

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja STRELEC

**PREŽIVETJE RAZLIČNIH SEVOV BAKTERIJ  
RODU *Salmonella* PRI PASTERIZACIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja STRELEC

**PREŽIVETJE RAZLIČNIH SEVOV BAKTERIJ RODU *Salmonella*  
PRI PASTERIZACIJI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**SURVIVAL OF *Salmonella* STRAINS THROUGH  
PASTEURIZATION TREATMENT**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za živilsko mikrobiologijo in v laboratoriju Katedre za kemijo na Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko doc. dr. Leo Gašperlin.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: doc. dr. Lea Gašperlin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Strelec

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD DN  
DK UDK 579.24+579.26:579.67(043)=863  
KD mikroorganizmi/*Salmonella*/jajčni melanž/pasterizacija/temperatura pasterizacije/čas pasterizacije/inhibicija rasti/decimalni redukcijski čas/vrednost D  
AV STRELEC, Mateja  
SA JERŠEK, Barbara (mentorica) / GAŠPERLIN, Lea (recenzentka)  
KZ SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2006  
IN PREŽIVETJE RAZLIČNIH SEVOV BAKTERIJ RODU *Salmonella* PRI PASTERIZACIJI  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 58 str., 10 pregl., 16 sl., 5 pril., 56vir.  
IJ sl  
JI sl/en
- AI Različnim sevom bakterij rodu *Salmonella* smo določali toplotno odpornost pri različnih izvedbah pasterizacije. Inokulum smo pripravili v 10 ml gojišča triptični soja bujon (TSB) iz ene kolonije preiskovanega seva bakterij rodu *Salmonella*, katerega smo 24 ur inkubirali na stresalniku ( $100 \text{ min}^{-1}$ ) pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzorce za pasterizacijo smo pripravili tako, da smo v 99 ml gojišča TSB ali 99 ml jajčnega melanža dodali 1 ml inokuluma in tako dobili začetno koncentracijo bakterij med  $10^6$  in  $10^7$  cfu/ml. Vzorec smo razdelili v epruvete s po 4 ml suspenzije. Med 15 minutno pasterizacijo v vodni kopeli pri izbrani temperaturi ( $58 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $64 \text{ }^\circ\text{C}$ ) smo vzorčenje opravili po 3, 5, 10 in 15 min. Začetno število bakterij v vzorcu in števila preživelih bakterij smo določili s števno metodo po standardu SIST EN ISO 4833 (2003). V prvem delu poizkusa smo določili preživetje 17 različnih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  v gojišču TSB. Iz enačb premic preživetja preiskovanih sevov smo izračunali decimalne redukcijske čase (D). Glede na razlike med vrednostmi D določenimi za 17 sevov bakterij rodu *Salmonella* smo ugotovili, da vrsta seva vpliva na preživetje teh bakterij pri pasterizaciji in za nadaljnje delo izbrali seve *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492. Ugotovili smo, da vrsta seva bakterij rodu *Salmonella* vpliva na preživetje bakterij pri temperaturi pasterizacije  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  v gojišču TSB in pri temperaturi pasterizacije  $64 \text{ }^\circ\text{C}$  v jajčnem melanžu, medtem ko vrsta seva ni imela vpliva na preživetje bakterij pri temperaturi pasterizacije  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  v jajčnem melanžu. Izbrani parametri pasterizacije (temperatura pasterizacije:  $58 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  in  $64 \text{ }^\circ\text{C}$  ter medij pasterizacije: gojišče TSB in jajčni melanž) so vplivali na preživetje pri sevih *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Typhimurium* ŽM142 in *Typhimurium* ŽM352, medtem ko pri sevu *S. Senftenberg* ŽM492 ta dva parametra nista imela vpliva na določitev razlik med vrednostmi D.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN DN  
DC UDC 579.24+579.26:579.67(043)=863  
CX microorganism/*Salmonella*/liquid whole egg/pasteurization/pasteurization temperature/pasteurization time/growth inhibition/decimal reduction time/D value  
AU STRELEC, Mateja  
AA JERŠEK, Barbara (supervisor) / GAŠPERLIN, Lea (reviewer)  
PP SI-1000 LJUBLJANA, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2006  
TI SURVIVAL OF *Salmonella* STRAINS THROUGH PASTEURIZATION TREATMENT  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO IX, 58 p., 10 tab., 16 fig., 5 ann., 56 ref.  
LA sl  
AL sl/en
- AB We determined thermal resistance of various *Salmonella* strains through different pasteurizations. A single colony of *Salmonella* strain tested was inoculated into 10 ml of Tryptone Soya Broth (TSB) and incubated for 24 hours on a rotary shaker (100 min<sup>-1</sup>) at 37 °C. In order to prepare samples for pasteurization 1 ml of inoculum was added into 99 ml of TSB or 99 ml of liquid egg respectively and thus the initial concentration of bacteria between 10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> cfu/ml was obtained. The sample was divided in aliquots of 4 ml in test tubes. During 15 min of pasteurization in water bath at the selected temperature (58 °C, 60 °C and 64 °C) sampling was carried out after 3, 5, 10 and 15 min. Initial number of bacteria in the sample and the number of survived bacteria was determined by plate count technique according to SIST EN ISO 4833 (2003). In the first part of test survival of 17 different strains through the pasteurization in TSB at 58 °C was determined. Survival curves were the basis for calculating the decimal reduction time (D value). As regards the differences between the D values determined for the 17 *Salmonella* strains, it was established that the strain type affects the survival of these bacteria through the pasteurization and thus *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 and *S. Senftenberg* ŽM492 were selected for further tests. We established that the *Salmonella* strain type has an impact on the survival of these bacteria through the pasteurization process in TSB at 60 °C and in liquid egg at 64 °C, while the strain type has no impact on the survival through the pasteurization in liquid egg at 60 °C. Selected pasteurization parameters (pasteurization temperature, 58 °C, 60 °C in 64 °C, and pasteurization medium, TSB and liquid egg) has an impact on *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Typhimurium* ŽM142 and *Typhimurium* ŽM352 strains. However, these two parameters have no impact on the determination of differences between D values for the *S. Senftenberg* ŽM492 strain.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>OKRAJŠAVE .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 SPLOŠNE LASTNOSTI KOKOŠJIH JAJC .....	2
2.1.1 Zgradba in kemijska sestava jajc.....	2
2.1.2 Prehranska in biološka vrednost jajc .....	4
2.1.3 Kakovost jajc .....	4
2.1.4 Jajčni izdelki .....	5
2.2 MIKROBIOLOGIJA JAJC IN JAJČNIH IZDELKOV .....	6
2.2.1 Primarna kontaminacija jajc .....	7
2.2.2 Sekundarna kontaminacija jajc .....	7
2.2.3 Kontaminacija tekočih jajčnih proizvodov .....	7
2.2.4 Ukrepi za preprečevanje kontaminiranosti jajc in jajčnih izdelkov .....	8
2.2.4.1 Patogene bakterije v jajcih.....	9
2.2.5 Zakonska določila o mikrobioloških merilih za jajčne proizvode .....	9
2.3 TOPLOTNA OBDELAVA ŽIVIL.....	10
2.3.1 Pasterizacija živil .....	11
2.3.2 Pasterizacija jajc in jajčnih izdelkov .....	12
2.3.2.1 Pasterizacija jajc v lupini .....	13
2.3.2.2 Pasterizacija jajčnega melanža .....	14
2.3.2.3 Pasterizacija jajčnega rumenjaka .....	15
2.3.2.4 Pasterizacija jajčnega beljaka .....	15
2.3.3 Toplotna odpornost mikroorganizmov.....	16
2.3.3.1 Decimalni redukcijski čas ali vrednost D .....	17
2.3.3.2 Vrednost Z .....	18
2.3.3.3 Vrednost F .....	19
2.4 BAKTERIJE RODU <i>SALMONELLA</i> .....	19
2.4.1 Splošne lastnosti bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	19
2.4.2 Klasifikacija bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	20
2.4.3 Razširjenost in načini prenosa bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	20
2.4.3.1 Salmoneloza .....	21
2.4.4 Preživetje bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri pasterizaciji .....	23
2.4.4.1 Vpliv pasterizacije živil na preživetje bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	24
2.4.4.2 Vpliv pasterizacije jajčnih proizvodov na preživetje bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	26
2.4 CILJI NALOGE .....	28
2.5 DELOVNE HIPOTEZE .....	28
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>29</b>
3.1 MATERIAL .....	29

3.1.1 Bakterijski sevi.....	29
3.1.2 Mikrobiološka gojišča .....	29
3.1.3 Živilo .....	30
3.1.4 Druge kemikalije .....	30
3.1.5 Laboratorijska oprema .....	30
3.2 METODE .....	30
3.2.1 Potek eksperimenta .....	30
3.2.2 Oživitev in priprava bakterijskih kultur za eksperimentalno delo .....	31
3.2.3 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču .....	33
3.2.3.1 Priprava gojišča .....	33
3.2.3.2 Priprava vzorca in določitev števila bakterij v vzorcu .....	33
3.2.3.3 Izračun števila bakterij v vzorcu.....	33
3.2.4 Rastna krivulja .....	34
3.2.5 Določanje števila preživelih bakterij pri pasterizaciji.....	34
3.2.6 Krivulje preživetja in izračun decimalnih redukcijskih časov.....	36
3.2.7 Statistična analiza .....	36
4 REZULTATI.....	39
4.1 RASTNA KRIVULJA BAKTERIJ SEVA <i>S. ENTERITIDIS</i> ŽM2.....	39
4.2 PREŽIVETJE RAZLIČNIH SEVOV BAKTERIJ RODU <i>Salmonella</i> PRI TEMPERATURI PASTERIZACIJE 58 °C V GOJIŠČU TSB.....	39
4.2.1 Primer izračuna vrednosti D za sev <i>S. Typhimurium</i> ŽM142 .....	40
4.2.2 Vpliv vrste seva bakterij rodu <i>Salmonella</i> na vrednosti D določene pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB.....	41
4.3 PREŽIVETJE IZBRANIH SEVOV BAKTERIJ RODU <i>Salmonella</i> PRI PASTERIZACIJI .....	42
4.3.1 Vpliv vrste seva na preživetje bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri pasterizaciji.....	42
4.3.2 Vpliv temperature in medija pasterizacije na preživetje izbranih sevov bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri pasterizaciji.....	45
5. RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1 RAZPRAVA.....	48
5.1.1 Potek pasterizacije in izračun vrednosti D.....	48
5.1.2 Vpliv vrste seva bakterij rodu <i>Salmonella</i> na preživetje bakterijskih celic pri pasterizaciji.....	48
5.1.3 Vpliv temperature in medija pasterizacije na preživetje bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	50
5.2 SKLEPI.....	52
6 POVZETEK.....	53
7 VIRI .....	54
ZAHVALA	
PRILOGE	



## KAZALO SLIK

Slika 2.1: Presek jajca (Holcman in sod., 2004: 99).....	2
Slika 2.2: Proizvodnja jajčnih izdelkov (Gašperlin in Bem, 2003: 455).....	13
Slika 2.3: Krivulja preživetja mikrobne populacije pri segrevanju (Singh in Heldman, 1993: 226).....	17
Slika 2.4: Premica preživetja mikroorganizmov pri segrevanju (Singh in Heldman, 1993: 226).....	18
Slika 2.5 : Pomembnejše poti širjenja bakterij rodu <i>Salmonella</i> (Krauss in sod., 2004: 308).....	21
Slika 2.6 : Prijavljeni primeri salmoneloze v Sloveniji v letih od 1995 do 2004 (Salmoneloze, 2005).....	23
Slika 3.1: Shema poteka glavnih stopenj eksperimentalnega dela.....	31
Slika 3.2: Shema poteka oživitve posameznega seva bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	32
Slika 3.3: Shema priprave vzorca, pasterizacije in vzorčenja.....	35
Slika 3.4: Potek določitve vrednosti D za seve bakterij rodu <i>Salmonella</i> .....	36
Slika 4.1: Rastna krivulja seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM2 v gojišču TSB pri 37 °C.....	39
Slika 4.2: Premice preživetja bakterij seva <i>S. Typhimurium</i> ŽM142 pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB po 15 minutni pasterizaciji.....	40
Slika 4.3: Premice preživetja bakterij seva <i>S. Typhimurium</i> ŽM142 pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB po 10 minutni pasterizaciji.....	40
Slika 4.4: Premice preživetja bakterij seva <i>S. Typhimurium</i> ŽM142 pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB po 5 minutni pasterizaciji.....	41
Slika 4.5: Krivulje preživetja seva <i>S. Enteritidis</i> ŽM351 pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB ter pri 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu.....	44
Slika 4.6: Povprečne vrednosti D izbranih sevov bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri temperaturi pasterizacije 58 °C, 60 °C in 64 °C v gojišču TSB in v jajčnem melanžu.....	47

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 2.1: Povprečna kemijska sestava celotne jajčne mase, rumenjaka in beljaka (Roberts in sod., 1998) .....	4
Preglednica 2.2: Proizvodna higienska merila za jajčne proizvode (Uredba komisije ES, št. 2073, 2005) .....	10
Preglednica 2.3: Priporočene temperature in čas zadrževanja pri pasterizaciji tekočih jajčnih proizvodov (Sheldon, 2005) .....	12
Preglednica 2.4: Vrednosti D za različne seve bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri različnih temperaturah pasterizacije in v različnih medijih.....	24
Preglednica 2.5: Vrednosti D določene za različne seve bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri pasterizaciji v različnih živilih.....	25
Preglednica 2.6: Vrednosti D določene za različne seve bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri pasterizaciji jajčnih proizvodov.....	26
Preglednica 3.1: Sevi bakterij rodu <i>Salmonella</i> uporabljeni pri praktičnem delu.....	29
Preglednica 4.1: Vpliv seva bakterij rodu <i>Salmonella</i> na vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB .....	41
Preglednica 4.2: Povprečne vrednosti D izbranih sevov bakterij rodu <i>Salmonella</i> pri temperaturi pasterizacije 58°, 60° in 64°C v gojišču TSB in jajčnem melanžu (n = 3).....	43
Preglednica 4.3: Vpliv temperature in medija pasterizacije na vrednosti D določene za izbrane seve bakterij rodu <i>Salmonella</i> (n = 3).....	46

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM2 pri temperaturi 37 °C v gojišču TSB
- Priloga B1: Preživetje 17-ih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB
- Priloga B2: Vrednosti D 17-ih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB
- Priloga C1: Preživetje izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB in v jajčnem melažu, ter pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melažu
- Priloga C2: Vrednosti D za 5 izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije 58 °C, 60 °C in 64 °C v gojišču TSB in v jajčnem melažu

## OKRAJŠAVE

<b>Kratica - okrajšava</b>	<b>pomen</b>
A, B, C	paralelka
BHI	(angl. Brain Heart Infusion Broth)
Cfu	(angl. colony forming unit) kolonijska enota
D	decimalni redukcijski čas (min)
$\bar{D}$	povprečen decimalni redukcijski čas (min)
$D_{T,g}$	decimalni redukcijski čas pri temperaturi T in v gojišču g (min)
$\bar{D}_{T,g}$	povprečen decimalni redukcijski čas pri temperaturi T in v gojišču g (min)
JM	jajčni melanž
$JM_T$	pasterizacija jajčnega melanža pri temperaturi T
min	minute
N	število mikroorganizmov
n	število paralelk; število sevov
so	standardni odklon
T	temperatura (°C)
TSA	gojišče triptični soja agar TSA (ang. Tryptone soya agar, TSAP gojišče TSB z dodatki: 0,3 ut. % kvasnega ekstrakta; 0,1 ut. % Na-piruvata; 1,4 ut. % agar bacteriological)
TSB	gojišče triptični soja bujon TSB (ang. Tryptone soya broth)
$TSB_T$	pasterizacija v gojišču TSB pri temperaturi T
XLD	gojišče XLD (ang. Xylose lysine desoxycholate agar)

## 1 UVOD

Bakterije rodu *Salmonella* so po Gramu negativne palčke in naseljujejo prebavila sesalcev in ptic. Okužba iz prebavnega trakta živali (predvsem perutnine) se lahko prenese na jajca in meso z neustrezno higieno. Vir bakterij rodu *Salmonella* predstavljajo tudi okuženi ljudje s slabimi higienskimi navadami, navzkrižno kontaminirana živila, slaba higiena pribora. Pri kontaminiranih ali pogojno kontaminiranih surovinah je potrebno zagotoviti ustreznost živil z ustrezno toplotno obdelavo (Risk assesment..., 2002). Bakterije rodu *Salmonella* so med najpogostejšimi povzročitelji okužb z mikrobiološko kontaminirano hrano. Predvsem so okužena živila živalskega izvora, na prvem mestu sta meso perutnine in jajca.

V Sloveniji je največ okužb pri ljudeh povzročenih s sevom *S. Enteritidis* (Salmoneloze, 2005), v svetu pa najbolj naraščajo okužbe s sevom *S. Typhimurium* (Risk assesment..., 2002). Pomembno je tudi dejstvo, da je prav vsak sev bakterij rodu *Salmonella* potencialno lahko vzrok zastrupitve s kontaminirano hrano (Wray, 2003; Salmoneloze, 2005).

Jajca so s svojo sestavo idealen medij za rast in razmnoževanje mikroorganizmov, kontaminacija pa je lahko primarna ali sekundarna. Preko 99 % okužb je sekundarnih, preko jajčne lupine (Roberts in sod., 1998). Postopek pasterizacije jajčnih izdelkov, kontaktni čas in temperatura pasterizacije sta prilagojena toplotno najbolj odpornemu sevu *S. Senftenberg 775 W*. Priporočena temperatura pasterizacije je 64,4 °C, zadrževalni čas pa 2,5 min (Wray, 2003).

Pri predelavi jajc in jajčnih izdelkov je najpogosteje v rabi postopek pasterizacije. Pasterizacija se uporablja za cela jajca v lupini in za tekoče jajčne proizvode, jajčni melanž, jajčni beljak in jajčni rumenjaki. Pasterizacija je zadovoljivo izvedena, če se uniči 90 % potencialno nevarnih, vegetativnih bakterijskih celic, ki so sposobne rasti in razmnoževanja. Na uspešnost pasterizacije vplivajo medij / živilo katerega pasteriziramo, vrednost pH, začetna kontaminacija živila, temperatura inkubacije (idealna 37 °C), predgrevanje vzorca. Z določitvijo decimalnega redukcijskega časa (D) pri določeni temperaturi pasterizacije lahko določimo ustrezen čas pasterizacije, ki je potreben za 90 % uničenje vegetativnih celic (Board in Fuller, 1994; Ramaswamy in Marcotte, 2006).

Namen našega dela je bil ugotoviti kako vplivajo vrsta seva bakterij rodu *Salmonella*, temperatura in medij, na vrednosti D pri pasterizaciji. Učinkovitost pasterizacije smo preverili s klasično mikrobiološko metodo štetja kolonij na ploščah po 24 urni inkubaciji pri 37 °C (SIST EN ISO 4833, 2003). Decimalne redukcijske čase (vrednosti D) za posamezen sev smo izračunali iz enačb premic preživetja za 5 min pasterizacijo. S statistično analizo vrednosti D smo nato določili, kako vplivajo posamezen sev, temperatura pasterizacije in medij pasterizacije na preživelost bakterij rodu *Salmonella*.

## 2 PREGLED OBJAV

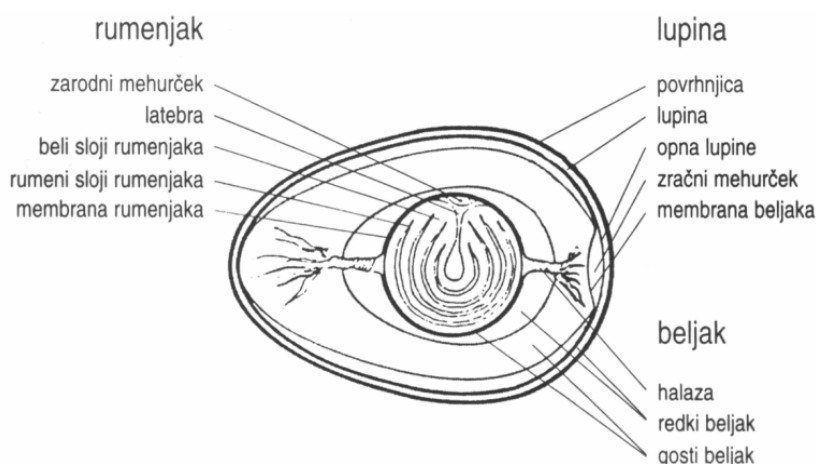
### 2.1 SPLOŠNE LASTNOSTI KOKOŠJIH JAJC

Primarna vloga kokošjih jajc je razmnoževanje, razvoj zarodka poteka 21 dni. Lupina in beljak ščitita zarodek pred mehanskimi poškodbami in infekcijami. S staranjem jajca se spreminja njegova sestava. Če se jajce ne obrača, se rumenjaki prilepi na notranjo stran lupine jajca. S staranjem se predvsem povečuje zračna komora med zunanjo in notranjo membrano, kar pomeni večja kot je zračna komora, starejše je jajce. Sveža jajca vrednost pH med 7,6 in 7,8, zanimivo je, da vrednost pH beljaka naraste pri hranjenju jajc pri sobni temperaturi 1 – 3 dni od 9,1 do 9,6 (Roberts in sod., 1998; Zorko, 1995).

Jajce, univerzalno živilo, predstavlja pomemben del naše vsakdanje prehrane, kot samostojno živilo ali kot sestavni del številnih živilskih izdelkov (na primer: peciva, testenine, majoneze, omake). Na kakovost jajc imata največji vpliv kakovost krme (izvor, kvaliteta) in način reje kokoši (Zorko, 1995).

#### 2.1.1 Zgradba in kemijska sestava jajc

Jajce je sestavljeno iz lupine, beljaka in rumenjaka (Slika 2.1).



Slika 2.1: Presek jajca (Holcman in sod., 2004: 99)

Povprečna kemijska sestava celotne jajčne mase, rumenjaka in beljaka je prikazana v preglednici 2.1. Jedilni del jajca predstavlja približno 89 – 91 % mase celotnega jajca v lupini (Cherian, 2006).

**Jajčno lupino** obdaja kutikula (zaščitni sloj) ali povrhnjica, katera zapira številne pore na jajčni lupini, dovoljuje izmenjavo plinov in vode skozi pore, hkrati pa ščiti jajce pred vdorom mikroorganizmov. S staranjem jajca se ta lastnost izgublja in tako imajo plesni in bakterije večje možnosti vdora v jajce. Zaščitni sloj se odstrani tudi z mehanskim čiščenjem ali umivanjem. Jajčna lupina predstavlja naravno neelastično, vendar relativno trdno embalažo, ki je debela 0,2 – 0,4 mm ter sestavljena iz organske membrane z mrežasto strukturo in vmesnega anorganskega (apnenčastega) sloja. V apnenčastem sloju so pore, ki omogočajo prehod plinov med zunanjim in notranjim okoljem jajca. Prehodnih

je 1 % por, največ se jih nahaja na širšem delu jajca, njihovo povprečno število znaša 70 – 150 por na cm<sup>2</sup> jajčne površine oziroma 6000 – 10000 por na jajčno površino. Število por na jajčni lupini narašča s staranjem kokošje jate. V času skladiščenja se povečuje število prehodnih por. Pore na površini merijo 15 – 60 μm, v notranjosti pa 6 – 23 μm, kar zadošča za prehod bakterij v notranjost. Membrana je dvoslojna, sestavljena iz opne lupine (zunani sloj) in membrane beljaka (notranji sloj), ki se prekrivata, na topem delu jajca se razmakneta in tvorita zračni mehurček. Zračni mehurček je pokazatelj svežine jajca, kajti ta se s starostjo jajca veča. Pri svežem jajcu ima obliko leče premera 13,2 mm in višine do 2 mm. Membrana beljaka zelo učinkovito preprečuje prehod mikroorganizmov v globino jajca. Med membrano in beljakom je tudi gosto področje, imenovano mejna membrana, ki ni prepustna za sestavine beljaka in prispeva k nepropustnosti notranjosti lupine (Gašperlin in Bem, 2003; Holcman in sod., 2004; Zorko, 1995).

**Beljak** sestavljajo halaza ter redki in gosti beljak. Notranji in zunanji sloj beljaka sestavljata redki, tekoči beljak, srednji sloj pa je žilav in gost. Srednji, viskozni sloj beljaka na krajih zaključujejo halaze, spiralno zvite niti, katere povezujejo rumenjaka z beljakom in ga držijo v centralni legi. Razmerje med gostim in redkim beljakom pri svežem jajcu je 2 : 1, s staranjem jajca se spremeni v 1 : 1. Povprečna kemijska sestava jajčnega beljaka je podana v preglednici 2.1, sestavljen je v večini iz vode (87,9 %). Na drugem mestu so beljakovine: ovalbumin (5,4 %), konalbumin (13 %), ovomukoid (11 %), lizozim (3,5 %), ovomucin (1,5 %), flavoprotein – apoprotein (0,8 %), ovoinhibitor (0,1%), avidin (0,05 %), ter globulini in ostali proteini (8 %) (Roberts in sod., 1998; Zorko, 1995).

Protimikrobni učinek imajo beljakovine:

- ovomukoid – inhibitor tripsina,
- lizozim – lizira mukopeptide celične stene grampozitivnih bakterij,
- ovotransferin (konalbumin) – vsebuje železo, cink in baker, kateri so za življenjske procese mikroorganizmov neobhodno potrebni in
- avidin (Gašperlin in Bem, 2003).

Visoka vrednost pH beljaka, katera lahko variira od 7,6 – 9,3, najpogosteje je med 8,4 – 9,2, vpliva inhibitorno na mikroorganizme. Koagulacija beljaka se prične pri 62 °C (Gašperlin in Bem, 2003; Roberts in sod., 1998; Zorko, 1995) .

**Rumenjak** je obdan s tanko štirislojno membrano, imenovano tudi vitelinska ovojnica (Gašperlin in Bem, 2003). Beli sloj rumenjaka leži v petih slojih rumenega sloja rumenjaka. Latebra (tvorni rumenjaka) je v obliki kija, v njem se nahaja zarodni mehurček (ploščica). Rumenjak zaradi vsebnosti maščob (63,1 % trigliceridov, 4,9 % prostega holesterola, 1,3 % holesterola, 0,9 % prostih maščobnih kislin, 29,7 % fosfolipidov) teži vedno navzgor, ker je specifično lažji od beljaka (Zorko, 1995). Povprečna kemijska sestava jajčnega rumenjaka je podana v preglednici 2.1. Takšna sestava je idealna za rast in razvoj mikroorganizmov. Pri maščobah prevladujejo fosfolipidi, pomembna je tudi vsebnost vitaminov (askorbinska kislina, tiamin, riboflavin, niacin, pantetonska kislina, vitamin A, vitaminov B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> in B<sub>12</sub>), mineralov (kalcij, železo, magnezij, cink, baker, mangan), encimov, pigmentov in hormonov (Gašperlin in Bem, 2003; Roberts, 1998; Zorko, 1995). Večina jajčnega rumenjaka se uporabi v slaščičarstvu, pekarstvu in pri izdelovanju majonez (Board in Fuller, 1994). Rumenjak začne koagulirati pri 65 °C.

Povprečna kemijska sestava celotne jajčne mase (jajčni melanž), rumenjaka in beljaka je prikazana v preglednici 2.1.

**Preglednica 2.1: Povprečna kemijska sestava celotne jajčne mase, rumenjaka in beljaka (Roberts in sod., 1998)**

Sestavina	Celotna jajčna masa	Rumenjak	Beljak
Voda (%)	74,6	48	87,9
Suha snov (%)	26,4	51,3	12,2
Organske snovi (%)	25,6	50,2	11,6
Proteini (%)	12,8	16,6	10,6
Maščobe (%)	11,8	32,6	sledovi
Ogljikovi hidrati (%)	1,0	1,0	0,9
Anorganske snovi (%)	0,8	1,1	0,6

### 2.1.2 Prehranska in biološka vrednost jajc

Kokošja jajca imajo visoko prehransko in biološko vrednost ter so pomemben vir visoko vrednih beljakovin in maščob. Jajčni beljak sestavljajo proteini, katerih aminokislinsko razmerje je skoraj idealno za prehranske potrebe ljudi. Večina glavnih hranilnih snovi se nahaja v rumenjaku, posebej so pomembni lipoproteini. Glavne prehranske komponente jajčnega rumenjaka so proteini (16 – 17 %) in maščobe (31 – 33 %). Glavne komponente maščob so triacilgliceroli, fosfolipidi in holesterol. V maščobah se nahajajo še barvila, v maščobah topni vitamini in minerali (Cherian, 2006). Prebavljivost jajca je 97 % in je med vsemi beljakovinskimi živali največja, kar pogojuje zelo visok proteinski izkoristek. (Zorko, 1995; Gašperlin in Bem, 2003). Povprečna energijska vrednost 100 g jajčne mase (jajčni melanž) je 155 kcal oziroma 657 kJ (Zorko, 1995).

### 2.1.3 Kakovost jajc

Na kakovost jajca vplivajo zunanje (predvsem jajčna lupina) in notranje lastnosti jajca (predvsem sestava in izgled rumenjaka in beljaka). Mednje spadajo fizikalne in kemijske lastnosti rumenjaka, beljaka in lupine, ki vplivajo na sprejemljivost jajc za prehrano ljudi. Lastnost, katero uporabimo za oceno kakovosti, mora biti za jajce značilna, jasno definirana, enostavno izmerljiva, zanesljivo ponovljiva in natančna. Za ocenjevanje kakovosti in svežosti jajc se uporabljajo predvsem fizikalne in senzorične metode. Za potrošnika pomeni kakovost predvsem značilne senzorične lastnosti (čistost in barva lupine, velikost jajca, barva rumenjaka) in svežost. Proizvajalec gleda na kakovost predvsem pri trdnosti lupine, masi jajca in odsotnosti napak (Doganoc in Komar, 2001).

Zunanjo kakovost jajca se ocenjuje skupaj z lupino. Sem spadajo oblika in velikost jajca, barva in izgled lupine ter njena čistost. Za ugotavljanje zunanje kakovosti se uporabljajo naslednje analize (Doganoc in Komar, 2001):

- debelina, izgled in masa jajčne lupine,
- ugotavljanje specifične teže in mase jajca,
- dokazi za uporabo konzervansov (parafin, maščobe, apneno mleko),
- preizkus umivanja jajc in
- barva lupine pod UV – svetlobo.



Notranja kakovost jajca se ocenjuje po razbitju, ko se opazujejo predvsem lastnosti in izgled rumenjaka (barva, oblika, čvrstost, lomni količnik) ter beljaka (količina, gostota, višina gostega beljaka, vidnost slojev, lomni količnik). Za ugotavljanje notranje kakovosti se uporabljajo naslednje analize (Doganoc in Komar, 2001):

- izgled ter ocena beljaka in rumenjaka pri ubitem jajcu,
- presvetljevanje jajc in merjenje zračnega mehurčka,
- merjenje vrednosti pH za beljak,
- merjenje refrakcije beljaka in rumenjaka,
- merjenje višine gostega beljaka,
- ocena okusa in vonja beljaka in rumenjaka in
- ugotavljanje barve rumenjaka.

Jajca se po kakovosti razvrščajo na (EGS, 1907/90):

- jajca razreda "A" ali sveža jajca,
- jajca razreda "B" ali "jajca druge kakovosti" oziroma "podklasirana jajca", namenjena industriji in
- jajca razreda "C" glede kakovosti ne ustrezajo prejšnjima razredoma in so namenjena uporabi izključno v industriji.

Jajca kakovostnega razreda "A" in "oprana" jajca se razvrščajo glede na maso (Uredba komisije (ES) 2295, 2003):

- XL – zelo velika        73 g in več
- L – velika                od 63 g do 73 g
- M – srednja              od 53 g do 63 g
- S – majhna                pod 53 g

Rok trajanja za jajca razreda A in "oprana" jajca je največ 28 dni od dneva znesitve (Uredba komisije (ES) 2295, 2003).

Za ustrezno kakovost jajc in jajčnih izdelkov je potrebno zagotoviti tudi primerno skladiščenje svežih jajc v zračnem in suhem prostoru pri enakomerni temperaturi od +5 °C do +18 °C, najbolje pa je uporabiti temperaturo od 0 °C do +1 °C, da se prepreči izsuševanje jajc. Relativna vlaga v skladišču mora biti med 70 % in 85 %. V dobro prezračenih prostorih, brez tujih vonjev in velikih temperaturnih nihanj je jajca možno skladiščiti tudi do 8 mesecev, v prostorih s kontrolirano atmosfero pa tudi do 12 mesecev. Med skladiščenjem in transportom morajo jajca ostati suha, brez tujih vonjev, čista in zaščitena pred vremenskimi vplivi, svetlobo in trki (Doganoc in Komar, 2001).

#### **2.1.4 Jajčni izdelki**

Večina jajc se porabi v gospodinjstvu kot cela jajca v lupini. Z razbitjem jajčne lupine lahko pridobimo tri tekoče jajčne proizvode in sicer: jajčni melanz, jajčni rumenjaki in jajčni beljak, kateri se uporabljajo večinoma v industrijsko-predelovalni industriji in večjih prehrabnih obratih (menze, restavracije). Z ločevanjem lupine od jajčne vsebine lahko pridobimo tekoče, koncentrirane, sušene, kristalizirane, hitro zmrznjene, koagulirane izdelke ali izdelke z zmanjšano vsebnostjo holesterola. Ti izdelki se lahko dodajo številnim živilskim izdelkom, zaradi svoje sestave in hranilne vrednosti, se jajca uporabljajo tudi kot

samostojno živilo. Tekoče jajčne proizvode se praviloma toplotno obdela s pasterizacijo in do uporabe spravi v posebne hlajene posode. Pred postopki obdelave se jim lahko dodajo sol, sladkor ali sredstva, ki znižajo pH. Jajčni proizvodi so uporabni v pekarskih in slašičarskih obratih, pri pripravi testenin, posebnih diet, omak in majonez. Večina jajčnih izdelkov se pridobi iz kokošjih, račjih in puranjih jajc, vendar so v jajčnih proizvodih dovoljena samo jajca iste vrste (Board in Fuller, 1994; Roberts in sod., 1998).

**Jajčni melanž** predstavlja homogeniziran tekoči jajčni rumenjaki in beljak, kateri povprečno vsebuje 23 – 25 % suhe snovi. Če želimo v jajčnem melanžu višjo vsebnost suhe snovi, se doda jajčni rumenjaki, če želimo nižjo vsebnost suhe snovi, se doda jajčni beljak. Bakteriološko je toplotno neobdelan jajčni melanž manj stabilen kot pa samo jajčni beljak ali rumenjaki. Jajčni melanž se uporablja predvsem v pekarstvu, konditorstvu in v mnogih drugih živilskih proizvodih (Board in Fuller, 1994).

**Tekoči jajčni beljak** pridobimo s ločevanjem jajčnega rumenjaka od jajčne lupine, vsebuje približno 12 % suhe snovi. Je zelo viskozen in z mešanjem oblikuje peno, katera se uporablja predvsem pri peki slaščic. Koagulirati začne pri 62 °C (Board in Fuller, 1994; Zorko, 1995).

**Tekoči jajčni rumenjaki** pridobimo s homogenizacijo jajčnih rumenjakov ločenih od beljaka in lupine, vsebuje pa približno 51,9 % suhe snovi. Koagulirati začne pri 65 °C (Board in Fuller, 1994; Zorko 1995).

## 2.2 MIKROBIOLOGIJA JAJC IN JAJČNIH IZDELKOV

Jajce v lupini je naravno zaščiteno z več sloji, vendar lahko mikroorganizmi vseeno kontaminirajo jajčno vsebino. Poznamo primarno kontaminacijo, ki nastopi pred valjenjem in sekundarno kontaminacijo, ki nastopi po valjenju jajc. Primarna kontaminacija je redka. V trenutku izvalitve je 99 % kokošjih jajc sterilnih, kontaminacija z mikroorganizmi je v večini primerov sekundarna. Kontaminacija jajc večinoma poteka preko jajčne lupine, predvsem pri jajcih brez kutikule – povrhnjice, katero smo kemijsko ali mehansko odstranili (Roberts in sod., 1998).

Na jajčni lupini so večinoma prisotne grampozitivne, v notranjosti jajca pa gramnegativne bakterije, katere povzročajo kvar. Določene bakterije (na primer *Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp. in *Citrobacter* spp., ter patogene *Salmonella* spp., *Listeria* spp. in *Staphylococcus* spp.) se lahko v rumenjaku in beljaku razmnožujejo, ne da bi se pri tem spremenile senzorične lastnosti jajc (Gašperlin in Bem, 2003; Opinion of..., 2000).

Že iz zgodovine je poznana povezava med jajci in bakterijami rodu *Salmonella*, katere povzročijo večino okužb, povezanih z jajci (Gast, 2005). 10 % jajčnih lupin je okuženih z različnimi sevi bakterij rodu *Salmonella*, najpogosteje se pojavljajo sevi *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*. Najpogostejši kontaminant jajc so bakterije seva *S. Enteritidis*. To dokazujejo študije na Japonskem, pri katerih so dokazali prisotnost tega seva v enem od šestih jajc pri s tem sevom umetno okuženih kokoših, in v Veliki Britaniji, kjer so dokazali prisotnost tega seva v naravno kontaminiranih jajcih (Gast, 2005).

Pogosti kvarljivci jajc so bakterije rodu *Pseudomonas*, manj pogosti kvarljivci jajc so bakterije rodov *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus* in *Bacillus* (Board in Fuller, 1994). Kot pogoste patogene bakterije na jajčni lupini navaja Gast (2005) bakterije vrst *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* in *Yersinia enterocolitica*. Bakterije se prisotne v umazaniji na jajčni lupini, vendar pa lahko ob ugodnih razmerah prehajajo tudi skozi jajčno lupino. To se pogosto dogaja po umivanju in čiščenju jajčne lupine, ko se odstrani povrhnjica, katera predstavlja naraven ščit pred vdorom mikroorganizmov v jajce (Gast, 2005).

V ZDA proizvedejo letno 46,8 milijard jajc od tega jih je s *S. enterica* podvrsta *enterica* kontaminiranih 2,3 milijona, kar predstavlja 0,0049 % proizvedenih jajc, oziroma le 1 s salmonelami kontaminirano jajce na 20.000 proizvedenih jajc (Sheldon, 2005).

### 2.2.1 Primarna kontaminacija jajc

Do primarne kontaminacije jajc pride med oblikovanjem jajca, mikroorganizmi se prenesejo iz jajčnikov na rumenjaki. Do okužbe jajčnikov pride z mikroorganizmi iz kloake še preden se formira jajčna lupina. Najpogostejši kontaminanti so bakterije rodu *Salmonella*, med njimi najpogosteje sev *S. Enteritidis*, vendar so kontaminanti lahko tudi mikobakterije in mikrokoki. Pri oblikovanju jajca v jajcevodu je možna tudi kontaminacija rumenjaka, beljaka ali notranje strani lupine. Pri primarni kontaminaciji vplivata na število bakterij rodu *Salmonella* (*S. Enteritidis*) temperatura in čas kontaminacije. Temperatura nižja od 12 °C zavira razmnoževanje bakterij v beljaku in preprečuje prehod bakterij iz beljaka v rumenjaki (Gašperlin in Bem, 2003; Opinion of..., 2000).

### 2.2.2 Sekundarna kontaminacija jajc

Sekundarna kontaminacija je bolj pogosta in do nje pride po valjenju. Pogosto je posledica več dejavnikov, med katerimi so na prvem mestu slaba higiena živali in obrata ter kontaminirana voda. Možna je kontaminacija s fekalijami ali umazanijo kot posledica kontakta s kletko, napravami, opremo ali prehodom iz zraka. Kolikšna bo sekundarna kontaminacija jajc, je odvisno predvsem od higienskih razmer, v katerih so skladiščena jajca. Prehod in hitrost razmnoževanja bakterij rodu *Salmonella* v jajcu sta odvisni predvsem od fekalne onesnaženosti lupine, temperature skladiščenja in začetnega števila bakterij. Pri enodnevnem skladiščenju jajc pri 25 °C se poveča število salmonel za tri potence, pri enodnevnem skladiščenju pri 10 °C je rast bistveno počasnejša, medtem ko je pri 4 °C zaznati celo zmanjšanje števila bakterij. Pri kontaminiranih fekalijah z 10<sup>4</sup> salmonelami na 1 gram so jih v jajcu izolirali po enem do treh dneh. V primeru kontaminacije 10<sup>6</sup> salmonel na 1 gram fekalij, so bile bakterije rodu *Salmonella* prisotne že pri 50 – 75 % vzorcev (Gašperlin in Bem, 2003; Opinion of..., 2000).

### 2.2.3 Kontaminacija tekočih jajčnih proizvodov

Do kontaminacije tekočih jajčnih proizvodov prihaja v večini primerov po stiku jajčne vsebine s površino jajčne lupine. Ker želimo imeti ustrezen jajčni izdelek, je potrebno zagotoviti čim nižjo kontaminacijo pri razbijanju in ločevanju jajčne vsebine. Pri tem dobimo tri proizvode in sicer: jajčni melanj, jajčni beljak in jajčni rumenjaki. Jajčni melanj in jajčni rumenjaki sta zaradi specifične kemijske sestave idealna medija za rast in razvoj mikroorganizmov. Proizvodnja tekočih jajčnih proizvodov poteka iz svežih jajc, kar je

smiselno tako iz mikrobiološkega kot iz ekonomskega vidika. Tekoče jajčne proizvode je priporočljivo čim hitreje pasterizirati in nato primerno skladiščiti, da preprečimo rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Za jajčne proizvode, ki pred pasterizacijo vsebujejo od 100 cfu/g do 5000 cfu/g mikrobnih celic bo pasterizacija še ustrezna (Board in Fuller, 1994).

Priporočljivo je hranjenje tekočih jajčnih proizvodov pri temperaturi do 6 °C/24 ur. Po tem času se morajo izdelki zamrzniti ali predelati, da se prepreči morebitno razmnoževanje prisotnih mikroorganizmov (Gašperlin in Bem, 2003).

#### **2.2.4 Ukrepi za preprečevanje kontaminiranosti jajc in jajčnih izdelkov**

Primarno kontaminacijo jajc lahko preprečujemo z ustrežno higieno vode, krme in kletk ter veterinarskim nadzorom živali. Sekundarno kontaminacijo jajc lahko preprečimo ali omilimo s primerno in nadzorovano higieno obrata in pravilnim rokovanjem z jajci, kar pomeni, da mora biti površina jajčne lupine brez nečistoč. Če se nečistoče pojavijo na jajčni lupini, se lahko odstranijo s suhim ali mokrim čiščenjem. Vendar se tako odstrani tudi povrhnjica in tako postane jajčna lupina ob ugodnih razmerah (temperatura, vlaga, pH) lažje prehodna za mikroorganizme. Preprečevanje okužb preko jajčne lupine se lahko prepreči s pasterizacijo jajčne lupine (Board in Fuller, 1994).

Preprečevanje kontaminacije se izvaja z različnimi ukrepi. Potapljanje jajc, preden se loči vsebina od lupine, za 10 sekund v vodno kopel s temperaturo 78 – 80 °C se je izkazalo za učinkovito. Vendar je potrebno tekoče jajčne proizvode takoj ohladiti na 6 °C ter pred pasterizacijo hraniti največ 24 ur (Gašperlin in Bem, 2003).

Prehod mikroorganizmov v notranjost jajca se poizkuša zaustaviti ali upočasniti s postopki konzerviranja, primerna so jajca do starosti 8 dni. Uporabljajo se postopki hlajenja, prevleke površine lupine, mešanice plinov in obsevanje. Najpogosteje se uporablja hlajenje. Kot konzervirna sredstva za jajčno lupino se najpogosteje uporabljata gašeno apno  $\text{Ca(OH)}_2$  in parafinsko olje. V manjših obratih pa se za konzerviranje jajčne lupine uporabljajo tudi maščobe, vazelin, vosek in vodno steklo (Board in Fuller, 1994; Doganoc in Komar, 2001).

V nekaterih državah je dovoljena uporaba  $\gamma$ -žarkov za obsevanje jajc, katerih namen je zaščita pred mikroorganizmi in tako podaljšanje obstojnosti. Za obsevanje jajc v lupini oziroma svežih jajc se uporablja doza 1,5 kGy ( $\text{Gy} = \text{J kg}^{-1}$ ). Tako konzervirana jajca, hranjena 25 dni pri +4 °C, so brez organoleptičnih sprememb. Med skladiščenjem in transportom morajo jajca ostati suha, brez tujih vonjev, čista in zaščitena pred vremenskimi vplivi, svetlobo in trki (Doganoc in Komar, 2001).  $\gamma$ -žarki se uporabljajo za uničenje bakterij rodu *Salmonella* tudi pri obdelavi perutninskega mesa, jajčnih izdelkih in piščančji krmi (Gast, 2003).

Pri tekočih jajčnih proizvodih je najbolj smotrni ukrep priprava jajčnih produktov iz svežih jajc, avtomatizacija postopka ločevanja jajc in nato čim hitrejša pasterizacija izdelka. Seveda je pomembno tudi hranjenje pasteriziranega produkta v ustrezni embalaži, da se zavaruje pred vplivi svetlobe in temperaturnimi nihanjem (Board in Fuller, 1994).

Tekoči jajčni proizvodi so najpogosteje kontaminirani s sevom *S. Enteritidis*. Isiker in sod. (2003) so raziskali, kakšen je vpliv kombinacije visokega hidrostatičnega pritiska (250 MPa) in vodikovega peroksida (koncentracije 0,1, 0,5 in 1 %) na inhibicijo bakterijskih celic *S. Enteritidis* pri temperaturi 20 °C. Največji učinek je imela kombinacija 0,1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hidrostatskega tlaka 250 MPa po 5-minutnem delovanju, saj se je število celic zmanjšalo iz 1,9x10<sup>8</sup> cfu/ml na 5,5x10<sup>2</sup> cfu/ml. Zanimivo, da pri kombinaciji 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in hidrostatskem tlaku 250 MPa po 5-minutnem delovanju ni bilo učinka na bakterijske celice, kajti njihovo število je ostalo nespremenjeno 8,9x10<sup>7</sup> cfu/ml (Isiker in sod., 2003).

#### 2.2.4.1 Patogene bakterije v jajcih

Jajca so kot živilo živalskega izvora pogosto kontaminirana z pogojno patogenimi mikroorganizmi. Surova jajca tako lahko vsebujejo bakterije vrst *Salmonella enterica* ss. *Enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* in *Campylobacter* spp.

Mikrobiološka varnost surovih jajčnih proizvodov, kontaminiranih s patogenimi mikroorganizmi, je odvisna od (Gast, 2005):

- zanesljive toplotne obdelave (pasterizacije), ali katerega drugega postopka, kateri uniči patogene mikroorganizme,
- pravnega hlajenja,
- ustrezne in kvalitetne higijene proizvodnega obrata in zaposlenih, poseben poudarek je pri higieni za tekoče jajčne proizvode,
- nadzora nad temperaturo in časom pri distribuciji in
- namena uporabe.

#### 2.2.5 Zakonska določila o mikrobioloških merilih za jajčne proizvode

Glede mikrobioloških meril velja za jajčne proizvode uredba komisije ES št. 2073 (2005) o mikrobioloških merilih za živila. Merila za varnost jajčnih proizvodov, izvzeti so proizvodi pri katerih postopek predelave ali sestava proizvoda odpravlja tveganje salmonele:

- vzorčenje v 5-ih paralelkah,
- odsotnost bakterij rodu *Salmonella* v 25 g jajčnega proizvoda,
- uporabi se metoda najnovejše izdaje standarda EN/ISO 6579 in
- velja za proizvode dane v promet med rokom uporabnosti.

**Preglednica 2.2: Proizvodna higienska merila za jajčne proizvode (Uredba komisije ES, št. 2073, 2005)**

Mikroorganizmi	Načrt vzorčenja <sup>(1)</sup>		Mejne vrednosti		Referenčna analizna metoda <sup>(2)</sup>	Stopnja, v kateri se merilo uporablja	Ukrepi v primeru nezadovoljivih rezultatov
	n	c	m	M			
Enterobakterije	5	2	10 cfu /g ali ml	100 cfu /g ali ml	ISO 21528- 2	Na koncu proizvodnega procesa	Kontrola učinkovitosti termične obdelave in preprečevanja naknadne kontaminacije

Legenda: <sup>(1)</sup> – n je število enot v vzorcu; c je število vzorčnih enot, kjer je vrednost med m in M; m – najnižja vrednost za prisotnost enterobakterij; M – najvišja vrednost za prisotnost enterobakterij; <sup>(2)</sup> – uporabi se najnovejša izdaja standarda.

V preglednici 2.2 so prikazana proizvodna higienska merila za jajčne proizvode, katerim mora izdelek ustrezati ob koncu proizvodnega procesa. Vzorčenje poteka v petih enotah in rezultat je zadovoljiv, če so ugotovljene vrednosti za enterobakterije v vseh enotah manjše od 10 cfu/g (ml). Rezultat je še sprejemljiv, če so najvišje vrednosti v dveh od petih enot med 10 cfu/g (ml) in 100 cfu/g (ml) in če so vrednosti v drugih treh vzorčnih enotah manjše od 10 cfu/g (ml). Rezultat je nezadovoljiv, če je ena ali več ugotovljenih vrednosti večja od 100 cfu/g (ml) ali če sta več kot dve vrednosti med 10 cfu/g (ml) in 100 cfu/g (ml) (Uredba komisije ES, št. 2073, 2005).

### 2.3 TOPLOTNA OBDELAVA ŽIVIL

Toplotna obdelava živil je proces segrevanja živil pri določeni temperaturi in ustreznem času, pri čemer želimo uničiti mikroorganizme in encime, kateri so lahko povzročitelji kvara živil in/ali povzročitelji okužb in zastrupitev pri ljudeh. Francoski znanstvenik Nicholas Appert je leta 1810 pričel raziskovati področje toplotne obdelave živil in ima veliko zaslug za razvoj in napredek teh postopkov. Danes potrošnik zahteva visoko kvalitetna in varno proizvedena živila. Razvoj postopkov za toplotno obdelavo poteka v smeri ekonomične proizvodnje, ki v čim krajšem času in ob čim manjši porabi energije proizvede varno živilo. Zaradi različne sestave živil je potrebno postopek primerno prilagoditi vsakemu proizvodu in proizvodnemu obratu. Postopki toplotne obdelave se morajo izvesti čim hitreje in kasneje mora biti zagotovljeno še aseptično polnjenje v ustrezno embalažo in primerno skladiščenje (Ramaswamy in Marcotte, 2006).

Postopke toplotne obdelave lahko v grobem razdelimo na pasterizacijo, katera predstavlja blago toplotno obdelavo živil do 100 °C in sterilizacijo (apertizacije) s temperaturo obdelave višjo od 100 °C (Garbutt, 1997). Toplotna obdelava živil je v večini primerov samo eden od korakov v proizvodnem procesu. Pred pasterizacijo je potrebna priprava živila (čiščenje, lupljenje, rezanje, homogenizacija), po postopku toplotne obdelave lahko sledijo hlajenje, pakiranje (lahko tudi v kontrolirano, modificirano ali aktivno atmosfero) ali zmrzovanje (zmrzovanje s sušenjem, koncentriranje med zmrzovanjem) (Ramaswamy in Marcotte, 2006).

Glede na sredstvo za prenos toplote lahko toplotne postopke za obdelavo živil razdelimo:

- obdelava z vročo vodo ali paro (kuhanje, blanširanje, pasterizacija, evaporacija),

- obdelava z vročim zrakom (pečenje, praženje, sušenje),
- obdelava z vročim oljem (cvrenje) in
- obdelava s sevanjem (mikrovalovi, infrardeče sevanje, ionizirajoče sevanje) (Ramaswamy in Marcotte, 2006; Varley, 2003).

Preden se določen toplotni postopek uvede v procesu obdelave živil je potrebno poznati in upoštevati (Ramaswamy in Marcotte, 2006):

- tip in toplotno odpornost tarčnih mikroorganizmov, spor ali encimov v živilu,
- vrednost pH živila,
- parametre, ki opisujejo toplotni postopek,
- termofizične lastnosti živila in
- razmere skladiščenja toplotno obdelanega živila.

Uspešnost uničenja mikroorganizmov s toplotno obdelavo živil preverimo s (Garbutt, 1997):

- določitvijo števila preživelih mikroorganizmov,
- turbidimetrijo in
- spremembo metabolne aktivnosti.

Toplotna obdelava temelji na fizikalno-kemijskih zakonitostih. Pri delovanju toplote se v živilu dogajajo številne spremembe, kot so: sprememba viskoznosti, sprememba osmotskega tlaka v celicah, razpad vodikovih vezi in preoblikovanje molekul. Vsak toplotni postopek ima na živilo stranske učinke. Vpliv na spremembo živila je lahko mehanski, kemični, fizikalni, biokemijski in mikrobní (James in James, 2003).

Kemijske spremembe, ki se lahko pojavijo pri toplotni obdelavi živil, so lahko (James in James, 2003):

- encimsko in neencimsko porjavenje,
- uničenje vitaminov,
- sprememba strukture aminokislin,
- oksidacija maščob,
- sprememba okusa,
- uničenje barvil, kot so klorofil, karitenoidi, flavonoidi,
- razgradnja ogljikovih hidratov in proteinov,
- združevanje v nove strukture, katere vključujejo proteine in ogljikove hidrate, ponavadi ob pomoči vode.

### **2.3.1 Pasterizacija živil**

Pasterizacija je blag toplotni postopek obdelave živil, kateri lahko uniči vegetativne mikrobné celice in encime. Pasterizacija je lahko neučinkovita za bakterijske spore in določene toplotno odporne encime, ki kasneje lahko zmanjšujejo uporabnost izdelka (Wilbey, 2003ab). Tako obdelana živila so lahko obstojna od nekaj dni (mleko) do nekaj mesecev (sadni sokovi). Temperatura in čas pasterizacije sta odvisna predvsem od vrste živila, vrednosti pH, vrste mikroorganizmov ali encimov, občutljivosti živila in uporabnosti postopka za sam izdelek. Postopek pasterizacije se najpogosteje uporablja v območju med 60 °C in 80 °C za tekoča živila, kot so mleko, tekoče jajčne mase, pivo, sokovi, sladoledne mase. Za jajčni melanj je priporočena temperatura pasterizacije 2,5 min

pri 64,4 °C, pri čemer se zagotovi uničenje mikrobnih celic za patogen sev *S. Senftenberg* (Ramaswamy in Marcotte, 2006).

Pasterizacija se uporablja tudi za netekoča oziroma trdna živila. Pri teh živilih se pasterizacija izvaja v embalaži. Zaradi počasnejšega prehajanja toplote v notranjost živila je daljši čas zadrževanja živila pri določeni temperaturi in posledica so lahko slabše senzorične lastnosti živila (Ramaswamy in Marcotte, 2006).

Za ustrezno izveden postopek pasterizacije se morajo upoštevati način in čas segrevanja, čas zadrževanja ter čas hlajenja. Cilj toplotne obdelave je uničenje potencialno nevarnih mikroorganizmov, kateri so lahko prisotni v živilu. Pasterizacija je način toplotne obdelave živil namenjen posebej zmanjšanju števila vegetativnih oblik mikroorganizmov. Zadovoljive rezultate toplotne obdelave lahko pričakujemo v primeru ustreznega hlajenja po končanem postopku (Singh in Heldman, 1993).

### 2.3.2 Pasterizacija jajc in jajčnih izdelkov

Pasterizacijo tekoče jajčne mase razdelimo na toplotno obdelavo jajčnega melanža, rumenjaka ali beljaka. Za vsakega posebej je priporočena temperatura pasterizacije in čas zadrževanja pri tej temperaturi. Kot je navedeno v preglednici 2.3 lahko s posameznimi dodatki, kot sta sladkor ali sol vplivamo na temperaturo pasterizacije in čas zadrževanja. Priporočene vrednosti za čas in temperaturo pasterizacije veljajo za ZDA (Board in Fuller, 1994; Sheldon, 2005). Vrednost pH pasteriziranega jajčnega melanža je lahko med 6,4 in 8,0 (Sheldon, 2005).

**Preglednica 2.3: Priporočene temperature in čas zadrževanja pri pasterizaciji tekočih jajčnih proizvodov (Sheldon, 2005)**

Tekoči jajčni proizvod	Minimalen čas zadrževanja pri minimalni temperaturi pasterizacije
Jajčni beljak	3,5 min pri 55,6 °C
	6,2 min pri 56,7 °C
Jajčni melanž	3,5 min pri 60 °C
Jajčni melanž z dodatki (manj kot 2 %)	3,5 min pri 61,1 °C
	6,2 min pri 60 °C
Jajčni melanž (24-38 % ss, 2-12 % dodatkov)	3,5 min pri 62,2 °C
	6,2 min pri 61,1 °C
Soljen jajčni melanž (2 % ali več dodane soli)	3,5 min pri 63,3 °C
	6,2 min pri 62,2 °C
Sladkan jajčni melanž (2-12 % dodanega sladkorja)	3,5 min pri 61,1 °C
	6,2 min pri 60 °C
Rumenjak brez dodatkov	3,5 min pri 61,1 °C
	6,2 min pri 60 °C
Sladkan rumenjak (2 % ali več dodanega sladkorja)	3,5 min pri 63,3 °C
	6,2 min pri 62,2 °C
Soljen rumenjak (2-12 % dodane soli)	3,5 min pri 63,3 °C
	6,2 min pri 62,2 °C

Legenda: ss – suha snov, min – čas v min;



Slika 2.2 nam prikazuje tehnološki proces proizvodnje jajčnih izdelkov. Tekoče jajčne mase so osnova za proizvodnjo zamrznjenih, tekočih, pasteriziranih in sušenih jajčnih izdelkov. Za pridobitev jajčnih proizvodov so potrebni naslednji osnovni koraki: 1) odstranjevanje jajčne lupine, 2) kontrola kakovosti, 3) odstranjevanje ostankov lupin, 4) homogeniziranje, 5) filtriranje in 6) hlajenje. Potem se postopki ločijo odvisno od želenega proizvoda. Za tekoča jajca sledi polnjenje v embalažo, za zamrznjena jajca sledi pasterizacija (ni obvezna), polnjenje in zmrzovanje, za pasterizirane jajčne proizvode sledi pasterizacija, za sušene jajčne proizvode sledi po pasterizaciji še sušenje (Gašperlin in Bem, 2003). Uspešnost pasterizacije pri tekočih jajčnih proizvodih lahko preverimo s preprostim alfa – amilaza testom (Belyavin, 2003).

Za čim nižjo kontaminacijo jajčne mase je ključnega pomena ločevanje jajčne vsebine od lupine, zelo pomembno je, da ne pride do stika med zunanjo stranjo lupine in vsebino jajca. Umazana jajca je potrebno predhodno oprati in osušiti. Pri celotnem postopku je pomembna higiena in snažnost opreme, delavcev in prostora. Učinkovito je 10 sekundno potapljanje jajc pred ubijanjem v vodo s temperaturo 78 °C do 80 °C. Po odstranitvi lupine je pomembno takojšnje hlajenje jajčne mase na manj kot 6 °C, in skladiščenje do 24 ur. Po tem času se mora jajčna masa predelati ali zamrzniti. Zaradi nevarnosti koagulacije beljakovin, je potrebno pazljivo izvesti pasterizacijo. Uspešnost postopka naj bi zagotavljala 4 minutna obdelava jajčne mase na 63 °C – 65 °C (Gašperlin in Bem, 2003).



Slika 2.2: Proizvodnja jajčnih izdelkov (Gašperlin in Bem, 2003: 455)

### 2.3.2.1 Pasterizacija jajc v lupini

Prenos mikroorganizmov v notranjost jajca poteka v 99 % preko jajčne lupine. Tudi, če je jajce na videz čisto, se na površini lahko nahajajo mikroorganizmi. S pasterizacijo celega jajca v lupini želimo uničiti morebitne mikroorganizme na jajčni lupini in tako preprečiti njihov prehod v notranjost jajca. Priporočena temperatura pasterizacije celih jajc v lupini je v ZDA 60 °C, čas zadrževanja pa 3,5 min (Board in Fuller, 1994). Ta kombinacija je

učinkovita za različne seve bakterij rodu *Salmonella* (izvzet je sev *S. Senftenberg*). Največkrat je površina jajca kontaminirana s sevom *S. Enteritidis*, na drugem mestu je sev *S. Heidelberg* (Board in Fuller, 1994).

Številne raziskave so preučevale pasterizacijo celega jajca v lupini. Posebej je priporočljiva pasterizacija jajc v lupini, če so jajca oprana ali mehanično očiščena. V komercialne namene se največkrat uporabi vodna kopel s temperaturo do 60 °C. S tem postopkom lahko tudi spremenimo lastnosti in kvaliteto jajca, na kar vplivata čas in temperatura pasterizacije. Ker želimo čim manjši vpliv na notranjost jajca, so v porastu toplotni postopki s krajšim časom delovanja pri višji temperaturi, na primer: vroč zrak, vroča voda, infra – rdeča svetloba in atmosferska para. Decimalni redukcijski čas za bakterije seva *S. Enteritidis* pri 50 °C znaša 16,5 min in pri 57,5 °C 0,7 min. S ekstrapolacijo lahko predvidimo za temperaturo pasterizacije nad 70 °C, vrednost D manj kot 1,5 s. S tem bi uničili bakterije *S. Enteritidis* za okrog 6 logaritmskih enot (James in James, 2003).

Pasterizacija jajc v jajčni lupini za bakterije seva *S. Enteritidis* je učinkovita pri 57 °C in zadrževalnem času 65 – 75 min ter pri 58 °C in zadrževalnem času 50 – 57,5 min. Po tako izvedeni pasterizaciji ni več prisotnih celic bakterij *S. Enteritidis* (Schuman in sod., 1997).

Gast in sod. (2003) navajajo tudi kombinirano toplotno obdelavo jajc v lupini, tako da jih najprej zadržujejo 25 min v vodni kopeli pri 60 °C in nato tretirajo 60 min z vročim zrakom pri 55 °C. Tak postopek zmanjša prisotnost bakterij seva *S. Enteritidis* na jajčni površini za 7 logaritmskih enot.

Jajčna površina je največkrat kontaminirana s sevom *S. Enteritidis*. Za preprečevanje nadaljnjih okužb se priporoča pasterizacija jajčne lupine že v proizvodnih obratih (Sheldon, 2005).

#### 2.3.2.2 Pasterizacija jajčnega melanža

Jajčni melanž je homogena zmes jajčnega rumenjaka in beljaka, katera vsebuje 23 – 25 % suhe snovi. Priporočena pasterizacija jajčnega melanža brez dodanih aditivov je 10 minutno oziroma 15 minutno segrevanje pri 55,6 °C oziroma 69 °C. Nižja temperatura in krajši čas pasterizacije povečujeta verjetnost večjega preživetja bakterijskih celic rodu *Salmonella*, višja temperatura in daljši čas pa lahko vplivata na poslabšanje lastnosti jajčnega melanža (tvorbo emulzije, koagulacijo in spremembo barve, okusa, teksture ter prehranske vrednosti). Fizikalne in kemijske lastnosti jajčnega melanža vplivajo na preživelost oziroma toplotno odpornost posameznega seva bakterij (Roberts in sod., 1998).

Zadrževalni čas in temperatura pasterizacije za jajčni melanž sta predpisana za vsako državo posebej (Roberts, 1998). V ZDA je določena 1,75 minutna pasterizacija pri najmanj 60 °C, v Veliki Britaniji pri 2,5 minutna pasterizacija pri 64 °C (Wilbey, 2003b). Board in Fuller (1994) za ZDA navajata najnižjo temperaturo pasterizacije 60 °C in minimalen zadrževalni čas 3,5 min. Pasterizacija jajčnega melanža poteka ponavadi s ploščnim pasterizatorjem. Pasterizacijo je potrebno prilagoditi tudi glede na vrsto dodatkov v jajčnem melanžu, kot je prikazano v preglednici 2.3 (Sheldon, 2005; Belyavin, 2003).

Zaradi specifične kemijske sestave je jajčni melanž idealno gojišče za rast mikroorganizmov. Pasterizacija jajčnega melanža bo izvedena optimalno pri kontaminaciji od 100 cfu/g do 5000 cfu/g, zaželena je čim nižja kontaminacija vhodne surovine (Board in Fuller, 1994).

Industrijska pasterizacija jajčnega melanža je določena z uničenjem toplotno najbolj odpornega seva salmonel, *S. Senftenberg 775W*. Predpisan čas pasterizacije pri 60 °C je 3,5 min, pri 64 °C 2,5 min in pri 70 °C 1,5 min, pri čemer se prisotnost bakterijskih celic zmanjšuje za 1, 2 ali 4 logaritemske enote (Mañas in sod., 2003b).

#### 2.3.2.3 Pasterizacija jajčnega rumenjaka

Pasterizacija rumenjaka je odvisna od več dejavnikov, kot so starost jajc, postopek razbijanja jajc in velikost jajc. Ker vsebuje jajčni rumenjaki okrog 51,9 % suhe snovi, je bogat z beljakovinami in maščobami, ter ima nižjo vrednost pH, je idealen medij za rast salmonel. Temperatura in čas pasterizacije sta enaka kot za pasterizacijo celega jajca. Dodatki, kot sta sladkor in sol, zvišujejo toplotno odpornost mikroorganizmov, kar je prikazano v preglednici 2.3 (Sheldon, 2005).

Priporočeni časi zadrževanja za uničenje bakterij rodu *Salmonella* v jajčnem rumenjaku pri temperaturi pasterizacije 63,3 °C so (Roberts in sod., 1998):

- 0,21 min za jajčni rumenjaki z vrednostjo  $a_w$  0,989,
- 0,72 min za jajčni rumenjaki z vrednostjo  $a_w$  0,978 in z 10 % dodanega sladkorja in
- 1,50 min za jajčni rumenjaki z vrednostjo  $a_w$  0,965 in 10 % dodane soli.

#### 2.3.2.4 Pasterizacija jajčnega beljaka

Pasterizacija jajčnega beljaka je predvsem odvisna od vrednosti pH in deleža suhe snovi v beljaku. Povprečna vrednost suhe snovi v beljaku je 12,2 %. Beljak ni idealen medij za rast in razmnoževanje mikroorganizmov (Board in Fuller, 1994). Za pasterizacijo jajčnega beljaka se zato lahko uporabljajo nižje temperature (največ 60 °C), ker se pri višjih temperaturah spremeni viskoznost in izgubi se funkcionalnost beljaka, ki je pomembna predvsem pri pripravi slaščic (Belyavin, 2003; Sheldon, 2005).

Beljak ima vrednost pH 9, za boljšo stabilnost beljakovin med pasterizacijo se mu lahko pred samim postopkom vrednost pH zniža na 6,5 – 7, pri čemer pa postane boljši medij za rast in razmnoževanje bakterij rodu *Salmonella*. Priporočene temperature 3,5 – 4 min pasterizacije jajčnega beljaka s predhodnim 0,5 minutnim predgrevanjem pri 48 °C in različnimi vrednostmi pH so (Sheldon, 2005):

- vrednost pH 9,6, temperatura pasterizacije 54,2 °C,
- vrednost pH 9, temperatura pasterizacije 56,6 °C,
- vrednost pH 8,4, temperatura pasterizacije 59 °C in
- vrednost pH 7, temperatura pasterizacije 60 – 62 °C.

Za pasterizacijo jajčnega beljaka se uporabljajo trije postopki (Board in Fuller, 1994):

a) Postopek z mlečno kislino – aluminijev sulfat pri pH 7, pri 60 °C 3,5 min. S predpisano količino dodane 25 % mlečne kisline se uravna vrednost pH na približno 7. Ker je postopek patentiran, je za uvedbo tega postopka potrebna licenca.

b) Postopek z vodikovim peroksidom, pri 52 – 53 °C, 1,5 min. Postopek priporoča dodatek 0,075 – 0,10 % vodikovega peroksida (10 % raztopine) v jajčni beljak. Po ohladitvi katalaza pomaga razgraditi vodikov peroksid.

c) Postopek v vakuumu pri 57 °C 3,5 min. Postopek poteka v ploščnem pasterizatorju v vakuumu po principu HTST.

Jajčni beljak je najbolj občutljiva jajčna komponenta zaradi specifične sestave beljakovin. 3,5 minutna pasterizacija pri 62 °C poškoduje 3 – 5 % ovomucina, 90 – 100 % lizozima in preko 50 % konalbumina. Zaradi specifične kemijske sestave je priporočena pasterizacija pri temperaturah do 60 °C. Za Veliko Britanijo je priporočen čas pasterizacije 2,5 do 3 min pri 57 °C. Z dodatkom 0,1 – 1 % vodikovega peroksida je priporočen čas zadrževanja 1,44 min pri temperaturi pasterizacije 56,6 °C, pri dodatku 0,875 % vodikovega peroksida je priporočen čas zadrževanja 1,54 min pri temperaturi pasterizacije 53,2 °C (Roberts in sod., 1998).

### 2.3.3 Toplotna odpornost mikroorganizmov

Pri toplotni obdelavi živil je najpomembnejša identifikacija toplotno najbolj odporne vrste mikroorganizmov ali encima, na podlagi katerega se potem izbere ustrezen toplotni postopek. V živilih so prisotni različni neželeni mikroorganizmi in encimi, katere želimo s toplotnim postopkom uničiti. V praksi velja, da se toplotni postopek izbere glede na vrsto in toplotno odpornost mikroorganizmov. Pomembna lastnost mikroorganizmov je njihov odnos do kisika (aerobni, obligatno aerobni, fakultativno ali obligatno anaerobni). Poudarek je na fakultativno in obligatno anaerobnih mikroorganizmih, kateri predstavljajo največji problem pri toplotno obdelanih in pakiranih živilih, saj lahko rastejo ob zelo nizki koncentraciji kisika (Ramaswamy in Marcotte, 2006).

Na toplotno odpornost mikroorganizmov vplivajo (Ramaswamy in Marcotte, 2006; Garbutt, 1997):

- temperatura in kontaktni čas segrevanja,
- način segrevanja,
- sestava živila,
- vrednost pH,
- stres oziroma okoljski dejavniki, ki so jim bili izpostavljeni mikroorganizmi in
- začetno število mikroorganizmov v živilu.

Ramaswamy in Marcotte (2006) priporočata pri načrtovanju toplotnega postopka upoštevanje vrednosti pH živila. Glede na vrednost pH živila klasificirata v tri skupine:

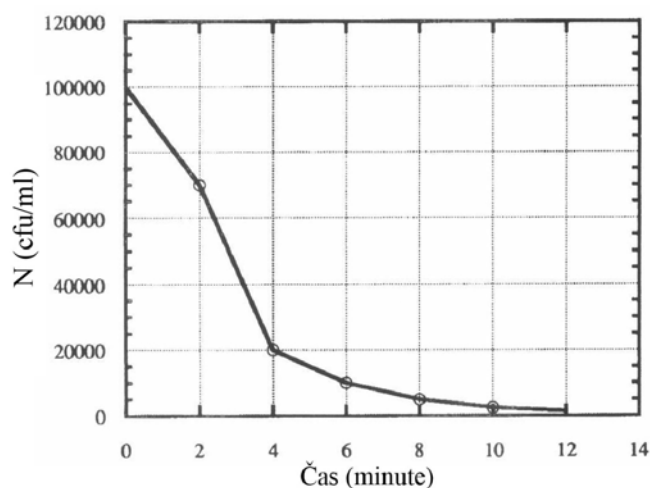
- zelo kisla živila, vrednost pH < 3,7, med katera spadajo sadni sokovi, jabolka, češnje, slive, kislo zelje, kis,
- kislina do srednje kislina živila, vrednost pH 3,7 – 4,5, med katera spadajo marmelade, grozdje, paradižnik, paradižnikov sok, breskve, ananas, krompirjeva solata, zelenjavni sokovi in
- živila z blago kislostjo, vrednost pH > 4,5, med katera spadajo meso, ribe, zelenjava, juhe.

Toplotno bolj odporni mikroorganizmi, kateri se pogosto pojavljajo v živilih, so: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, *Salmonella* Senftenberg 775W, *Shigella*, *Listeria*

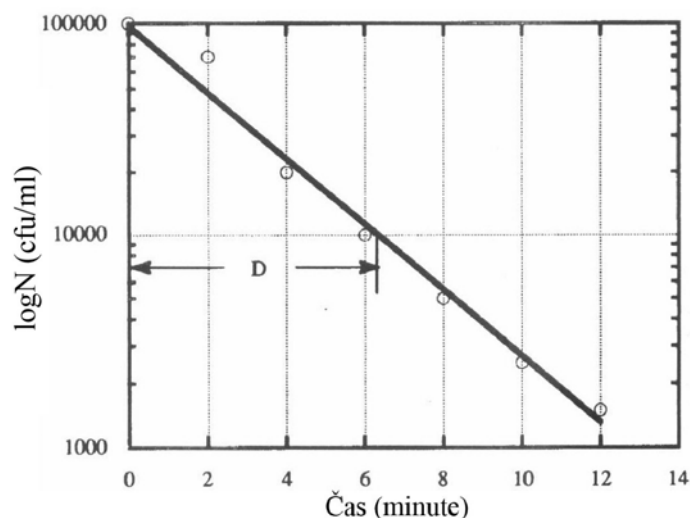
monocytogenes, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*. V živilih se lahko pojavijo tudi virusi. Večino teh mikroorganizmov in virusov uniči že postopek pasterizacije. Najvišjo toplotno odpornost imajo bakterije vrste *Clostridium botulinum* (uniči jih temperatura 121 °C, čas zadrževanja je 9,9 – 11,4 min) (Ramaswamy in Marcotte, 2006; Garbutt, 1997). Bakterije vrste *Clostridium botulinum* tvorijo tudi spore tipov A in B, ki jih zanesljivo uniči temperatura 100 °C šele po 6 urah, spore tipa E uniči že temperatura 80 °C po 15 min. Neuničene spore lahko ob ustreznih pogojih proizvajajo izredno nevarne toksine tipov A, B in E, pri čemer za uničenje toksinov A in B zadostuje 10 min pri 80 °C, za toksin E pa že 5 min pri 65 °C (Milohnoja in Tomašič, 1996). Problem pri toplotno obdelanih živilih predstavljajo tudi termostabilni mikotoksini (Ramaswamy in Marcotte, 2006; Garbutt, 1997).

### 2.3.3.1 Decimalni redukcijski čas ali vrednost D

Populacija mikroorganizmov v živilu predstavlja glavno merilo za izvedbo toplotnega postopka. V živilu so lahko prisotne vegetativne celice bakterij rodu *Salmonella*, vrst *E. coli* ali *L. monocytogenes*, zmanjševanje njihovega števila pri toplotni obdelavi poteka (teoretično) logaritemsko. Krivuljo preživetja narišemo tako, da na os y nanašamo logaritmizirane vrednosti preživelih bakterijskih celic in na os x čas v min (Slika 2.8). Iz premice odmiranja (slika 2.9) lahko decimalni redukcijski čas (D) odčitamo iz grafa ali ga določimo računsko (enačba 2.1). Vrednost D je definirana kot čas v min, kateri je potreben, da se število mikroorganizmov zmanjša za 90 %. Če poteka odmiranje bakterijskih celic enakomerno, ustreza vrednost D času, v katerem se zmanjša število bakterij za en logaritem (Singh in Heldman, 1993).



**Slika 2.3: Krivulja preživetja mikrobne populacije pri segrevanju (Singh in Heldman, 1993: 226)**  
Legenda: N – število mikroorganizmov v cfu/ml.



Slika 2.4: Premica preživetja mikroorganizmov pri segrevanju (Singh in Heldman, 1993: 226)

Legenda: N – število mikroorganizmov v cfu/ml.

Slika 2.4 prikazuje premico preživetja mikroorganizmov pri segrevanju in postopek grafične določitve vrednosti D. Za izračun vrednosti D se lahko uporablja tudi naslednja formula:

$$\log N_0 - \log N = t/D \quad \dots(2.1)$$

Legenda:  $N_0$  – začetno število mikroorganizmov, N – število mikroorganizmov ob času t, t – čas in D – decimalni redukcijski čas.

Kot primer se uporablja vrednost  $D_{121}$ , ki pomeni čas potreben za 90 % zmanjšanje mikrobne populacije pri 121 °C. Temperatura 121 °C se uporablja za termostabilne spore, kot jih tvorijo bakterije vrste *Bacillus stearothermophilus*, čas zadrževanja temperature pa je 4 - 5 min. Za vegetativne celice bakterij, vključno s kvasovkami, je vrednost  $D_{65,5}$  med 0,5 in 3 min (Garbutt, 1997). Za toplotno odpornost bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji so vrednosti  $D_{65,5}$  v območju od 0,02 do 0,25 min, za bakterije seva S. Senftenberg je vrednost  $D_{65,5}$  0,80 do 1 min (Ramaswamy in Marcotte, 2006).

### 2.3.3.2 Vrednost Z

Vrednost Z je konstanta toplotne odpornosti oziroma faktor, ki opisuje toplotno odpornost bakterijskih spor. Definirana je kot sprememba temperature (°C), ki je potrebna za desetkratno spremembo vrednosti D. Vrednosti D za različne temperature ustrezajo zmanjšanju mikrobne populacije za en logaritem, pri čemer temperaturna razlika med dvema vrednostma D predstavlja vrednost Z (Singh in Heldman, 1993). Vegetativne celice bakterij, plesni in kvasovke imajo vrednost Z med 5 °C in 8 °C, bakterijske spore so vrednosti Z med 6 °C in 16 °C (normalno okrog 10 °C) (Garbutt, 1997; Ramaswamy in Marcotte, 2006). Vrednost Z za bakterije rodu *Salmonella* je med 4,4 – 5,5 °C, za sev S. Senftenberg je vrednost Z med 4,4 – 6,7 °C (Ramaswamy in Marcotte, 2006). Vrednost Z izračunamo z enačbo 2.2 (Ramaswamy in Marcotte, 2006; Singh in Heldman, 1993):

$$Z = (T_2 - T_1) / [\log(D_{T1}) - \log(D_{T2})] \quad \dots (2.2)$$

Legenda:  $T_1$  – nižja temperatura pasterizacije v °C;  $T_2$  - višja temperatura pasterizacije v °C;  $D_{T1}$  – vrednost D pri nižji temperaturi pasterizacije v min;  $D_{T2}$  – vrednost D pri višji temperaturi pasterizacije v min.

### 2.3.3.3 Vrednost F

Čas toplotne smrtnosti oziroma vrednost F je čas potreben za redukcijo mikrobne populacije ali spor. Kot primer za uničenje 99,99 % mikrobne populacije so potrebni štirje log-cikli ali drugače  $F = 4 D$ . Značilen primer uporabe vrednosti F pri proizvodnji živil se uporablja za bakterije vrste *Clostridium botulinum*, kjer je  $F = 12D$  (Singh in Heldman, 1993). V praksi se uporablja vrednost  $F^Z_T$ , kar pomeni čas toplotne smrtnosti pri temperaturi T in konstanti toplotne odpornosti Z. Običajno se uporablja  $F^{10}_{121}$ , lahko jo označimo tudi kot  $F_0$  in predstavlja čas potreben za uničenje mikrobnih spor za vrednost Z 10 °C pri 121 °C (Singh in Heldman, 1993). Primer je vrednost F (čas zadrževanja 1 min) pri 121,1 °C za postopke sterilizacije (Ramaswamy in Marcotte, 2006).

Za izračun vrednosti F se uporablja enačba 2.3:

$$F = F_0 10^{[(T_0 - T)/Z]} \quad \dots (2.3)$$

Legenda: F – vrednost F v min pri temperaturi T,  $F_0$  vrednost F v min pri temperaturi  $T_0$  in Z – vrednost Z

## 2.4 BAKTERIJE RODU *Salmonella*

### 2.4.1 Splošne lastnosti bakterij rodu *Salmonella*

Bakterije rodu *Salmonella* so taksonomska skupina, ki obsega preko 2500 sevov. Ime so dobile leta 1885 po patologu Salmonu. Spadajo v družino *Enterobacteriaceae* in so gramnegativne, nesporogene, fakultativno anaerobne, gibljive palčke s fermentativnim in respiratornim metabolizmom. Bakterije rodu *Salmonella* lahko fermentirajo glukozo (pri čemer nastajata kislina in plin), dulcitol, manitol, maltozo, redki sevi lahko fermentirajo saharozo in laktozo. Bakterije rodu *Salmonella* ne morejo fermentirati malonata in salicina. Lahko proizvajajo vodikov sulfid v različnih medijih, dekarboksilirajo ornitin in lizin, izkoriščajo citrat kot edini vir ogljika in raducirajo nitrate v nitrite. Ne morejo pa hidrolizirati uree ali želatine ter ne tvorijo indola (Gast, 2003). Večina sevov bakterij rodu *Salmonella* ima flagele (Opinion of..., 2000; Yan in sod., 2003; Andlovic, 2002; Garitty in sod., 2004; Bakterije rodu..., 2002).

Po izgledu so značilne kolonije bakterij rodu *Salmonella* na trdnem gojišču hranljivi agar okrogle (premer od 2 do 4 mm), z gladkim robom, rahlo izbočene in svetleče (Gast, 2003).

Bakterije rodu *Salmonella* rastejo in se razmnožujejo pri temperaturah od 5 – 7 °C do 45 – 47 °C (Adamič in sod., 2003; Gast 2003). Optimalna temperatura za rast bakterij rodu *Salmonella* je 37 °C, temperatura nad 65 °C jih hitro uniči (Adamič in sod., 2003). Bakterije rodu *Salmonella* lahko rastejo v razponu vrednosti pH med 4 in 9, optimalna vrednost za rast pa je pH 7 (Gast, 2003). Minimalno vrednost pH, katera še omogoča razmnoževanje, določa vrsta prisotne kisline. Za rast potrebujejo tudi minimalno vrednost  $a_w$  0,94 (Adamič in sod., 2003).

Rast bakterijam rodu *Salmonella* omogočajo že preprosta gojišča, katera vsebujejo ogljik in dušik. Bakterije rodu *Salmonella*, ki so bile precepljene na preprosta gojišča, kot sta peptonski ali hranljivi agar, dobro zaprte in hranjene pri sobni temperaturi, lahko v takšnih razmerah preživijo več let (Gast, 2003).

#### 2.4.2 Klasifikacija bakterij rodu *Salmonella*

Bakterije rodu *Salmonella* se delijo v dve vrsti in sicer: *Salmonella enterica* in *Salmonella bongori* (Garitty in sod., 2004). Shelobolina in sod. (2004) so odkrili tudi novo vrsto *Salmonella subterranea*, ki je potrjena z objavo v validacijskem listu 102 (Euzéby, 2005). Vrsta *Salmonella bongori* obsega 21 poznanih sevov, izvor katerih so večinoma hladnokrvne živali in okolje, redkeje sesalci vključno s človekom (Yan in sod., 2003).

Vrsta *Salmonella enterica* se deli v šest podvrst (Wray, 2003):

- *Salmonella enterica* podvrsta *enterica*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *salamae*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *arizonae*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *diarizonae*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *houtenae* in
- *Salmonella enterica* podvrsta *indica*.

Preko 99 % salmonel spada v vrsto *Salmonella enterica*, blizu 60 % sevov te vrste spada v podvrsto *enterica* (Garitty in sod., 2004; Yan in sod., 2003).

Bakterije rodu *Salmonella* razdelimo na različne serotipe s pomočjo treh skupin antigenov K - kapsularni antigen, H – flagelarni antigen in O – somatski antigen. Kapsularni antigeni so strukturni proteini bičkov, kateri so toplotno neobstojni, somatski antigeni so toplotno obstojni polisaharidi. Vendar večina sevov bakterij rodu *Salmonella* ni dobila imena po antigenu, ampak po bolezni pri ljudeh in živalih, npr. seva *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium* (Andlovic, 2002; Yan in sod., 2003).

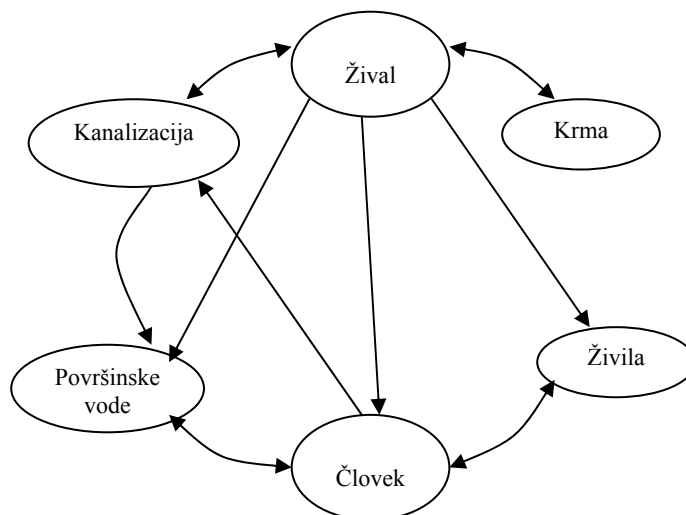
#### 2.4.3 Razširjenost in načini prenosa bakterij rodu *Salmonella*

Bakterije rodu *Salmonella* so prisotne povsod v okolju, naravno okolje za te bakterije so prebavila sesalcev in ptičev. Lahko jih najdemo tudi pri številnih členonožcih (npr. ščurkih in muhah) in pri vseh nevretenčarjih. Prenos okužbe na ljudi je povečini povezan z infekcijo živalskih vrst, katere vstopajo v prehransko verigo ljudi (Krauss in sod., 2004). Salmonele se najpogosteje pojavljajo pri živalih namenjenih za zakol (teleta, svinje), perutnini (kokoši, gosi, race), prostoživečih pticah v naravi (golobi), domačih živalih (psi, mačke, želve, kače), glodalcih (miši, podgane) ter pri drugih živalskih vrstah. Okužbe so v porastu tudi zaradi naraščajoče svetovne trgovine, kajti lahko so okuženi uvoženi prehranski artikli, okužbe so možne prav tako preko kanalizacije in površinskih voda (Krauss in sod., 2004). Bakterije rodu *Salmonella* lahko najdemo tudi pri številnih vrstah členonožcev (ščurki, mune). Okužbe jajc z bakterijami rodu *Salmonella* so lahko na jajčni lupini ali v notranjosti. Tako se prenašata predvsem serotipa *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*, pogosteje se pojavlja *S. Enteritidis* (Andlovic, 2002).

Najbolj pogoste poti prenosa in širjenja bakterij rodu *Salmonella* so prikazane na sliki 2.5. Zadnji člen praviloma predstavlja človek. Ključna je povezava, med skrbniki živali in dobro preživelostjo salmonel v naravi. Živali, ki se okužijo v naravi, lahko okužbo



prenesejo na oskrbnike, ta povezava je lahko pogosto vzrok za nastanek zapletenih in velikokrat težko predvidljivih infekcij, zadnji člen pa je ponavadi človek. Z dobro higieno in zadostno toplotno obdelavo živil se lahko proces prenosa upočasni ali celo ustavi. Potrebna je tudi skrbna higiena predmetov (nožev, desk, strojev, delavnih površin), ki prihajajo v stik s potencialno kontaminiranimi živili (Krauss in sod., 2004).



Slika 2.5 : Pomembnejše poti širjenja bakterij rodu *Salmonella* (Krauss in sod., 2004: 308)

Epidemiološko razdelimo bakterije rodu *Salmonella* v tri skupine (Opinion of..., 2000; Jeršek, 2002):

- a) V to skupino prištevamo seve, kateri inficirajo le človeka, za živali ne predstavljajo nevarnosti za okužbo. Najpogosteje se pojavljajo sevi podvrst *S. typhi* in *S. paratyphi* (A in C). Pri ljudeh sta najresnejši obolenji tifus in paratifis, katere povzročajo salmonele z najvišjo stopnjo umrljivosti.
- b) V to skupino spadajo sevi visoko prilagojeni živalim na primer: *S. Abortus-ovis* (pri ovcah), *S. Gallinarum* (pri perutnini), *S. Cholerae-suis* (pri prašičih) in *S. Dublin* (pri govedu). Ti sevi pri ljudeh praviloma ne povzročajo okužb, v izjemnih primerih pa lahko povzročijo tudi hude oblike infekcij.
- c) V to skupino spadajo neprilagojeni sevi, ki so prisotni v živilih in so patogeni za živali in ljudi.

#### 2.4.3.1 Salmoneloza

Bolezen povzročena z bakterijami rodu *Salmonella* imenujemo salmoneloza. Najpogostejši vir okužb so izdelki pripravljenih iz surovih jajc (omake, jajčne kreme, tiramisu), mesa (perutnina, svinjina, redko govedina ali ribe) ter tudi sadje in zelenjava, pri katerih pride do kontaminacije med pripravo obroka. Izvor salmonel je lahko tudi obolel človek s slabimi higienskimi navadami, kar pomeni ne umivanje rok po uporabi stranišča in potem dotikanje površin, katere onesaži. Najbolj je nevarna okužba s salmonelo pri manjših otrocih in ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom, kajti zaradi bruhanja in driske lahko povzroči dehidracijo. Bolj ogrožene so tudi skupine ljudi, katere imajo neposredni stik z živalmi in živalskimi proizvodi, kot so: delavci na kmetiji, trgovci z živino, veterinarji, klavci, mesarji, komunalni delavci, delavci v živilsko-predelovalni industriji ter delavci v

restavracijah, gostiščih (Krauss in sod., 2004). Pomembno je tudi omeniti, da so lahko ogroženi tudi gostje v gostiščih, restavracijah, večjih prehranskih obratih, predvsem zaradi možnosti večjega števila hkratnih okužb s kontaminirano hrano (Krauss in sod., 2004).

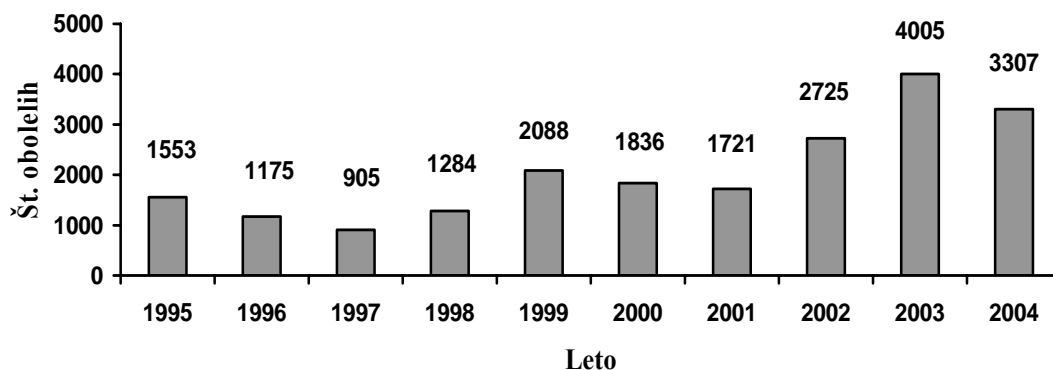
Infekcije s človeku neprilagojenimi sevi bakterij rodu *Salmonella* spremljajo visoka vročina (do 40 °C), bruhanje, trebušne bolečine in diareja. Prvi bolezenski znaki pri salmonelozi se običajno pojavijo po zaužitju okuženega živila v 5 – 72 urah, najkasneje pa v 5 – 7 dneh, kar je odvisno tudi od konstitucije bolnika (Krauss in sod., 2004; Opinion of..., 2000). Približno 5 % okužb je rizičnih, v teh primerih je smrtnost pacientov 2 %. Vzrok smrti je povečini dehidracija, obolenja ledvic in / ali septični šok (Opinion of..., 2000). Bakterije rodu *Salmonella* so v Evropi med najpogostejšimi povzročitelji zastrupitev s hrano. Število prijavljenih okužb na 100.000 prebivalcev za leto 1998 variira od 1,9 na Portugalskem do 135,7 v Belgiji (Opinion of..., 2000).

Okužba z bakterijami rodu *Salmonella* v večini primerov poteka po oralni poti, z okuženo vodo in živilom. Pri naravni okužbi je infektivni odmerek bakterijskih celic salmonel od  $10^5$  do  $10^{10}$ , pri sevu *S. Typhi* pa zadostuje celo  $10^3$  bakterijskih celic. Vendar je potrebno še poudariti, da normalno kisel želodčni sok škoduje bakterijami rodu *Salmonella* (Andlovic, 2002).

Pomemben vidik priprave hrane je preprečevanje navzkrižne kontaminacije živil. Pomembna je tudi menjava pribora (deske, noži, vilice), katerega se uporabi pred in po obdelavi (toplotni ali z mikrovalovi). Priporočena temperatura skladiščenja živil je pri 4 °C v hladilniku. Podatki o številu okužb z bakterijami rodu *Salmonella* za leto 2004 (Salmoneloze, 2005) kažejo porast okužb v poletnih mesecih (julij, avgust, september) in v prednovoletnem času (druga polovica decembra). Vidi se trend naraščanja okužb, čeprav je v letu 2004 zaznati manjše število okužb, glede na leto 2003 (Salmoneloze, 2005). Salmonelozo pri ljudeh povzročajo na človeka neprilagojene salmonelle. Število okužb s temi salmonelami narašča predvsem zaradi industrijsko predelane hrane in farmske reje živali. Salmonelle so najpogostejši povzročitelj alimentarnih toksikoinfekcij v našem okolju. Bolnik s salmonelozo in slabimi higijenski navadami je lahko prenašalec salmonel (Andlovic, 2002; Adamič in sod., 2003).

V svetu so bakterije rodu *Salmonella* med najpogostejšimi vzroki zastrupitev s hrano, te okužbe so v porastu. Najpogostejši vir okužb s salmonelami so živila živalskega izvora, predvsem perutnina in perutninski izdelki, vključno z jajci (Risk assessments, 2002). V ZDA je povprečno letno število (podatki od leta 1990 do leta 2001) obolelih ljudi s salmonelozo 661,633 (nihanje od 126.374 do 1.700.000), od tega 94 % ljudi ne obišče zdravnika, približno 5 % ljudi obišče zdravnika in 0,05 % obolelih umre (Sheldon, 2005).

Na sliki 2.6 so podatki o salmonelozah od leta 1995 do 2004 v Sloveniji. Število prijav salmoneloze je naraščalo v letih 1997 do 1999 in v letih 2002 do 2003. Število prijav v letu 2004 se je glede na leto 2003 zmanjšalo za 18,2 %. Približno tretjina (30,8 %) obolelih so bili otroci, mlajši od 10 let. Med prijavljenimi primeri salmoneloze je bilo tudi 32 seps in trije bolnišnično hospitalizirani primeri tifusa, smrtnega primera ni bilo (Salmoneloze, 2005).



Slika 2.6 : Prijavljeni primeri salmoneloze v Sloveniji v letih od 1995 do 2004 (Salmoneloze, 2005)

Najpogosteje izoliran sev v letu 2004 je bil sev *S. Enteritidis*, ki je bil prisoten v kar 3187 primerih (največ prijav v Mariboru 865, v Ljubljani 601, v Celju 564) na drugem mestu je sev *S. Typhimurium* s 34 primeri in na tretjem sev *S. Coeln* z 12 primeri (Salmoneloze, 2005).

#### 2.4.4 Preživetje bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji

Na toplotno odpornost bakterij rodu *Salmonella* vplivajo vrsta seva, temperatura pasterizacije, začetno število bakterij v živilu, medij, vrednost pH, vrednost  $a_w$ , kontaktni čas, stres (Mañas in sod., 2003a,b; Sheldon, 2005; Quintavalla in sod, 2001; Juneja in sod., 2003).

V preglednici 2.4 so prikazane priporočene temperature in čas pasterizacije za posamezne seve bakterij rodu *Salmonella* v nekaterih medijih in vpliv dodatkov na spremembo temperature in časa pasterizacije v posameznem mediju. Med dodatke prištevamo kisline ali baze, s katerimi dosežemo spremembo vrednosti pH ter sladkor in sol. Pasterizacija se izvaja tako pri tekočih živilih (tekoči jajčni proizvodi, sladoledne mase) kot ne-tekočih živilih (meso, mesni izdelki). Toplotno najbolj odporen sev je sev *S. Senftenberg* 775W in zato je pri načrtovanju pasterizacije potrebno upoštevati možno kontaminacijo živila s tem sevom in temu prilagoditi temperaturo in čas pasterizacije.

**Preglednica 2.4: Vrednosti D za različne seve bakterij rodu *Salmonella* pri različnih temperaturah pasterizacije in v različnih medijih**

Sev	T (°C)	Medij	D (min)	Vir
<i>Salmonella</i>	57,2	Pečeno meso	3,8 – 4,2	James in James, 2003
<i>Salmonella</i>	62,8	Pečeno meso	0,6 – 0,7	James in James, 2003
<i>Salmonella</i>	60	/	0,58 – 0,98	Garbutt, 1997
<i>Salmonella</i>	60	Jajčni melanž	3,5	Gast, 2003
<i>S. Typhimurium</i>	56	Jajčni melanž pH 5,5	5,5	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Jajčni melanž in s. k.*	4,5	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Jajčni melanž in prop.**	4,5	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Jajčni melanž in benz.***	2,2	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Jajčni rumenjaki	3	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Jajčni rumenjaki in 10 % sla.	25	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Jajčni rumenjaki in 10 % sol	45	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	58	Jajčni rumenjaki	1,3	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	58	Jajčni rumenjaki in 10 % sla.	10	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	58	Jajčni rumenjaki in 10 % sol	17	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Beljak s pH 9,2	/	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Beljak s pH 9,2 in 10 % sla.	0,8	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	56	Beljak s pH 7,3 in sol	2,5	Sheldon, 2005
<i>S. Typhimurium</i>	62,8	/	0,11	James in James, 2003
<i>S. Typhimurium</i>	71,7	/	0,003	James in James, 2003
<i>S. Senftenberg 775W</i>	60	/	6,3	James in James, 2003
<i>S. Senftenberg 775W</i>	60	/	6,3	Garbutt, 1997
<i>S. Senftenberg 775W</i>	71,7	/	0,02	Opinion of..., 2000
<i>S. Senftenberg 775W</i>	71,7	/	0,09	Wray, 2003
<i>S. Senftenberg 775W</i>	60	Jajčni melanž	3,5	Mañas, 2003b
<i>S. Senftenberg 775W</i>	64	Jajčni melanž	2,5	Mañas, 2003b
<i>S. Senftenberg 775W</i>	64,4	Jajčni melanž	2,5	Ramaswamy in Marcotte 2006
<i>S. Senftenberg 775W</i>	70	Jajčni melanž	1,5	Mañas, 2003b

Legenda: D – decimalni redukcijski čas v min; T – temperatura pasterizacije v °C; / - ni podatka; \* - sorbinska kislina 100 ppm; \*\* - β propiolakton 100 ppm; \*\*\* - benzojska kislina 500 ppm; sla. - sladkor

#### 2.4.4.1 Vpliv pasterizacije živil na preživetje bakterij rodu *Salmonella*

Različne vrste mesa in tekoči jajčni izdelki predstavljajo idealno gojišče za rast in razvoj bakterij rodu *Salmonella*. Uspešnost pasterizacije je smiselno primerjati tudi z rezultati dobljenimi v gojišču kot je TSB. Na preživetje bakterijskih celic v različnih medijih močno vpliva tudi stres (povišana ali znižana vrednost pH medija, različne temperature inkubacije inokuluma). Namnoževanje inokuluma lahko poteka pri idealnih 37 °C ali nižjih temperaturah, kar lahko vpliva na preživetje bakterijskih celic pri pasterizaciji. Stres za bakterije rodu *Salmonella* predstavlja tudi krajši ali daljši čas zadrževanja na nekaj stopinj nižji temperaturi od same temperature pasterizacije. Tak stres pogosto vpliva na boljše preživetje salmonel pri pasterizaciji.

Quintavalla in sod. (2001) so preučevali 8 različnih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije 58 °C, 60 °C in 63 °C v gojišču TSB in prašičjem mesu. Ugotovili so, da ima posamezen sev bakterij rodu *Salmonella* vpliv na preživetje bakterijskih celic pri temperaturi pasterizacije 58 °C. Vpliv posameznega seva se zmanjšuje s poviševanjem temperature pasterizacije iz 60 °C na 63 °C. Preživetje bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji pri 58 °C je boljša v prašičjem mesu kot v gojišču TSB. Za

uničenje enakega števila bakterijskih celic salmonel je bilo pri prašičjem mesu potrebno podaljšati čas pasterizacije, za koliko pa je bilo odvisno od posameznega seva. Začetna koncentracija bakterijskih celic je bila  $8,0 \times 10^6$  cfu/g. Med preiskovanimi sevi se je kot najbolj toplotno odporen izkazal sev *S. Podstam* 133 z vrednostmi  $D_{58}$  4,8 min,  $D_{60}$  1,57 min in  $D_{63}$  0,3 min, najmanj toplotno odporen pa sev *S. Kingston* I124 z vrednostmi  $D_{58}$  2,79 min,  $D_{60}$  0,92 min in  $D_{63}$  0,24 min (Quintavalla in sod., 2001).

**Preglednica 2.5: Vrednosti D določene za različne seve bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji v različnih živilih**

Število sevov	T(°C)	D (min)	Medij	Stres	Vir
88	58	1,33	TSB	/	Quintavalla in sod., 2001
<i>S. Podtsdam</i>	58	4,8	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
<i>S. Podtsdam</i>	60	1,57	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
<i>S. Podtsdam</i>	63	0,3	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
<i>S. Kingston</i>	58	2,79	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
<i>S. Kingston</i>	60	0,92	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
<i>S. Kingston</i>	63	0,24	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
8 različnih sevov	58	2,79 – 4,8	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
8 različnih sevov	63	0,23 – 0,31	PM	/	Quintavalla in sod., 2001
10 različnih sevov	60	0,3-0,7	GE	I	Juneja in sod., 2003
<i>S. Typhimurium</i>	58	0,33	N	pH	Mañas in sod., 2003a
<i>S. Senftenberg</i> 775W	58	2,8	N	pH	Mañas in sod., 2003a
<i>S. Heidelberg</i>	68	20*	PV	/	Huang, 2004
<i>S. Heidelberg</i>	78	0,05*	PV	/	Huang, 2004
<i>S. Typhimurium</i>	58	0,08 - 0,4	TSAYE	NaCl	Mañas in sod., 2001

Legenda: / - ni podatka; TSB – tekoče gojišče angl. Tryptone Soya Broth; SM – prašičje meso; GE – gojišče z govejim ekstraktom; I – inkubacija; N – nevtralen medij; PV – peptonska voda; NaCl – natrijev klorid; TSAYE – gojišče TSA z 0,6 % dodatkom kvasnega ekstrakta; \* - čas v sekundah.

Poizkuse pasterizacije 10 različnih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri 60 °C so opravili tudi Juneja in sod. (2002). Proučevane bakterije rodu *Salmonella* so bile humani izolati ter izolati iz piščančjega, puranjega, prašičjega in govejega mesa. Pasterizacija je bila izvedena v vodni kopeli, gojišče za bakterijske celice je vsebovalo: 5 % govejega ekstrakta, 0,5 % kvasnega ekstrakta in 1,7 % raztopljenega škroba. Začetno število bakterijskih celic je bilo približno  $10^7$  do  $10^8$  cfu/ml. Vrednost D za različne seve bakterij rodu *Salmonella* v gojišču z govejim ekstraktom pri 60 °C pasterizacije je bila 0,3 – 0,7 min.

Mañas in sod. (2003a) so proučevali vplive različnih vrednosti pH na preživetje bakterijskih sevov *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* 775W in *S. Enteritidis* pri pasterizaciji. Najbolj toplotno odporne so celice v mediju z vrednostjo pH 6, katere so bile predhodno inkubirane na temperaturi 37 °C. Pri povišanju vrednosti pH na 7,7 ter inkubaciji inokuluma pri 37 °C se je število preživelih bakterijskih celic po pasterizaciji zmanjšalo za 3 krat. Preučevali so tudi, kolikšni so vplivi temperature (10 °C, 20 °C in 37 °C) inkubacije inokuluma, različnega seva (*S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* 775W, *S. Enteritidis*) in vrednosti pH na vrednost  $D_{58}$ . Vrednost  $D_{58}$  pri temperaturi inkubacije 37 °C in vrednosti pH 7 je za sev *S. Typhimurium* 0,33 min, za sev *S. Senftenberg* 775W pa 2,8 min (Mañas in sod., 2003a).

Huang (2004) je preučeval toplotno odpornost salmonel seva *S. Heidelberg* pri temperaturah pasterizacije 68 °C, 70 °C, 72 °C, 74 °C, 76 °C in 78 °C. Pričakovana vrednost D pri temperaturi pasterizacije 68 °C je bila 20 s, pri 78 °C pa 0,06 s. Pasterizacija je potekala v gojišču peptonska voda in v vodni kopeli.

Na preživetje bakterijskih celic rodu *S. Typhimurium* pri temperaturi pasterizacije 58 °C vpliva tudi koncentracija dodanega NaCl (0, 1, 2, 3, 4, 5 vol. %) v gojišče TSAYE, pri pasterizaciji v tekočem gojišču in pri kontroli preživelih bakterij na ploščah. Zanimiv je tudi vpliv različnih koncentracij dodanega natrijevega klorida v gojišče TSAYE in v identifikacijsko gojišče na preživetje bakterij *S. Typhimurium*. Pri dodatku 5 vol % NaCl v gojišče TSAYE za pasterizacijo so vrednosti D variirale od 0,4 – 0,66 min, glede na dodatek NaCl od 0 – 5 vol. % v gojišče TSAYE za kontrolo preživelih bakterij. Pri dodatku 5 vol. % NaCl v gojišče za kontrolo preživelih bakterij in razponom dodatka NaCl od 0 – 5 vol. % v gojišče TSAYE za pasterizacijo je vrednost D nihala od 0,4 – 0,008 min. V primeru enake koncentracije dodanega NaCl v obeh gojiščih TSAYE je bilo preživetje bakterijskih celic *S. Typhimurium* vedno enako (Mañas in sod., 2001).

#### 2.4.4.2 Vpliv pasterizacije jajčnih proizvodov na preživetje bakterij rodu *Salmonella*

Pasterizacija tekočih jajčnih izdelkov se deli na jajčni melanj, tekoč rumenjaki in tekoč beljak. Odvisno od izdelka se izbere primerno temperaturo in ustrezen čas pasterizacije. V preglednici 2.6 so prikazane vrednosti D in stresni dejavniki, ki so vplivali na preživetje različnih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri različnih temperaturah pasterizacije jajčnih izdelkov.

**Preglednica 2.6: Vrednosti D določene za različne seve bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji jajčnih proizvodov**

Sevi baterij rodu <i>Salmonella</i>	D (min)	T (°C)	Stres	Jajčni izdelek	Vir
<i>S. Senftenberg 775W</i>	3,5	60	TI	JM	Mañas in sod., 2003b
<i>S. Senftenberg 775W</i>	2,5	64	TI	JM	Mañas in sod., 2003b
<i>S. Senftenberg 775W</i>	1,5	70	TI	JM	Mañas in sod., 2003b
<i>S. Typhimurium DT104</i>	10,85 – 0,17	51 – 61	pH	JM, JR, JB	Jung in Beuchat, 2000
<i>Salmonella</i>	10	55,6	/	JM, JR, JB	Roberts in sod., 1998
<i>Salmonella</i>	1,5	69	/	JM	Roberts in sod., 1998
<i>S. Enteritidis</i>	6	57	/	CJ	Schuman in sod., 1997
<i>S. Enteritidis</i>	4,5	58	/	CJ	Schuman in sod., 1997
<i>S. Enteritidis</i>	0,2 – 0,52	60	/	JB	Juneja in sod., 2003
<i>S. Enteritidis</i>	/	< 60	/	CJ	James in sod., 2002
<i>S. Enteritidis</i>	103 ± 27*	57,2	/	JM	Whiting in Buchanan, 2003
<i>S. Enteritidis</i>	19 ± 5,26*	60	/	JM	Whiting in Buchanan, 2003

Legenda: t – zadrževalni čas pri temperaturi T; T – temperatura pasterizacije; D – decimalni redukcijski čas v min; \* – vrednost D v sekundah; TI – temperatura inkubacije in prilagajanja; / – ni podatka; HT – hidrostatski tlak; VP – vodikov peroksid; JM – jajčni melanj; JR – jajčni rumenjaki; JB – jajčni beljak; CJ – celo jajce.

Za oprana jajca razreda A se priporoča pasterizacija pri temperaturi nižji od 60 °C v vodni kopeli (James s sod., 2002). Tak proces je dolgotrajen in lahko vpliva na kvaliteto jajčne vsebine, zato so priporočajo tudi štirje novejši postopki (James in sod., 2002):

- z vročim zrakom (T = 180 °C, čas = 8 s); temperatura jajčne lupine je lahko največ 85 °C, temperatura notranjosti jajca pa 44 °C,

- z vročo vodo ( $T = 95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , čas = 10 s); temperatura jajčne lupine je lahko največ  $86\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura notranjosti jajca pa  $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,
- z infra-rdečo svetlobo ( $T = 210\text{ }^{\circ}\text{C}$ , čas = 30s); temperatura jajčne lupine je lahko največ  $88\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura notranjosti jajca pa  $52\text{ }^{\circ}\text{C}$  in
- s paro ( $T = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , čas = 2 s); temperatura jajčne lupine je lahko največ  $92\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura notranjosti jajca pa  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Roberts in sod. (1998) priporočajo pasterizacijo tekočih jajčnih proizvodov brez dodanih aditivov pri temperaturah med  $55,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $69\text{ }^{\circ}\text{C}$  od 10 do 1,5 min. Ker so bakterije rodu *Salmonella* najpogostejši patogeni kontaminanti jajc in jajčnih izdelkov, je potrebno poudariti, da sta za varnost živila primernejša višja temperatura ali daljši čas pri nižji temperaturi pasterizacije.

Preživelost bakterij seva *S. Senftenberg 775W* v jajčnem melanžu so preučevali Mañas in sod. (2003b). Pri raziskavi so za primerjavo vključili tudi toplotni šok, ki so ga izvedli tako, da so vzorec 1 uro predgrevali pri  $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vrednost D pri  $63\text{ }^{\circ}\text{C}$  pasterizacije jajčnega melanža je po toplotnem šoku znašala 3,1 min, pri postopku brez toplotnega šoka pa 1,2 min. Pri pasterizaciji tekočih jajčnih proizvodov v industrijskih obratih se priporočajo naslednje temperature: 3,5 min pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 2,5 min pri  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 1,5 min pri  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pri takem načinu se bo število mikrobnih celic zmanjšalo predvidoma za 1, 2 ali 4 logaritemske enote. Pri 1,5 minutni pasterizaciji pri  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu se število bakterijskih celic *S. Senftenberg 775W* zmanjša za 3 – 4 log enot, število bakterijskih celic drugih sevov bakterij rodu *Salmonella* pa za 9 log enot (Mañas in sod., 2003b).

Na preživetje bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji vpliva tudi vrednost pH. Vpliv različnih vrednosti pH na rast bakterijskih celic *S. Typhimurium DT104* sta proučevala Jung in Beuchat (2000). Ugotovila sta, da znižanje vrednosti pH z dodajanjem kisline v gojišče TSB vpliva na manjše preživetje seva *S. Typhimurium DT104* pri pasterizaciji v tekočih jajčnih proizvodih (jajčni melanž, jajčni beljak, jajčni rumenjaki). Pasterizacijo jajčnega melanža sta izvedla pri  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $59\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Bakterijske celice so bile izpostavljene različnim vrednostim pH (7,3, 5,4, 4,4 in 4,0) med 24-urno inkubacijo pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v gojišču TSB. Pri vrednostih pH 4,4 in 4,0 bakterije rodu *Salmonella* niso preživele. Vrednosti  $D_{55}$  po pripravi inokuluma pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  je bila 6,05 min, pri pripravi inokuluma v gojišču z dodano kislino pa 2,80 min. Primerjava vrednosti  $D_{55}$  je pokazala, da stres povzročen z znižanjem vrednosti pH statistično značilno vpliva na preživetje celic *S. Typhimurium DT104* (Jung in Beuchat, 2000).

Povezavo med dejavniki tveganja in bakterijskimi sevi *S. Enteritidis* v pasteriziranem jajčnem melanžu sta proučevala tudi Whiting in Buchanan (1997). Dejavnike tveganja sta proučevala teoretično in s pomočjo matematičnih izračunov bakterijam seva *S. Enteritidis* določila vrednost D  $103\pm 27$  s pri pasterizaciji pri  $57,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  in vrednost D  $19\pm 5,26$  s pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Juneja in sod. (2003) so proučevali vpliv temperature pasterizacije ( $57\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) na 17 različnih sevov *S. Enteritidis* v jajčnem beljaku. Vrednost D se je pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  zmanjšala za 17-krat glede na vrednost D pri  $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Povprečna vrednost D pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  je bila 0,33 min.

Jajca se lahko pasterizirajo tudi v jajčni lupini. Uspešnost takšne pasterizacije so preučevali Schuman in sod. (1997). Sveža, oprana in očiščena jajca teže  $62 \pm 2$  g so kontaminirali z bakterijami seva *S. Enteritidis* preko jajčne lupine s koncentracijo celic približno  $3 \times 10^8$  cfu v sredino jajčnega rumenjaka. Pri takšni kontaminaciji jajc je bila uspešna 50 – 57,5 minutna pasterizacija v vodni kopeli pri 58 °C oziroma pri 57 °C v času 65 – 75 min. Pri pasterizaciji 58 °C (čas zadrževanja je bil 24 min) je znašala vrednost D 4,5 min, pri pasterizaciji pri 57 °C (čas zadrževanja je bil 35 min) je bila določena vrednost D 6 min (Schuman in sod., 1997).

## 2.4 CILJI NALOGE

Namen naloge je bil določiti preživetje različnih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri različnih temperaturah pasterizacije in v različnih medijih:

- v gojišču triptični soja bujon (TSB) pri 58 °C 15 min, za določitev 5 – 7 različnih sevov,
- 5 – 7 izbranih sevov v gojišču TSB pri 60 °C 15 min in
- 5 – 7 izbranih sevov v jajčnem melanžu pri 60 °C in 64 °C 15 min.

Učinek pasterizacije na različne seve bakterij rodu *Salmonella* bomo določili z izračuni decimalnih redukcijskih časov (vrednosti D) pri različnih izvedbah pasterizacije. S statistično analizo vrednosti D bomo lahko razvrstili seve bakterij rodu *Salmonella* glede na toplotno odpornost, od najbolj toplotno odpornega do najmanj toplotno odpornega seva, določili bomo vplive temperatur, medija in posameznega seva na preživetje bakterijskih celic. Dobljene rezultate bomo tudi primerjali z rezultati iz literature.

## 2.5 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevamo, da imajo različni sevi bakterij rodu *Salmonella* različno toplotno odpornost. Decimalni redukcijski časi se bodo razlikovali glede na naslednje parametre:

- vrsta seva,
- vrsta medija in
- temperatura pasaterizacije.

Predvidevamo, da se bo z višanjem temperature pasterizacije preživetje bakterij zmanjševala, ne glede na vrsto medija in vrsto izbranega seva.



### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Bakterijski sevi

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabili 17 sevov bakterij rodu *Salmonella* iz zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo (ŽM), Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete (preglednica 3.1).

**Preglednica 3.1: Sevi bakterij rodu *Salmonella* uporabljeni pri praktičnem delu**

Oznaka seva	Vir seva
<i>S. Anatum</i> ŽM148	Piščančje meso
<i>S. Anatum</i> ŽM149	Piščančje meso
<i>S. Brandenburg</i> ŽM4	Piščančje meso
<i>S. Enteritidis</i> ŽM2	Piščančje meso
<i>S. Enteritidis</i> ŽM14	Piščančje meso
<i>S. Enteritidis</i> ŽM348	Jajčni beljak
<i>S. Enteritidis</i> ŽM351	Jajčni melanž
<i>S. Hadar</i> ŽM123	Klinični sev
<i>S. Hadar</i> ŽM378	Perutninsko meso
<i>S. Heidelberg</i> ŽM11	Piščančje meso
<i>S. Heidelberg</i> ŽM134	Klinični izolat
<i>S. Infantis</i> ŽM9	Piščančje meso
<i>S. Infantis</i> ŽM350	Jajce
<i>S. Senftenberg</i> ŽM492	/
<i>S. Typhimurium</i> ŽM142	Piščančje meso
<i>S. Typhimurium</i> ŽM352	Piščančje meso
<i>S. Typhimurium</i> ŽM375	ATCC 14028

Legenda:

ATCC: tipski sev zbirke American Type Culture Collection

/: ni poznano

##### 3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Neselektivna gojišča:

- gojišče triptični soja agar TSA (Tryptone soya agar, Oxoid, CM 0131, Basingstoke, Anglija),
- gojišče triptični soja bujon TSB (Tryptone soya broth, Oxoid, CM 0129, Basingstoke, Anglija),
- gojišče TSAP je gojišče TSB z dodatki: 0,3 ut. % kvasnega ekstrakta, Biolife, 411030, Milano, Italija; 0,1 ut. % Na-piruvata, Sigma, P2256-256, Japan; 1,4 ut. % agar bacteriological, Biolife, 412220, Milano, Italija) in
- gojišče BHI (Brain heart infusion broth, Merck 1.10493, Darmstadt, Nemčija).

Selektivno gojišče:

- gojišče XLD (Xylose lysine desoxycholate agar, Biolife, 4022062, Milano, Italija).

### 3.1.3 Živilo

- jajčni melanž – homogeniziran, pasteriziran in hlajen (Jata Emona d.d., Ljubljana, Slovenija).

### 3.1.4 Druge kemikalije

- fosfatni pufer (42,5 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{l}$ ), (pH 7,2), (11161, Kemika, Zagreb),
- glicerol (Kemika, 0711901, Zagreb, Hrvaška) in
- alkohol (Merck, 1.00971.6025, Darmstadt, Nemčija).

### 3.1.5 Laboratorijska oprema

- Mešalo za epruvete (Yellow line, TTS2, IKA, ZDA),
- digitalna tehtnica (Mettler toledo, PB 1502-S, Mono Bloc),
- inkubator (T-115 C, Kambič, Slovenija),
- avtoklav (Tip 250, Sutjeska, Beograd, Jugoslavija),
- termometer, natančnost  $\pm 1$  °C (Testo 915-1, Nemčija),
- vodna kopel, konstantnost temperature  $\pm 0,02$  °C (JULABO MP-5, Nemčija), stresalnik (Vibromiks, Tehtnica, Železniki, Slovenija),
- analogna štoparica (/),
- pipeta 1ml (Pipetman P 1000, Gilson),
- pipeta 5ml (Labsystems 4500, Finpipette),
- hladilnik (Gorenje, Velenje, Slovenija),
- zmrzovalna skrinja (Gorenje, Velenje, Slovenija) in
- mikrovalovna pečica (Cookgrill 1300, Sanyo, Japonska).

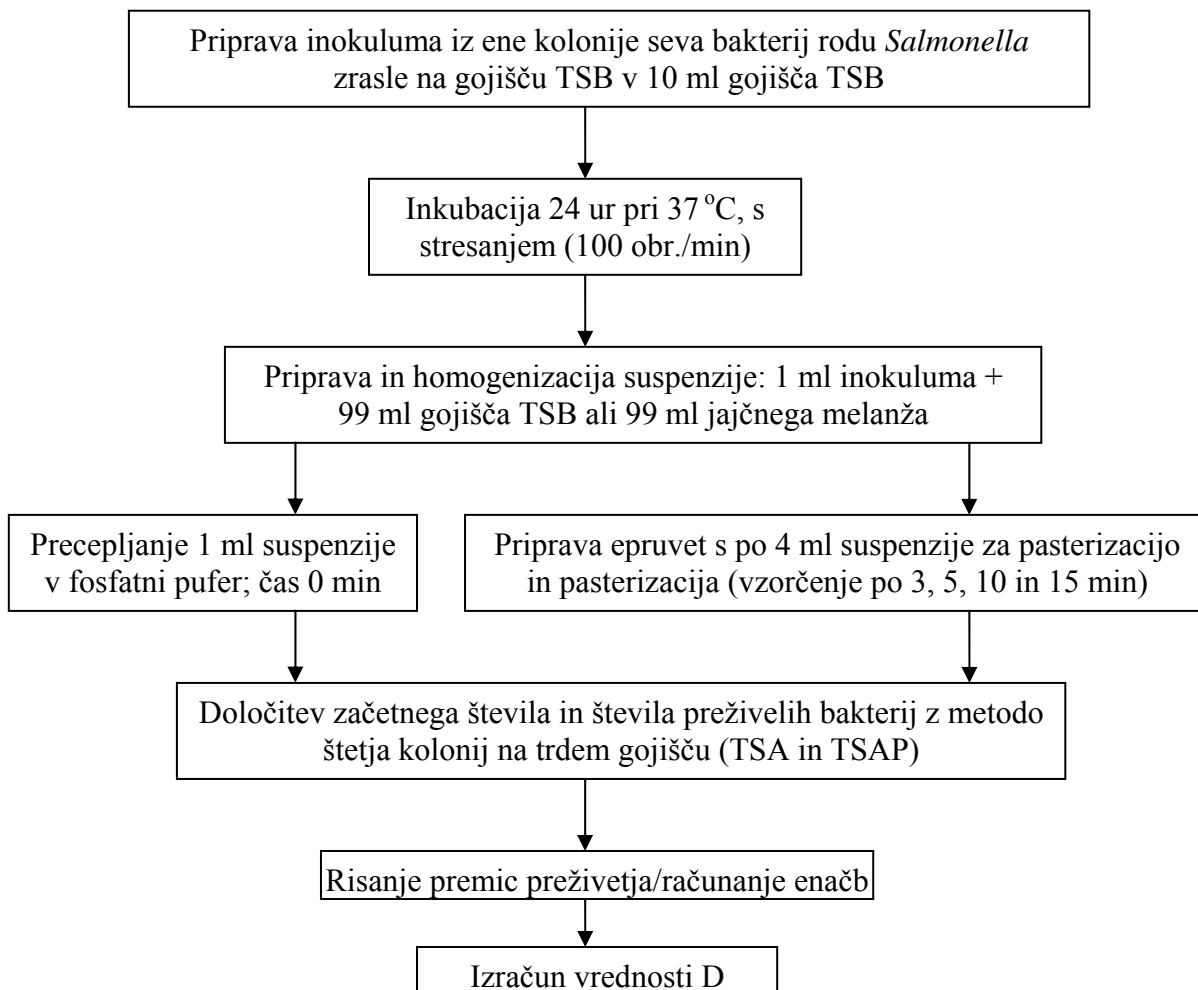
Pri izvedbi poizkusov smo uporabljali tudi klasične laboratorijske pripomočke, kot so: plinski gorilniki, sterilne petrijevke, epruvete (2, 5 in 10 ml), erlenmajerice, steklenice s pokrovom, sterilne cepilne zanke za enkratno uporabo, stojala za epruvete, vrečke za izdelovanje ledu in papirnate brisače.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Potek eksperimenta

Pred začetkom smo najprej oživili izbrane seve bakterij rodu *Salmonella*, kateri so bili pred začetkom eksperimentalnega dela shranjeni pri  $-20$  °C. Eksperiment smo nato izvedli v dveh delih (slika 3.1).

V prvem delu smo s pasterizacijo pri  $58$  °C v gojišču TSB določili preživetje 17 sevov bakterij rodu *Salmonella*. Število preživelih bakterij smo kot logaritemske vrednosti ( $\log N$ ) uporabili za izdelavo premic preživetja po 15, 10 in 5 min pasterizacije. Za izračun decimalnih redukcijskih časov smo uporabili premice preživetja po 5 min, zaradi najvišjega korelacijskega koeficienta ( $R^2$ ). Decimalne redukcijske čase smo določili iz enačb premic, pri čemer smo vrednosti D izračunali iz naklona premic ( $1/k$ ). Pridobljene vrednosti D smo nato statistično analizirali.



**Slika 3.1: Shema poteka glavnih stopenj eksperimentalnega dela**

Legenda: TSA – gojišče triptični soja agar; TSB – gojišče triptični soja bujon; TSAP – gojišče TSB in dodatki.

V drugem delu smo določili vrednosti D izbranim sevom bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije 60 °C in 64 °C in v gojišču TSB in v jajčnem melanžu. Postopek določitve decimalnih redukcijskih časov je bil enak kot v prvem delu poizkusa. Primerjali smo izračunane vrednosti D za pet izbranih sevov:

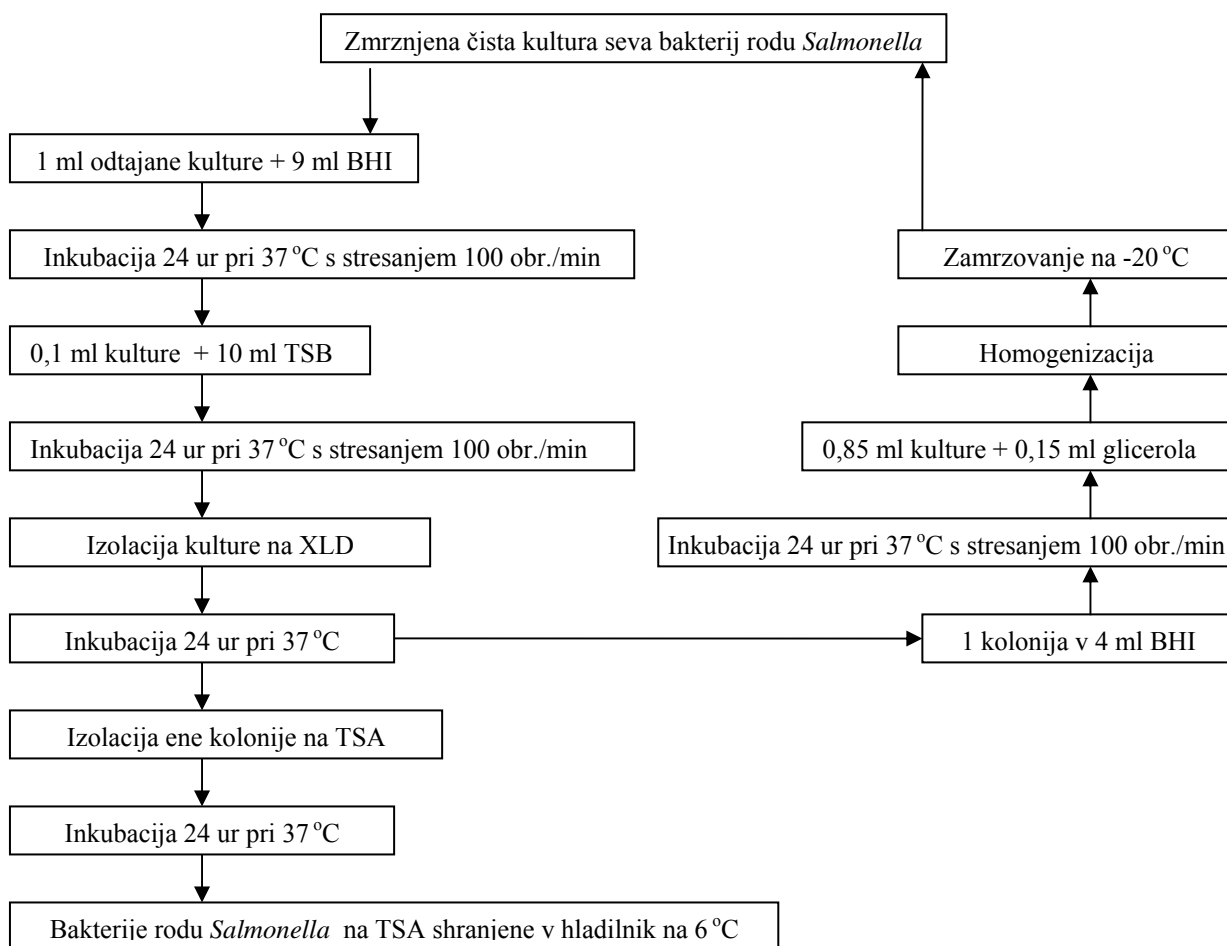
- v gojišču TSB pri 58 °C in 60 °C,
- v gojišču TSB in jajčnem melanžu pri 58 °C in 60 °C in
- v jajčnem melanžu pri 60 °C in 64 °C.

Statistična analiza vrednosti D določenih za posamezen sev bakterij rodu *Salmonella* je vključevala primerjavo vrednosti D, določeno pri različnih temperaturah (58 °C, 60 °C in 64 °C) v gojišču TSB in jajčnem melanžu.

### 3.2.2 Oživitev in priprava bakterijskih kultur za eksperimentalno delo

Pri sobni temperaturi smo odtajali seve bakterij rodov *Salmonella* in prelili vsebino (1 ml) epruvete v 10 ml gojišča BHI, suspenzijo smo 24 ur inkubirali na stresalniku (100

obratov/min) pri 37 °C. Po inkubaciji smo 0,1 ml suspenzije prenesli v 10 ml gojišča TSB ter ga 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo salmonele izolirali na gojišču XLD in TSA ter gojišči 24 ur inkubirali pri 37 °C. Kolonijo iz gojišča XLD smo nato precepili v gojišče BHI in ga 24 ur inkubirali pri 37 °C. Zatam smo 0,25 ml bakterijske suspenzije dodali 0,75 ml glicerola in kulturo ponovno shranili pri -20 °C. Kolonije bakterij rodu *Salmonella* na gojišču TSA smo hranili v hladilniku za praktično delo. Shema je prikazana na sliki 3.2.



**Slika 3.2:** Shema poteka oživitve posameznega seva bakterij rodu *Salmonella*

Legenda: BHI – tekoče gojišče, angl. Brain Heart Infusion Broth; XLD – trdno gojišče, angl. Xylose Lysine Deoxycholate agar; TSA – gojišče triptični soja agar.

Za vsak poizkus smo pripravili 24-urno kulturo izbranega seva bakterij rodu *Salmonella*. Iz gojišča TSA z izbranim sevom bakterije rodu *Salmonella* smo precepili eno kolonijo v sveže gojišče TSA ter nato suspenzijo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Eno kolonijo 24-urne kulture smo nato nacepili v 10 ml gojišča TSB, suspenzijo dobro premešali na namiznem mešalu ter inkubirali na stresalniku 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo 1 ml namnožene kulture dodali v 99 ml gojišča TSB ali v 99 ml jajčnega melanja za določitev preživetja bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji (3.2.6).

### 3.2.3 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču

Postopek določitve števila bakterij smo povzeli po metodi, opisani po standardu SIST EN ISO 4833 (2003). Metodo določitve števila bakterij rodu *Salmonella* na trdem gojišču smo uporabili pred (čas t: 0 min) in po 3, 5, 10 in 15 min pasterizacije.

#### 3.2.3.1 Priprava gojišča

Pri poizkusu smo uporabili trdna gojišča (TSA, TSAP, XLD). Gojišča smo pripravili in hranili po navodilih proizvajalcev in jih hranili v hladilniku. Nerazlito sterilizirano gojišče TSA smo do uporabe (24 - 48 ur) hranili v inkubatorju pri 45 °C.

#### 3.2.3.2 Priprava vzorca in določitev števila bakterij v vzorcu

V 9 ml sterilnega fosfatnega pufra smo dodali 1 ml vzorca, v katerem smo določali število bakterij, in vsebino premešali na namiznem mešalu. Razredčevanje vzorca smo ponovili po enakem postopku.

Razredčitve vzorca smo cepili na ali v gojišče. Pri metodi razmazovanja smo na vnaprej razlito gojišče cepili 0,1 ml razredčitve vzorca, za metodo razlivanja smo 1 ml razredčitve vzorca umešali v stopljeno in na 45 °C ohlajeno gojišče. Vsako razredčitev vzorca smo nacepili na/v gojišče v treh paralelkah. Metodo razmazovanja na trdnem gojišču smo uporabili za določitev števila preživelih bakterij pri pasterizaciji v tistih primerih, ko smo uporabili selektivno gojišče XLD in neselektivno gojišče TSA. Metodo vmešavanja smo uporabili za določitev števila preživelih bakterij pri pasterizaciji v primerih, ko smo uporabili gojišče TSAP. Gojišče TSA smo uporabili za določanje začetnega števila bakterij rodu *Salmonella*, gojišče TSAP pa za določanje preživelih bakterij po pasterizaciji. Gojišča smo v vseh primerih inkubirali 24-48 ur pri 37 °C.

#### 3.2.3.3 Izračun števila bakterij v vzorcu

Po inkubaciji smo na gojišču prešteli kolonije ter za izračunali število bakterij N (cfu/ml). Za gojišča z od 15-300 kolonijami smo uporabili enačbo 3.1:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2)d} \quad \dots(3.1)$$

Legenda:  $\sum C$  – seštevek vseh kolonij na števnihih ploščah,  $n_1$  – število kolonij pri prvi razredčitvi,  $n_2$  - število zraslih kolonij pri drugi razredčitvi,  $d$  – faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi in  $N$  – število mikroorganizmov v cfu/ml.

Za gojišča z od 1 do 15 zraslimi kolonijami smo uporabili enačbo 3.2:

$$N_E = m \quad \dots(3.2)$$

Legenda:  $N_E$  – število mikroorganizmov v 1 ml živila in  $m$  – aritmetična sredina dveh plošč.

Rezultat smo podali kot število preživelih bakterij rodu *Salmonella* med 1,0 in 8,9 pomnoženo z  $10^x$ , pri čemer pomeni  $x$  faktor razredčitve vzorca.

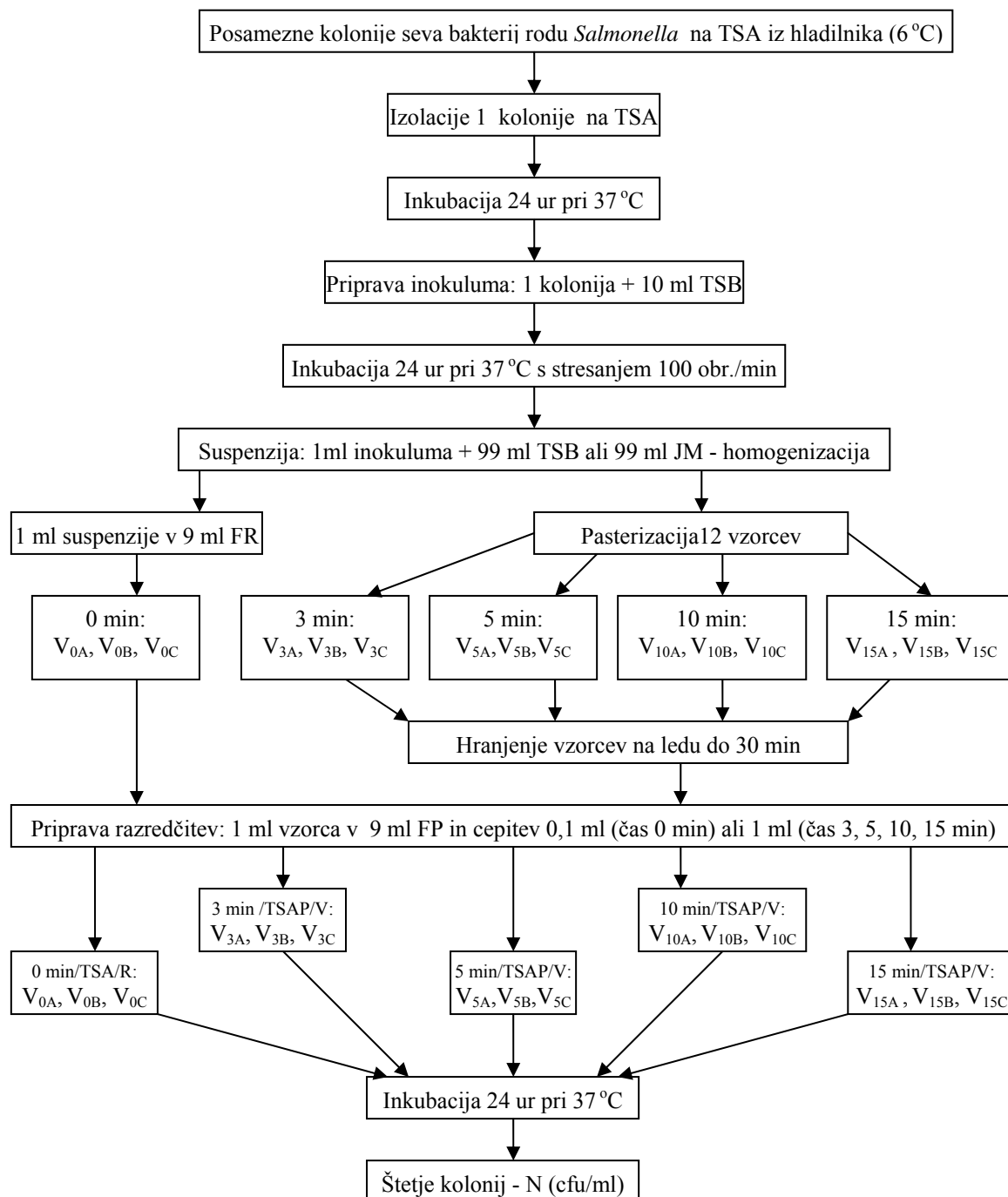
### 3.2.4 Rastna krivulja

Za določitev rastne krivulje smo uporabili sev *S. Enteritidis* ŽM2. Kolonijo iz gojišča TSA (3.2.2) smo precepili v 4 ml gojišča TSB ter suspenzijo premešali. Nato smo 0,5 ml suspenzije prenesli v 99 ml gojišča TSB ter vsebino dobro homogenizirali. V času 0 ter po 2, 4, 6, 8, 10, 24 in 28 urah smo določili število bakterij z metodo štetja kolonij na trdem gojišču (3.2.3). Vzorec je bil 28 ur inkubiran na stresalniku pri 37 °C.

### 3.2.5 Določanje števila preživelih bakterij pri pasterizaciji

Posamezen sev bakterij rodu *Salmonella* (preglednica 3.1) smo pripravili za pasterizacijo kot je opisano v poglavju 3.2.2. Za čas 0 min (oznake vzorcev  $V_{0A}$ ,  $V_{0B}$ ,  $V_{0C}$  na sliki 3.3) smo za določitev začetnega števila bakterij rodu *Salmonella* pred pasterizacijo aseptično iz vsake paralelke odvzeli po 1 ml homogenega vzorca in pripravili razredčitve s fosfatnim pufrom. Preostanek suspenzije smo razdelili v epruvete po 4 ml za določitev preživetja bakterij po 3 (oznake vzorcev  $V_{3A}$ ,  $V_{3B}$ ,  $V_{3C}$ ), 5 (oznake vzorcev  $V_{5A}$ ,  $V_{5B}$ ,  $V_{5C}$ ), 10 (oznake  $V_{10A}$ ,  $V_{10B}$ ,  $V_{10C}$ ) in 15 min (oznake vzorcev  $V_{15A}$ ,  $V_{15B}$ ,  $V_{15C}$ ) pasterizacije pri določeni temperaturi.

Pasterizacijo bakterij rodu *Salmonella* smo izvedli v vodni kopeli pri 58 °C, 60 °C in 64 °C. Čas smo pričeli meriti, ko je v kontrolni epruveti, ki je vsebovala gojišče TSB brez dodanih salmonel, termometer pokazal ustrezno temperaturo pasterizacije. Po določenem času pasterizacije (3, 5, 10 in 15 min) smo 3 paralelke vzeli iz vodne kopeli in jih hranili na ledu do določitve števila preživelih bakterij z metodo opisano v poglavju 3.2.3. Slika 3.3 nam prikazuje potek pasterizacije in vzorčenja pred in med potekom pasterizacije.



**Slika 3.3: Shema priprave vzorca, pasterizacije in vzorčenja**

Legenda: TSA – gojišče triptični soja agar; TSB – tekoče gojišče triptični soja bujon; TSAP – trdno gojišče TSB in dodatki; JM – jajčni melanž; FP – fosfatni pufer; V – vmešavanje vzorca; R – razmazovanje vzorca; V<sub>0A</sub>, V<sub>0B</sub>, V<sub>0C</sub> – vzorci vzorčeni v času 0 min, paralelke A, B, C; V<sub>3A</sub>, V<sub>3B</sub>, V<sub>3C</sub> – vzorci vzorčeni v času 3 min; V<sub>5A</sub>, V<sub>5B</sub>, V<sub>5C</sub> – vzorci vzorčeni v času 5 min; V<sub>10A</sub>, V<sub>10B</sub>, V<sub>10C</sub> – vzorci vzorčeni v času 10 min; V<sub>15A</sub>, V<sub>15B</sub>, V<sub>15C</sub> – vzorci vzorčeni v času 15 min; N – število mikroorganizmov.

### 3.2.6 Krivulje preživetja in izračun decimalnih redukcijskih časov

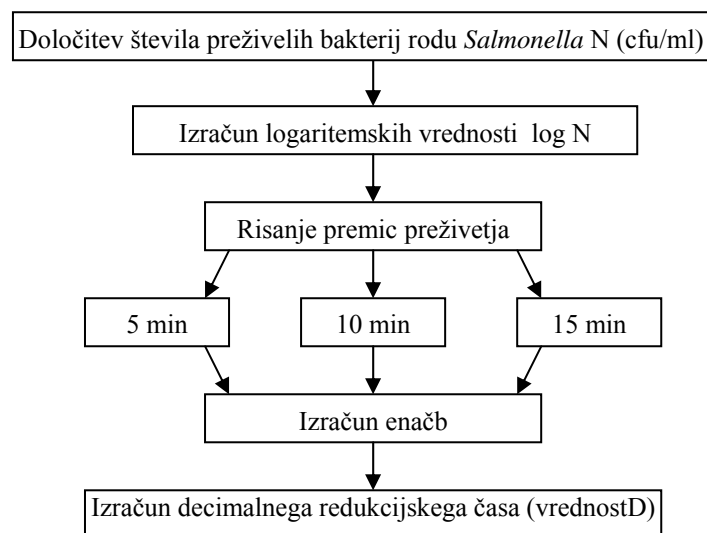
Podatke o začetnem številu in številu preživelih bakterij rodu *Salmonella* N (cfu/ml) smo določili z metodo štetja kolonij na trdem gojišču (3.2.3). Števila preživelih bakterij (N) smo zatem logaritmirali ter s tako urejenimi podatki narisali ustrezne premice preživetja za 5, 10 in 15 min pasterizacije. Za vsako paralelko smo izračunali enačbo premice (enačba 3.3) in iz naklona premice izračunali vrednost D (enačba 3.4). Slika 3.4 prikazuje potek izračuna vrednosti D za posamezen sev pri pasterizaciji.

$$Y = kX + n \quad \dots (3.3)$$

Legenda: Y – log N, k – naklon premice, X – čas pasterizacije in n – log N<sub>0</sub>.

$$D = 1/-k \quad \dots (3.4)$$

Legenda: D – decimalni redukcijski čas (min) in k – naklon premice.



Slika 3.4: Potek določitve vrednosti D za seve bakterij rodu *Salmonella*

### 3.2.7 Statistična analiza

V poskusu zbrane decimalne redukcijske čase različnih sevov bakterij rodu *Salmonella* smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) s proceduro GLM (General Linear Models).

Za obdelavo rezultatov, pridobljenih v naši nalogi, smo uporabili 6 statističnih modelov, ki so opisani v nadaljevanju. Pri vseh modelih so bili povprečni decimalni časi za eksperimentalne skupine izračunani z uporabo Duncanovega testa in primerjani pri 5 % tveganju.



Statistični model za analizo vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB je vključeval vpliv 17-ih različnih sevov (S) bakterij rodu *Salmonella* (model 3.5).

$$Y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij} \quad \dots(3.5)$$

Legenda:  $y_{ij}$  – ij-to opazovanje,  $\mu$  - povprečna vrednost,  $S_i$  – vpliv različnega seva (*S. Enteritidis* ŽM2, *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM348, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352, *S. Typhimurium* ŽM375, *S. Heidelberg* ŽM11, *S. Heidelberg* ŽM134, *S. Anatum* ŽM148, *S. Anatum* ŽM149, *S. Infantis* ŽM9, *S. Infantis* ŽM350, *S. Hadar* ŽM123, *S. Hadar* ŽM378, *S. Senftenberg* ŽM492, *S. Brandenburg* ŽM4) in  $e_{ij}$  - ostanek.

Statistični model za analizo vrednosti D pri posamezni pasterizaciji, 58 °C v gojišču TSB, 60 °C v gojišču TSB, 60 °C v jajčnem melanžu in 64 °C v jajčnem melanžu, je vključeval vplive 5-ih različnih sevov (S) bakterij rodu *Salmonella* (model 3.6):

$$Y_{ij} = \mu + S_i + e_{ij} \quad \dots(3.6)$$

Legenda:  $y_{ij}$  – ij-to opazovanje,  $\mu$  - povprečna vrednost,  $S_i$  – vpliv različnega seva (*S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352, *S. Senftenberg* ŽM492) in  $e_{ij}$  - ostanek.

Statistični model za analizo vrednosti D pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB je vključeval vplive 5-ih različnih sevov (S) bakterij rodu *Salmonella*, vpliv različne temperature pasterizacije (T) ter interakcijo različnih sevov in različnih temperatur pasterizacije (S\*T) (model 3.7).

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + S*T_{ij} + e_{ijk} \quad \dots(3.7)$$

Legenda:  $y_{ijk}$  – ijk-to opazovanje,  $\mu$  - povprečna vrednost,  $S_i$  – vpliv različnega seva (*S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Senftenberg* ŽM492, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352),  $T_j$  – vpliv temperature (58 °C, 60 °C),  $S*T_{ij}$  – interakcija i-tega seva in j-te temperature;  $e_{ijk}$  - ostanek.

Statistični model za analizo vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 60 °C je vključeval vplive različnih sevov (S) bakterij rodu *Salmonella*, različnih gojišč (G), interakcije različnih sevov in različnih gojišč (S\*G) (model 3.8).

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + G_j + S*G_{ij} + e_{ijk} \quad \dots(3.8)$$

Legenda:  $y_{ijk}$  – ijk-to opazovanje,  $\mu$  - povprečna vrednost,  $S_i$  – vpliv različnega seva (*S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Senftenberg* ŽM492, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352),  $G_j$  – vpliv vrste gojišča (jajčni melanž – JM, gojišče TSB),  $S*G_{ij}$  – interakcija i-tega seva in j-tega gojišča in  $e_{ijk}$  – ostanek.

Statistični model za analizo vrednosti D pri temperaturah pasterizacije 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu je vključeval vplive različnih sevov (S) bakterij rodu *Salmonella*, različnih temperatur pasterizacije (T) ter interakcije različnih sevov in različnih temperatur (S\*T) (model 3.9).

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + S*T_{ij} + e_{ijk} \quad \dots(3.9)$$

Legenda:  $y_{ijk}$  – ijk-to opazovanje,  $\mu$  - povprečna vrednost,  $S_i$  – vpliv različnega seva (*S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Senftenberg* ŽM492, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352),  $T_j$  – vpliv temperature (60°C, 64°C);  $S*T_{ij}$  – interakcija i-tega seva in j-te temperature in  $e_{ijk}$  -ostanek.

Statistični model za analizo vrednosti D za posamezen izbrani sev bakterij rodu *Salmnella* je vključeval vplive različnih temperatur pasterizacije (T), različnih gojišč (G) ter interakcije različnih temperatur in različnih gojišč (T\*G) (model 3.10).

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + G_j + T*G_{ij} + e_{ijk} \quad \dots(3.10)$$

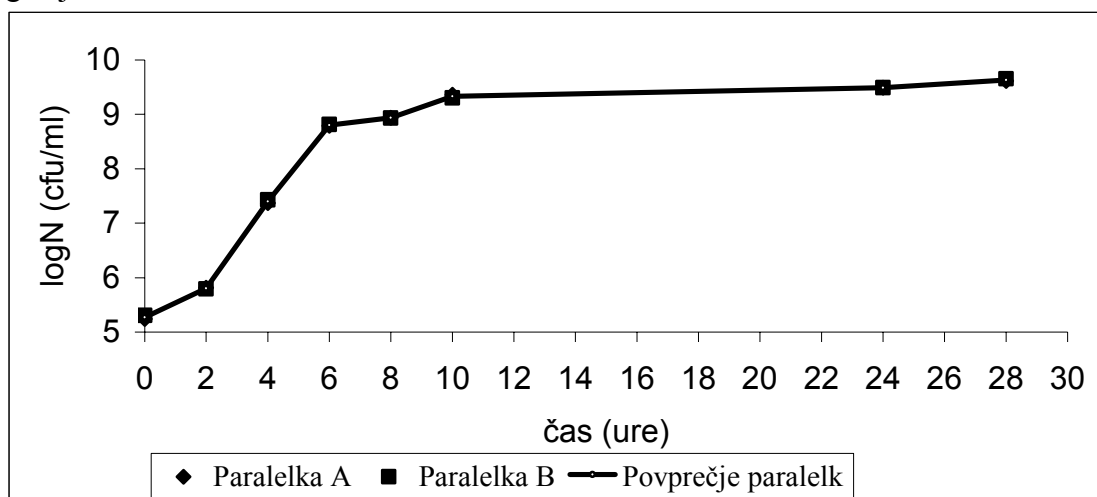
Legenda:  $y_{ijk}$  –  $ijk$ -to opazovanje,  $\mu$  - povprečna vrednost,  $T_i$  - vpliv različne temperature (58 °C, 60 °C, 64 °C),  $G_j$  – vpliv gojišča (TSB, jajčni melanž, jajčni melanž z XLD),  $T*G_{ij}$  – interakcija  $i$ -te temperature in  $j$ -tega gojišča in  $e_{ijk}$  = ostanek.

## 4 REZULTATI

Naše raziskovalno delo smo opravili v dveh delih. V prvem delu smo določili preživetje 17 sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB (Priloga B1) in izračunali decimalne redukcijske čase – vrednost D (priloga B2). Glede na razlike med vrednostmi D smo izbrali 5 različno toplotno odpornih sevov bakterij rodu *Salmonella*. Tem sevom smo v drugem delu poizkusa določili preživetje pri temperaturah pasterizacije 60 °C v gojišču TSB in jajčnem melažu ter pri 64 °C v jajčnem melažu in izračunali decimalne redukcijske čase (prilogi C1 in C2). Želeli smo ugotoviti, ali temperatura pasterizacije, vrsta gojišča in različni sevi bakterij rodu *Salmonella* vplivajo na vrednosti D oziroma na preživetje salmonel pri pasterizaciji.

### 4.1 RASTNA KRIVULJA BAKTERIJ SEVA *S. Enteritidis* ŽM2

Rastno krivuljo smo določili za bakterije seva *S. Enteritidis* ŽM2. Rast bakterij smo 28 ur spremljali v gojišču TSB pri 37 °C na stresalniku (100 min<sup>-1</sup>). V prilogi A so podani rezultati. Število bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM2 smo določili z metodo opisano v poglavju 3.2.3.



Slika 4.1: Rastna krivulja seva *S. Enteritidis* ŽM2 v gojišču TSB pri 37 °C

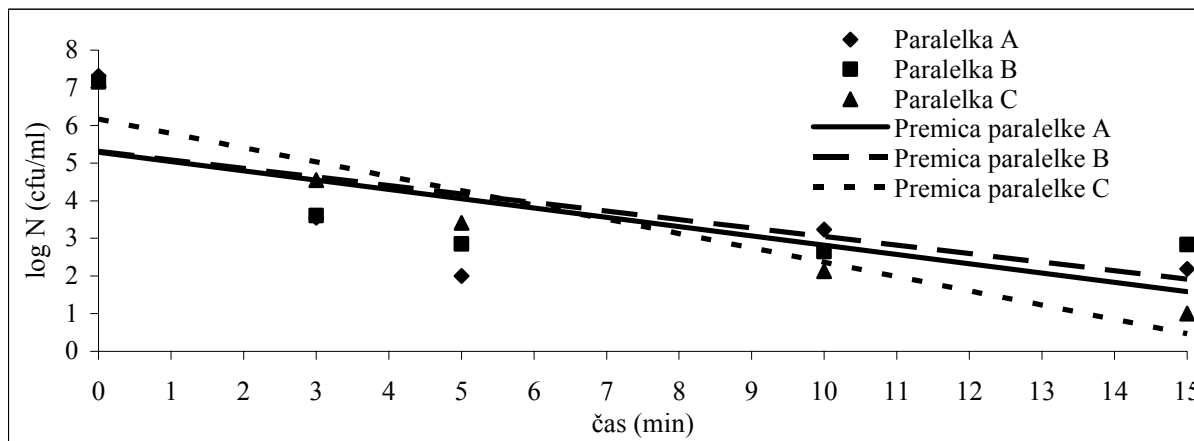
Iz slike 4.1 je razvidno, da nastopi stacionarna faza rasti bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM2 po približno 10 urah. Za določitev števila preživelih salmonel smo zato pri vseh eksperimentih, ki so vključevali pasterizacijo, uporabili 24-urno kulturo, ker so bile takrat bakterije v stacionarni fazi rasti.

### 4.2 PREŽIVETJE RAZLIČNIH SEVOV BAKTERIJ RODU *Salmonella* PRI TEMPERATURI PASTERIZACIJE 58 °C V GOJIŠČU TSB

V prvem delu naše naloge smo spremljali preživetje 17-ih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB (priloga B1). Z dobljenimi števili preživelih bakterij rodu *Salmonella* smo narisali krivulje in premice preživetja po 15, 10 in 5-ih min pasterizacije. Za izračun vrednosti D smo uporabili enačbe premic preživetja po pet minutni pasterizaciji, ker je bil korelacijski koeficient ( $R^2$ ) najbližje 1. Vrednosti D za te seve so podane v prilogi B1.

#### 4.2.1 Primer izračuna vrednosti D za sev *S. Typhimurium* ŽM142

Iz podatkov o številu preživelih bakterij seva *S. Typhimurium* ŽM142 (priloga B1, vrstica 8) smo narisali premice preživetja po 15 minutni pasterizaciji (slika 4.2), 10 minutni pasterizaciji (slika 4.3) in 5 minutni pasterizaciji (slika 4.4) v treh paralelkah.



Slika 4.2: Premice preživetja bakterij seva *S. Typhimurium* ŽM142 pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB po 15 minutni pasterizaciji

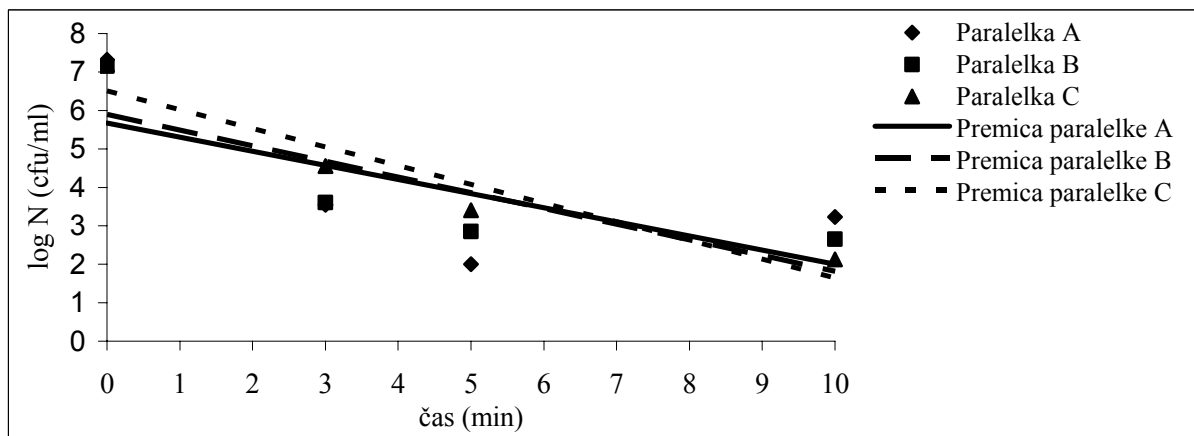
Enačbe premic po 15 minutni pasterizaciji:

Premica paralelke A:  $\log N = -0,2469 t + 5,1857$ ;  $R^2 = 0,4658$

Premica paralelke B:  $\log N = -0,226 t + 5,03077$ ;  $R^2 = 0,5000$

Premica paralelke C:  $\log N = -0,3801 t + 6,1648$ ;  $R^2 = 0,8964$

Legenda: t – čas v min in  $R^2$ - korelacijski koeficient.



Slika 4.3: Premice preživetja bakterij seva *S. Typhimurium* ŽM142 pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB po 10 minutni pasterizaciji

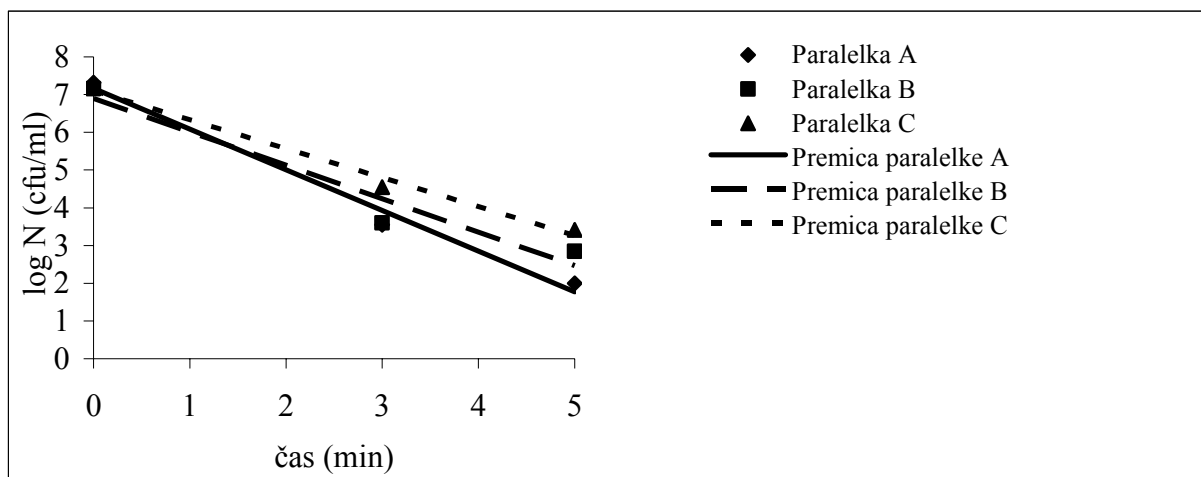
Enačbe premic po 10 minutni pasterizaciji:

Premica paralelke A:  $\log N = -0,3674 t + 5,6758$ ;  $R^2 = 0,4529$

Premica paralelke B:  $\log N = -0,4073 t + 5,8946$ ;  $R^2 = 0,6652$

Premica paralelke C:  $\log N = -0,4863 t + 6,5088$ ;  $R^2 = 0,8995$

Legenda: t – čas v min in  $R^2$ - korelacijski koeficient.



Slika 4.4: Premice preživetja bakterij seva *S. Typhimurium* ŽM142 pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB po 5 minutni pasterizaciji

Enačbe premic po 5 minutni pasterizaciji:

Premica paralelke A:  $\log N = -1,0785t + 7,1627$ ;  $R^2 = 0,9851$ ;  $D = 0,92$  min

Premica paralelke B:  $\log N = -0,8856t + 6,8949$ ;  $R^2 = 0,9417$ ;  $D = 1,12$  min

Premica paralelke C:  $\log N = -0,7668t + 7,0952$ ;  $R^2 = 0,9879$ ;  $D = 1,3$  min

Legenda: t – čas v min,  $R^2$ - korelacijski koeficient, D – decimalni redukcijski čas in min – min.

Vse decimalne redukcijske čase smo izračunali iz premic preživetja po 5-ih min pasterizacije, kot je prikazano na primeru za sev *S. Typhimurium* ŽM142, ker je bil koeficient korelacije ( $R^2$ ) najbližje 1 (slika 4.4.). Vrednosti D smo izračunali po enačbi 3.4 in so podane v prilogi B2.

#### 4.2.2 Vpliv vrste seva bakterij rodu *Salmonella* na vrednosti D, določene pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB

Za vsak sev bakterij rodu *Salmonella* smo uporabili enak postopek izračuna vrednosti D, kot je prikazan v poglavju 4.2.1. Vrednosti D za 17 sevov bakterij rodu *Salmonella*, ki smo jim določali preživetje pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB, so podane v prilogi B2. Za primerjavo vrednosti D smo uporabili model 3.5. Povprečne vrednosti D in vpliv seva na preživetje bakterij rodu *Salmonella* so prikazani v preglednici 4.1.

Pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB je preživetje salmonel odvisno od vrste seva ( $P < 0,0001$ ). Najvišjo povprečno vrednost D ima sev *S. Enteritidis* ŽM351 (1,9 min). Sev *S. Enteritidis* ŽM351 je bil izoliran iz jajčnega melanža in vrednost D določena za ta sev se razlikuje od vrednosti D, določene za še tri seve *S. Enteritidis*. Najnižjo vrednost D ima sev *S. Heidelberg* ŽM11 (1,08 min), ki je bil izoliran iz piščančjega mesa. Vrednost D seva *S. Heidelberg* ŽM11 je manjša od vrednosti D, ki smo jo določili sevu humanega izvora *S. Heidelberg* ŽM134 (1,23 min). Za nadaljnje eksperimentalno delo smo glede na razlike med vrednostmi D, pogostosti pojavljanja posameznega seva in ob upoštevanju literaturnih podatkov izbrali pet sevov in sicer: *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492. Vrednosti D določene za štiri seve *S. Enteritidis*.

**Preglednica 4.1: Vpliv seva bakterij rodu *Salmonella* na vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB**

SEV	n	$\bar{D} \pm so(\text{min})$
<i>S. Enteritidis</i> ŽM2	3	1,43±0,091 <sup>bc</sup>
<b><i>S. Enteritidis</i> ŽM14</b>	<b>3</b>	<b>1,39±0,036<sup>bc</sup></b>
<i>S. Enteritidis</i> ŽM348	3	1,22±0,18 <sup>bcde</sup>
<b><i>S. Enteritidis</i> ŽM351</b>	<b>3</b>	<b>1,90±0,011<sup>a</sup></b>
<b><i>S. Typhimurium</i> ŽM142</b>	<b>3</b>	<b>1,12±0,18<sup>e</sup></b>
<b><i>S. Typhimurium</i> ŽM352</b>	<b>3</b>	<b>1,33±0,113<sup>bcd</sup></b>
<i>S. Typhimurium</i> ŽM375	3	1,28±0,07 <sup>bcde</sup>
<i>S. Anatum</i> ŽM148	3	1,35±0,29 <sup>bcd</sup>
<i>S. Anatum</i> ŽM149	3	1,38±0,068 <sup>bc</sup>
<i>S. Hadar</i> ŽM123	3	1,15±0,053 <sup>de</sup>
<i>S. Hadar</i> ŽM378	3	1,22±0,056 <sup>bcde</sup>
<i>S. Heidelberg</i> ŽM11	3	1,08±0,076 <sup>e</sup>
<i>S. Heidelberg</i> ŽM134	3	1,23±0,061 <sup>bcde</sup>
<b><i>S. Senftenberg</i> ŽM492</b>	<b>3</b>	<b>1,21±0,029<sup>cde</sup></b>
<i>S. Brandenburg</i> ŽM4	3	1,24±0,061 <sup>bcde</sup>
<i>S. Infantis</i> ŽM9	3	1,39±0,04 <sup>bc</sup>
<i>S. Infantis</i> ŽM350	3	1,20±0,052 <sup>cde</sup>
Vpliv S (vrednost P)	<0,0001	
Vsi sevi	51	1,30
<i>S. Enteritidis</i> - vsi	12	1,49
<i>S. Typhimurium</i> – vsi	9	1,24
<i>S. Heidelberg</i> – vsi	6	1,16
<i>S. Anatum</i> - vsi	6	1,37
<i>S. Infantis</i> - vsi	6	1,3

Legenda: n – število paralelk, S – sev,  $\bar{D}$  - povprečen decimalni redukcijski čas, so – standardni odklon, P – značilnost vpliva, **P≤0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv** in <sup>a,b,c,d,e</sup> – vrednosti D z enako črko se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (P > 0,05), krepko so označeni sevi, ki so bili izbrani za nadaljnje poskuse.

#### 4.3 PREŽIVETJE IZBRANIH SEVOV BAKTERIJ RODU *Salmonella* PRI PASTERIZACIJI

V drugem delu poizkusa smo proučevali preživetje izbranih sevov *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB in v jajčnem melanžu ter pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu. S števili preživelih bakterij (priloga C1) smo narisali premice preživetja po 15, 10 in 5 min pasterizacije, kot je prikazano na primeru v poglavju 4.2.1. Za izračune vrednosti D smo uporabili enačbe premic po 5 min pasterizaciji ( $R^2$  najbližje 1). S primerjavo decimalnih redukcijskih časov smo želeli ugotoviti vpliv posameznega seva (*S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492), vpliv

temperature pasterizacije (58 °C, 60 °C in 64 °C) in vpliv medija (gojišče TSB in jajčni melanž) na preživetje posameznega seva pri pasterizaciji. Decimalni redukcijski časi za izbrane seve bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB ter pri temperaturah pasterizacije 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu so prikazani v prilogi C2. Pri sevih *S. Typhimurium* ŽM142 in *S. Senftenberg* ŽM492 smo števila preživelih bakterij pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu določili na dveh gojiščih, na neselektivnem gojišču TSAP in na selektivnem gojišču XLD, medtem ko smo pri drugih treh sevih število preživelih bakterij določili le na gojišču TSAP.

#### 4.3.1 Vpliv vrste seva na preživetje bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji

Podatki o preživelih bakterijah rodu *Salmonella* pri posamezni pasterizaciji so prikazani v prilogah B1 in C1, izračunane vrednosti D pa v prilogah B2 in C2. Za primerjavo vrednosti D smo uporabili modela 3.6 in 3.10. V preglednici 4.2 so prikazane povprečne vrednosti D za seve *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB, ter pri temperaturah pasterizacije 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu.

**Preglednica 4.2: Povprečne vrednosti D in standardni odkloni ( $\bar{D} \pm s_0$ ) izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58°, 60° in 64°C v gojišču TSB in jajčnem melanžu (n = 3)**

Sev $\bar{D} \pm s_0$ (min)	<i>S.</i> Enteritidis ŽM14	<i>S.</i> Enteritidis ŽM351	<i>S.</i> Typhimurium ŽM142	<i>S.</i> Typhimurium ŽM352	<i>S.</i> Senftenberg ŽM492	Vpliv S (vrednost P)
$\bar{D}_{58, TSB}$	1,39±0,036 <sup>ay</sup>	1,90±0,011 <sup>ax</sup>	1,12±0,180 <sup>bcz</sup>	1,33±0,11 <sup>ay</sup>	1,21±0,029 <sup>ayz</sup>	<b>0,0002</b>
$\bar{D}_{60, TSB}$	1,25±0,018 <sup>by</sup>	1,33±0,033 <sup>bx</sup>	1,23±0,029 <sup>aby</sup>	1,27±0,021 <sup>ay</sup>	1,11±0,029 <sup>az</sup>	<b>0,0002</b>
$\bar{D}_{60, JM}$	1,27±0,054 <sup>bx</sup>	1,21±0,007 <sup>cx</sup>	1,29±0,061 <sup>ax</sup>	1,20±0,046 <sup>ax</sup>	1,19±0,100 <sup>ax</sup>	0,3189
$\bar{D}_{60, JM, XLD}$	/	/	1,36±0,092 <sup>a</sup>	/	1,22±0,13 <sup>a</sup>	/
$\bar{D}_{64, JM}$	1,10±0,053 <sup>cx</sup>	1,10±0,012 <sup>dx</sup>	1,02±0,054 <sup>cy</sup>	1,00±0,085 <sup>by</sup>	1,08±0,077 <sup>ax</sup>	<b>0,0121</b>
Vpliv T in M (vrednost P)	<b>0,0017</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0062</b>	<b>0,0107</b>	0,3258	

Legenda: n – število paralelk, min – min,  $\bar{D}$  – povprečen decimalni redukcijski čas,  $\bar{D}_{58, TSB}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB,  $\bar{D}_{60, TSB}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB,  $\bar{D}_{60, JM}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu,  $\bar{D}_{60, JM, XLD}$  – pasterizacija pri 60°C v jajčnem melanžu, kontrola preživelih bakterij na selektivnem gojišču XLD,  $\bar{D}_{64, JM}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu, so – standardni odklon, S – sev, T – temperatura pasterizacije, M – medij pasterizacije, **P≤0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv**, **P≤0,01 statistično visoko značilen vpliv**, **P≤0,05 statistično značilen vpliv**, <sup>a,b,c,d</sup> – vrednosti  $\bar{D}$  z enako črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (P > 0,05) in <sup>x,y,z</sup> – vrednosti  $\bar{D}$  z enako črko znotraj vrstice se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (P > 0,05).

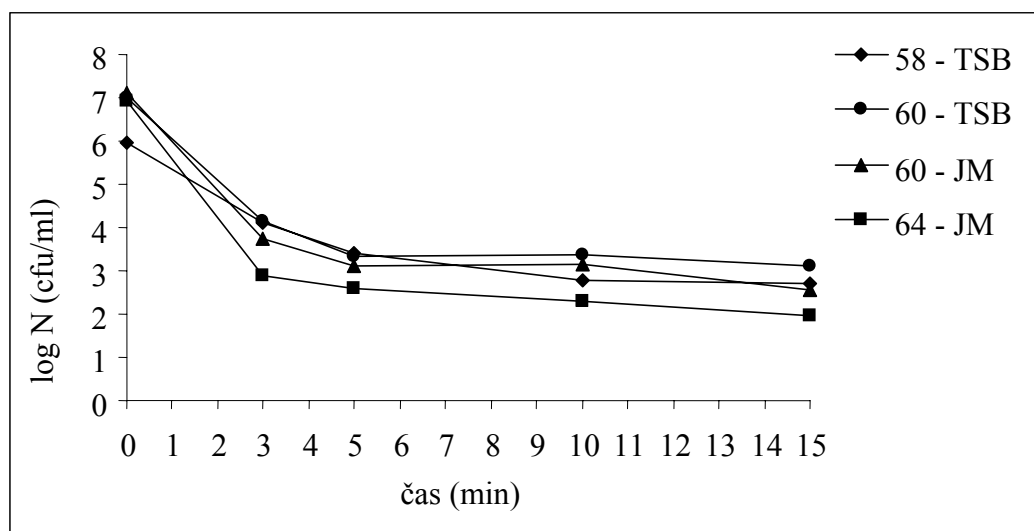
Najvišje vrednosti D so bile določene pri sevih *S. Enteritidis* ŽM351 (1,9 min), *S. Enteritidis* ŽM14 (1,39 min), *S. Typhimurium* ŽM352 (1,33 min) in *S. Senftenberg* ŽM492 (1,21 min) pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB, pri sevu *S. Typhimurium* ŽM142 (1,29 min) pa pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu. Pri vseh sevih bakterij rodu *Salmonella* so bile vse vrednosti D, pridobljene pri temperaturi pasterizacije 64 °C (1,00 – 1,10 min), nižje kot pri temperaturi pasterizacije 60 °C (1,19 – 1,29 min).

Kako vplivajo različne temperature pasterizacije v različnih medijih na vrednost D smo določili pri sevih *S. Enteritidis* ŽM14 ( $P=0,0017$ ), *S. Enteritidis* ŽM351 ( $P<0,0001$ ), *S. Typhimurium* ŽM142 ( $P=0,0062$ ) in *S. Typhimurium* ŽM352 ( $P=0,0107$ ). Pri sevu *S. Senftenberg* ŽM492 so izbrani parametri pasterizacije vplivali na zmanjšano preživetje bakterijskih celic (priloga C2), vendar ne značilno ( $P=0,3258$ ).

Pri sevih *S. Typhimurium* ŽM142 in *S. Senftenberg* ŽM492 smo določili število preživelih bakterij pri temperaturi pasterizacije  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu na selektivnem gojišču XLD in na neselektivnem gojišču TSAP (priloga C1). Povprečne vrednosti D so podobne ne glede na vrsto uporabljenega gojišča (preglednica 4.2). Primerjavo med gojišči XLD in TSAP smo opravili zato, ker smo predvidevali, da bo na selektivnem gojišču XLD določeno število preživelih salmonel bistveno manjše kot število, določeno na gojišču TSAP, ki nudi poškodovanim celicam boljše razmere za rast.

Posamezen sev bakterij rodu *Salmonella* je vplival na vrednosti D pri temperaturah pasterizacije  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v gojišču TSB ( $P=0,0002$ ) in pri temperaturi pasterizacije  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu ( $P=0,0121$ ), medtem ko pri temperaturi pasterizacije  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu posamezen sev ni imel vpliva ( $P=0,3189$ ).

Kot primer je na sliki 4.5 prikazano preživetje bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM351 pri različnih temperaturah pasterizacije v različnih medijih. Pri temu sevu je najbolj vidno, kako vplivajo različne temperature pasterizacije v različnih medijih na preživetje bakterijskih celic. Po treh minutah pasterizacije je v vseh kombinacijah pasterizacije vidno najhitrejše odmiranje bakterijskih celic, najbolj strma pa je krivulja pri temperaturi pasterizacije  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu.



Slika 4.5: Krivulje preživetja seva *S. Enteritidis* ŽM351 pri temperaturah pasterizacije  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v gojišču TSB ter pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu

Legenda: 58-TSB – pasterizacija pri  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  v gojišču TSB; 60-TSB – pasterizacija pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v gojišču TSB; 60-JM – pasterizacija pri  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu; 64-JM – pasterizacije pri  $64\text{ }^{\circ}\text{C}$  v jajčnem melanžu.



#### **4.3.2 Vpliv temperature in medija pasterizacije na preživetje izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri pasterizaciji**

Glede na števila preživelih bakterij sevov *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 pri posamezni izvedbi pasterizacije smo proučevali vpliv povišane temperature v istem mediju (58 °C in 60 °C v gojišču TSB, 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu) in vpliv različnega medija (gojišče TSB in jajčni mlanž pri 60 °C) na vrednost D. Za primerjavo vrednosti D smo uporabili modele 3.7, 3.8 in 3.9.

V preglednici 4.3 so prikazane povprečne vrednosti D za seve *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492, pri vseh izvedbah pasterizacije ter vplivi temperature in medija pasterizacije na vrednost D.

Iz rezultatov v preglednici 4.3 lahko vidimo, da pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB, povišana temperatura pasterizacije vpliva na zmanjšanje vrednosti D pri sevih *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351 in *S. Senftenberg* ŽM492, medtem ko pri sevih *S. Typhimurium* ŽM142 in *S. Typhimurium* ŽM352 vpliva temperature na zmanjšano preživelost nismo dokazali.

Povišanje temperature pasterizacije od 60 °C na 64 °C v jajčnem melanžu je vplivalo na manjšo preživetje vseh izbranih sevov, vendar je bil dokazan vpliv povišane temperature na določitev manjših vrednosti D le pri dveh sevih, *S. Enteritidis* ŽM351 ( $P=0,0072$ ) in *S. Typhimurium* ŽM142 ( $P=0,0281$ ).

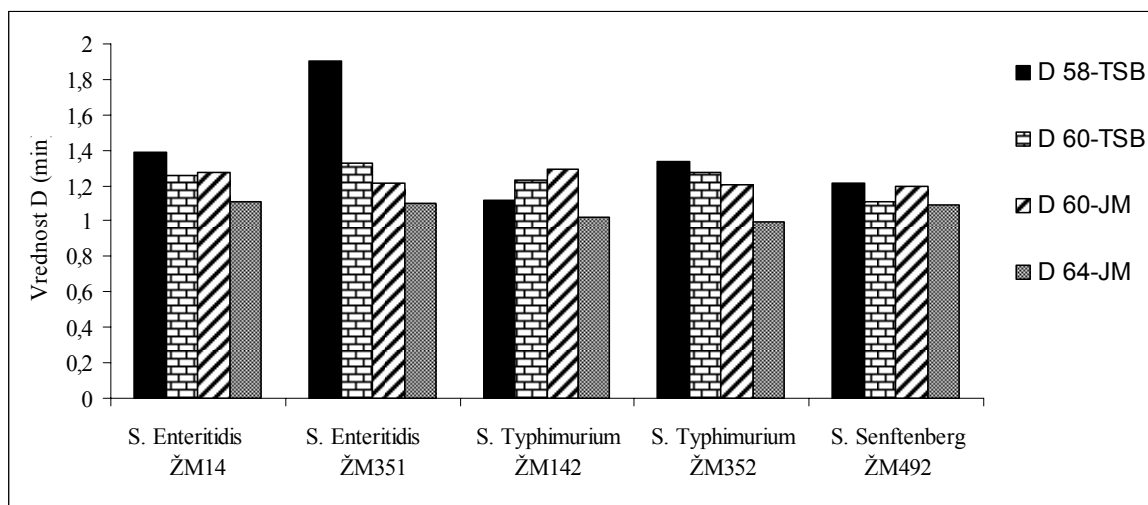
**Preglednica 4.3: Vpliv temperature in medija pasterizacije na vrednosti D določene za izbrane seve bakterij rodu *Salmonella* (n = 3)**

Sev $\bar{D}_{\pm so}$ (min)	S. Enteritidis ŽM14	S. Enteritidis ŽM351	S. Typhimurium ŽM142	S. Typhimurium ŽM352	S. Senftenberg ŽM492
$\bar{D}_{58, TSB}$	1,39±0,036 <sup>a</sup>	1,90±0,011 <sup>a</sup>	1,12±0,18 <sup>a</sup>	1,33±0,11 <sup>a</sup>	1,21±0,029 <sup>a</sup>
$\bar{D}_{60, TSB}$	1,25±0,018 <sup>b</sup>	1,33±0,033 <sup>b</sup>	1,23±0,029 <sup>a</sup>	1,27±0,02 <sup>a</sup>	1,11±0,029 <sup>a</sup>
<b>Vpliv T<sub>1</sub> (vrednost P)</b>	<b>0,0268</b>	<b>0,0017</b>	0,4238	0,3893	<b>0,0074</b>
$\bar{D}_{60, JM}$	1,27±0,054 <sup>x</sup>	1,21±0,007 <sup>x</sup>	1,29±0,061 <sup>x</sup>	1,20±0,046 <sup>x</sup>	1,19±0,1 <sup>x</sup>
$\bar{D}_{64, JM}$	1,10±0,053 <sup>x</sup>	1,10±0,012 <sup>y</sup>	1,02±0,054 <sup>y</sup>	1,00±0,085 <sup>x</sup>	1,08±0,077 <sup>x</sup>
<b>Vpliv T<sub>2</sub> (vrednost P)</b>	0,1007	<b>0,0072</b>	<b>0,0281</b>	0,1112	0,3673
$\bar{D}_{60, TSB}$	1,25±0,018 <sup>c</sup>	1,33±0,033 <sup>c</sup>	1,23±0,029 <sup>c</sup>	1,27±0,02 <sup>c</sup>	1,11±0,029 <sup>c</sup>
$\bar{D}_{60, JM}$	1,27±0,054 <sup>c</sup>	1,21±0,007 <sup>f</sup>	1,29±0,061 <sup>c</sup>	1,20±0,046 <sup>c</sup>	1,19±0,1 <sup>c</sup>
<b>Vpliv M<sub>1</sub> (vrednost P)</b>	0,7799	<b>0,0336</b>	0,2451	0,2192	0,3694

Legenda: n – število paralelk, min – min,  $\bar{D}$  – povprečen decimalni redukcijski čas,  $\bar{D}_{58, TSB}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB,  $\bar{D}_{60, TSB}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB,  $\bar{D}_{60, JM}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu,  $\bar{D}_{64, JM}$  – povprečna vrednost D pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu, so – standardni odklon, T – temperatura pasterizacije, T<sub>1</sub> – primerjava vrednosti D pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB, T<sub>2</sub> – primerjava vrednosti D pri temperaturah pasterizacije 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu, M – medij pasterizacije, M<sub>1</sub> – primerjava vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB in jajčnem melanžu, **P≤0,001 statistično zelo visoko značilen vpliv, P≤0,01 statistično visoko značilen vpliv, P≤0,05 statistično značilen vpliv**, <sup>a,b</sup> vrednosti  $\bar{D}_{58, TSB}$  in  $\bar{D}_{60, TSB}$  z enako črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (P > 0,05), <sup>e,f</sup> vrednosti  $\bar{D}_{60, TSB}$  in  $\bar{D}_{60, JM}$  z enako črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (P > 0,05) in <sup>x,y</sup> vrednosti  $\bar{D}_{60, JM}$  in  $\bar{D}_{64, JM}$  z enako črko znotraj stolpca se med seboj statistično značilno ne razlikujejo (P > 0,05).

Na preživetje izbranih sevov pri temperaturi pasterizacije 60 °C medij pasterizacije ni imel bistvenega vpliva in sicer pri sevih *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 in zato so tudi izračunane vrednosti D določene v gojišču TSB in jajčnem melanžu podobne. Pri sevu *S. Typhimurium* ŽM351 smo določili boljše preživetje bakterijskih celic in s tem tudi višjo povprečno vrednost D v gojišču TSB (P=0,0336).

Na sliki 4.6 so prikazane povprečne vrednosti D za izbrane seve *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 pri temperaturah pasterizacije 58 °C, 60 °C in 64 °C v gojišču TSB in v jajčnem melanžu. Za vse seve velja, da je preživetje bakterijskih celic največje pri pasterizaciji v gojišču TSB pri 58 °C, najmanjše pri pasterizaciji 64 °C v jajčnem melanžu in zato so tudi izračunani decimalni redukcijski časi najmanjši pri najvišji temperaturi pasterizacije (64 °C). Najvišji decimalni redukcijski čas smo določili pri sevu *S. Enteritidis* ŽM351 pri pasterizaciji v gojišču TSB pri 58°C.



**Slika 4.6: Povprečne vrednosti D izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C, 60 °C in 64 °C v gojišču TSB in v jajčnem melanžu**

Legenda: D 58-TSB – povprečni decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB; D 60-TSB – povprečni decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB; D 60-JM – povprečni decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu; D 64-JM – povprečni decimalni redukcijski pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu.

## 5. RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Potek pasterizacije in izračun vrednosti D

Namen našega raziskovalnega dela je bil, da preučimo vrednosti D različnih sevov bakterij rodu *Salmonella*, pri temperaturah pasterizacije 58 °C v gojišču TSB, 60 °C v gojišču TSB in jajčnem melanžu ter pri 64 °C v jajčnem melanžu. Potek eksperimentalnega dela je bil za vse seve bakterij rodu *Salmonella* in vseh pasterizacijah enak. Potekal je po naslednjih osnovnih stopnjah: priprava inokuluma izbranega seva bakterij rodu *Salmonella*; priprava suspenzije (gojišče TSB ali jajčni melanž) z začetno koncentracijo salmonel  $10^6 - 10^7$  cfu/ml, razdelitev suspenzije po 4 ml v epruvete za pasterizacijo; pasterizacija v vodni kopeli pri 58 °C, 60 °C ali 64 °C; vzorčenje po 3, 5, 10, 15 min pasterizacije; določanje začetnega števila in števila preživelih salmonel pri pasterizaciji z metodo štetja na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003); risanje premic preživetja; računanje vrednosti D; izračun statističnih parametrov in statistična analiza vrednosti D.

Pasterizacijo 10-ih različnih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri 60 °C so podobno kot v našem primeru opravili Juneja in sod. (2002). Razlika glede na naše eksperimentalno delo je bila v tem, da smo mi opravili pasterizacije v jajčnem melanžu, Juneja in sod. (2002) so pasterizacijo izvedli v gojišču z govejim ekstraktom in z začetnim številom bakterij rodu *Salmonella*  $10^7 - 10^8$  cfu/ml.

#### 5.1.2 Vpliv vrste seva bakterij rodu *Salmonella* na preživetje bakterijskih celic pri pasterizaciji

V prvem delu smo določili preživetje 17-ih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB. Po risanju krivulj in premic preživetja smo iz enačb premic po 5-ih min pasterizacije izračunali povprečne vrednosti D. Posamezna vrsta seva bakterij rodu *Salmonella* je imela vpliv na preživetje bakterijskih celic pri pasterizaciji oziroma na vrednost D ( $P < 0,0001$ ). Največjo povprečno vrednost D je imel sev *S. Enteritidis* ŽM351 1,90 min in najmanjšo sev *S. Heidelberg* ŽM11 1,08 min.

Vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB, dobljene pri našem delu za seve *S. Typhimurium* in *S. Anatum* ter za vse vključene seve lahko primerjamo s podobnimi rezultati, ki so jih dobili Quantavalla in sod. (2001). Povprečne vrednosti D pri našem poizkusu so bile za sev *S. Typhimurium* 1,24 min, za sev *S. Anatum* 1,37 min in za vse vključene seve 1,30 min, Quantavalla in sod. (2001) so določili povprečne vrednosti D za seve *S. Typhimurium* (16 sevov) 1,33 min, za seve *S. Anatum* (4 sevi) 1,63 min in za vse vključene seve (88 sevov) 1,34 min.

Preživetje salmonel pri temperaturi pasterizacije 58 °C so raziskovali tudi Mañas in sod. (2003a), ki so v poizkus vključili še proučevanje vpliva različnih vrednosti pH na preživetje bakterij rodu *Salmonella*. Ugotovili so, da poleg vrste seva bakterij rodu *Salmonella* vpliva na preživetje bakterijskih celic tudi vrednost pH. Za bakterije rodu *Salmonella* so dokazali, da imajo najvišjo toplotno odpornost pri vrednostih pH okrog 6. V pufri (vrednost pH 7,0) so za sev *S. Typhimurium* izračunali vrednost D 0,33 min, za sev

*S. Senftenberg* 775W pa vrednost D 2,8 min (Mañas in sod., 2003a). Pri našem raziskovalnem delu so bile izračunane povprečne vrednosti D za vse preiskovane seve *S. Typhimurium* višje (1,24 min) in za sev *S. Senftenberg* ŽM492 (1,21 min) nižje, vrednost pH našega gojišča TSB je bila 7,3.

Vpliv vrste seva bakterij rodu *Salmonella* na preživetje pasterizacije smo podrobneje proučili na izbranih sevih *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 (preglednica 4.3).

V našem poskusu so bile povprečne vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB v območju od 1,12 min (*S. Typhimurium* ŽM142) do 1,9 min (*S. Enteritidis* ŽM351). Quantavalla in sod. (2001) so določili vrednosti D za različne seve bakterij rodu *Salmonella* od 0,79 do 2,67 min. V našem poizkusu smo pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB izračunali vrednosti D v območju od 1,11 min (*S. Senftenberg* ŽM492) do 1,33 min (*S. Enteritidis* ŽM351), pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu so bile v območju od 1,19 min (*S. Senftenberg* ŽM492) do 1,29 min (*S. Typhimurium* ŽM142) in pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu so bile v območju od 1,00 min (*S. Typhimurium* ŽM352) do 1,10 min (*S. Enteritidis* ŽM14 in *S. Enteritidis* ŽM351). Quantavalla in sod. (2001) so v prašičjem mesu določili vrednosti D za sev *S. Potsdam* I33 pri temperaturi pasterizacije 58 °C 4,8 min, pri temperaturi pasterizacije 60 °C 1,57 min in pri temperaturi pasterizacije 63 °C 0,24 min.

Vpliv vrste seva na vrednost D smo določili pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB ( $P=0,0002$ ) in pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu ( $P=0,0121$ ). Pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu posamezna vrsta seva ni vplivala na preživetje bakterijskih celic ( $P=0,3189$ ). Quantavalla in sod. (2001) so pri proučevanju vpliva seva na vrednost D ugotovili, da pri temperaturi pasterizacije 58 °C na preživetje salmonel vpliva vrsta seva bakterij rodu *Salmonella*, pri 60 °C je le manjši vpliv posameznega seva, medtem ko pri 63 °C na preživelost celic posamezen sev več ne vpliva.

Quantavalla in sod. (2001) so v prašičjem mesu za več sevov bakterij rodu *Salmonella* izračunali povprečno vrednost D pri temperaturi pasterizacije 63 °C 0,31 min. Pri našem poizkusu smo izračunali povprečne vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu od 1,00 – 1,11 min, odvisno od posameznega seva bakterij rodu *Salmonella*.

Pasterizacijo 10-ih različnih sevov bakterij *S. Enteritidis* pri 60 °C v jajčnem melanžu so raziskovali Juneja in sod. (2002) in prišli do ugotovitev, da posamezna vrsta seva vpliva na preživetje bakterijskih celic. Povprečna vrednost D je bila v območju 0,20 – 0,52 min (povprečje 0,33 min). Statistična analiza vrednosti D, je pokazala, da se sevi glede na toplotno odpornost med seboj razlikujejo ( $P=0,04$ ) (Juneja in sod., 2002). Pri našem poizkusu smo pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu izračunali povprečni vrednosti D za seva *S. Enteritidis* ŽM14 1,27 min in *S. Enteritidis* ŽM351 1,21 min. Razlike med vrednostmi D različnih sevov so bile majhne, statistično neznčilne. Eden od razlogov bi bil lahko v izvedbi pasterizacije. V našem poskusu smo preživetje bakterij določali pri pasterizaciji v jajčnem melanžu v steklenih epruvetah, medtem ko so Juneja in

sod. (2002) določali preživetje v posebnem aparatu, ki jim je omogočal hitro spreminjanje temperatur in večje število vzorčenj v kratkem času pasterizacije.

### 5.1.3 Vpliv temperature in medija pasterizacije na preživetje bakterij rodu *Salmonella*

Vpliv temperature in medija pasterizacije smo podrobneje proučili na izbranih sevih *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492.

Za povprečne vrednosti D, ki smo jih določili za pet izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije pri 58 °C in 60 °C v gojišču TSB ter pri temperaturah pasterizacije 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu lahko ugotovimo, da imata temperatura in medij pasterizacije pri vseh sevih, razen pri sevu *S. Senftenberg* ŽM492 vpliv na povprečno vrednost D (preglednica 4.3).

Rezultate lahko le deloma primerjamo z literaturo za sev *S. Senftenberg* 775W. Manas in sod. (2003b) so pri temperaturah pasterizacije 60 °C, 64 °C in 70 °C v jajčnem melanžu grafično določili vrednosti D 5,5 min, 0,65 min in 0,082 min, čas zadrževanja na posamezni temperaturi pasterizacije v industriji pa priporočajo 3,5, 2,5 in 1,5 min. Prav tako so Manas in sod. (2003b) za sev *S. Senftenberg* 775W proučevali vpliv izotermalnega šoka, zadrževanje vzorca 1 uro pri 54 °C, na vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 63 °C v jajčnem melanžu in ugotovili, da se vrednost D pri šoku poveča iz 1,2 na 3,1 min. Pri našem delu nismo uporabili najbolj odpornega seva *S. Senftenberg* 775W, ampak sev *S. Senftenberg* ŽM492. Izračunali smo povprečne vrednosti D pri temperaturah pasterizacije 58 °C v gojišču TSB (1,21 min), 60 °C v gojišču TSB (1,11 min), 60 °C v jajčnem melanžu (1,19 min) in 64 °C v jajčnem melanžu (1,08 min). Zaradi različnega seva *S. Senftenberg* se tudi rezultati razlikujejo.

Vpliv temperature pasterizacije v istem mediju na povprečno vrednost D smo proučevali za izbrane seve bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB in pri temperaturah pasterizacije 60 °C in 64 °C v jajčnem melanžu (preglednica 4.4). Pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB imajo sevi *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 nižje povprečne vrednosti D kot pri temperaturi 60 °C, medtem ko ima sev *S. Typhimurium* ŽM142 nižjo povprečno vrednost D pri temperaturi 58 °C ( $P=0,4238$ ). Pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu imajo vsi sevi nižje povprečne vrednosti D kot pri temperaturi 64 °C. Vpliv povišane temperature na preživetje bakterij rodu *Salmonella* v prašičjem mesu so raziskovali tudi Quantavalla in sod. (2001). Ugotovili so, da se vrednosti D zmanjšajo pri temperaturah pasterizacije 60 °C (1,57 min) in 64 °C (0,24 min) v primerjavi s temperaturo pasterizacije 58 °C (4,8 min). Vpliv povišane temperature pasterizacije v jajčnem melanžu na bakterije seva *S. Typhimurium* DT104 sta raziskovala tudi Jung in Beauchat (2000) in ugotovila, da ima povišana temperatura pasterizacije 61 °C ( $D = 0,17$  min) velik vpliv na zmanjšanje preživelosti v primerjavi s temperaturo pasterizacije 57 °C ( $D = 1,91$  min).

Vpliv medija pasterizacije (gojišče TSB in jajčni melanž) na povprečno vrednost D smo proučevali pri temperaturi pasterizacije 60 °C (preglednica 4.4). Povprečne vrednosti D so

bile višje v jajčnem melanžu pri sevih *S. Enteritidis* ŽM14 ( $D_{60,TSB}$ : 1,25 min in  $D_{60,JM}$ : 1,27 min), *S. Typhimurium* ŽM142 ( $D_{60,TSB}$ : 1,23 min in  $D_{60,JM}$ : 1,29 min) in *S. Senftenberg* ŽM492 ( $D_{60,TSB}$ : 1,11 min in  $D_{60,JM}$ : 1,19 min) oziroma višje v gojišču TSB pri sevih *S. Enteritidis* ŽM351 ( $D_{60,TSB}$ : 1,33 min in  $D_{60,JM}$ : 1,21 min) in *S. Typhimurium* ŽM352 ( $D_{60,TSB}$ : 1,27 min in  $D_{60,JM}$ : 1,20 min). Vpliv medija na določitev vrednosti D smo dokazali le pri enem sevu *S. Enteritidis* ŽM351.

Quantavalla in sod. (2001) so ugotovili, da je preživetje bakterijskih celic rodu *Salmonella* boljša v živilu kot v gojišču. Primerjali so vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 58 °C, določene za salmonele v prašičjem mesu (od 2,79 do 4,8 min) in gojišču TSB (od 0,79 do 2,67 min). Pri našem delu smo primerjali preživetje bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB (vrednosti D od 1,11 do 1,33 min) in jajčnem melanžu (vrednosti D od 1,19 do 1,29 min). Boljše preživetje bakterijskih celic v jajčnem melanžu smo sicer določili pri sevih *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Typhimurium* ŽM142 in *S. Senftenberg* ŽM492, vendar pa razlike niso bile statistično značilne. Na višje vrednosti D v gojišču TSB, kot pa v jajčnem melanžu, bi lahko vplivala tudi vrednost pH. Gojišče TSB ima vrednost pH 7,3, pasteriziran jajčni melanž, kakršnega smo uporabili pri poizkusu, pa med 6,4 in 8 (Sheldon, 2005). Če je imel naš pasteriziran jajčni melanž vrednost pH blizu 8, potem je razumljivo, da je so vrednosti D nižje. To lahko samo domnevamo, kajti vrednosti pH jajčnemu melanžu nismo izmerili. Mañas in sod. (2003b) so proučevali preživetje bakterij *S. Senftenberg* 775W v fosfatnem pufri in jajčnem melanžu pri temperaturi pasterizacije 63 °C, pri obeh medijih enaki vrednosti pH 7,7 in določili višje vrednosti D v jajčnem melanžu.

## 5.2 SKLEPI

Glede na naše rezultate diplomskega dela smo naredili naslednje sklepe:

- Vrsta seva bakterij rodu *Salmonella* vpliva na povprečne vrednosti D pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB in pri temperaturi pasterizacije 64 °C jajčnem melanžu.
- Vrsta seva bakterij rodu *Salmonella* ne vpliva na povprečne vrednosti D pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu.
- Izbrani parametri pasterizacije (temperatura: 58 °C, 60 °C in 64 °C ter medij: gojišče TSB in jajčni melanž) vplivajo na preživetje sevov *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Typhimurium* ŽM142 in *S. Typhimurium* ŽM352.
- Višja temperatura pasterizacije (60 °C v primerjavi s 58 °C) v gojišču TSB vpliva na zmanjšanje povprečne vrednosti D pri sevih *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351 in *S. Senftenberg* ŽM492, medtem ko na razlike pri sevih *S. Typhimurium* ŽM142 in *S. Typhimurium* ŽM352 ne vpliva.
- Višja temperatura pasterizacije (60 °C v primerjavi s 64 °C) v jajčnem melanžu vpliva na zmanjšanje povprečne vrednosti D pri sevih *S. Enteritidis* ŽM351 in *S. Typhimurium* ŽM142, medtem ko tega vpliva pri sevih *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Typhimurium* ŽM352 in *S. Senftenberg* ŽM492 nismo dokazali.
- Vpliv medija pasterizacije (gojišče TSB in jajčni melanž) pri temperaturi pasterizacije 60 °C na povprečno vrednost D smo določili pri pri sevu *S. Enteritidis* ŽM351.



## 6 POVZETEK

Pasterizacija je blag toplotni postopek za obdelavo živil. Živilom s tem postopkom podaljšamo čas obstojnosti, saj uničimo večino vegetativnih celic. Postopek toplotne obdelave živil je običajno določen s toplotno najbolj odpornimi mikroorganizmi, ki so v živilu.

Pri živilih kot so jajca, jajčni izdelki, majoneze, omake, piščančje meso in izdelki, prašičje meso, kjer lahko predvidevamo kontaminacijo z bakterijami rodu *Salmonella*, je priporočljivo pri načrtovanju postopka pasterizacije upoštevati toplotno najbolj odporen sev *S. Senftenberg* 775W. Uspešnost pasterizacije je odvisna od mnogih dejavnikov, kot so začetno število mikroorganizmov, vrednost pH, vrednost  $a_w$  in razni dodatki (sol, sladkor) v živilu. Ob slabo ali pomanjkljivo izvedeni pasterizaciji je večja možnost preživetja bakterijskih celic, kar lahko vodi do neustreznosti izdelka ali do navzkrižne kontaminacije drugih živil.

Pri našem delu smo želeli ugotoviti vplive temperature in časa pasterizacije, vrste medija in vrste seva bakterij rodu *Salmonella* na vrednosti D. Preživetje bakterij rodu *Salmonella* smo določili s standardno števno metodo (SIST EN ISO 4833 (2003)). Glede na števila preživelih bakterijskih celic smo narisali premice preživetja. Iz enačb premic smo izračunali vrednosti D. Vrednosti D smo statistično obdelali s programom SAS/STAT. Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da posamezna vrsta seva bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije 58 °C in 60 °C v gojišču TSB ter pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu vpliva na preživetje bakterijskih celic, medtem ko pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu tega vpliva nismo dokazali.

Temperatura pasterizacije (58 °C, 60 °C in 64 °C) in medij pasterizacije (gojišče TSB in jajčni melanž) sta vplivala na preživetje bakterijskih celic pri vseh preiskovanih sevih bakterij rodu *Salmonella*, vendar je ta vpliv značilen za seve *S. Enteritidis* ŽM14, *S. Enteritidis* ŽM351, *S. Typhimurium* ŽM142 in *S. Typhimurium* ŽM352, medtem ko za sev *S. Senftenberg* ŽM492 ta vpliv ni značilen. Najnižja povprečna vrednost D je bila pri vseh sevih pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu, in sicer od 1,00 – 1,10 min, najvišja pa pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB za seve *S. Enteritidis* ŽM14 (1,39 min), *S. Enteritidis* ŽM351 (1,9 min), *S. Typhimurium* ŽM352 (1,33 min) in *S. Senftenberg* ŽM492 (1,21 min) ter pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu za sev *S. Typhimurium* ŽM142 (1,29 min). Lahko sklenemo, da višja temperatura pasterizacije pri vseh priskovanih sevih bakterij rodu *Salmonella* vpliva na zmanjšanje števila preživelih bakterijskih celic.

## 7 VIRI

Adamič J., Smole – Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Možina - Smole S., Gašperlin L. (ur.) Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1 - 45

Andlovic A. 2002. Salmorele, šigele. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi, Inc.: 189-200

Gašperlin L., Bem Z. 2003. Jajca. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Možina Smole S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 447-458

Belyavin C. G. 2003. Eggs: Use in the food industry. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 3. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trogo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science, Inc.; 2000 - 2004

Biolife: Biolife manual. 3<sup>rd</sup> ed. 2003. Milano, Biolife, Inc.: 147-148

Board R. G., Fuller R. 1994. Microbiology of the avian egg. 1<sup>st</sup> ed. London, Chapman & Hall: 139-148, 153-163

Cherian G. 2006. Egg biology. V: Handbook of food science, technology and engineering. Vol. 4. Hui H. Y. (ed.). CRC Press, Tylor & Francis Group: 153-1 – 153-12

Doganoc Z. D., Komar M. 2001. Analize kakovosti jajc in jajčnih izdelkov. Ljubljana, Veterinarska fakulteta: 8-17

Eggs and egg products. 1998. V: Microorganisms in foods. 6: Microbial ecology of food commodities. ICMFS. 1<sup>st</sup> ed. Roberts T. A., Pitt J. I., Farkas J., Grau F. H. (eds.). London, Blackie Academic & Professional; International Commission on Microbiological Specifications for Foods.: 475-514

Euzéby J. 2005. Validation list no. 102: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 547-549  
<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/55/2/547> (19. 04. 2006): 3 str.

Garbutt J. 1997. Essentials of food. London, Sydney, Auckland. Arnold: 87-95, 158-162

Garitty M. G., Bell A. J., Lilburn G. T. 2004. Taxonomic outline of the procariotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. 11<sup>nd</sup> ed. Release 5.0, New York, Springer: 121-122

Gast R. K. 2003. Introduction: Salmonella infections. V: Diseases of poultry. 11<sup>th</sup> ed. Saif M. Y., Barnes J. H., Glisson R. J., Fadly M. A., McDougald R. L., Swayne E. D. (eds.). Ames, Iowa, Iowa State Press: 583 – 613

Gast R. K. 2005. Bacterial infection of eggs. V: Food safety control in the poultry industry. Mead G. C. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 1-14

Holcman A., Salobir J., Zorman – Rojs O., Kavčič S. 2004. Reja kokoši v manjših jatah. Ljubljana, Kmečki glas: 99 - 102

Huang L. 2004. Thermal resistance of *Lysteria monocytogenes*, *Salmonella* Heidelberg and *Escherichia coli* O157:H7 at elevated temperatures. Journal of Food Protection, 67, 8: 1666-1670

Işiker G., Gurakam C. G., Bayindrili. 2003. Combined effect of high hydrostatic pressure treatment and hydrogen peroxide on *Salmonella* Enteritidis in liquid whole egg. European Food Research Technology, 217: 244-248

ISO 4833. Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms – Colony count technique at 30 °C. 2<sup>nd</sup> ed. 2003: 5 str.

James C., Lechevalier V., Ketteringham L. 2002. Surface pasteurization of shell eggs. Journal of Food Engineering, 53: 193 - 197

James C., James S. 2003. Heat treatment/Chemical and microbiological changes. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 5. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 3039 - 3044

Jeršek B. (ur.) 2002. Praktikum mikrobiološke analize: skripta in delovni zvezek za študente IV. letnika živilstva. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 2-3

Juneja K. V., Marks M. H., Huang L. 2003. Growth and heat resistance kinetic variation among various isolates of *Salmonella* and its application to risk assessment. Risk Analysis, 23, 1: 199-212

Jung S. Y., Beuchat R. L. 2000. Sensitivity of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 to organic acids and thermal inactivation in liquid egg products. Food Microbiology, 17: 63-71

Krauss H., Weber A., Appel M., Enders B., Von Graevenitz A., Isenberg H. D., Schiefer H. G., Slenczka W., Zahner H. 2004. Zoonosen: von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. 3. Aufl. Köln, Deutscher Ärzte-Verlag: 307-309

Mañas P., Pagán R., Leguérinel I., Condón S., Mafart P., Sala F. 2001. Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and recovery of *Salmonella* Typhimurium. International Journal of Food Microbiology, 63: 209-216

Mañas P., Pagán R., Raso J., Condón S. 2003a. Predicenting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grow at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 45-52

Mañas P., Pagán R., Raso, Alvarez I., Condón U. S. 2003b. Survival of *Salmonella* senftenberg 775W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology*, 20: 593-599

Merck: Microbiology manual. 12<sup>th</sup> ed. 2002. Darmstadt, Merck, Inc.: 207-207

Milohnoja M., Tomašič A. 1996. Higiena v proizvodnji in prometu u živilih. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 52

Opinion of the Scientific Commite on Veterinary Measures relating to public health on food-borne zoonoses: *Salmonella*, 12. APRIL 2000. Brussels, European Commision, Health and Consumer Protection Directorate - General, <http://europa.eu.int/comm> (avgust, 2005): 24-25, 86-92

Quintavalla S., Larini S., Mutti P., Barbuti S. 2001. Evaluation of the thermal resistance of different *Salmonella* serotypes in pork meat containing curing additives. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 107-113

Oxoid: The manual. 8<sup>th</sup> ed. 1998. Hamshire, Oxoid, Inc.: 207-208

Pravilnik o kakovosti jajc. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 33: 3881-3882

Pravilnik o spremembah in dopolnitvi Pravilnika o kakovosti jajc. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 106: 11297-11297

Rabsch W., Tschäpe H., Bäumlner A. J. 2001. Non-typhodial salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection*, 3: 237-247

Ramaswamy H. S., Marcotte M. 2006. Food processing: principles and applications. Boca Raton, CRC Taylor & Francis: 67-83

Recent changes in *Salmonella* nomenclature: The need for clarification. 2005. *Veterinary Journal*, 170: 275-277

Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. 2002. Geneva, World Health Organization, Rome, FAO: 7-13, 17-30, 97-104, 177-193

Salmoneloza. Nalezljive bolezni. 2004. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. [http://www.ivz.si/ivz/novica.php?ivz\\_id=113](http://www.ivz.si/ivz/novica.php?ivz_id=113) (26. 12. 2005): 1-3

Salmoneloze. 2005. V: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v letu 2004. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 22-25

SAS/STAT Software. Version 8.01. 1999. Cary, SAS Institute Inc: Software.

Schuman D. J., Sheldon W. B., Vandepopuliere M. J., Ball Jr. R. H. 1997. Immersion heat treatments for inactivation of *Salmonella* Enteritidis with intact eggs. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 438-444

Shelobolina S. E., Sullivan A. S., O'Neill R. K., Nevin P. K., Lovley R. D. 2004. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5: 2959-2965

Shivaprasad L. H. 2003. Pullorum disease and fowl typhoid: Salmonella infections. V: Diseases of poultry. 11<sup>th</sup> ed. Saif M. Y., Barnes J. H., Glisson R. J., Fadly M. A., McDougald R. L., Swayne E. D. (eds.). Ames, Iowa, Iowa State Press: 568-582

Sheldon B. W. 2005. Techniques for reducing pathogens in eggs. V: Food safety control in the poultry industry. Mead G. C. (ed.). Boca Raton, CRC Press; Cambridge: 273-304

Singh R. P., Heldman D. R. 1993. Introduction to food engineering. 2<sup>nd</sup> ed. London, Academic Press: 225 - 231

SIS EN ISO 4833. Microbiology – General guidance for the enumeration of micro-organisms – Colony count technique at 30 °C. 2003. 2<sup>nd</sup> ed.: 3,4

Uredba komisije (ES) št. 2295/2003 z dne 23. 12. 2003, o uvedbi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (EGS) št. 1907/90 o določenih standardih trženja za jajca. Bruselj, Evropska unija.

<http://europa.eu.int/eur-lex/si/dd/docs/2003/32003R2295-SL.doc> (22. 2. 2006): 28 str.

Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15. 11. 2005, o mikrobioloških merilih za živila. Uradni list Evropske unije, L 338: 1-26

Varley J. 2003. Heat transfer methods. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 5. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 3030 - 3033

Whiting C. R., Buchanan L. R. 1997. Development of a quantitative risk assessment model for *Salmonella* Enteritidis in pasteurized liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 36 : 111 – 125

Wilbey A. R. 2003a. Pasteurization. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 7. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 4381-4381

Wilbey A. R. 2003b. Pasteurization of liquid products. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 7. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 4386-4388

Wray C. 2003. Salmonella/Properties and occurrence. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 8. 2<sup>nd</sup> ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science: 5074-5079

Yan S. S., Pendrak L. M., Abela-Ridder B., Pounderson W. J., Fedorko P. D., Foley L. S. 2003 An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. Clinical and Applied Immunology Reviews, 4: 189-199

Zorko N. 1995. Proizvodnja jajc in mesa. Maribor, samozaložba: 18-24

## **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem mentorici, doc. dr. Barbari Jeršek, za koristne in uporabne nasvete pri praktičnem delu naloge in za številne odgovore ter strokovno vodstvo pri pisanju naloge.

Prav tako je zahvala namenjena recenzentki, doc. dr. Lei Gašperlin, za pomoč pri statistični obdelavi podatkov in koristne nasvete pri pisanju naloge.

Zahvala gre tudi ge. Jani Avbelj za iskreno pomoč in številne uporabne nasvete pri praktičnem delu v laboratoriju. Hvala tudi ge. Andreji Habjanič in njenim sodelavcem na Katedri za kemijo, ki so mi posodili aparaturo za vodno kopel.

Na tem mestu se želim iskreno zahvaliti mami in očetu, ki sta me v času študija spodbujala in podpirala ter imata največ zaslug za uspešen zaključek študija. Zahvala pa velja tudi sestri Alenki in Gašperju za pomoč pri izdelavi naloge.

Za prevod povzetka v angleščino se zahvaljujem Suzani, za lektoriranje pa ge. Cvetki Belca.

Zahvala tudi Tini za potrpljenje in pomoč pri oblikovanju naloge. Hvala tudi vsem ostalim, ki ste me spremljali med študijem.

## PRILOGE

### Priloga A: Rast bakterij seva *S. Enteritidis* ŽM2 pri temperaturi 37 °C v gojišču TSB

ČAS (ura)		0	2	4	6	8	10	24	28
log N (cfu/ml)	Paralelka A	5,24	5,81	7,37	8,73	8,93	9,36	9,49	9,61
	Paralelka B	5,30	5,79	7,42	8,812	8,93	9,30	9,49	9,65

Legenda: A – prva paralelka; B – druga paralelka; N (cfu/ml) – število bakterij

### Priloga B1: Preživetje 17-ih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB

Čas (min)	0			3			5			10			15		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Sev	log N (cfu/ml)														
<i>S. Enteritidis</i> ŽM2	7,41	7,41	7,41	4,37	4,44	4,70	4,15	4,24	3,73	4,03	4,06	3,68	3,41	3,49	3,56
<i>S. Enteritidis</i> ŽM14	6,95	7,14	7,01	5,03	4,88	4,24	3,26	3,51	3,53	3,12	3,11	2,99	2,97	3,07	3,09
<i>S. Enteritidis</i> ŽM348	7,02	7,02	7,02	3,98	3,30	3,88	2,73	3,77	2,55	3,20	3,19	3,72	1,39	2,07	2,92
<i>S. Enteritidis</i> ŽM351	6,06	5,92	5,95	4,04	4,17	4,07	3,50	3,34	3,35	2,53	2,66	3,08	2,82	2,51	2,78
<i>S. Typhimurium</i> ŽM142	7,31	7,14	7,19	3,54	3,60	4,55	2,00	2,84	3,40	3,23	2,64	2,13	2,19	2,83	1,00
<i>S. Typhimurium</i> ŽM352	7,05	7,02	7,06	4,09	3,70	3,78	3,76	3,35	3,17	3,27	3,00	3,23	2,82	3,03	3,06
<i>S. Typhimurium</i> ŽM375	7,07	7,07	7,07	3,74	4,88	3,95	3,06	3,36	3,31	2,79	3,12	2,83	2,38	2,75	2,45
<i>S. Anatum</i> ŽM148	7,02	7,02	7,02	4,91	5,18	5,31	3,90	3,55	3,17	3,44	3,53	3,69	3,45	3,17	3,29
<i>S. Anatum</i> ŽM149	5,97	5,90	5,79	3,31	3,41	3,22	2,77	2,98	2,07	1,54	1,39	0,84	1,47	1,17	1,60
<i>S. Hadar</i> ŽM123	7,12	7,12	7,17	3,49	3,38	2,91	2,96	3,15	2,83	3,27	2,52	3,39	2,65	2,25	2,72
<i>S. Hadar</i> ŽM378	7,22	7,11	7,19	3,85	3,92	3,69	3,31	3,31	3,02	3,35	2,89	3,20	2,45	2,84	2,72
<i>S. Heidelberg</i> ŽM 11	7,26	7,26	7,26	4,25	4,24	4,11	3,07	2,54	2,47	2,16	2,45	1,77	1,74	2,19	3,30
<i>S. Heidelberg</i> ŽM 134	7,08	7,08	7,10	2,95	2,84	3,27	3,03	3,16	3,31	3,23	3,11	3,27	2,73	2,74	2,48
<i>S. Senftenberg</i> ŽM492	6,99	7,01	6,93	3,86	3,81	3,66	2,87	2,96	3,04	2,41	3,11	3,10	2,86	2,82	2,53
<i>S. Brandenburg</i> ŽM4	7,02	7,02	7,02	3,65	2,69	3,00	2,97	3,52	3,19	3,38	3,10	3,21	2,75	2,17	3,55
<i>S. Infantis</i> ŽM9	7,04	7,06	7,05	4,44	4,38	4,43	3,28	3,09	3,16	2,71	2,51	2,76	2,60	1,81	2,53
<i>S. Infantis</i> ŽM350	7,09	7,24	7,24	4,79	4,69	4,27	3,08	3,17	2,94	2,83	2,61	2,61	2,62	2,94	3,02

Legenda: A – prva paralelka; B – druga paralelka; C – tretja paralelka; N (cfu/ml) – število bakterij



Priloga B2: Vrednosti D 17-ih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB

Sev	Paralelka	D <sub>58,TSB</sub> (min)
S. Enteritidis ŽM2	A	1.46
	B	1.51
	C	1.33
S. Enteritidis ŽM14	A	1.36
	B	1.37
	C	1.43
S. Enteritidis ŽM348	A	1.14
	B	1.43
	C	1.1
S. Enteritidis ŽM351	A	1.9
	B	1.91
	C	1.89
S. Anatum ŽM148	A	1.58
	B	1.45
	C	1.32
S. Anatum ŽM149	A	1.65
	B	1.33
	C	1.51
S. Typhimurium ŽM142	A	0.92
	B	1.12
	C	1.3
S. Typhimurium ŽM375	A	1.2
	B	1.34
	C	1.28
S. Typhimurium ŽM352	A	1.46
	B	1.3
	C	1.24
S. Brandenburg ŽM4	A	1.19
	B	1.31
	C	1.23
S. Infantis ŽM9	A	1.31
	B	1.24
	C	1.27
S. Infantis ŽM350	A	1.25
	B	1.22
	C	1.14
S. Hadar ŽM123	A	1.15
	B	1.2
	C	1.09
S. Hadar ŽM378	A	1.23
	B	1.27
	C	1.16
S. Semftemberg ŽM492	A	1.18
	B	1.2
	C	1.24
S. Heidelberg ŽM11	A	1.17
	B	1.05
	C	1.03
S. Heidelberg ŽM134	A	1.16
	B	1.19
	C	1.25

**Priloga C1: Preživetje izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB in v jajčnem melažu, ter pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melažu**

<b>Pasterizacija pri 60 °C v gojišču TSB</b>																
Čas (min)		0			3			5			10			15		
Sev	Paralelka	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	log N (cfu/ml)															
	<i>S. Enteritidis</i> ŽM14	7,11	7,11	7,11	7,11	7,11	7,11	3,16	3,50	3,18	3,60	3,98	3,74	3,47	3,22	3,63
	<i>S. Enteritidis</i> ŽM351	7,09	7,09	7,09	4,11	3,76	3,36	3,00	3,10	3,17	3,05	3,26	3,14	2,97	1,69	3,04
	<i>S. Typhimurium</i> ŽM142	7,08	7,09	7,13	7,08	7,09	7,13	3,19	3,41	3,61	3,26	2,87	1,17	2,76	2,56	2,38
	<i>S. Typhimurium</i> ŽM352	7,11	7,03	7,13	3,74	3,30	3,38	3,12	3,21	2,96	2,74	2,84	3,42	2,64	2,87	2,51
	<i>S. Senftenberg</i> ŽM492	6,91	6,91	6,86	2,87	2,92	2,72	3,26	3,07	2,43	2,41	2,55	2,16	2,20	1,84	2,20
<b>Pasterizacija pri 60 °C v jajčnem melažu</b>																
Čas (min)		0			3			5			10			15		
Sev	Paralelka	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	log N (cfu/ml)															
	<i>S. Enteritidis</i> ŽM14	6,96	7,11	6,97	3,29	3,30	3,31	3,23	3,27	3,20	3,08	3,28	3,16	3,19	2,13	2,96
	<i>S. Enteritidis</i> ŽM351	6,99	7,03	6,94	3,76	4,28	4,37	3,45	3,22	3,27	3,46	3,28	3,31	3,10	3,18	2,99
	<i>S. Typhimurium</i> ŽM142	7,07	7,09	7,11	3,13	3,10	3,24	3,17	3,37	3,19	3,23	3,14	3,05	2,91	2,94	2,96
	<i>S. Typhimurium</i> ŽM142*	6,73	6,62	6,58	2,92	3,61	3,23	2,97	3,17	3,29	2,80	2,69	1,00	1,81	1,60	1,65
	<i>S. Typhimurium</i> ŽM352	7,09	7,09	7,09	3,02	3,38	3,40	3,45	3,27	3,38	3,05	3,33	2,72	3,20	2,72	3,10
	<i>S. Senftenberg</i> ŽM492	6,86	6,84	6,81	2,80	2,31	2,79	2,40	2,64	2,60	2,61	2,82	2,85	2,50	2,38	2,34
	<i>S. Senftenberg</i> ŽM492*	6,61	6,43	6,55	2,63	3,21	2,47	3,00	2,70	2,04	2,36	2,30	2,14	1,47	1,00	1,30
<b>Pasterizacija pri 64 °C v jajčnem melažu</b>																
Čas (min)		0			3			5			10			15		
Sev	Paralelka	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
	log N (cfu/ml)															
	<i>S. Enteritidis</i> ŽM14	6,93	6,91	6,88	3,20	2,99	3,04	2,47	2,36	2,77	1,99	2,38	2,32	2,13	1,70	2,00
	<i>S. Enteritidis</i> ŽM351	6,98	6,90	6,91	2,91	2,79	2,95	2,65	2,50	2,60	2,14	2,36	2,34	1,77	1,97	2,14
	<i>S. Typhimurium</i> ŽM142	6,99	7,04	6,94	2,72	3,27	3,02	2,36	1,94	2,42	0,30	0,00	1,74	0,00	0,00	0,00
	<i>S. Typhimurium</i> ŽM352	7,14	7,17	7,12	2,56	2,61	2,49	2,14	2,04	2,83	2,32	2,20	2,38	2,32	2,34	2,43
	<i>S. Senftenberg</i> ŽM492	6,58	6,52	6,56	2,25	3,11	3,30	2,26	1,61	2,34	1,76	1,82	2,23	2,08	2,01	1,79

Legenda: \* - določitev preživelih bakterij rodu *Salmonella* na selektivnem gojišču XLD.

Priloga C2: Vrednosti D za 5 izbranih sevov bakterij rodu *Salmonella* pri temperaturah pasterizacije 58 °C, 60 °C in 64 °C v gojišču TSB in v jajčnem melanžu

Sev	Paralelka	D <sub>58,TSB</sub> (min)	D <sub>60,TSB</sub> (min)	D <sub>60,JM,XLD</sub> (min)	D <sub>60, JM</sub> (min)	D <sub>64, JM</sub> (min)
<i>S. Enteritidis</i> ŽM14	A	1,36	1,27	/	1,24	1,08
	B	1,37	1,23	/	1,33	1,06
	C	1,43	1,26	/	1,24	1,16
<i>S. Enteritidis</i> ŽM351	A	1,9	1,35	/	1,2	1,1
	B	1,91	1,29	/	1,21	1,08
	C	1,89	1,34	/	1,21	1,11
<i>S. Typhimurium</i> ŽM142	A	0,92	1,21	1,26	1,22	1,03
	B	1,12	1,26	1,39	1,30	0,96
	C	1,3	1,21	1,43	1,34	1,06
<i>S. Typhimurium</i> ŽM352	A	1,46	1,28	/	1,21	0,95
	B	1,3	1,24	/	1,24	0,93
	C	1,24	1,28	/	1,15	1,09
<i>S. Senftenberg</i> ŽM492	A	1,18	1,07	1,29	1,28	1,09
	B	1,2	1,12	1,29	1,22	1,0
	C	1,24	1,13	1,06	1,08	1,15

Legenda: D<sub>58, TSB</sub> – decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 58 °C v gojišču TSB; D<sub>60, TSB</sub> – decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 60 °C v gojišču TSB; D<sub>60, JM, XLD</sub> – decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu, po določitvi števila preživelih bakterij na gojišču XLD; D<sub>60, JM</sub> – decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 60 °C v jajčnem melanžu; D<sub>64, JM</sub> – decimalni redukcijski čas pri temperaturi pasterizacije 64 °C v jajčnem melanžu; / - ni bilo izvedeno.