pages 167 – 175, 2001. Medline
11. Jean – Marc Denès, Alain Baton, Catherine M.S.G. Kenard, Christophe Péan, Jean François Drilleau. Different action patterns for apple pectin methylesterase at pH 7,0 and 4,5. Carbohydrate Research 327 (2000) 385 – 393, www.elsevier.nl/locate/carres
12. P.D.G. Wilson, T.F. Brocklehurst, S. Arino, D. Thuquault, M. Jakobsen, M. Lange, J. Farkas, J.W.T. Wimpenny, J.F. Van Jupe. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. International Journal of Food



- Microbiology 73 (2002) 275-289. www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro
13. Sheryl A., Yamamoto, Linda J. Harris. Department of Food Science and Technology, University of California-Davis. The effects of freezing and thawing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 67 (2001) 89-96. www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro
14. James Freston, M.D., Ph.D., Yi-Lin Chiu, Ph.D., Wei-Jian Pan, Ph.D., Nancy Lu Kasik, B.S.N., and Jörg Täubel, M.D., A.F.P.M. Effects on 24-hour intragastric pH: A comparison of Lansoprazole Administered Nasogastrically in Apple Juice and Pantoprazole Administered Intravenously. *The American Journal of Gastroenterology*, 2001.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

~~Τηλ.: 74.760-61~~ ΛΑΡΙΣΑ

2410-565077

565078



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057246