



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**“Μελέτη Της Ποιότητας Και Υγιεινής Ενός Νωπού Προϊόντος
Πουλερικών (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά)-Επίδραση
Του Συνδυασμού Συσκευασίας Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας
Και Θυμαρέλαιου/Χιτοζάνης”**



Βασιλική Γιατράκου
Χημικός, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Ημερομηνία αίτησης της Βασιλικής Γιατράκου: 05/03/2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 27/03/2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Επιβλέπων: Ιωάννης Σαββαΐδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Μιχαήλ Κοντομηνάς, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων

Ευαγγελία Μπεζιρτζόγλου, Καθηγήτρια Δημοκριτείου Παν/μίου Θράκης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 27/03/2007

Θέμα: «Μελέτη Της Ποιότητας Και Υγιεινής Ενός Νωπού Προϊόντος Πουλερικών (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά)-Επίδραση Του Συνδυασμού Συσκευασίας Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας Και Θυμαρέλαιου/Χιτοζάνης»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 08/10/2010

1. **Ιωάννης Σαββαΐδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων**
2. **Μιχαήλ Κοντομηνάς, Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων**
3. **Ευαγγελία Μπεζιρτζόγλου, Καθηγήτρια Δημοκριτείου Παν/μίου Θράκης**
4. **Νικόλαος Σούλτος, Αναπληρωτής Καθηγητής Κτηνιατρικής Σχολής Παν/ίου Θεσσαλονίκης**
5. **Κυριάκος Ρηγανάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Παν/μίου Ιωαννίνων**
6. **Ιωάννης Αρβανιτογιάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος Παν/μίου Θεσσαλίας**
7. **Αικατερίνη Παπαβέργου, Επίκουρος Καθηγήτρια Κτηνιατρικής Σχολής Παν/μίου Θεσσαλονίκης**

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό: «Άριστα, 10» στις 29/10/2010

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα
(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Ευρωπαϊκού Προγράμματος με κωδικό έργου 32185 (PL 023182) και τίτλο «Τεχνολογία Υγιεινών Γευμάτων Έτοιμων προς Κατανάλωση, DOUBLE FRESH», για το χρονικό διάστημα 2006-2009. Η ερευνητική εργασία έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Χημείας-Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την εποπτεία και καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ι. Ν. Σαββαΐδη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος της εργασίας, την πολύτιμη συμβουλευτική του υποστήριξη και τη συνεχή καθοδήγησή του σε όλο το διάστημα της ερευνητικής μου εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα δύο υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Χημείας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Μ. Γ. Κοντομηνά και την Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης κ. Ε. Μπεζιρτζόγλου για την άρτια επιστημονική τους συμμετοχή και την πολύτιμη συμβουλευτική υποστήριξη κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Πολλές και θερμές ευχαριστίες οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κ. Ρηγανάκο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ι. Αρβανιτογιάννη, την Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Α. Παπαβέργου και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ν. Σούλτο της Κτηνιατρικής Σχολής του ΑΠΘ, για τις επιστημονικές συμβουλές και το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη της παρούσας διατριβής.

Εκφράζω επίσης τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στον Καθηγητή Μ. Η. Zwietering του Πανεπιστημίου του Wageningen και στο μεταδιδακτορικό ερευνητή Dr. Zeus Sosa Mejia, για την εκπαίδευσή μου σε μικροβιολογικές τεχνικές, και την επιστημονική τους συμβολή στην παρούσα μελέτη. Ευχαριστώ επίσης τους υποψήφιους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Χημείας-Τεχνολογίας Τροφίμων για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και ιδιαίτερα την Α. Ντζιμάνη, για την ηθική υποστήριξη και την άρτια συνεργασία στα διάφορα στάδια της υλοποίησης της διατριβής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συνεχή ηθική και οικονομική στήριξη που μου παρείχαν, καθώς επίσης και το συνάδελφο Χ. Πήχα για τη

διαρκή ηθική συμπαράσταση και τις επιστημονικές συμβουλές του κατά την εκπόνηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	ΠΡΟΛΟΓΟΣ	Σελ. 5
	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.0	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1.1	Παγκόσμια στοιχεία παραγωγής και κατανάλωσης κρέατος πουλερικών	18
1.2	Εξέλιξη παραγωγής & κατανάλωσης κρέατος πουλερικών στην Ελλάδα	18
1.3	Προϊόντα πουλερικών στην Ελληνική αγορά	20
1.4	Στάδια παραγωγής-επεξεργασίας προϊόντων πουλερικών	22
1.5	Θρεπτική αξία κρέατος πουλερικών	24
2.0	ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ, ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ	29
2.1	Φυσικοχημικές μεταβολές κατά την συντήρηση του κρέατος πουλερικών	29
2.1.1	Μεταβολή του pH κατά τη νεκρική ακαμψία	30
2.1.2	Πρωτεόλυση	31
2.1.3	Παραγωγή βιογενών αμινών	32
2.1.4	Τάγγιση του λίπους (Οξειδωση και Υδρόλυση λιπιδίων νωπού κρέατος)	33
2.1.5	Μεταβολές του χρώματος κατά την συντήρηση	37
2.2	Μικροχλωρίδα και μικροβιολογική αλλοίωση του κρέατος πουλερικών κατά την συντήρηση	38
2.3	Ασφάλεια κρέατος πουλερικών-Παθογόνοι μικροοργανισμοί	41
2.3.1	<i>Campylobacter</i> spp.	42
2.3.2	<i>Arcobacter</i> spp.	43

2.3.3	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	44
2.3.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	45
2.3.5	<i>Clostridium spp.</i>	46
2.3.6	<i>Listeria spp.-Listeria monocytogenes</i>	47
2.3.6.1	Είδη του γένους <i>Listeria</i>	47
2.3.6.2	Μορφολογία και ιδιότητες του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i>	47
2.3.6.3	Σύνδρομο Λιστερίωσης στον άνθρωπο	50
2.3.7	<i>Bacillus cereus</i>	52
2.3.7.1	Γενικά χαρακτηριστικά του <i>Bacillus cereus</i> -Πηγές προέλευσης	52
2.3.7.2	Σπόροι του <i>B. cereus</i>	55
2.3.7.3	Παθογένεια	57
2.3.8	<i>Salmonella spp.</i>	59
2.3.8.1	Γενικά χαρακτηριστικά - Πηγές προέλευσης	59
2.3.8.2	Χαρακτηριστικά ανάπτυξης της Non-Typhoidal <i>Salmonellae</i>	61
2.3.8.3	Σύνδρομο Σαλμονέλλωσης στον άνθρωπο	62
3.0	ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ	65
3.1	Υψηλή Υδροστατική Πίεση (ΥΥΠ)	65
3.2	Ακτινοβόληση	66
3.3	Οζονισμός	66
3.4	Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας (MAP)	67
3.5	“Φυσικοί” αντιμικροβιακοί παράγοντες	73
3.5.1	Βακτηριοσίνες	73
3.5.2	Αιθέρια Έλαια (Α.Ε.)	74

3.5.2.1	Σύσταση των Α.Ε.	74
3.5.2.2	Αντιβακτηριακή δράση των Α.Ε.	76
3.5.2.3	Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης των Α.Ε.	79
3.5.2.4	Ευαισθησία των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έναντι της δράσης των Α.Ε.	80
3.5.2.5	Αιθέριο έλαιο θυμαριού	82
3.5.3	Χιτίνη και Χιτοζάνη	83
3.5.3.1	Γενικά χαρακτηριστικά-Προέλευση	83
3.5.3.2	Αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης	85
3.5.3.3	Παράγοντες που επηρεάζουν την αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης	87
3.5.3.4	Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης της χιτοζάνης	91
3.5.3.5	Εφαρμογές στην σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων	95
4.0	ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ	99
4.1	Αρχή λειτουργίας μικροκυμάτων-Αλληλεπίδραση με την ύλη	99
4.2	Επίδραση μικροκυμάτων στους μικροοργανισμούς	101
4.3	Μηχανισμός δράσης μικροκυμάτων στους μικροοργανισμούς	103
		Σελ.
	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ	107
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	109
<u>Κεφάλαιο 1</u>	<i>“Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της Listeria monocytogenes, Salmonella enterica ser. Montevideo και Bacillus cereus στα επιμέρους συστατικά (κοτόπουλο/πιπεριά) και στο ολόκληρο προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρησ για διάστημα έξι ημερών, στους 4 °C (αερόβιες συνθήκες)”</i>	109

1.0	ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	109
2.0	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	109
2.1	Παραγωγή του προϊόντος	109
2.2	Καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών-προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος	110
2.3	Ενοφθαλμισμός των παθογόνων βακτηρίων επί του προϊόντος	112
2.4	Μικροβιολογική ανάλυση	112
2.5	Μέτρηση του pH	115
3.0	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	117
3.1	Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της <i>Listeria monocytogenes</i> στο ολόκληρο προϊόν και στα επιμέρους συστατικά του-Μεταβολή της Μικροχλωρίδας αλλοίωσης παρουσία της <i>Listeria monocytogenes</i>	117
3.2	Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της <i>Salmonella enterica</i> ser. Montevideo στο ολόκληρο προϊόν και στα επιμέρους συστατικά του-Μεταβολή της μικροχλωρίδας αλλοίωσης παρουσία της <i>Salmonella enterica</i>	127
3.3	Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του <i>Bacillus cereus</i> στο ολόκληρο προϊόν και στα επιμέρους συστατικά του-Μεταβολή της Μικροχλωρίδας αλλοίωσης παρουσία του <i>Bacillus cereus</i>	133
3.4	Μεταβολή του pH των δειγμάτων μετά τον ενοφθαλμισμό τους με <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> ser. Montevideo ή <i>Bacillus cereus</i> και κατά την συντήρηση για έξι ημέρες στους 4 °C	140
4.0	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	143
Κεφάλαιο 2	“Επίδραση του συνδυασμού α) συσκευασίας (αερόβιας, τροποποιημένης ατμόσφαιρας) και β) χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου στο χρόνο συντήρησης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση στους 4 °C”	145
1.0	ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	145

2.0	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	145
2.1	Προετοιμασία του προϊόντος	145
2.2	Παρασκευή διαλύματος χιτοζάνης	145
2.3	Αιθέριο Έλαιο Θυμαριού	146
2.4	Προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (χιτοζάνης/θυμαρέλαιου) στα δείγματα	146
2.5	Συσκευασία των δειγμάτων-Μεταχειρίσεις	147
2.6	Μικροβιολογική ανάλυση	148
2.7	Φυσικοχημική Ανάλυση	149
2.7.1	Προσδιορισμός TBA ενεργών ενώσεων (TBARS= Thiobarbituric Acid Reactive Substances)	149
2.7.2	Προσδιορισμός του pH	150
2.7.3	Προσδιορισμός του χρώματος	150
2.8	Οργανοληπτική αξιολόγηση	151
3.0	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	153
3.1	Μικροβιολογική ανάλυση	153
3.1.1	Μεταβολή της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας	153
3.1.2	Μεταβολή των Ψευδομονάδων	163
3.1.3	Μεταβολή των Οξυγαλακτικών βακτηρίων	168
3.1.4	Μεταβολή του <i>Brochothrix thermosphacta</i>	174
3.1.5	Μεταβολή των Εντεροβακτηριοειδών	178
3.1.6	Μεταβολή των Ζυμών-Μυκήτων	183
3.2	Φυσικοχημική ανάλυση	187
3.2.1	Μεταβολή των TBA ενεργών ενώσεων (TBARS= Thiobarbituric Acid Reactive Substances)	188

3.2.2	Μεταβολή του χρώματος	196
3.2.2.1	Μεταβολή της φωτεινότητας (L^*), ερυθρότητας (a^*), κίτρινης απόχρωσης (b^*), έντασης του χρώματος (<i>Chroma</i>)	196
3.2.2.2	Συνολική χρωματική μεταβολή (DE^*)	203
3.2.3	Μεταβολή του pH	206
3.2.4	Οργανοληπτική ανάλυση	208
3.2.4.1	Μεταβολή της Γεύσης	208
3.2.4.2	Μεταβολή της Οσμής	214
4.0	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	217
Κεφάλαιο 3	<i>“Επίδραση χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στην πορεία ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Salmonella enterica ser. Montevideo</i> και <i>Bacillus cereus</i> κατά την συντήρησή του προϊόντος “Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά” στους 4°C και 8°C (συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας). Συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων με θεωρητικά μοντέλα <i>Combase®</i> και <i>Gamma®</i>”</i>	221
1.0	ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	221
2.0	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	221
2.1	Προετοιμασία του προϊόντος	221
2.2	Καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών-προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος-ενοφθαλισμός των παθογόνων βακτηρίων επί του προϊόντος	221
2.3	Συσκευασία των δειγμάτων	222
2.4	Μικροβιολογική εξέταση και προσδιορισμός του pH	223
2.5	Εφαρμογή θεωρητικών μοντέλων για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών κατά τις συνθήκες συντήρησης του προϊόντος	223
3.0	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	227

3.1	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε προϊόν Κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C και 8 °C- Συγκριτική μελέτη με θεωρητικά μοντέλα πρόβλεψης	227
3.1.1	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε προϊόν Κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	227
3.1.2	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε προϊόν Κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	236
3.2	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Salmonella enterica</i> ser. Montevideo σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C και 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	241
3.2.1	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Salmonella enterica</i> ser. Montevideo σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	242
3.2.2	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Salmonella enterica</i> σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	247
3.3	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Bacillus cereus</i> σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °c και 8 °c- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	253
3.3.1	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Bacillus cereus</i> σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	254

3.3.2	Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου <i>Bacillus cereus</i> σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης	261
3.4	Μεταβολή της μικροχλωρίδας του προϊόντος που ενοφθαλμίστηκε με τον μικροοργανισμό <i>Listeria monocytogenes</i> ή <i>Salmonella enterica ser. Montevideo</i> ή <i>Bacillus cereus</i> και συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου στους 4 °C και 8 °C	266
4.0	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	275
Κεφάλαιο 4	“Επίδραση θερμικής επεξεργασίας (μικροκυμάτων) στην επιβίωση/θανάτωση των παθογόνων βακτηρίων <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica ser. Montevideo</i> , <i>Bacillus cereus</i> κατά την συντήρηση του προϊόντος «Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά» στους 4 °c και 8 °c, σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου”	277
1.0	ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	277
2.0	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	277
2.1	Προετοιμασία του προϊόντος	277
2.2	Ενοφθαλμισμός των παθογόνων βακτηρίων επί του προϊόντος	277
2.3	Συσκευασία των δειγμάτων-Μεταχειρίσεις	278
2.4	Θερμική επεξεργασία του προϊόντος-Μικροβιολογική ανάλυση	278
3.0	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	281
3.1	Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της <i>Listeria monocytogenes</i> στο προϊόν κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου, για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C	281

3.2	Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της <i>Salmonella enterica</i> ser. Montevideo στο προϊόν, κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C	288
3.3	Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση του <i>Bacillus cereus</i> στο προϊόν, κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C	293
3.4	Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) στο προϊόν μετά τον ενοφθαλμισμό του με παθογόνα βακτήρια (<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Bacillus cereus</i>) και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C	303
3.4.1	Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης στο προϊόν μετά τον ενοφθαλμισμό του με το παθογόνο βακτήριο <i>Listeria monocytogenes</i> και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C	303
3.4.2	Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης του προϊόντος μετά τον ενοφθαλμισμό του με το παθογόνο βακτήριο <i>Salmonella enterica</i> και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C	306
3.4.3	Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης του προϊόντος, μετά τον ενοφθαλμισμό του με το παθογόνο βακτήριο <i>Bacillus cereus</i> και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C	309
4.0	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	315
	ΕΠΙΛΟΓΟΣ: Γενικά συμπεράσματα και προτάσεις για την βιομηχανία και τον καταναλωτή	317
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	319
	ABSTRACT	321
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ)	323
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ)	354

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η πτηνοτροφία περιλαμβάνει την εκτροφή των ορνίθων (*Gallus domesticus*), της πάπιας, της χήνας, της φραγκόκοτας, του φασιανού, της γαλοπούλας, των ορτυκιών, της πέρδικας, της στρουθοκαμήλου κ.α.. Η πτηνοτροφία παρέχει στον άνθρωπο πολύτιμη για την επιβίωση του τροφή, από το 2.500 π.Χ. που σύμφωνα με αναφορές θεωρείται ότι πραγματοποιήθηκε η εξημέρωση της όρνιθας (Υπ.Α.Α.Τ., 2007).



Προϊόντα πτηνοτροφίας (Υπ.Α.Α.Τ., 2007):

α) *κρέας πουλερικών*: οι πετεινοί, οι κότες, οι πάπιες, οι χήνες, οι γαλοπούλες και οι φραγκόκοτες, τα κρέατα και τα βρώσιμα εντόσθια, τα συκώτια πουλερικών, τα λίπη και τα άλλα παρασκευάσματα με βάση τα πουλερικά, αποτελούν το κρέας πουλερικών.

Τρόποι παραγωγής κρέατος πουλερικών: βιολογική εκτροφή, ελεύθερα βοσκή, παραδοσιακά ελεύθερη βοσκή.

β) *αυγά*: τα αυγά πουλερικών ορνιθώνα, τα αυγά χωρίς κέλυφος και οι κρόκοι αυγών, ανεξαρτήτως του τρόπου διατήρησής τους

Τρόποι παραγωγής αυγών: βιολογική εκτροφή, ελεύθερη βοσκή, αχυρώνας, εκκολαπτήρια

Προβλήματα-Προκλήσεις του πτηνοτροφικού κλάδου:

- **Υψηλό κόστος διακίνησης και διατήρησης (κόστος Logistics).** Το νωπό κρέας πουλερικών παρουσιάζει σημαντική ευπάθεια στις κανονικές συνθήκες του περιβάλλοντος, γεγονός που συνεπάγεται ότι η μεταφορά και η διατήρησή του απαιτούν ειδικούς χειρισμούς και αυξημένο κόστος διανομής και διατήρησης στην προσπάθεια επίτευξης ικανοποιητικής λειτουργίας της λεγόμενης «ψυχρής αλυσίδας» κατά την διακίνησή του.
- **Μικρός χρόνος διατήρησης του νωπού κοτόπουλου.** Αποτελεί σημαντικό πρόβλημα των επιχειρήσεων τυποποίησης, αφού αφενός καθιστά σχεδόν απαγορευτική τη διάθεση του όχι μόνο σε αγορές του εξωτερικού αλλά και σε απομακρυσμένες περιοχές της Ελλάδας (π.χ. Κρήτη). Μία τεχνολογική λύση αποτελεί η αερόψυξη, η οποία αυξάνει το χρόνο διατήρησης του νωπού

κοτόπουλου από τις 5 ημέρες στις 12-15 ημέρες, ενώ παράλληλα συντελεί στην διατήρηση της ποιότητάς του, αφού το ποσοστό υγρασίας (που αποτελεί εν δυνάμει εστία μικροβιακής μόλυνσης) μειώνεται στο ελάχιστο.

Τα δύο παραπάνω προβλήματα θα μπορούσαν επίσης να αντιμετωπιστούν με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων επεξεργασίας και συντήρησης τροφίμων (τεχνολογία εμποδίων), σε συνδυασμό με τις παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης των πουλερικών, όπως η ψύξη και η κατάψυξη. Τελευταία έχουν προταθεί, νέες αναδυόμενες μέθοδοι και τεχνικές, όπως η ακτινοβολήση, ο οζονισμός, η παστερίωση, η προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων (αιθέριων ελαίων, βακτηριοσινών, χιτοζάνης) και η χρήση κατάλληλης συσκευασίας (τροποποιημένη ατμόσφαιρα, κενό και ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, αντιμικροβιακές μεμβράνες). Παρόλα αυτά η χρήση αυτών στην βιομηχανία πουλερικών είναι ακόμη περιορισμένη.

1.1 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ

Οι μεγαλύτερες παραγωγικές χώρες κρέατος όρνιθας είναι κατά σειρά η Κίνα, η Βραζιλία, όλες σχεδόν οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.), το Μεξικό και η Ινδία. Η μεγαλύτερη κατανάλωση πραγματοποιείται στην Κίνα (10,09 εκατομμύρια τόνους για το 2005) και ακολουθούν οι χώρες της Ε.Ε. (7,5 εκατομμύρια για το 2005) η Βραζιλία (6,6) το Μεξικό (2,87) και η Ομοσπονδία της Ρωσίας (2,14). Σε ότι αφορά την παραγωγή κρέατος γαλοπούλας οι κύριες παραγωγικές χώρες είναι οι χώρες της Ε.Ε., Βραζιλία, Καναδάς, Ρωσία και Νότια Αφρική. Η μεγαλύτερη εγχώρια κατανάλωση κρέατος όρνιθας καταγράφεται για τις χώρες της Ευρωπαϊκής ένωσης. Αναφορικά με το κρέας από γαλοπούλα οι ΗΠΑ είναι η πρώτη χώρα σε κατά κεφαλή κατανάλωση (7,6 κιλά) και τη διαδέχονται ο Καναδάς με 4,4 κιλά, και η Ε.Ε με 4 κιλά/άτομο (Υπ.Α.Α.Τ., 2007).

1.2 ΕΞΕΛΙΞΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Η εξέλιξη της συνολικής παραγωγής κρέατος πουλερικών στην Ελλάδα για την περίοδο 1999-2003, σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (Υπ.Α.Α.Τ., 2007), παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1.1**. Σύμφωνα με τα συγκεκριμένα στοιχεία, προκύπτει η ετήσια μεταβολή για την αντίστοιχη περίοδο.

Πίνακας 1.1: Παραγωγή κρέατος πουλερικών στην Ελλάδα (Υπ.Α.Α.Τ., 2007)

Έτος	Ποσότητα (1000t)	Ετήσια Μεταβολή	Σφάγια (1000 κεφάλια)
1999	153,5	3,8%	98.834,3
2000	163,8	6,7%	105.859,5
2001	162,0	-1,1%	103.617,3
2002	163,6	1,0%	104.151,1
2003	169,1	3,4%	107.060,3

Η συνολική εγχώρια παραγωγή κρέατος πουλερικών παρουσίασε ετήσιες διακυμάνσεις το διάστημα 1999-2003. Το διάστημα από το 1999 μέχρι το 2003 η παραγωγή ακολουθεί σταθερά αυξητική πορεία (με μέσο ετήσιο ρυθμό της τάξης του 2,7%) φθάνοντας το 2003 στα επίπεδα των 169 χιλ. τόνων, με εξαίρεση το 2001.

Στον **Πίνακα 1.2** παρουσιάζεται η διαχρονική εξέλιξη της εγχώριας παραγωγής κρέατος πουλερικών ανά κατηγορία ζώου (κοτόπουλα, γαλοπούλες, πάπιες-χήνες-φραγκόκοτες, λοιπά σφάγια πουλερικών), για το χρονικό διάστημα 1999-2003, σε χιλιάδες τόνους.

Πίνακας 1.2: Εξέλιξη της παραγωγής κρέατος πουλερικών ανά κατηγορία ζώου σε 1000 τόνους (Υπ.Α.Α.Τ., 2007)

Κατηγορία ζώου	1999	2000	2001	2002	2003
Κότες & Κοτόπουλα	150,4	160,1	158,4	160,3	166,1
Γαλοπούλες	2,4	3,0	2,9	2,6	2,4
Πάπιες-χήνες-φραγκόκοτες	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Λοιπά πουλερικά	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
ΣΥΝΟΛΟ	153,5	163,8	162,0	163,6	169,1

Όσον αφορά τα κοτόπουλα, αποτελούν μακράν τη μεγαλύτερη κατηγορία εγχώρια παραγόμενων πουλερικών. Στον **Πίνακα 1.3** παρουσιάζεται η εξέλιξη της παραγωγής και κατανάλωσης κρέατος πουλερικών καθώς και το μέγεθος των εισαγωγών-εξαγωγών για την περίοδο 1999-2002, στην Ελλάδα, σύμφωνα με τα στοιχεία που προκύπτουν από τα ετήσια ισοζύγια παραγωγής-κατανάλωσης κρέατος του Υπ.Α.Α.Τ. Τα στοιχεία της

παραγωγής αφορούν τόσο τη συστηματική πτηνοτροφία όσο και τη χωρική πτηνοτροφία και καλύπτουν, εκτός από κοτόπουλα, και άλλα είδη, όπως γαλοπούλες, πάπιες-χήνες-φραγκόκοτες, κλπ.

Πίνακας 1.3: Γενικό ισοζύγιο παραγωγής-κατανάλωσης κρέατος πουλερικών (*1000 τόνους, Υπ.Α.Α.Τ., 2007)

	1999	2000	2001	2002
Μικτή Εγχώρια Παραγωγή	153,7	163,8	162,6	164
Εισαγωγές	45,6	49,8	49,8	50,7
Εξαγωγές	4,6	6,4	5,0	3,1
Κατανάλωση	194,5	207,2	206,8	211,2
Βαθμός αυτάρκειας (%)	79,0	79,1	78,6	77,7
Κατά κεφαλή κατανάλωση (κιλά/χρόνο)	18,5	19,7	19,6	19,6

1.3 ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΓΟΡΑ

Νωπά:

- ✓ Ολόκληρα: Φρέσκο κοτόπουλο συσκευασμένο (συμβατικής, βιολογικής, εκτατικής εκτροφής) ή μη.
- ✓ Τεμαχισμένα: Φιλέτο από στήθος, στήθος ολόκληρο, σουβλάκι (χειροποίητο) με πιπεριά, σουβλάκι μηχανής, ρολό κοτόπουλο, παιδάκια κοτόπουλου, φτερούγες, εντόσθια, φιλέτο μπούτι, ολόκληρο μπούτι



Κατεψυγμένα:

- ✓ Ολόκληρα: κότα, κοτόπουλο
- ✓ Τεμαχισμένα: Φιλέτο από στήθος, στήθος ολόκληρο, ρολό κοτόπουλο, φτερούγες, φιλέτο από μπούτι, μπούτι ολόκληρο, γύρος

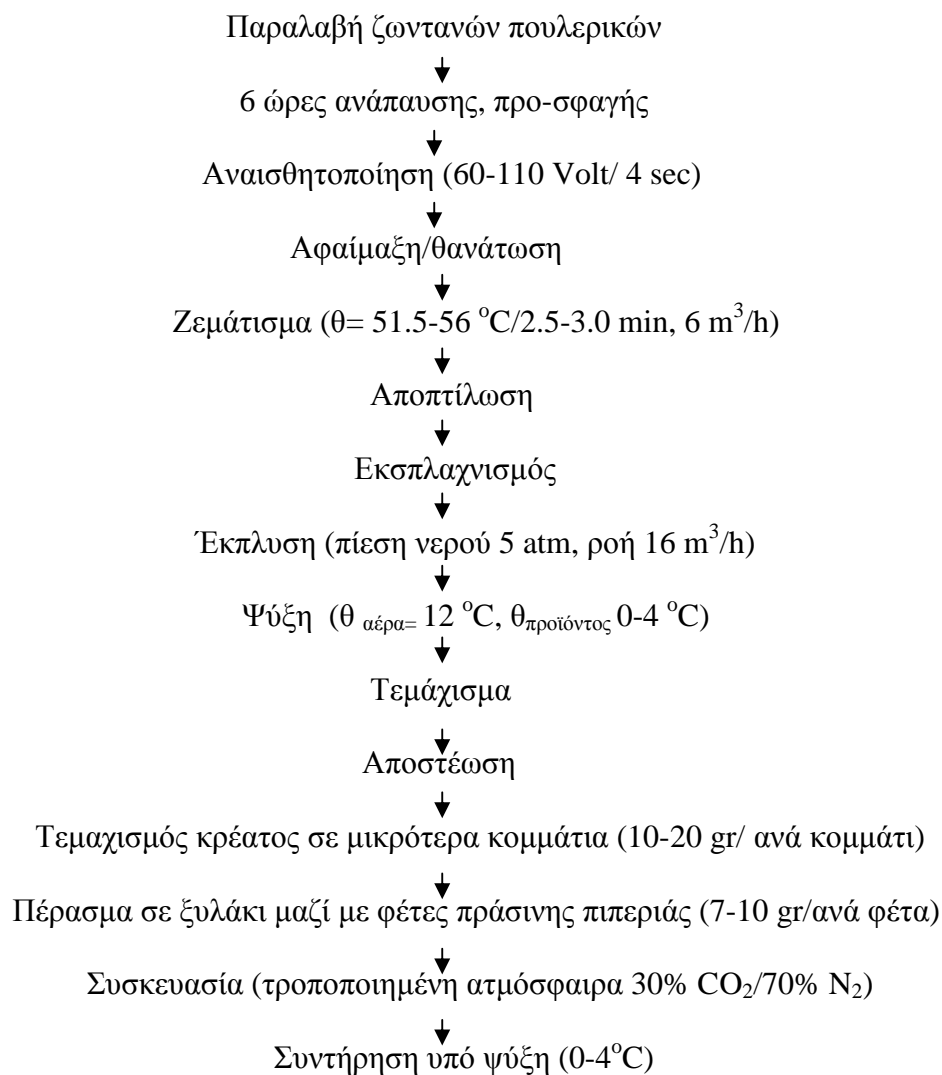
Έτοιμα ψημένα ή ημιμαγειρεμένα: (<http://pindos-apsi.gr>, mimikos.gr)

- ✓ Διατήρηση υπό ψύξη: στήθος πανέ, σνίτσελ, nuggets, Cordon Bleu
- ✓ Διατήρηση υπό κατάψυξη: στήθος πανέ, σνίτσελ, nuggets, κροκέτες, κεφτεδάκια, Cordon Bleu, μπιφτέκι

Αλλαντικά: πάριζα, φιλέτο κοτόπουλου (1% λιπαρά), καπνιστό/βραστό φιλέτο κοτόπουλου (1% λιπαρά), λουκάνικα τύπου Φρανκφούρτης, λουκάνικα cocktail (<http://mimikos.gr>)

Το Σουβλάκι κοτόπουλο με πιπεριά, αποτελεί ένα νωπό προϊόν κοτόπουλου που η παρασκευή του γίνεται συνήθως με χειρονακτικό τρόπο, και κυκλοφορεί στο εμπόριο με την ονομασία: «Σουβλάκι χειροποίητο με πιπεριά, νωπό» (http://www.pindosapsi.gr/el/products/temacismena_4/soublaki_ceiropoieto_nopo).

Περιγραφή προϊόντος: Φιλέτο στήθος, φιλέτο μπούτι και πιπεριά, χειροποίητο, βάρους 100-200 gr (περασμένα σε ξυλάκι). Το **διάγραμμα ροής** της παραγωγής του προϊόντος, σύμφωνα με την εταιρία παραγωγής (Πίνδος Α.Ε., Ροδοτόπι Ιωαννίνων) είναι το εξής:



Σχήμα 1.1: Διάγραμμα ροής της παραγωγής προϊόντος «Σουβλάκι χειροποίητο με πιπεριά, νωπό» (Πίνδος Α.Ε.)

1.4 ΣΤΑΔΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ-ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ

Στην σύγχρονη βιομηχανία παραγωγής πουλερικών και προϊόντων τους, όλες οι διεργασίες, από τη σφαγή μέχρι την τελική τυποποίηση γίνονται κυρίως μέσω αυτοματοποιημένων μεθόδων. Ως αποτέλεσμα, μια σύγχρονη μονάδα τυποποίησης προϊόντων πουλερικών, μπορεί να διαχειριστεί έως και 20.000 πουλερικά ανά ώρα. Τα κυριότερα στάδια επεξεργασίας των πουλερικών, ωστόσο μετατραπούν σε προϊόντα έτοιμα προς κατανάλωση ή έτοιμα προς μαγείρεμα είναι τα εξής (Maurer, 2003):

1. Διαδικασία αναισθητοποίησης και σφαγής. Η διαδικασία της επεξεργασίας αρχίζει με την «προ σφαγής» κτηνιατρική επιθεώρηση των κοτόπουλων. Αμέσως μετά γίνεται ανάρτηση των ζωντανών πουλερικών σε ειδικά άγκιστρα μεταφορικής αλυσίδας. Σύμφωνα με την Εταιρία «Πίνδος», ο ιδανικός χρόνος που μεσολαβεί από το κρέμασμα μέχρι την αναισθητοποίηση των πουλερικών είναι τα 12 δευτερόλεπτα. Στο πρώτο στάδιο της αναισθητοποίησης, γίνεται εμβάπτιση των πουλερικών σε δεξαμενές νερού που περιέχουν χλωριούχο νάτριο 0.1-1.0%. Η τάση του ηλεκτρικού πεδίου είναι περίπου 50 Volt. Ωστόσο το ηλεκτρικό σοκ δεν αποσκοπεί στην απευθείας θανάτωση του πτηνού αλλά στην αναισθητοποίησή του. Η σφαγή του ζώου μπορεί να γίνει, είτε μηχανικά, είτε από ειδικά καταρτισμένο προσωπικό με την χρήση ειδικών εργαλείων (περιστροφικό μαχαίρι) και πραγματοποιείται με αποκοπή της καρωτίδας. Η εκτεταμένη αφαίμαξη του ζώου (25-50 ml/ όρνιθα) είναι και η τελική αιτία της θανάτωσής του και διαρκεί από 1.5 έως 2.0 λεπτά.

2. Ζεμάτισμα και Αποπτίλωση. Η διαδικασία αφαίρεσης των πτίλων γίνεται με εμβάπτισή τους σε ζεστό νερό (ζεμάτισμα). Η θερμοκρασία της δεξαμενής πρέπει να είναι 50-54 °C και ο χρόνος εμβάπτισης 1.5-2.5 λεπτά. Η αποπτίλωση γίνεται, είτε χειρωνακτικά, είτε με μηχανικό τρόπο και πολλές φορές διευκολύνεται με την προσθήκη χημικών ουσιών στην δεξαμενή (χλωριωμένο νερό). Ακολουθεί αποκοπή και απόρριψη της κεφαλής.

3. Εκσπλαχνισμός. Η διαδικασία του εκσπλαχνισμού γίνεται μηχανικά (σε μεγάλες μονάδες επεξεργασίας) ή από ειδικό προσωπικό το οποίο πρέπει να βρίσκεται υπό την επίβλεψη επιθεωρητή υγείας. Οι εργάτες αφαιρούν τα όργανα (καρδιά, συκώτι, πνεύμονες) και στην συνέχεια το υπόλοιπο μέρος του κοτόπουλου καθαρίζεται (έκπλυση) και ψύχεται.

4. Ψύξη. Η πιο κοινή πρακτική είναι η εμβάπτιση του σφάγιου σε δεξαμενές με τεμαχισμένο πάγο (υδρόψυξη) αλλά πολλές σύγχρονες βιομηχανίες εφαρμόζουν την αερόψυξη (ψύξη με ρεύμα αέρα). Σύμφωνα με τον USDA, η ροή ψυχρού νερού ή πάγου

πρέπει να διατηρείται σταθερή στην τιμή 21/κοτόπουλο για να ελαχιστοποιηθεί η μικροβιακή ανάπτυξη. Τα κοτόπουλα αρχικά τοποθετούνται σε μια δεξαμενή προ-υδρόψυξης, θερμοκρασίας 10-18 °C. Στην συνέχεια, εμβαπτίζονται σε θρυμματισμένο πάγο θερμοκρασίας 0-1 °C. Η τελική θερμοκρασία του σφαγίου σύμφωνα με τον USDA πρέπει να είναι 4 °C, και ο απαιτούμενος χρόνος δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 40-60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου λαμβάνει χώρα γρήγορη μικροβιακή ανάπτυξη μικροοργανισμών αλλοίωσης ή/και παθογόνων βακτηρίων(Nychas et al., 2008). Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός σε αυτό το στάδιο συνήθως κυμαίνεται από 10^2 - 10^5 CFU/cm². Με το πέρας της ψύξης, τα κοτόπουλα τοποθετούνται ανάποδα σε ειδικούς γάντζους για διάστημα 2.5-4.0 λεπτών, προκειμένου να γίνει η αποστράγγιση του νερού.

5. Συσκευασία. Η συσκευασία ολόκληρων πουλερικών γίνεται σε σακούλες πολυαιθυλενίου οι οποίες σφραγίζονται με θερμοσυγκόλληση. Ωστόσο, στις ΗΠΑ είναι κοινή πρακτική η τοποθέτηση των ολόκληρων πουλερικών σε πτυχωτά κιβώτια εμποτισμένα με κηρό, και η επικάλυψή τους με πάγο. Επίσης, ολοένα και πιο δημοφιλής καθίσταται η μέθοδος «chill-packing» κατά την οποία η θερμοκρασία του κοτόπουλου μειώνεται αρχικά στους -1 °C ή -2 °C με ψυχρό ρεύμα αέρα (-6 °C) ενώ στην συνέχεια διατηρείται σταθερή σε ανάλογο επίπεδο με τη συντήρηση υπό ψύξη.

6. Τεμαχισμός/Μηχανική αποστέωση/Μετατροπή σε κιμά. Τα πουλερικά που δεν διατίθενται ολόκληρα στο λιανικό εμπόριο, υφίστανται περαιτέρω επεξεργασία τεμαχισμού προκειμένου να μετατραπούν σε προϊόντα πουλερικών όπως φιλετάκια, φτερούγες, λουκάνικα, μπιφτέκια, σουβλάκια, κ.λ.π. Ο τεμαχισμός πραγματοποιείται συνήθως με τη χρήση μηχανοκίνητων συσκευών ή στρογγυλών λεπίδων και γίνεται εντός συντόμου χρονικού διαστήματος μετά την διαδικασία της ψύξης σε ειδικά κλιματιζόμενο χώρο. Τα συγκεκριμένα στάδια της επεξεργασίας μπορεί να οδηγήσουν σε αξιοσημείωτη αύξηση του μικροβιακού φορτίου των πουλερικών. Για παράδειγμα, οι Cervený et al., (2009) αναφέρουν ότι μετά την μηχανική αποστέωση κρέατος πουλερικών, τα επίπεδα των ψυχρότροφων βακτηρίων προσδιορίστηκαν να είναι της τάξης των 10^5 - 10^6 CFU/g και τα εντεροβακτηριοειδή 10^2 - 10^3 CFU/g. Όσο αυξάνουν τα στάδια τεμαχισμού των προϊόντων κρέατος, τόσο περισσότερο επιβαρύνεται σημαντικά το μικροβιακό τους φορτίο. Τα νωπά προϊόντα κρέατος που έχουν υποστεί τεμαχισμό ή έχουν μετατραπεί σε κιμά, τείνουν να έχουν περιορισμένο χρόνο συντήρησης επειδή κατά την διάρκεια των συγκεκριμένων διεργασιών επιμολύνονται κυρίως από ψυχρότροφες ψευδομονάδες, εντεροβακτηριοειδή

και ζύμες. Επίσης, οξυγαλακτικά βακτήρια, κλωστηρίδια και θειοαναγωγικά βακτήρια αποτελούν βακτήρια που ανευρίσκονται συνήθως σε τεμαχισμένα προϊόντα και σε κιμά .

1.5 ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ

Τα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, όπως τα πουλερικά, αποτελούν καλή πηγή θρεπτικών συστατικών (πρωτεΐνες, βιταμίνες, λιπαρά οξέα, μεταλλικά στοιχεία), τα οποία μάλιστα βρίσκονται σε βιοδιαθέσιμη μορφή, με αποτέλεσμα να είναι εύκολα αφομοιώσιμα από τον ανθρώπινο οργανισμό. Το θρεπτικό περιεχόμενο του κρέατος πουλερικών (κοτόπουλο, γαλοπούλα) δεν διαφέρει σημαντικά από το αντίστοιχο του κόκκινου κρέατος (μοσχάρι, χοιρινό). Ωστόσο, το κοτόπουλο και η γαλοπούλα, περιέχουν πολύ μικρότερη συγκέντρωση αιμικού σιδήρου σε σχέση με το μοσχαρίσιο κρέας. Επίσης, το κρέας της γαλοπούλας έχει σχετικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε μεταλλικά στοιχεία (ασβέστιο, φώσφορο, σίδηρο, κάλιο, ψευδάργυρο, χαλκό) σε σχέση με το κοτόπουλο (Lofgren et al., 2005). Η μέση σύσταση του ωμού κρέατος κοτόπουλου είναι: Νερό 69,5-74,7%, Πρωτεΐνη 18,1-23,1% και τέλος Λίπος 9,25-12,12 και 1,24% για κρέας από στήθος/μούτι με δέρμα και χωρίς δέρμα (στήθος), αντίστοιχα (Maurer, 2003). Τα προϊόντα κρέατος πουλερικών περιέχουν σημαντική ποσότητα Βιταμινών του συμπλέγματος Β (νιασίνη, πυριδοξίνη, παντοθενικό οξύ, ριβοφλαβίνη και θειαμίνη) η οποία μάλιστα δεν διαφέρει από την αντίστοιχη που βρίσκεται στο κόκκινο κρέας. Στον **Πίνακα 1.4** παρουσιάζεται η μέση περιεκτικότητα του κρέατος κοτόπουλου (μεγειρεμένου) σε πρωτεΐνες, λίπος, μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες, σύμφωνα με τα δεδομένα του USDA, 2004 (www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp).

Πίνακας 1.4: Πρωτεϊνικό περιεχόμενο, περιεκτικότητα σε λίπος, μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες σε μερίδα ψητού κρέατος κοτόπουλου (85 g, χωρίς επιδερμίδα/δέρμα, 147-174 Kcal/KJ)

Μέρος Κρέατος κοτόπουλου	Πρωτεΐνες (g)	Ολικά λιπαρά (g)	SFA ^{*1} (g)	MUFA ^{*2} (g)	PUFA ^{*3} (g)	Χολ. ^{*4} (mg)	
στήθος, φτερούγες (Light)	26,3	3,8	1,08	1,31	0,83	72	
μπούτι (Dark)	23,3	8,3	2,26	3,03	1,92	79	
Μεταλλικά στοιχεία							
	Ca (mg)	Fe (mg)	Mg (mg)	K (mg)	Na (mg)	Zn (mg)	
στήθος, φτερούγες (Light)	13	0,90	23	184	210	65	
μπούτι (Dark)	13	1,31	20	152	204	79	
Βιταμίνες							
	Θειαμίνη (mg)	Ριβοφλαβίνη (mg)	Νιασίνη (mg)	Παντοθενικό οξύ (mg)	Πυριδοξίνη (B6) (mg)	B12 (μg)	E (mg)
στήθος, φτερούγες (Light)	0,06	0,10	10,56	0,83	0,51	0,29	0,23
μπούτι (Dark)	0,06	0,19	5,57	1,03	0,31	0,27	0,23

^{*1} SFA= Κορεσμένα λιπαρά οξέα, ^{*2} MUFA= Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα

^{*3} PUFA=Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ^{*4} Χολ.=χοληστερόλη

Το λίπος που περιέχεται στο κρέας του κοτόπουλου περιλαμβάνει πολλές ενώσεις όπως φωσφολιπίδια (αποτελούνται από εστέρες λιπαρών οξέων με γλυκερόλη, φωσφορικό οξύ και άλλες αζωτούχες ομάδες), ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο-, δι-, τρι- γλυκερίδια (εστέρες της γλυκερόλης με τα λιπαρά οξέα), και στερόλες (παράγωγα λιπιδίων, λιπαρές αλκοόλες

π.χ. χοληστερόλη). Τα % ποσοστά των φωσφολιπιδίων (αμφίφιλος χαρακτήρας) και των υπόλοιπων ουδέτερων λιπιδίων (neutral lipids) του λίπους που ανευρίσκεται σε διάφορα μέρη του κρέατος κοτόπουλου παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1.5**.

Πίνακας 1.5: Ολικό % περιεχόμενο σε φωσφολιπίδια και άλλα «ουδέτερα» λιπίδια (neutral lipids) του νωπού κρέατος κοτόπουλου (Katz et al., 1966).

Μέρος κρέατος κοτόπουλου	Ολικά λιπίδια (% νωπού κρέατος)	Φωσφολιπίδια (% ολικών λιπιδίων)	Ουδέτερα λιπίδια (% ολικών λιπιδίων)
Στήθος, φτερούγες (white meat)	1.0	48	52
Μπούτι (dark meat)	2.5	21	
Δέρμα	25	2.0	
Αποθηκευμένο Λίπος	60-80	0.9	

Επίσης, στον **Πίνακα 1.6**, παρουσιάζεται το προφίλ της σύστασης του κρέατος κοτόπουλου (μούτι) σε λιπαρά οξέα, σύμφωνα με τους de Almeida et al. (2006). Η περιεκτικότητα του λίπους κοτόπουλου σε κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι 31-36%, σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα 42-47% και σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα 21-22.4% (Γεωργάκης, 2002). Σύμφωνα με τον **Πίνακα 1.6** (de Almeida et al., 2006) τα κύρια λιπαρά οξέα που απαντούν στο λίπος του (νωπού) κρέατος των πουλερικών είναι το ελαϊκό, το λινελαϊκό και το παλμιτικό (79% του ολικού περιεχομένου σε λιπίδια). Επίσης, το αραχιδονικό οξύ αποτελεί το κύριο συστατικό των φωσφολιπιδίων. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το λίπος του κοτόπουλου περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό ακόρεστων λιπαρών οξέων σε σχέση με το κόκκινο κρέας και πολύ λιγότερη χοληστερόλη (Katz et al. 1966).

Πίνακας 1.6: Περιεχόμενο νωπού κρέατος κοτόπουλου (από μπούτι, dark meat) σε λιπαρά οξέα (mg/100 gr, de Almeida et al., 2006)

Μυριστικό οξύ (14:0)	29 ± 3
Παλμιτικό οξύ (16:0)	1097 ± 124
Στεατικό οξύ (18:0)	302 ± 22
Ολικό περιεχόμενο σε κορεσμένα λιπαρά οξέα	1428 ± 124
Παλμιτελαϊκό οξύ (16:1n-7)	298 ± 56
Ελαιϊκό οξύ (18:1n-9)	1366 ± 77
n-9 μονοακόρεστα	1366 ± 77
Ολικό περιεχόμενο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	1664 ± 77
Λινελαϊκό οξύ (18:2n-6)	728 ± 94
γ-λινολενικό οξύ (18:3n-6)	1
α-λινολενικό οξύ (18:3n-3)	25 ± 4
Αραχιδονικό οξύ (20:4n-6)	46 ± 3
Εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA, 20:5n-3)	23 ± 3
Δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA, 22:6n-3)	14 ± 1
n-3 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ	62 ± 4
n-6 πολυακόρεστο λιπαρό οξύ	775 ± 94
Ολικό περιεχόμενο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	837 ± 94

Γενικά το κρέας των πουλερικών περιέχει πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας και χαμηλή ποσότητα ενέργειας. Ο μυϊκός ιστός του κοτόπουλου είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην διατροφή του ανθρώπου, γιατί περιέχει αρκετά διαφορετικά αμινοξέα. Στον **Πίνακα 1.7** παρουσιάζεται η % ποσότητα του κάθε αμινοξέος στις πρωτεΐνες του κρέατος του κοτόπουλου (Mountney & Parkhurst, 1995).

Πίνακας 1.7: Περιεκτικότητα κρέατος κοτόπουλου σε αμινοξέα (Mountney & Parkhurst, 1995)

Είδος Αμινοξέος	g/100 g πρωτεϊνών
Αργινίνη*	7,0
Ιστιδίνη*	2,3
Λυσίνη	8,4
Φαινυλαλανίνη*	4,6
Τυροσίνη*	4,3
Θρυπτοφάνη*	1,3
Θρεονίνη*	4,7
Κυστεΐνη	1,2
Μεθειονίνη	3,4

*Απαραίτητα αμινοξέα

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μικρό ποσοστό της θρεπτικής σύστασης του κρέατος κοτόπουλου. Μάλιστα, οι περισσότερες διατροφικοί πίνακες που αναφέρονται στην θρεπτική αξία του κρέατος πουλερικών δεν εντάσσουν καν τους υδατάνθρακες στην λίστα των θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, οι Lilyblade & and Peterson (1962) μελέτησαν διεξοδικά την περιεκτικότητα του κρέατος κοτόπουλου (μετά τη θανάτωσή του) σε υδατάνθρακες και αναφέρουν την ινοσιτόλη (50-124 mg/ 100 g κρέατος), την γλυκόζη (141-188 mg/ 100 g κρέατος) και την φρουκτόζη (10-13 mg/ 100 g κρέατος) ως τους κυριότερους εκπροσώπους τους είδους, ενώ η ριβόζη και η μαννόζη κυμάνθηκαν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (1-3 mg/ 100 g κρέατος).

2.0 ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΑ, ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΑ, ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ

Ως ποιότητα ενός τροφίμου ορίζεται ο συνδυασμός των χαρακτηριστικών εκείνων του προϊόντος που θεωρούνται σημαντικά για τον προσδιορισμό του βαθμού αποδοχής του από το καταναλωτικό κοινό. Η ποιότητα των τροφίμων κρίνεται από τις εξής βασικές παραμέτρους:

1. **Την θρεπτική και θερμιδική τους αξία** καθώς και την περιεκτικότητά τους σε συστατικά που προάγουν την καλή υγεία του καταναλωτή.
2. **Την μικροβιολογική και χημική τους ασφάλεια.** Η μικροβιολογική τους ασφάλεια αφορά στην τήρηση των τυπικών κανόνων υγιεινής κατά την παραγωγή των προϊόντων και στην κατάλληλη συντήρησή τους, η οποία προστατεύει το τρόφιμο από την ανάπτυξη μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση ή/και παθογόνων μικροοργανισμών. Η χημική τους ασφάλεια εξαρτάται από την παρουσία σε αυτά χημικών ουσιών, που είτε προστέθηκαν κατά την παραγωγή/συσκευασία, είτε προήλθαν από την γεωργική και βιομηχανική ρύπανση του περιβάλλοντος, είτε έχουν φυσική προέλευση (βαρέα μέταλλα, εντομοκτόνα, ορμόνες).
3. **Τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά** (εμφάνιση, χρώμα, υφή, οσμή και γεύση). Η οργανοληπτική αξιολόγηση αποτελεί πολύ σημαντικό κριτήριο στην εκτίμηση της ολικής ποιότητας του κρέατος. Ωστόσο, η παρουσία ορισμένων συντηρητικών (π.χ. αιθέρια έλαια) στο τρόφιμο είναι δυνατό να παραπλανήσει τον καταναλωτή και να οδηγηθεί σε εσφαλμένη εντύπωση ως προς την πραγματική ποιότητα του προϊόντος που επέλεξε.

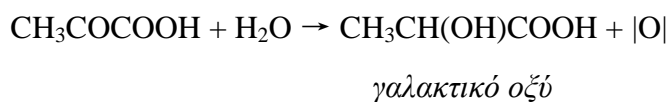
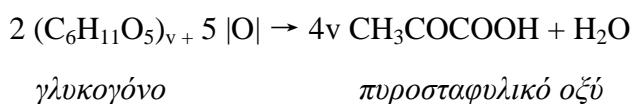
2.1 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ

Η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο οικοσύστημα του κρέατος οδηγεί στην εκδήλωση φυσικοχημικών μεταβολών κατά την αλλοίωση του. Αυτές οι αλλαγές λαμβάνουν χώρα εκεί όπου υπάρχουν τα υδατοδιαλυτά συστατικά του κρέατος όπως, το γαλακτικό οξύ, τα αμινοξέα, τα νουκλεοτίδια και οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Όλα τα παραπάνω συστατικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα από το

σύνολο των μικροοργανισμών αλλοίωσης με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού (π.χ. σουλφίδια, κετόνες, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, ακετοΐνη) που υποβαθμίζουν την οργανοληπτική ποιότητα των προϊόντων κρέατος.

2.1.1 Μεταβολή του pH κατά τη νεκρική ακαμψία

Αμέσως μετά την σφαγή των πουλερικών αρχίζει μια σειρά πολύπλοκων φυσικοχημικών μεταβολών στον μυϊκό τους ιστό. Ο μεταβολισμός στον μυϊκό ιστό συνεχίζεται με τη διαφορά ότι λόγω της διακοπής παροχής οξυγόνου οι αντιδράσεις γίνονται αναερόβια. Παρουσία μικρής ποσότητας οξυγόνου, το γλυκογόνο διασπάται προς γαλακτικό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Βουδούρης & Κοντομηνάς, 2002):



Το pH του κρέατος πουλερικών έχει τιμή περίπου 7,0 πριν τη σφαγή. Το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τη διάσπαση του γλυκογόνου συσσωρεύεται στον μυϊκό ιστό και μειώνει το pH από 7,0 σε 6,2-6,6 (Dransfield & Sosnicki, 1999; Enfors, 2008). Το φαινόμενο αυτό λέγεται νεκρική ακαμψία (*rigor mortis*) και έχει σοβαρές επιπτώσεις στην γεύση, το χρώμα, το χυμώδες και την τρυφερότητα του κρέατος που θα προκύψει. Η διάρκεια της νεκρικής ακαμψίας στο κρέας κοτόπουλου είναι μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη κρέατος (1-4 ώρες, Dransfield & Sosnicki, 1999; Enfors 2008). Γενικά, οι παράγοντες που καθορίζουν την τιμή του pH μετά τον θάνατο εξαρτώνται από την ποσότητα του γλυκογόνου στους μύες, τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, το βαθμό αφάιμαξης και την περιεκτικότητα του κρέατος σε λιπώδη και συνδετικό ιστό.

Γρήγορη και απότομη πτώση του pH παρεμποδίζει την ενζυμική δράση των καλπαϊνών με αποτέλεσμα να παρακωλύεται η αύξηση της τρυφερότητας του κρέατος των πουλερικών (*post mortem tenderization*). Επιπρόσθετα, η μυοσίνη καθίσταται επιρρεπής σε φαινόμενα μετουσίωσης, τα οποία οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα συγκράτησης ύδατος, και μειωμένη ένταση χρώματος στο κρέας των πουλερικών (*exudative condition*, Dransfield & Sosnicki 1999). Έρευνες *in vitro* έδειξαν ότι μείωση του μεταθανάτιου pH

κατά μόλις μία μονάδα αυξάνει τον ρυθμό μετουσίωσης των πρωτεϊνών κατά 12 φορές, ενώ αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C (στην περιοχή των 30 °C) οδηγεί σε 20 φορές εντονότερα φαινόμενα μετουσίωσης (Dransfield & Sosnicki 1999).

Με το πέρας της γλυκόλυσης (στάδιο ωρίμανσης), η συνεισφορά των ενδογενών ενζύμων (καλπαΐνες και καθεψίνες) στην αλλοίωση του κρέατος είναι αμελητέα σε σχέση με την αντίστοιχη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Nychas et al., 2008). Μάλιστα, πολλές φορές, η μεταθανάτια δραστηριότητα των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων είναι τόσο χαμηλή ώστε να είναι απαραίτητη η προσθήκη «τρυφεροποιητών» όπως NaCl 2% (Βουδούρης & Κοντομηνάς, 2002). Γενικά, έχει αναφερθεί ότι ο ρυθμός τρυφεροποίησης του κρέατος κοτόπουλου είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα, εφόσον απαιτούνται μόλις 0.3 ημέρες (στους 1°C) προκειμένου να επέλθει τρυφεροποίηση ίση με 80% (Dransfield & Sosnicki 1999). Ο αντίστοιχος χρόνος για το χοιρινό κρέας είναι 4.2 ημέρες, ενώ για τα υπόλοιπα είδη κρέατος (βοδινό κρέας, λαγού, πρόβειο) είναι αρκετά μεγαλύτερος (7.7-10 ημέρες).

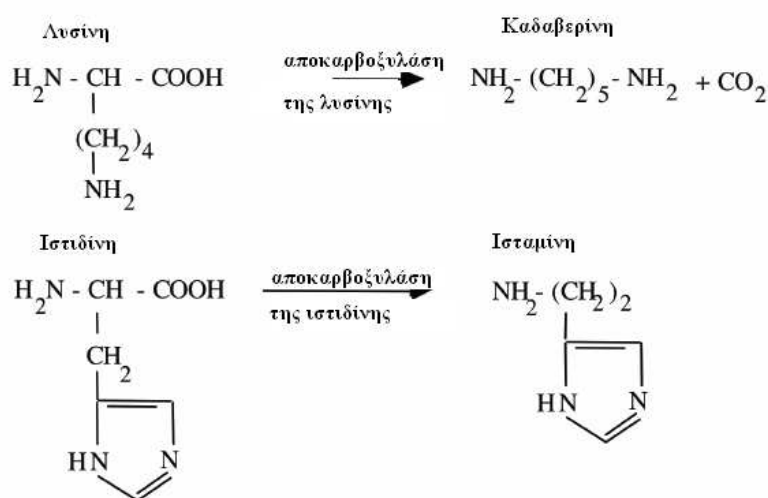
2.1.2 Πρωτεόλυση

Η πρωτεόλυση είναι μια διαδικασία που καταλύεται από μικροοργανισμούς που παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες), όπως είναι οι Ψευδομονάδες. Ωστόσο, δεν διαθέτουν όλοι οι μικροοργανισμοί την ικανότητα παραγωγής των συγκεκριμένων ενζύμων, και εκείνοι που μπορούν, προβαίνουν στην παραγωγή τους μόνο σε συνθήκες έλλειψης πηγής αζώτου. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αν και διαθέτουν μηχανισμούς καταβολισμού των πρωτεϊνών, έχουν ασθενή πρωτεολυτική δράση σε σχέση με τις ψευδομονάδες.

Σε προχωρημένα στάδια της αλλοίωσης, οι πρωτεάσες και οι πεπτιδάσες αποδομούν τις πρωτεΐνες προς την παραγωγή πεπτιδίων και α-αμινοξέων, τα οποία χρησιμοποιούνται ως μια επιπλέον πηγή ενέργειας. Επιπλέον οι ψευδομονάδες, υπό αερόβιες συνθήκες έχουν την ικανότητα καταβολισμού της κρεατίνης και κρεατινίνης. Οι συγκεκριμένες ουσίες, μαζί με τα αμινοξέα, αποτελούν το υπόστρωμα για την ανάπτυξη διάφορων δύσοσμων μεταβολίτων, όπως αμμωνία, θειούχες ενώσεις, αιθυλεστέρες, κετόνες και βιογενείς αμίνες. Επιπρόσθετα, πολλά πεπτιδία έχουν έντονη γεύση (πικρή ή γλυκιά) και αυτό μερικές φορές έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των προϊόντων κρέατος (Enfors, 2008).

2.1.3 Παραγωγή βιογενών αμινών

Οι βιογενείς αμίνες είναι οργανικές βάσεις χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες σχηματίζονται μέσω της αποκαρβοξυλίωσης των ελεύθερων αμινοξέων των τροφίμων, υπό την ενζυμική επίδραση των βακτηρίων της μικροχλωρίδας αυτών. Το είδος και η ποσότητα των βιογενών αμινών που παράγονται εξαρτάται από το βακτήριο, τον πληθυσμό της μικροχλωρίδας αλλοίωσης των τροφίμων και τη θερμοκρασία διατήρησης (Silva & Gloria, 2002). Σύμφωνα με τους Shalaby et al. (1996), η βιογενής αμίνη ισταμίνη παράγεται από ορισμένα βακτήρια της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών (*Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Edwardsiella* spp.) και από ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια όπως *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. divergens*, *L. carnis*, *L. curvatus* και *L. hilgardii*, ενώ η τυραμίνη από βακτήρια του είδους Streptococci, *Enterococcus faecalis*, κολοβακτηριοειδή (coliforms) και οξυγαλακτικά βακτήρια (κυρίως *L. divergens* και *L. carnis*). Επίσης, πολλά στελέχη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* παράγουν αξιοσημείωτη ποσότητα καδαβερίνης, ενώ οι ψευδομονάδες παράγουν κυρίως πουτρεσκίνη. Σύμφωνα με τα παραπάνω και με βάση τα βακτηριακά είδη που απαντώνται συχνότερα στο κρέας πουλερικών, οι κυριότερες βιογενείς αμίνες που μπορούν να ανευρεθούν στα προϊόντα πουλερικών είναι η πουτρεσκίνη, η καδαβερίνη, η τυραμίνη και η ισταμίνη (Silva & Gloria, 2002). Οι παραπάνω ενώσεις έχουν πολύ δυσάρεστη οσμή. Η καδαβερίνη, η πουτρεσκίνη και η ισταμίνη είναι τα προϊόντα αποκαρβοξυλίωσης της λυσίνης, της ορνιθίνης και της ιστιδίνης, αντίστοιχα (Εικόνα 2.1).



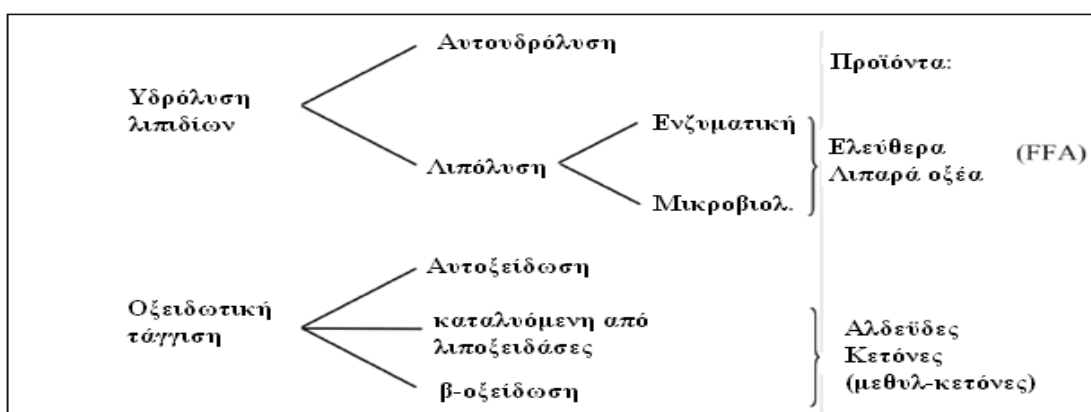
Εικόνα 2.1: Παραγωγή Ισταμίνης και Καδαβερίνης (Enfors, 2008)

Η καδαβερίνη και η πουτρεσκίνη δεν είναι επικίνδυνες για την υγεία του καταναλωτή και η δράση τους περιορίζεται στην υποβάθμιση της οργανοληπτικής ποιότητας του τροφίμου (Enfors, 2008). Ωστόσο, η ισταμίνη και η τυραμίνη έχουν τοξική δράση με αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρών διαταραχών στους καταναλωτές (διαστολή των περιφερειακών αγγείων, υπόταση και κεφαλαλγία, Silva & Gloria, 2002).

2.1.4 Τάγγιση του λίπους (Οξειδωση και Υδρόλυση λιπιδίων νεπού κρέατος)

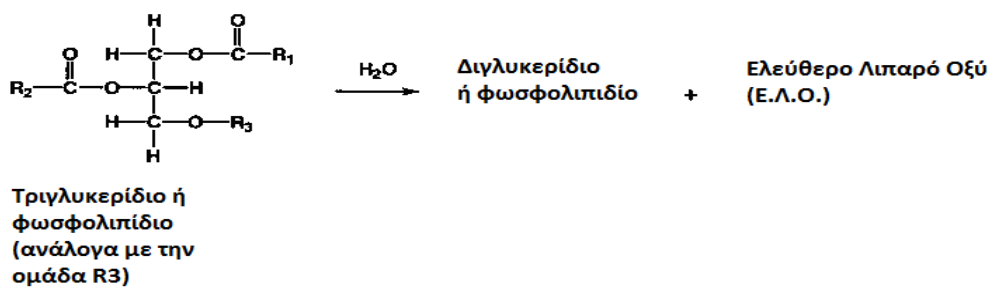
Η τάγγιση του λίπους των πουλερικών οδηγεί στην παραγωγή ενώσεων που επιφέρουν δυσάρεστες μεταβολές στην οσμή, την γεύση, την υφή, την συνεκτικότητα του μυϊκού ιστού, την εμφάνιση (π.χ. χρώμα) και την διατροφική του αξία του κρέατος (Fellenberg & Spreisky, 2006).

Η τάγγιση του λίπους είναι το αποτέλεσμα ενός συνόλου πολλών διαφορετικών αντιδράσεων, οι οποίες συνοψίζονται ως εξής (Εικόνα 2.2):



Εικόνα 2.2: Τάγγιση των λιπιδίων (Enfors, 2008)

Υδρόλυση των φωσφολιπιδίων ή (σε μικρότερο βαθμό) των τριγλυκεριδίων μπορεί να προκαλέσει την τάγγιση που έχει ως συνέπεια την αλλοίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων (Εικόνα 2.3)

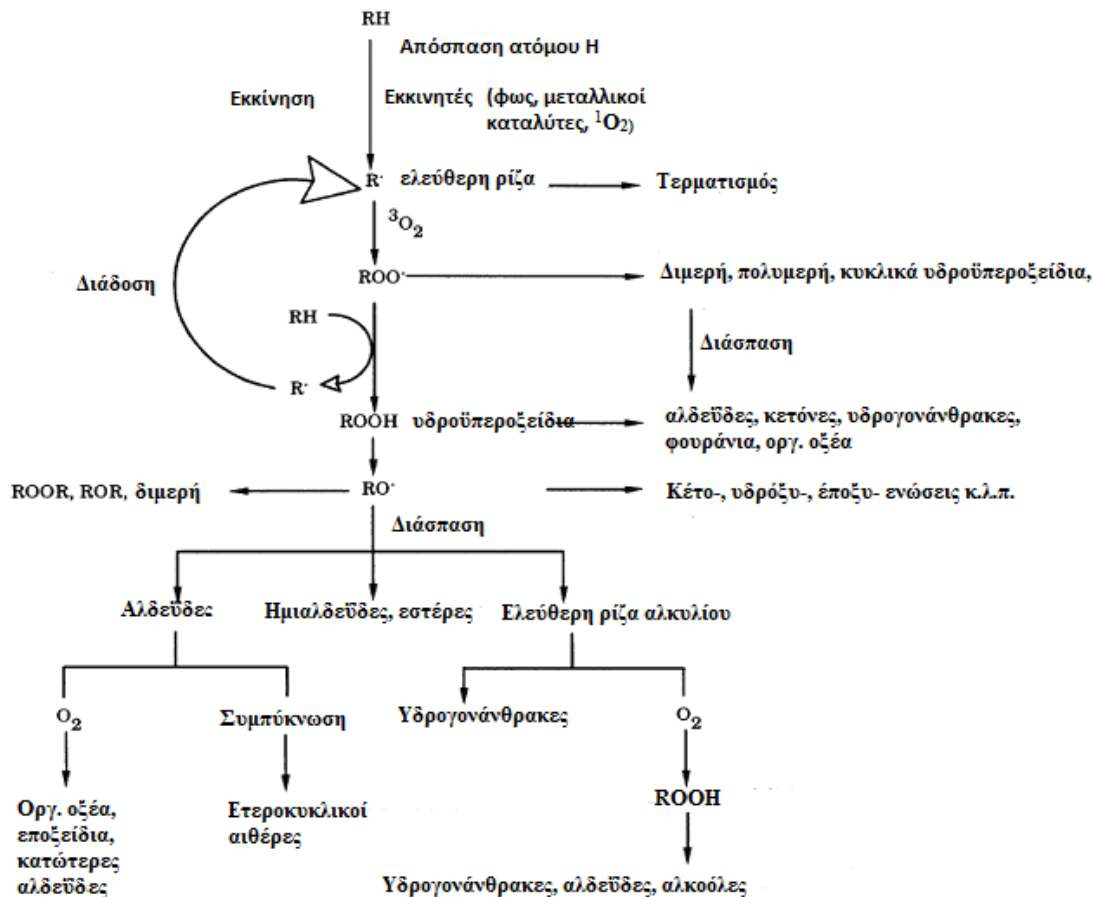


Εικόνα 2.3: Παραγωγή λιπαρών οξέων από την υδρόλυση τριγλυκεριδίων ή φωσφολιπιδίων

Οι οργανοληπτικές μεταβολές που παρατηρούνται μετά από την παραγωγή των ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA) εξαρτώνται από το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας των οξέων και την ποσότητά τους. Για παράδειγμα, παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων σε ποσοστό 15% θεωρείται αποδεκτή για προϊόντα μοσχαρίσιου κρέατος (αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά) ενώ στην περίπτωση του ελαιόλαδου, ποσοστό μεγαλύτερο από 2% δεν θεωρείται αποδεκτό. Η υδρόλυση των λιπιδίων είναι σχετικά μια βραδεία διαδικασία, αλλά παρουσία λιπολυτικών ενζύμων (π.χ. παγκρεατική λιπάση) ή λιπολυτικών ενζύμων που παράγονται από τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (π.χ. *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* spp., *Serratia marcesans*, *Arthrobacter* spp.), μπορεί να γίνει με πολύ γρήγορο ρυθμό (Pawar et al., 2011, Enfors, 2008).

Η οξειδωτική τάγγιση των λιπαρών οξέων (oxidative rancidification) απαιτεί την παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Η αυτοοξείδωση καταλύεται από μεταλλικά ιόντα που δρουν ως προ-οξειδωτικά, και από το φως. Συγκεκριμένα, το μοριακό οξυγόνο αντιδρά με ιχνοστοιχεία μεταλλικών ιόντων Fe^{+2} Cu^{+2} προς την δημιουργία ελευθέρων ριζών.

Κατά την διαδικασία της αυτοοξείδωσης, ελεύθερες ρίζες υπεροξειδίων (ROO^* , περιέχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο εξωτερικό ατομικό ή μοριακό τροχιακό τους) αντιδρούν γρήγορα με άλλα ελεύθερα λιπαρά οξέα (RH), με αποτέλεσμα την δημιουργία ασταθών ενώσεων που λέγονται υδροϋπεροξειδία (R-OOH) και αποτελούν τα πρωτογενή προϊόντα οξείδωσης. Η παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων μπορεί να επιφέρει μεταβολές στο χρώμα του κρέατος πουλερικών (πρασίνισμα, καστανές ή γκριζές αποχρώσεις, Pawar et al., 2011). Στη συνέχεια, οι ασταθείς ενώσεις R-OOH διασπώνται σε αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες ή φουράνια (δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης) που έχουν ταγγή γεύση και προκαλούν δυσοσμία (π.χ. 2-δεκανάλη, ενεανάλη, οκτανάλη). Κατά την τελευταία φάση σχηματίζονται πολυμερή που επηρεάζουν το χρώμα, την υφή και την γεύση του προϊόντος καθώς και την ασφάλεια του προϊόντος, εφόσον σχηματίζονται τοξικά προϊόντα (Βουδούρης & Κοντομηνάς, 2002). Η διαδικασία της αυτοοξείδωσης των λιπαρών οξέων περιγράφεται στην **Εικόνα 2.4.:**



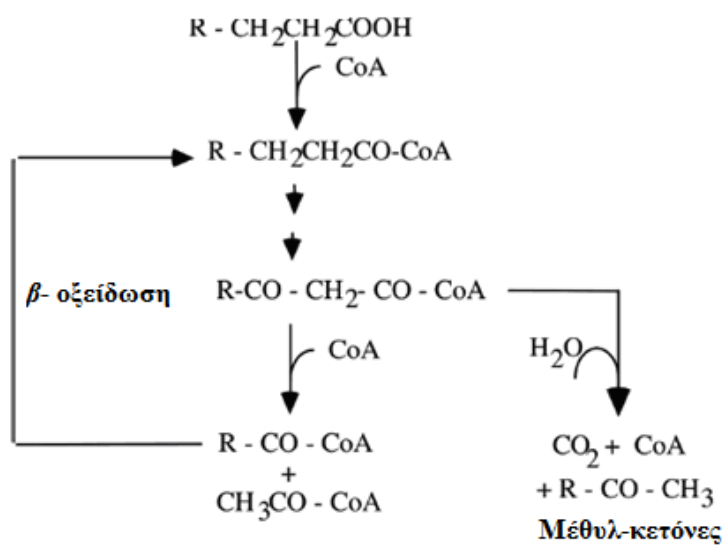
Εικόνα 2.4 (Shahidi & Wanasundara, 1996): Αυτοξειδωση των λιπαρών οξέων. Η αλυσιδωτή αντίδραση ξεκινά με την δημιουργία μιας ελεύθερης ρίζας (R^*) η οποία παράγεται από τα λιπαρά οξέα μέσω κατάλυσης από μεταλλικά ιόντα, οξυγόνο, φως, κ.λ.π.). Η ελεύθερη ρίζα (R^*) αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο, σχηματίζοντας την ελεύθερη ρίζα ROO^* . Απουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων, ξεκινά η αλυσιδωτή αντίδραση που περιλαμβάνει την αντίδραση ROO^* με ένα άλλο λιπαρό οξύ (RH) και κατά συνέπεια την δημιουργία μιας νέας ελεύθερης ρίζας R^* και την δημιουργία υδροϋπεροξειδίων ($R-OOH$). Τα υδροϋπεροξειδία είναι ασταθή και διασπώνται σε ενώσεις με ταγή οσμή και γεύση.

Κατά την διατροφή των πουλερικών, πολλές φορές λαμβάνει χώρα ο εμπλουτισμός της διαίτας τους με έλαια (π.χ. ιχθυέλαια). Ωστόσο, τα έλαια αυτά είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), και ιδιαίτερα σε ω -3 λιπαρά οξέα, τα οποία είναι πολύ ευπαθή στην οξειδωτική τάγγιση. Το δυσάρεστο αυτό φαινόμενο μπορεί να αντιμετωπιστεί με την προσθήκη αντιοξειδωτικών στην διαίτα των πουλερικών (Fellenberg & Speisky, 2006).

Η αιμοσφαιρίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκκίνηση της αυτοξειδωσης των λιπιδίων. Στην περίπτωση τους κρέατος πουλερικών, ο αιμικός σίδηρος ασκεί καταλυτική επίδραση στην οξειδωτική αποσύνθεση των PUFA. Το κρέας των πουλερικών περιέχει αρκετή συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (0,24 mg/g στο στήθος και 0,67 mg/g στο μπούτι), με αποτέλεσμα, όταν το ζώο υποβάλλεται σε σφαγή να αρχίζουν βιοχημικές αντιδράσεις οι

οποίες επιταχύνουν την συμμετοχή της αιμοσφαρίνης στην διαδικασία της οξειδωτικής τάγγισης (Fellenberg & Speisky, 2006). Τα φωσφολιπίδια είναι γενικά πιο επιρρεπή σε φαινόμενα αυτοοξειδωσης σε σχέση με τις άλλες κατηγορίες λιπιδίων, επειδή περιέχουν μεγάλη ποσότητα ω-6 λινελαϊκού οξέος (το άλλο είδος οξέος από το οποίο αποτελούνται είναι το παλμιτικό οξύ).

Η β-οξείδωση των λιπαρών οξέων είναι ουσιαστικά η μεταβολική πορεία της αποδόμησης των λιπαρών οξέων που οδηγεί στην παραγωγή ενός acetyl-CoA και ενός νέου λιπαρού οξέος. Το λιπαρό οξύ που παράγεται μέσω της β-οξείδωσης έχει ανθρακική αλυσίδα με 2 άνθρακες λιγότερους από την αρχική του μορφή (Εικόνα 2.5). Στο τελευταίο στάδιο της β-οξείδωσης, παράγονται ενώσεις (μέθυλ-κετόνες) με χαρακτηριστική οσμή και γεύση τάγγισης, που υποβαθμίζουν την οργανοληπτική ποιότητα των τροφίμων. Στην περίπτωση του κρέατος πουλερικών, το αραχιδονικό οξύ (υπεύθυνο για την χαρακτηριστική γεύση των πουλερικών) υποβάλλεται σε β-οξείδωση από μικροοργανισμούς, με αποτέλεσμα την δημιουργία υπεροξυ-εικοσιτετρανοϊκό (hydroperoxy-eicosatetraenoic) οξέων και την υποβάθμιση της γεύσης και της οσμής (Pawar et al., 2011).



Εικόνα 2.5: β-οξείδωση των λιπαρών οξέων (Enfors, 2008)

Οι λιποξυγενάσες είναι ένζυμα που απαντούν στον μυϊκό ιστό του κρέατος, ενώ μπορεί να παραχθούν και από ορισμένους μύκητες. Τα συγκεκριμένα ένζυμα οξειδώνουν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που έχουν στον συντακτικό τους τύπους την ομάδα cis-cis 1-4 πενταδιέν- (λινελαϊκό, λινολενικό, αραχιδονικό οξύ) σε υδροπεροξειδία, τα οποία με την σειρά τους διασπώνται σε αλδεύδες και κετόνες με δυσάρεστη οσμή και γεύση.

2.1.5 Μεταβολές του χρώματος κατά την συντήρηση

Η μεταβολή του χρώματος κατά την συντήρηση προϊόντων κρέατος αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα για την αποδοχή από το καταναλωτικό κοινό, εφόσον σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, οι καταναλωτές συχνά χρησιμοποιούν το κριτήριο του χρώματος ως ένδειξη φρεσκότητας ενός προϊόντος (Mancini & Hunt, 2005).

Το φυσιολογικό χρώμα του μυϊκού ιστού των κοτόπουλων μετά την σφαγή, ποικίλει από λευκό-ροζ έως σκούρο κόκκινο, ενώ το αντίστοιχο του δέρματος είναι λευκό-κρεμ ή κίτρινο. Παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η φυλή, η διατροφή (π.χ. καροτενοειδή), η λιποπερικτικότητα, και ο τρόπος σφαγής-επεξεργασίας (π.χ. θερμοκρασία ζεματίσματος) επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το χρώμα του κρέατος/δέρματος. Η χημεία του χρώματος του κρέατος είναι η χημεία της χρωστικής μυοσφαιρίνης. Η μυοσφαιρίνη (Mb) είναι σύνθετη πρωτεΐνη του μυός, παρόμοια ως προς τη λειτουργικότητα με τη χρωστική του αίματος, αιμοσφαιρίνη, αλλά διαφέρει στο ότι η πρώτη αποτελεί στερεοχημικά το ένα τέταρτο της δεύτερης. Πιο συγκεκριμένα, η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από 4 αιμοσυγκροτήματα (αιμοσυγκρότημα= 4 πυρολικό δακτύλιοι ενωμένοι με 4 άτομα άνθρακα, σε πλήρη συζυγία, που φέρουν ένα άτομο άνθρακα στο μεταξύ τους διάστημα) ενώ η μυογλοβίνη αποτελείται από ένα αιμοσυγκρότημα και μία πολυπεπτιδική αλυσίδα (Βουδούρης & Κοντομηνάς, 2002).

Η μυοσφαιρίνη (Mb) έχει χρώμα πορφυρό κόκκινο (purple-red) και σε αυτή οφείλεται το επιθυμητό χρώμα του κρέατος μετά την σφαγή του ζώου. Οι μεταβολές στο χρώμα που παρατηρούνται κατά την διάρκεια της συντήρησης του κρέατος οφείλονται:

α) στην πρόσληψη μοριακού οξυγόνου από την Mb (οξυγόνωση) με αποτέλεσμα την μετατροπή της σε οξυμυοσφαιρίνη (MbO_2), η οποία έχει φωτεινό κόκκινο ελκυστικό χρώμα (ιδιαίτερα ταχεία διαδικασία)

β) περαιτέρω οξείδωση της MbO_2 σε μεταμυοσφαιρίνη (αύξηση του σθένους αιμικού σιδήρου από Fe^{+2} σε Fe^{+3}) η οποία έχει καστανέρυθρο χρώμα.

Όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κρέατος είναι υψηλή (φρέσκο κρέας) τότε η Mb οξυγονώνεται προς την MbO_2 (ελκυστικό χρώμα) αλλά με την πάροδο των ημερών συντήρησης η συνεχής κατανάλωση του οξυγόνου από την μικροβιακή χλωρίδα οδηγεί σε μείωση της σχετική πίεσης και διείσδυση του οξυγόνου στο εσωτερικό του μυϊκού ιστού. Οι συνθήκες αυτές (σχετική πίεση του $O_2=4$ mm Hg) ευνοούν τον σχηματισμό της καφέ μεταμυοσφαιρίνης (αργή διαδικασία).

2.2 ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΛΛΟΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

Η μικροβιακή αλλοίωση των προϊόντων ζωϊκής προέλευσης είναι ένα οικολογικό φαινόμενο, εφόσον περιλαμβάνει τις μεταβολές που υφίσταται το τρόφιμο, λόγω της μικροβιολογικής δραστηριότητας της χλωρίδας αλλοίωσης. Το είδος της μικροβιολογικής χλωρίδας αλλοίωσης που αναπτύσσεται στα προϊόντα κρέατος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως π.χ. ενεργότητα ύδατος, διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, την παραγωγή, επεξεργασία, συντήρηση και διανομή των προϊόντων (Nychas et al., 2008).

Η μικροχλωρίδα αλλοίωσης των προϊόντων πουλερικών απαρτίζεται από μικροοργανισμούς που προέρχονται από το εντερικό (πεπτικό) σύστημα του πτηνού πριν τη σφαγή, καθώς και από μικροοργανισμούς που εισέρχονται στο προϊόν από το περιβάλλον, κατά τα διάφορα στάδια της επεξεργασίας (Nychas et al., 2008). Οι ιδιότητες του κρέατος πουλερικών που επηρεάζουν την βακτηριακή ανάπτυξη είναι η θρεπτική σύσταση, ο τρόπος επεξεργασίας, το pH, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό, η ενεργότητα ύδατος, και η διάρκεια/θερμοκρασία/συσκευασία συντήρησης.

Η μικροχλωρίδα αλλοίωσης των προϊόντων πουλερικών απαρτίζεται κυρίως από αρνητικά κατά Gram βακτήρια (ραβδόμορφα ή κόκκους) που ανήκουν στα γένη *Pseudomonas* spp. (*Ps. fragi*, *Ps. fluorescens*, *Ps. lundensis*), *Acinetobacter* spp., *Moraxella* spp., *Aeromonas* spp. και *Psychrobacter* spp. (Mead et al. 2004, Nychas et al., 2008; Cervený 2009). Η ανάπτυξη των ψευδομονάδων σε επίπεδα των 10^7 - 10^8 CFU/g έχει συνδεθεί με την εμφάνιση γλοιώδους επικάλυψης (slime) και δυσσομίας. Επίσης, είναι δυνατή η ανεύρεση αρνητικών κατά Gram ψυχρότροφων μελών της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* (*Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*) και θετικών κατά Gram κόκκων του γένους *Streptococci*, *Micrococci*, *Flavobacteria* ιδιαίτερα αν κατά την παραγωγή των προϊόντων πουλερικών έχουν λάβει χώρα διεργασίες όπως η μηχανική αποστέωση, ο τεμαχισμός ή η μετατροπή σε κιμά (Cervený 2009; Mead et al. 2004, Schmitt et al. 1988). Τα κυριότερα θετικά κατά Gram είδη που μπορούν να ανευρεθούν στο κρέας πουλερικών είναι ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* και τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* spp. (*L. sake*, *L. curvatus*, *L. bavarius*). Από τα θετικά κατά Gram βακτήρια, ο *Brochothrix thermosphacta* διαθέτει μεγαλύτερη ικανότητα αλλοίωσης σε σχέση με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες. Το βακτήριο αυτό καταβολίζει κυρίως γλυκόζη

και γλουταμινικό οξύ. Κατά την συντήρηση σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) ή κενού (VP) η μικροχλωρίδα αλλοίωσης κυριαρχείται από θετικά κατά Gram οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus* spp. και από και τον μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta* (Πίνακας 2.1). Οι ζύμες-μύκητες συνήθως δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των πουλερικών. Ωστόσο, αν σε αυτά γίνεται προσθήκη αντιβιοτικών τότε οι ζύμες-μύκητες επιβιώνουν και μπορούν να αποτελέσουν έναν από τους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (Cervený, 2009). Οι κυριότερες ζύμες που έχουν απομονωθεί από νωπά προϊόντα πουλερικών είναι οι εξής: *Candida* spp., *Rhodotula* spp., *Torulopsis* spp., *Yarrowia* spp. (Jay, 2005).

Πίνακας 2.1: Κυρίαρχοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης κατά την συντήρηση προϊόντων πουλερικών σε αερόβια συσκευασία ή συσκευασία MAP (υπό ψύξη, Cervený et al., 2009)

Αερόβια συσκευασία	Συσκευασία MAP
Pseudomonads	<i>Lactobacillus</i>
<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Brochothrix</i> spp.
<i>Moraxella</i> spp.	<i>Carnobacterium</i> spp.
<i>Psychrobacter</i> spp.	<i>Shewanella</i> spp.
<i>Candida</i> spp.	Enteric bacteria
<i>Yarrowia</i> spp.	

Η μεταβολική δράση των βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών στο οικοσύστημα του τροφίμου, οι οποίες επιφέρουν δυσάρεστες μεταβολές στην οσμή, την γεύση, την υφή, στο χρώμα και γενικά στην εμφάνιση του προϊόντος. Τα κυριότερα προϊόντα μεταβολισμού των αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων, που αναπτύσσονται στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης και σχετίζονται με την αλλοίωσή τους, εξαρτώνται από την συσκευασία (Πίνακες 2.2 και 2.3, Nychas et al., 2008).

Πίνακας 2.2: Προϊόντα μεταβολισμού των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε προϊόντα κρέατος (*Pseudomonads*, *Shewanella putrefaciens*, *Moraxella* spp., κ.λ.π., Nychas et al., 2008)

Θειούχες ενώσεις:	Σουλφίδια, διμεθυλοσουλφίδια, διμεθυλοδισουλφίδια, τριμεθυλοδισουλφίδια, μεθυλομερκαπτάνη, υδρόθειο, διμεθυλοτρισουλφίδια
Εστέρες:	Μεθυλεστέρες, αιθυλεστέρες
Κετόνες:	Ακετόνη, 2-βουτανόνη, ακετοΐνη, διακετύλιο
Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες:	Διαιθυλ-βενζόλιο, τριμεθυλ-βενζόλιο
Αλειφατικοί Υδρογονάνθρακες:	Εξάνιο, 2,4-διμεθυλ-εξάνιο
Αλδεΐδες:	2-μεθυλ-βουτανάλη
Αλκοόλες:	Μεθανόλη, αιθανόλη, 2-μεθυλ-προπανόλη, 2-μεθυλ-βουτανόλη, 3-μεθυλ-βουτανόλη
Βιογενείς αμίνες-άλλες ενώσεις:	Καδαβερίνη, πουτρεσκίνη, αμμωνία, μεθυλαμίνη

Πίνακας 2.3: Προϊόντα μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *Brochothrix thermosphacta* σε προϊόντα κρέατος, κατά την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες ή MAP/VP (Nychas & Drosinos, 1999).

Αερόβιες συνθήκες	MAP /VP
Ακετοΐνη	Ακετοΐνη
Διοξειδίο του άνθρακα, Φορμικό (μυρμηκικό) οξύ, Οξικό οξύ, Γαλακτικό οξύ, Βουτυρικό οξύ, Βαλερικό οξύ, Ελεύθερα λιπαρά οξέα	Φορμικό οξύ, Οξικό οξύ, Γαλακτικό οξύ
Αιθανόλη	Αιθανόλη
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	
Μεθυλ-βουτανόλη, Βουτανοδιενόλη, Μεθυλοπροπανόλη, μεθυλοπροπανάλη	

Τέλος, στον **Πίνακα 2.4** παρουσιάζονται οι κυριότερες οργανοληπτικές μεταβολές που προκαλούνται στα προϊόντα κρέατος από την δράση των μικροοργανισμών αλλοίωσης.

Πίνακας 2.4: Οργανοληπτικές μεταβολές που σχετίζονται με την δράση των μικροοργανισμών αλλοίωσης (Nychas et al., 2008).

Οργανοληπτική μεταβολή	Βακτήριο
Μεταβολή της υφής/σχηματισμός γλοιώδους επικάλυψης (Slime)	<i>Pseudomonas, Lactobacillus, Enterococcus, Weisella, Brochothrix</i>
H ₂ O ₂ , πράσινο χρώμα (greening)	<i>Weisella, Leuconostoc, Enterococcus, Lactobacillus</i>
H ₂ S, πράσινο χρώμα (greening)	<i>Shewanella</i>
Οσμή σουλφιδίων	<i>Clostridium, Hafnia alvei</i>

2.3 ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΚΡΕΑΤΟΣ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ-ΠΑΘΟΓΟΝΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ

Η κατανάλωση προϊόντων πουλερικών ή κόκκινου κρέατος έχει συνδεθεί κατά καιρούς με την εμφάνιση τροφολοιμώξεων και τροφοτοξινώσεων. Εκ των βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση ασθενειών τροφικής προέλευσης, άλλα ήταν ανέκαθεν γνωστά («traditional» pathogens), ενώ άλλα δεν ήταν μέχρι προσφάτως για αυτό και χαρακτηρίστηκαν ως αναδυόμενα βακτήρια (emerging pathogens). Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα βακτήρια *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* και *Bacillus cereus*, ενώ ως νέοι αναδυόμενοι μικροβιολογικοί κίνδυνοι, σε προϊόντα κόκκινου κρέατος και πουλερικών, έχουν χαρακτηριστεί τα βακτήρια *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lanienae*, *Salmonella* Typhimurium (DT104, DTU302), *Salmonella enteritidis* (PT4, PT8, PT13, PT14b), Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), *Listeria monocytogenes*, *Arcobacter butzleri*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakazakii*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter pullorum* (Mor-Mur & Yuste, 2010).

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα των υγειονομικών αρχών και μικροβιολογικών εργαστηρίων της Ελλάδας (WHO, 1999-2000), η Σαλμονέλωση αποτέλεσε το 40% του συνόλου των κρουσμάτων τροφοδηλητηριάσεων, με ακόλουθες την Βρουκέλωση (23% και 24%, 1999 και 2000) και την Καμπυλοβακτηρίωση (13% και 12% το 1999 και 2000, Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.5: Κρούσματα τροφολοιμώξεων/τοξινώσεων στον Ελλαδικό χώρο (WHO, 1999-2000)

Ασθένεια	Αριθμός κρουσμάτων το έτος 1999*	Αριθμός κρουσμάτων το έτος 2000*
Σαλμονέλλωση	954	912
Σταφυλόκοκκος	0	0
Αλλαντίαση	0	0
Καμπυλοβακτηρίωση	306	261
Σιγκέλλωση	93	73
Λοίμωξη από εντεροαιμορραγικό <i>E. coli</i>	38	172
Λιστερίωση	7	6
Χολέρα	0**	0**
Βρουκέλλωση	538**	548**
Ηπατίτιδα Α	259**	158**
Εχινοκοκκίαση	46**	41**
Τριχίνωση	0	0
Γιαρδίαση	65	73

* κρούσματα επιβεβαιωμένα από μικροβιολογικά εργαστήρια, ** κρούσματα επιβεβαιωμένα από υγειονομικές αρχές

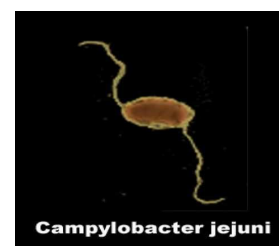
Τα κυριότερα παθογόνα βακτήρια που μπορούν να ανευρεθούν στα προϊόντα πουλερικών, είναι τα εξής :

2.3.1 *Campylobacter* spp.

Τα βακτήρια του γένους *Campylobacter* spp., θεωρούνται υπεύθυνα για την εμφάνιση σποραδικών κρουσμάτων γαστρεντερίτιδας, με το *Campylobacter jejuni* να κατέχει την πρώτη θέση ανάμεσα στα υπόλοιπα.

Χαρακτηριστικά:

- Αρνητικό κατά Gram ραβδόμορφο βακτήριο
- Μικροαερόφιλο: ανάπτυξη σε συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας σε οξυγόνο (3-5% O₂/ 5-10% CO₂)
- Ευαίσθητο στην θέρμανση
- Δεν αναπτύσσεται σε τρόφιμα με χαμηλή οξύτητα
- Επιβιώνει αλλά δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία ψύξης και κατάψυξης
- Θερμοκρασιακά όρια ανάπτυξης: 25-42 °C



Τα νωπά και ημιμαγειρεμένα προϊόντα κρέατος πουλερικών είναι οι κύριες πηγές ανεύρεσης του συγκεκριμένου βακτηρίου. Μάλιστα, το 98% των προϊόντων πουλερικών που είναι διαθέσιμα στο εμπόριο έχουν βρεθεί επιμολυσμένα με *Campylobacter* spp. (Mor-Mur & Yuste, 2010). Το *Campylobacter jejuni* προσβάλλει το εντερικό σύστημα των

ζωντανών κοτόπουλων, τα οποία και είναι δυνατό να μην παρουσιάζουν κανένα σύμπτωμα μόλυνσης, ακόμη και αν ο πληθυσμός του βακτηρίου είναι πολύ υψηλός. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τον υψηλό χρόνο εκτροφής των πουλερικών (43 ημέρες), μπορεί να οδηγήσει σε εξάπλωση της επιμόλυνσης στα ορνιθοτροφεία (Sahin et al., 2001). Οι περισσότερες περιπτώσεις Καμπυλοβακτηρίωσης οφείλονται στην κατανάλωση προϊόντων πουλερικών που έχουν παραχθεί από την έλλειψη καταλλήλων και ικανοποιητικών συνθηκών υγιεινής. Η δόση που μπορεί να προκαλέσει ασθένεια είναι μόλις 500 κύτταρα (infectious dose), και τα συμπτώματα είναι διάρροια, μυϊκοί πόνοι, πυρετός, ναυτία, εμετός, 2-7 ημέρες μετά την κατανάλωση. Μεγάλος χρόνος επώασης (1-6 εβδομάδες) στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο κεντρικό νευρικό σύστημα (σύνδρομο Guillain-Barre, αρθρίτιδα).

2.3.2 *Arcobacter* spp.

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Arcobacter* spp. είναι αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα, με ικανότητα να αναπτύσσονται σε αερόβιο και μικροαερόφιλο περιβάλλον και θερμοκρασίες 15-42 °C. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι του γένους είναι τα είδη: *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* και *A. nitrofigilis* (Ho et al., 2006). Το είδος *A. butzleri* μπορεί να βρεθεί στο πόσιμο νερό, σε προϊόντα κόκκινου κρέατος, ενώ το φρέσκο κρέας πουλερικών ή/και τα προϊόντα αυτών αποτελούν την κυριότερη πηγή επιμόλυνσης (Mor-Mur & Yuste, 2010).

Χαρακτηριστικά:

- Gram-αρνητικό βακτήριο
- Ανάπτυξη σε αερόβιες + μικροαερόφιλλες συνθήκες
- Ευαίσθητο στη θέρμανση (> 40 °C)
- Αναπτύσσεται σε pH 5.0-8.5
- Επιβιώνει αλλά δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασία ψύξης
- Θερμοκρασία ανάπτυξης: 15 °C- 40 °C



Arcobacter butzleri

Η επιμόλυνση των προϊόντων πουλερικών με το *A. butzleri*, μπορεί να προέρχεται από διάφορα στάδια της επεξεργασίας κατά την αλυσίδα παραγωγής τους, και οι ασθένειες που μπορεί να προκαλέσει είναι διαρροϊκό σύνδρομο (υδαρή διάρροια, κοιλιακοί πόνοι, ναυτία εμετός) ενώ μπορεί να οδηγήσει σε εκδήλωση βακτηριαιμίας και σηψαιμίας (Ho et al., 2006, Fisher et al., 2007).

Μέτρα πρόληψης για τον καταναλωτή (για *Campylobacter spp.* και *Arcobacter spp.*):

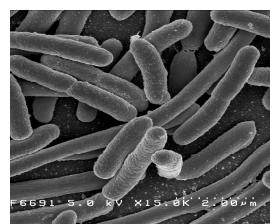
Ψήσιμο προϊόντων κοτόπουλου ή κόκκινου κρέατος ωσότου η εσωτερική θερμοκρασία φτάσει τους 73.8 °C, όχι κατανάλωση προϊόντων πουλερικών που δεν έχουν ψηθεί αρκετά, διαχωρισμός νωπών προϊόντων από ψημένα, καλό πλύσιμο εργαλείων/πάγκων κοπής κρεάτων, όχι κατανάλωση μη παστεριωμένου γάλακτος και μη-χλωριωμένου νερού.

2.3.3 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)

Το βακτήριο *Escherichia coli* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και μπορεί να επιμολύνει τα προϊόντα κρέατος και πουλερικών, κατά τη διάρκεια της σφαγής και άλλων σταδίων της επεξεργασίας τους (Juneja & Marmer, 1999). Έχει απομονωθεί από χάμπουργκερ, μπιφτέκια, ροσμίφ, κεφτεδάκια, ρολά γαλοπούλας, γαλακτοκομικά προϊόντα, φρέσκα φρούτα και λαχανικά (Meng & Doyle, 1998; Juneja & Marmer, 1999; WHO, 2010b).

Χαρακτηριστικά:

- Αρνητικό κατά Gram βακτήριο της οικογένειας *Enterobacteriaceae*)
- Προαιρετικά αναερόβιο
- Αναπτύσσεται σε pH >4.0-4.5
- Θερμοκρασία ανάπτυξης: 7 °C- 50 °C (βέλτιστη 37 °C)
- Παράγει Shiga-like τοξίνη (verotoxin)
- Θανατώνεται σε θερμοκρασία >70 °C



Escherichia coli

Η κατανάλωση τροφίμων, επιμολυσμένων με μικρό αριθμό κυττάρων (<100 cells) είναι ικανή να προκαλέσει διαρροϊκό σύνδρομο (σπάνια πυρετός) στο γενικό πληθυσμό, αλλά σε νεογνά, ηλικιωμένους και παιδιά μπορεί να προκαλέσει σοβαρής μορφής ασθένεια, την αιμορραγική κολίτιδα (νεφρική ανεπάρκεια, αναιμία, θρομβοκυτοπενία).

Μέτρα πρόληψης για τον καταναλωτή (CDC, 2009): Ψήσιμο των τροφίμων ωσότου η εσωτερική θερμοκρασία φτάσει τους 70 °C, χρησιμοποίηση νέων καλλιεργειών κατά την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης (γιαούρτι, σαλάμι κ.λ.π.), αποφυγή κατανάλωσης προϊόντων από μη παστεριωμένο γάλα, ή μη παστεριωμένων χυμών, καλό πλύσιμο χεριών, πάγκων, εργαλείων κοπής μετά το χειρισμό νωπών προϊόντων κρέατος.

2.3.4 *Staphylococcus aureus*

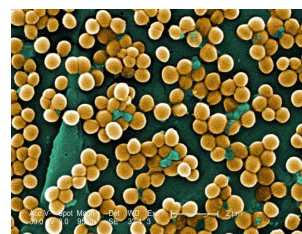
Ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα βακτήριο που ζει στο ανθρώπινο σώμα ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας της ρινικής κοιλότητας και της περιοχής που περιβάλλει τα γεννητικά όργανα και των δύο φύλων (Hawley et al., 2004). Συνεπώς, η εξάπλωση του συγκεκριμένου βακτηρίου είναι πολύ πιθανή, αν τα άτομα που χειρίζονται τα τρόφιμα είναι φορείς του, και δεν τηρούν τους απαραίτητους κανόνες υγιεινής (χρήση γαντιών, μάσκες προσώπου, ειδικά σκουφιά και καλό πλύσιμο των χεριών).

Σύμφωνα με τους Abdullahi et al. (2006), ο *Staphylococcus aureus* μπορεί να εισέλθει στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης και συνεπώς να τα επιμολύνει, κατά την επεξεργασία τους στην αλυσίδα βιομηχανικής παραγωγής, κατά τη μεταφορά τους στα κέντρα λιανικής πώλησης (κακός χειρισμός των τροφίμων από τους μεταφορείς) είτε κατά την εμπορική τους διάθεση.

Ωστόσο, αν και το ανθρώπινο σώμα είναι η σημαντικότερη πηγή προέλευσης του συγκεκριμένου βακτηρίου, έχει απομονωθεί και από το στήθος αγελάδων με μαστίτιδα, και από το δέρμα χοίρων, κοτόπουλων και γαλόπουλων (<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Staphylococcus-aureus.pdf>).

Χαρακτηριστικά:

- Θετικό κατά Gram βακτήριο (κόκκοι)
- Άριστη ανάπτυξη υπό αερόβιες συνθήκες, αλλά μπορεί και αναερόβια
- Αναπτύσσεται σε pH: 4.2-9.3 (άριστο 7.0-7.5)
- Θερμοκρασία ανάπτυξης: 7 °C- 48 °C (βέλτιστη 37 °C)
- Δυνατότητα ανάπτυξης σε χαμηλές τιμές a_w και σε μεγάλη περιεκτικότητα άλατος
- Βλαστικά κύτταρα θανατώνονται σε $\theta >70^\circ\text{C}$
- Τοξίνη θερμοανθεκτική!



Staphylococcus aureus

Το βακτήριο *Staphylococcus aureus* διαθέτει την ικανότητα παραγωγής πολλών και διαφορετικών τοξινών (Protein A, Εντεροτοξίνες A-E με αντοχή σε θέρμανση 60 °C, για 10 min, TSST-1 που οδηγούν σε σύνδρομο τοξικού σοκ, Coagulases, Cytolytic Staphylococcal alpha τοξίνη) που οδηγούν σε διάφορες ασθένειες. Ωστόσο, τα περισσότερα κρούσματα τροφολοξινώσεων, οφείλονται κυρίως στην κατανάλωση τροφίμων στα οποία έχει προηγηθεί η παραγωγή των εντεροτοξινών A-E. Τα συμπτώματα εμφανίζονται μόλις 2-6 ώρες μετά την κατανάλωση του επιμολυσμένου τροφίμου και περιλαμβάνουν ναυτία, κοιλιακούς πόνους, εμετό και διάρροια (Noah, 2005). Προϊόντα κρέατος που έχουν συνδεθεί με την πρόκληση σταφυλοτοξίνωσης:

γιαούρτι, σάντουιτς με ζαμπόν ή γαλοπούλα, κρέατα σε κονσέρβα, μπιφτέκια, πατατοσαλάτα, κοτοσαλάτα, λαζάνια (<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Staphylococcus-aureus.pdf>).

Μέτρα πρόληψης για τον καταναλωτή (CDC, 2009): Καλό πλύσιμο των χεριών με σαπούνι και νερό, πριν το χειρισμό τροφίμων. Αποφυγή χειρισμού τροφίμων αν το άτομο έχει πληγές, εγκαύματα, ρινική ή οφθαλμική μόλυνση. Συντήρηση τροφίμων σε θερμοκρασία < 5 °C ή > 60 °C, απολύμανση πάγκων και εργαλείων κοπής τροφίμων, καλή προσωπική υγιεινή.

2.3.5 *Clostridium* spp.

Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στο γένος *Clostridium* spp. είναι θετικά κατά Gram και σπορογόνα βακτήρια. Τα βακτήρια *Clostridium botulinum* (proteolytic, non-proteolytic) και *Clostridium perfringens* είναι εκείνα που έχουν συνδεθεί περισσότερο με την επιμόλυνση τροφίμων. Αναπτύσσονται αυστηρά κάτω από αναερόβιες συνθήκες, για αυτό και τα τρόφιμα τα οποία παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη πιθανότητα επιμόλυνσης είναι εκείνα που συντηρούνται υπό συσκευασία κενού ή MAP χαμηλής περιεκτικότητας σε οξυγόνο (Peck et al., 2008). Το πρωτεολυτικό *C. botulinum* παράγει τοξίνες A, B, F και αναπτύσσεται σε θερμοκρασία >10-12 °C, ενώ το μη-πρωτεολυτικό (non-proteolytic) αναπτύσσεται και παράγει τοξίνη ακόμη και στους 3.3 °C (Peck et al., 2008). Ωστόσο και τα δυο στελέχη έχουν εμπλακεί σε τροφοτοξινώσεις που προκλήθηκαν από την κατανάλωση τροφίμων που δεν είχαν συντηρηθεί σωστά (υψηλή θερμοκρασία συντήρησης, μεγάλος χρόνος συντήρησης) με αποτέλεσμα την παραγωγή τοξίνης σε αυτά.

<i>Clostridium botulinum</i> group						
	I	II	III	IV	<i>C. botitii</i>	<i>C. butyricum</i>
Τύπος τοξίνης	A, B, F	B, E, F	C, D	G	F	E
Θερμοκρασία ανάπτυξης (°C)						
Βέλτιστη	35-40	18-25	40	37	30-37	30-45
Ελάχιστη	12	3.3	15			10

Κυριότερα παραδείγματα τροφίμων-αιτία εμφάνισης τροφοτοξίνωσης (Peck et al., 2008): γιαούρτι με ξηρούς καρπούς (τοξίνη προσχηματισμένη στα αμύγδαλα), ψάρι ψημένο στα κάρβουνα (υψηλή θερμοκρασία συντήρησης), σάλτσα τυριού (τοξίνη από τυρί

που είχε προέλθει από κονσέρβα σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία συντήρησης), σκορδαλιά και μελιτζανοσαλάτα (τοξίνη στις πατάτες), καπνιστός σολομός σε συσκευασία κενού (κατανάλωση μετά την ημερομηνία λήξης), οργανικό χούμους (υψηλός χρόνος+θερμοκρασία συντήρησης).

Η ασθένεια που μπορεί να προκύψει από την κατανάλωση τροφίμων στα οποία προηγήθηκε ο σχηματισμός τοξίνης ονομάζεται αλλαντίαση. Τα συμπτώματα ξεκινούν εντός διαστήματος 18-36 ωρών και περιλαμβάνουν αδυναμία, ναυτία ή εμετός, θλωμένη όραση, διάρροια, παροδική παράλυση (Nantel, 1999).

Μέτρα πρόληψης από τον καταναλωτή (CDC, 2009): Θερμική επεξεργασία όλων των προϊόντων που προέρχονται από κονσέρβες (βρασμός για 10 λεπτά), αποφυγή κατανάλωσης προϊόντων κρέατος που δεν έχουν υποστεί κατάλληλη θερμική επεξεργασία ή έχουν επαναξεσταθεί (πίτες, σάλτσες, σούπες από κοτόπουλο, βοδινό ή γαλοπούλα), συντήρηση μαγειρεμένου φαγητού σε θερμοκρασία >60 °C, προ κατανάλωσης, όχι κατανάλωση μελιού από παιδιά μικρότερα του ενός έτους (σπόροι επιβιώνουν στο μέλι).

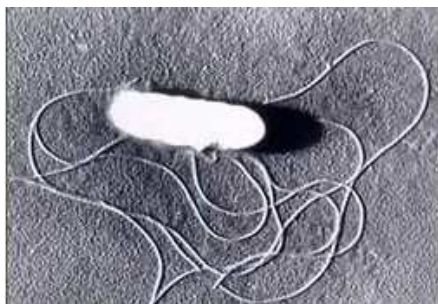
2.3.6 *Listeria spp.-Listeria monocytogenes*

2.3.6.1 Είδη του γένους *Listeria*

Στο γένος *Listeria* ανήκουν επτά είδη και είναι τα εξής: α) *Listeria monocytogenes*, β) *L. seligeri*, γ) *L. ivanovii*, δ) *L. innocua*, ε) *L. welshmeri*, στ) *L. grayi* και ζ) *L. murrayi*. Από αυτά, παθογόνα για τον άνθρωπο είναι μόνο η *Listeria monocytogenes*. Όλα τα είδη έχουν απομονωθεί από τρόφιμα, το περιβάλλον (έδαφος, φυτά, νερό κ.α.), τα ζώα, τα πτηνά, τα ψάρια, από το κρέας τους, από το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Αρσένη, 1994).

2.3.6.2 Χαρακτηριστικά και ιδιότητες του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, μη σπορογόνο, που μετατρέπεται γρήγορα σε πλειομορφικό ραβδοειδές με στρογγυλεμένα άκρα. Μπορεί να αναπτυχθεί υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Lungu et al., 2009, <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>). Έχει λίγες (1-5) βλεφαρίδες με τις οποίες κινείται με τρομώδη κίνηση όταν αναπτύσσεται στους 20-25 °C και παραμένει ακίνητη στους 35-37 °C (Εικόνα 2.6).



Εικόνα 2.6: Η *L. monocytogenes* έτσι όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο. Διακρίνεται το κυλινδρικό της σχήμα καθώς και οι βλεφαρίδες της.

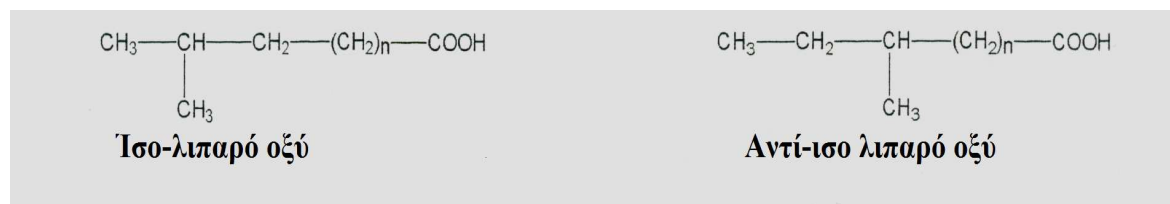
• **Επίδραση θερμοκρασίας στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* :**

Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης είναι μεταξύ 30 °C και 37 °C (FSAI, 2007). Η *L. monocytogenes* είναι ένα ψυχρότροφο βακτήριο και ως κατώτερο θερμοκρασιακό όριο ανάπτυξης έχουν αναφερθεί οι εξής τιμές: -1.5 (FSAI, 2007; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>), -0.4 °C (Walker et al., 1990), 0 °C (Lungu et al, 2009), 1 °C (Farber 1991), 2-4 °C (Gandhi et al., 2007), 2.5 °C (Datta, 2004), ενώ ως ανώτερο έχει αναφερθεί η τιμή των 44-45 °C (Datta, 2004; Gandhi et al., 2007, FSAI, 2007; Lungu et al, 2009).

Σύμφωνα με τους Datta (2004), η *L. monocytogenes* επιβιώνει αλλά σπάνια αναπτύσσεται σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 0 °C. Ωστόσο, σύμφωνα με την έρευνα των Datta & Wentz (1989), ένα μαλακό τυρί Μεξικάνικου τύπου βρέθηκε επιμολυσμένο με μεγάλο πληθυσμό της *L. monocytogenes* (10⁶ CFU/g) ακόμη και μετά την συντήρηση στους -70 °C για διάστημα 3 ετών. Επίσης η Food Safety Authority of Ireland (FSAI, 2007) αναφέρει ικανότητα επιβίωσης αλλά όχι ανάπτυξης του βακτηρίου στους -18 °C. Γενικά, η επιβίωση του βακτηρίου σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης εξαρτάται από την περιεχόμενη υγρασία, το pH, τα θρεπτικά συστατικά και τον συντελεστή ενεργού ύδατος. Σχετικά με την ικανότητα επιβίωσης και ανάπτυξης του βακτηρίου σε χαμηλές θερμοκρασίες (<7 °C) έχουν διατυπωθεί διάφοροι μηχανισμοί:

α) Μεταβολές στην δομή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Μείωση της θερμοκρασίας επιφέρει σημαντική μεταβολή στην λιπιδική σύσταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του βακτηρίου, προκειμένου να διατηρήσει την ρευστότητα που απαιτείται για την σωστή λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων της και την μεταφορά των θρεπτικών συστατικών διαμέσω αυτής (Gandhi et al., 2007). Η επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του βακτηρίου είναι πλούσια σε λιπαρά

οξέα που φέρουν διακλαδώσεις (μεθυλ-ομάδες) στην ανθρακική τους αλυσίδα (branched) με σημαντικότερα από αυτά τα αντι-ισο (anteiso) λιπαρά οξέα.



Τα αντι-ισο 15:0 και 17:0 αποτελούν πάνω από το 90% των λιπαρών της οξέων. Σύμφωνα με τους Anpous et al. (1997), μείωση της θερμοκρασίας από τους 20°C στους 5 °C οδήγησε σε μείωση των λιπαρών οξέων C_{17:0} και αύξηση των C_{15:0}, με ταυτόχρονη μετάβαση από την μορφή iso (iso) σε αντι-ισο. Αυτός ο περιορισμός του μέσου μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων μειώνει τη θερμοκρασία τήξης τους και συνεπώς διατηρεί τη ρευστότητα της μεμβράνης σε χαμηλή θερμοκρασία. Αυτές οι μεταβολές συντέλεσαν στην διατήρηση των λειτουργιών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης σε χαμηλή θερμοκρασία (Beales, 2004).

β) Παραγωγή πρωτεϊνών ψυχρής επίπληξης (cold-shock)

Η *L. monocytogenes* παράγει πρωτεΐνες ψυχρής επίπληξης (cold-shock), οι οποίες την βοηθούν να προσαρμόζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης. Σύμφωνα με τον Beales (2004) κατά την ανάπτυξη του βακτηρίου στους 5 °C παρατηρήθηκε η παραγωγή 12 διαφορετικών ειδών πρωτεϊνών cold-shock. Επιπρόσθετα, προσαρμογή σε χαμηλή θερμοκρασία αυξάνει την έκφραση των γονιδίων που αποκωδικοποιούν την παραγωγή ενζυμικών συστημάτων (Liu et al., 2002).

γ) Συσσώρευση ουσιών με ψυχο-προστατευτική δράση (cryoprotectants)

Σε χαμηλή θερμοκρασία, η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να συσσωρεύει στα κύτταρά της ενώσεις με ψυχο-προστατευτική δράση (cryoprotectants) όπως βεταΐνες και καρνιτίνη (Gandhi et al., 2007).

• Επίδραση NaCl και pH στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* :

Η *L. monocytogenes* είναι αξιοσημείωτα ανθεκτική στη δράση του NaCl. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη του βακτηρίου σε θρεπτικό μέσο με περιεκτικότητα σε NaCl μεγαλύτερη από 12%. Η *Listeria* μπορεί να αναπτυχθεί σε περιοχή pH από 4.1 έως 9.6 αλλά καλύτερη ανάπτυξη εμφανίζεται μεταξύ pH 6.0 και 8.0. Γενικά, το ελάχιστο pH ανάπτυξης του βακτηρίου εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης, τη σύσταση του θρεπτικού υλικού, την ενεργότητα νερού, την οσμωτική πίεση και την παρουσία

αναστολέων (Cole et al., 1990). Όπως και με τη θερμοκρασία, η λιπιδική σύσταση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μπορεί να καθοριστεί από το pH του μέσου ανάπτυξης και πιθανόν αντιπροσωπεύει μια διαδικασία προσαρμογής σε χαμηλό pH. Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε χαμηλό pH παρουσιάζουν μείωση του λόγου των ακόρεστων προς τα κεκορεσμένα λιπαρά οξέα με ταυτόχρονη αύξηση του ποσού των κυκλοπροπανικών λιπαρών οξέων. Η μεταβολή αυτή οδηγεί σε μείωση της ρευστότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης προστατεύοντας το κύτταρο από το χαμηλό pH (Beales, 2004).

- **Επίδραση συσκευασίας στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*:** Η σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί την τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) και την συσκευασία κενού (VP) για την καθυστέρηση της ανάπτυξης αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης. Ωστόσο, η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε συνθήκες χαμηλής ή μηδενικής περιεκτικότητας σε οξυγόνο. Οι Jydegaard-Axelsen et al. (2004) αναφέρουν ότι κατά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε ατμόσφαιρα 100% CO₂ ή 100% N₂ παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που αποκωδικοποιούν την παραγωγή του ενζύμου της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (GAD) που τη βοηθά να προσαρμόζεται σε αντίξοες συνθήκες. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Buchanan & Klawitter (1990) οι οποίοι αναφέρουν ότι ο περιορισμός του διαθέσιμου οξυγόνου κατά τη μελέτη της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (Scott A) στους 19 °C, βοήθησε το βακτήριο να επιδιορθώσει τις κυτταρικές του βλάβες (από την επίδραση χαμηλού pH), και αύξησε την ικανότητα επιβίωσής του σε σχέση με τις αερόβιες συνθήκες. Τέλος, οι Buchanan & Phillips (1990) αναφέρουν ότι το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο προσαρμόστηκε με ευκολία σε μικροαερόφιλες συνθήκες και ότι ο περιορισμός του διαθέσιμου οξυγόνου βελτίωσε την ικανότητα του να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες. Γενικά, η *L. monocytogenes* έχει αποδειχτεί αρκετά ανθεκτική σε συγκέντρωση 50-80% CO₂ (Ingham et al., 1990).

2.3.6.3 Σύνδρομο Λιστερίωσης στον άνθρωπο

Με τον όρο Λιστερίωση αποδίδονται συνολικά οι μολύνσεις λιστερικού τύπου γνωστές από το 1891. Η *Listeria* είναι παθογόνος για τον άνθρωπο και το μεγαλύτερο ποσοστό Λιστερίωσης εμφανίζεται σε άτομα, που φέρουν ασθένειες οι οποίες οδηγούν σε

αποδυνάμωση της κυτταρικής ανοσοαπόκρισης όπου μετέχουν τα T-λεμφοκύτταρα (Roitt et al., 1995).

Η Λιστερίωση διακρίνεται σε:

1) Λιστερίωση νεογνών (*granulomatosis infantiseptica*), που εκδηλώνεται κυρίως με μηνιγγίτιδα και σηψαιμία. Η μόλυνση του νεογνού μπορεί να είναι ενδομήτρια από κατάποση αμνιακού υγρού αλλά μπορεί και να έγινε κατά τον τοκετό από τον κόλπο της μητέρας (Hawley et al., 2004).

2) Λιστερίωση εγκύων γυναικών, που εμφανίζεται σαν ελαφριά εμπύρετη νόσος με διάρροια στην έναρξή της, που μοιάζει με γρίπη. Το έμβρυο μολύνεται, νοσεί με αποτέλεσμα την αποβολή του κατά τους πρώτους μήνες της εγκυμοσύνης. Άλλη έκβαση είναι η γέννηση νεκρού παιδιού ή ο πρόωρος τοκετός.

3) Λιστερίωση των ανοσοκατεσταλμένων, όπου προκαλεί ποικίλες λοιμώξεις με κυριότερες την εμφάνιση σηψαιμίας (septicemia) και μηνιγγίτιδας (meningitis). Οι πιο ευπαθείς είναι οι ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση και οι καρκινοπαθείς. Χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό θνησιμότητας (20-30%, FSAI, 2007).

4) Λιστερίωση των υγιών ενηλίκων και παιδιών. Εμφανίζεται κυρίως τους καλοκαιρινούς μήνες και στους υγιείς ενηλίκους ή παιδιά είναι συνήθως ασυμπτωματική (Hawley et al., 2004, WHO 2010a). Ωστόσο, ορισμένες φορές μπορεί να εκδηλωθεί με διάρροια και μυαλγία (FSAI, 2007). Η λιστερίωση στους ενήλικες σπάνια εκδηλώνεται ως πνευμονία, πνευμονίτιδα, πλευρίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, ενδοκαρδίτιδα ή περιτονίτιδα.

Η Λιστερίωση νεογνών, εγκύων, ανοσοκατεσταλμένων συνήθως εμφανίζεται μετά από κατανάλωση 100-1000 cells/g (infectious dose) ενώ στην περίπτωση της Λιστερίωσης των υγιών ενηλίκων η ελάχιστη δόση είναι αρκετά μεγαλύτερη ($>10^5$ cells/g, <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>).

Μέτρα πρόληψης για τον μέσο καταναλωτή (υγιείς ενήλικες και παιδιά) (CDC, 2009): Ψήσιμο νωπών προϊόντων ζωϊκής προέλευσης (μοσχάρι, κοτόπουλο, χοιρινό) σε (εσωτερική) θερμοκρασία >70 °C, πλύσιμο φρέσκων λαχανικών, αποφυγή κατανάλωσης προϊόντων από μη παστεριωμένο γάλα, πλύσιμο χεριών, μαχαιριών, πάγκων κοπής που ήρθαν σε επαφή με νωπά τρόφιμα, κατανάλωση έτοιμου φαγητού το συντομότερο μετά το άνοιγμα της συσκευασίας τους/προετοιμασία τους.

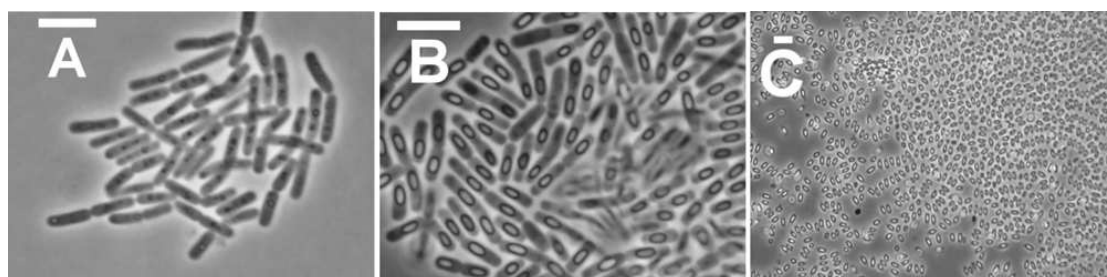
Μέτρα πρόληψης για καταναλωτές που ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου (εγκυμονούσες, ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς): Αποφυγή κατανάλωσης hot dogs, luncheon meats, deli meats, μαλακών τυριών όπως φέτα, Brie, blue cheese και τυριών

μεξικανικού τύπου (queso blanco, queso fresco, Panela) εκτός αν στην συσκευασία αναγράφεται ότι προέρχονται από παστεριωμένο γάλα, όχι κατανάλωση râté (ή ανάλογων αλειμμάτων) και καπνιστών ψαριών

2.3.7 *Bacillus cereus*

2.3.7.1 Γενικά χαρακτηριστικά του *Bacillus cereus*-Πηγές προέλευσης

Ο *Bacillus cereus* είναι ένα θετικό κατά Gram ραβδόμορφο σπορογόνο βακτήριο που ανήκει στο γένος *Bacillus* spp. και ορισμένα στελέχη του έχουν την ικανότητα παραγωγής εντεροτοξίνης ή/και εμετικής τοξίνης (Whyte & Wong, 2004). Ο *B. cereus* είναι ένα βακτήριο πολύ διαδεδομένο στην φύση, εφόσον απαντά στο φυσικό περιβάλλον (έδαφος, χώμα, φυτά) και στα τρόφιμα όπως το παστεριωμένο και μη γάλα, τα προϊόντα κρέατος (νωπά και μη), τα φρέσκα λαχανικά (καρότα, πράσινες πιπεριές, τομάτες κ.α.), τα γεύματα έτοιμα προς κατανάλωση που αποτελούνται από λαχανικά, γεύματα υψηλής διάρκειας συντήρησης υπό ψύξη (μαγειρεμένα ή μη), βρεφικές τροφές, μπαχαρικά και βότανα, και αμυλούχα τρόφιμα όπως βρασμένο ρύζι, μακαρόνια, πατάτες (Batt, 1999; Mahakarnchanakul 1999; Thorsen et al., 2009; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf>).



Εικόνα 2.7: Μικροσκοπικές εικόνες του *B. cereus* (5 μm) Α) Βλαστικά κύτταρα «συνωστισμένα» (aggregated) στην στατική φάση ανάπτυξης Β) Βλαστικά κύτταρα «συνωστισμένα» (aggregated), στην αρχή της σπορογονίας, C) σπόροι του *B. cereus* (ολοκλήρωση σπορογονίας).

Η παρουσία του βακτηρίου στα νωπά προϊόντα πουλερικών οφείλεται κυρίως σε ανθεκτικούς σπόρους του μικροοργανισμού, που προέρχονται από τα αγροκτήματα αναπαραγωγής ή επιμόλυνση κατά την σφαγή. Επίσης, τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την τροφή του κοτόπουλου, έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να περιέχουν *B. cereus* (Floristean et al., 2007). Το πέρασμα των προϊόντων πουλερικών από διάφορα στάδια επεξεργασίας της αλυσίδας παραγωγής τους (αποστέωση, τεμαχισμός, προσθήκη καρυκευμάτων ή λαχανικών, πανάρισμα κ.λ.π) αυξάνει σημαντικά την

πιθανότητα και την συχνότητα εμφάνισης του βακτηρίου (βλαστικών κυττάρων και σπόρων) η οποία οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων: την επιβίωση των σπόρων από τα νωπά (ολόκληρα) πουλερικά, των σπορίων από τα συστατικά που προστίθενται στα προϊόντα κρέατος (καρυκεύματα, λαχανικά, πρωτεϊνικά συμπληρώματα), και σε επιμόλυνση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (Valero 2002; Floristean et al., 2007). Επίσης, τα υλικά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων μπορεί να αποτελέσουν πηγή ανεύρεσης του *B. cereus* (Pirttijarvi et al., 2000).

• Επίδραση θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του *B. cereus*:

Το κατώτερο θερμοκρασιακό όριο ανάπτυξης του *B. cereus* είναι οι 4-5 °C (Granum et al., 1991; Mahakarnchanakul 1999; Batt 1999; Whyte & Wong, 2004; FSAI, 2007; Enfors, 2008; Thorsen et al., 2009; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf>), ενώ το ανώτερο είναι 48-55 °C (Batt, 1999; Whyte & Wong, 2004; FSAI, 2007). Ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης έχουν αναφερθεί οι 30-37 °C (Zwietering et al., 1996, <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf>) και 28-35 °C (Batt, 2004). Αξίζει να σημειωθεί ότι ψυχρότροφα στελέχη του μικροοργανισμού που έχουν απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα εμφανίζουν χαμηλότερη ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (0-2 °C, Zwietering et al., 1996; Fernandes et al., 2008). Έως και το έτος 1990, τα στελέχη του συγκεκριμένου βακτηρίου είχαν χαρακτηριστεί ως μεσόφιλα, με ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 7-7.5 °C (Mahakarnchanakul & Beuchat, 1999). Ωστόσο, η επιδημιολογική έρευνα των Van Netten et al. (1990) που πραγματοποιήθηκε στην αγορά τροφίμων της Ισπανίας και Ολλανδίας, ανέτρεψε την άποψη που επικρατούσε μέχρι τότε. Συγκεκριμένα, οι Van Netten et al. (1990) απομόνωσαν διάφορα στελέχη του *B. cereus* από τρόφιμα που είχαν συνδεθεί με την πρόκληση τροφοτοξινώσεων στους καταναλωτές, και παρατήρησαν ότι ορισμένα από αυτά μπορούσαν να αναπτυχθούν και να παράγουν εντεροτοξίνη, μετά από συντήρηση στους 4 °C, για 7 ημέρες. Τα στελέχη αυτά προέρχονται από παστεριωμένο γάλα, μπακαλιάρο, και pate. Επίσης, οι Griffith & Phillips (1990) αναφέρουν ότι το 50% των στελεχών του *B. cereus* που απομονώθηκαν από δεξαμενές γάλακτος επέδειξαν ανάπτυξη στους 2 °C. Σύμφωνα με τους Mahakarnchanakul & Beuchat (1999) και Brussole et al. (2010) η προσαρμογή των κυττάρων του *B. cereus* σε συνθήκες χαμηλής ή υψηλής θερμοκρασίας, είναι δυνατή μέσω την δημιουργίας πρωτεϊνών hot/cold shock. Επίσης, σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης, τα κύτταρα του *B. cereus* προσαρμόζουν την ρευστότητα της κυτταροπλασματικής

μεμβράνης αυξάνοντας την αναλογία των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων και μειώνοντας παράλληλα το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας. Επίσης αυξάνουν την ποσότητα των ακόρεστων λιπαρών οξέων και ιδιαίτερα των anteiso (Brussole et al., 2010).

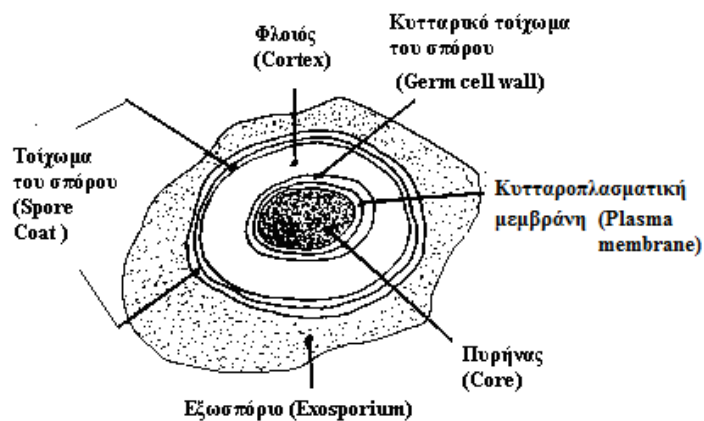
● **Επίδραση NaCl/pH/ a_w στην ανάπτυξη του *B. cereus*:** Μπορεί να αναπτυχθεί σε περιοχή pH από 4.3-4.9 έως 9.3 με βέλτιστη τιμή το pH=6.5 (Zwietering et al., 1996, Batt, 1999, Whyte & Wong, 2004). Σε γενικές γραμμές, το βακτήριο μπορεί να αναπτυχθεί σε περιεκτικότητα NaCl έως και 7.5% και $a_w > 0.912-0.950$ (Batt et al., 1999, Whyte & Wong, 2004, <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf>). Οι σπόροι του *B. cereus* επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε πολύ χαμηλές τιμές ενεργότητας ύδατος. Η ανθεκτικότητα του βακτηρίου στο NaCl μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος (Mahakarnchanakul & Beuchat, 1999). Οι Peters et al. (1991) αναφέρουν ότι όσο αυξάνει η περιεκτικότητα σε άλατα ενός υποστρώματος ανάπτυξης του βακτηρίου, μειώνεται το θερμοκρασιακό εύρος της ανάπτυξής τους. Συγκεκριμένα, αύξηση της συγκέντρωσης του NaCl από 0.5% σε 1.5%, περιόρισε το εύρος θερμοκρασίας ανάπτυξης του *B. cereus* από 14-41 σε 21-39 °C. Συντήρηση τροφίμων με χαμηλή περιεκτικότητα σε NaCl σε χαμηλή θερμοκρασία, μπορεί να ευνοήσει σημαντικά την ανάπτυξη ψυχρότροφων στελεχών του βακτηρίου, εις βάρος της αυτόχθονης μικροχλωρίδας αλλοίωσης (Mahakarnchanakul & Beuchat, 1999).

● **Επίδραση συσκευασίας στην ανάπτυξη του *B. cereus*:** Το παθογόνο βακτήριο *B. cereus* παρουσιάζει βέλτιστη (άριστη) ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες, αλλά διαθέτει την ικανότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται απουσία οξυγόνου, δηλαδή υπό αναερόβιες συνθήκες. Ωστόσο, η παραγωγή τοξίνης και η ανάπτυξη του βακτηρίου γίνεται με μικρότερο ρυθμό από το βακτήριο του *B. cereus* σε αναερόβιο περιβάλλον (Whyte & Wong, 2004, <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf>). Η ανάπτυξη του *B. cereus* σε προϊόντα που είναι συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, εξαρτάται από την συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα (%) τις ιδιότητες του στελέχους του *B. cereus*, φάση ανάπτυξης (κύτταρα στην βλαστική φάση ή σπόροι), καθώς και από την θερμοκρασία συντήρησης. Η βλαστική (vegetative) ανάπτυξη των κυττάρων του *B. cereus* (αναπαραγωγή των κυττάρων του *B. cereus* χωρίς την παραγωγή σπόρων) μπορεί να παρεμποδιστεί από το διοξείδιο του άνθρακα, μέσω διεύθυνσής του στο εσωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την

μείωση του ενδοκυτταρικού pH και την αλληλεπίδραση του CO₂ με τα μεταβολικά και ενζυμικά συστήματα του κυττάρου (Thorsen et al. 2009).

2.3.7.2 Σπόροι του *B. cereus*

Υπό συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας σε θρεπτικά συστατικά, τα βλαστικά κύτταρα του *B. cereus* προβαίνουν στην διαδικασία της *σπορογονίας* (sporulation). Από τη στιγμή που ολοκληρώνεται η δημιουργία των βακτηριακών σπόρων το βακτηριακό βλαστικό κύτταρο παύει να υφίσταται (λύση του βλαστικού κυττάρου). Η σπορογονία είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, εφόσον κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και αυξημένης θρεπτικής διαθεσιμότητας, οι σπόροι μπορούν να επιστρέψουν στην αρχική μορφή βλαστικού κυττάρου (Μπεζιρτζόγλου, 2005). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *ενεργοποίηση* (activation). Η δομή των σπόρων του *B. cereus* παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.8**



Εικόνα 2.8: Η κυτταρική δομή των σπόρων του *B.cereus*

Σύμφωνα με την **Εικόνα 2.8**, η κυτταρική δομή των σπορίων του *B.cereus* αποτελείται από τις εξής βασικές περιοχές (από μέσα προς τα έξω):

1. Πυρήνας (Core): περιέχει DNA, ριβοσώματα, γλυκολυτικά ένζυμα και σύμπλοκα του Ca⁺² με το διπικολινικό οξύ (DPA). Επίσης περιέχει πρωτεΐνες οι οποίες υδρολύονται εύκολα προς αμινοξέα κατά την εκβλάστηση του σπόρου (Enforns, 2008). Η ύπαρξη των συμπλόκων του DPA με το Ca⁺² και τα ένζυμα της συνθετάσης του DPA και θερμοανθεκτικής καταλάσης προσδίδουν στο κύτταρο μεγάλη ανθεκτικότητα στην επίδραση θέρμανσης και ακτινοβολήσης (Μπεζιρτζόγλου, 2005).

2. Μεμβράνη πλάσματος (Plasma membrane): περιβάλλει τον πυρήνα των σπόρων και αποτελεί την κυτταροπλασματικά μεμβράνη του «εκκολαπτόμενου» βλαστικού κυττάρου κατά την εκβλάστηση. Βρίσκεται σε συσπειρωμένη κατάσταση εφόσον τα λιπίδια της είναι σχεδόν ακινητοποιημένα, σε αντίθεση με τα βλαστικά κύτταρα όπου εμφανίζεται να έχει μεγάλη ρευστότητα (Cowan et al., 2004). Παρουσιάζει πολύ μικρή διαπερατότητα με αποτέλεσμα να θωρακίζει το κύτταρο από την επίδραση χημικών συντηρητικών.

3. Κυτταρικό τοίχωμα του σπόρου (Germ cell wall): Αποτελείται αποκλειστικά από πεπτιδογλυκάνη της ίδιας μορφής με τα βλαστικά κύτταρα (Hawley et al., 2004).

4. Φλοιός (Cortex): αποτελείται από παχύ στρώμα ειδικά τροποποιημένης πεπτιδογλυκάνης (less-crosslinked) και προσδίδει θερμοανθεκτικότητα στο κύτταρο.

5. Τοίχωμα του σπόρου (Spore coat): περιβάλλει τον φλοιό (cortex) και αποτελείται από στρώμα κερατίνης. Προστατεύει την πεπτιδογλυκάνη που εμπεριέχεται στο Cortex από ενζυμικές επιθέσεις. Περιέχει ειδικά ένζυμα (πχ. λακκάσες) που ενεργοποιούνται όταν η μεταβολική δραστηριότητα του πυρήνα είναι μειωμένη. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του πυρήνα τροποποιώντας το μικροπεριβάλλον του σπορίου (Nicholson, 2004). Προστατεύει το κύτταρο από την επίδραση της ακτινοβολήσης, των χημικών συντηρητικών και των αντιοξειδωτικών (Riesenman & Nicholson, 2000; Genest et al., 2002; Kim et al., 2004).

6. Εξωσπόριο (Exosporium): Τέλος, το τοίχωμα του σπόρου περιβάλλεται από το εξωσπόριο, το οποίο είναι στην ουσία μια χαλαρή μεμβράνη που προσδίδει υδρόφοβο χαρακτήρα και προσκολλητικές ιδιότητες στο κύτταρο.

Το μέγεθος των σπόρων είναι αρκετά μικρότερο από αυτό των βλαστικών κυττάρων (0.36-0.65 μ μήκος, 1.0-1.5 μ πλάτος) και παρουσιάζουν τις εξής ιδιότητες αντοχής (Hawley et al., 2004; Μπεζιρτζόγλου 2005; Fernandes et al., 2009).

- Υψηλή ανθεκτικότητα στην επίδραση χημικών συντηρητικών όπως αλκοόλες και οξέα
- Αντοχή στην ακτινοβολήση (ακτίνες UV, X) και τις υπερπίεσεις
- Αντοχή σε πολλά αντισηπτικά και απολυμαντικά μέσα (πλην κοινής χλωρίνης η οποία καταστρέφει ολοκληρωτικά τους σπόρους)
- Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (αντιβιοτικά βακτηριοκτόνα για τα βλαστικά κύτταρα μπορεί να είναι βακτηριοστατικά για τους σπόρους)

- Θερμοανθεκτικότητα στους 80 °C, που οφείλεται στην παρουσία DPA και στην δημιουργία συμπλόκων με τα ιόντα Ca²⁺ (αφυδάτωση → αδιαπερατότητα περιβλημάτων, άνυδρος κατάσταση σπόρου)
- Τέλος, μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες απόλυτης έλλειψης θρεπτικών συστατικών για πολλές δεκαετίες

Η βλάστηση ή αλλιώς ενεργοποίηση (activation) των σπόρων μπορεί να λάβει χώρα κατά την επίδραση υποθανάτιας θερμικής επεξεργασίας (sub-lethal heat treatment), υψηλής πίεσης ή σε συνθήκες πολύ χαμηλού pH (Enfors, 2008). Σπόροι που είναι δύσκολο να ενεργοποιηθούν ονομάζονται “super dormant spores” και είναι πολύ δύσκολος ο διαχωρισμός τους από τα νεκρά σπόρια, εφόσον μόνο όταν ξεκινήσει η διαδικασία της βλάστησης αποδεικνύεται ότι δεν είχαν θανατωθεί (Enfors, 2008). Η ενεργοποίηση των σπόρων δεν οδηγεί σε ορατές μεταβολές της κυτταρικής δομής της σύστασης των σπορίων και της μεταβολικής δραστηριότητας. Η βλάστηση των σπόρων γίνεται με απόσπαση του Ca²⁺ από το DPA στο εσωτερικό του πυρήνα, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωση της αρνητικά φορτισμένης πεπτιδογλυκάνης του φλοιού και την συρρίκνωση της. Έτσι, καθίσταται δυνατή η εισροή μορίων ύδατος στον πυρήνα με αποτέλεσμα την διόγκωσή του. Η βλάστηση ενός σπόρου μπορεί να ολοκληρωθεί μόλις σε δυο λεπτά, αλλά η βλάστηση ενός συνόλου σπόρων μπορεί να διαρκέσει παραπάνω από 15 λεπτά. Η τελευταία φάση της βλάστησης καλείται «έκφυση» (outgrowth) και σημαίνει την ολοκλήρωση της επαναδημιουργίας του βλαστικού κυττάρου, με πλήρη ανάκτηση όλων των μεταβολικών λειτουργιών του

2.3.7.3 Παθογένεια

Το βακτήριο *B. cereus* έχει την ικανότητα παραγωγής δύο διαφορετικών ειδών τοξίνης που μπορεί να προκαλέσουν σοβαρή ασθένεια στον ανθρώπινο οργανισμό: την εντεροτοξίνη και την εμετική τοξίνη, που είναι υπεύθυνες για την πρόκληση διαρροϊκού και εμετικού συνδρόμου, αντίστοιχα.

α) Εμετικό σύνδρομο-Εμετική τοξίνη. Τα συμπτώματα του εμετικού συνδρόμου παρουσιάζονται 1-6 ώρες μετά την κατανάλωση τροφίμων στα οποία έχει προηγηθεί ο σχηματισμός εμετικής τοξίνης (Whyte & Wong, 2004; Noah, 2005) και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό και περιστασιακά διάρροια (infectious dose= 30 μg/Kg σωματικού βάρους). Η παραγωγή εμετικής τοξίνης έχει παρατηρηθεί μόνο από βλαστικά κύτταρα ορισμένων στελεχών του βακτηρίου (emetic strains, συγκέντρωση > 10⁵ CFU/g)

και όχι από τους σπόρους (FSAI, 2007). Ωστόσο, ενεργοποίηση των σπόρων που έχουν επιβιώσει της θερμικής επεξεργασίας (παστερίωση, ψήσιμο) των τροφίμων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή βλαστικών κυττάρων και κατά συνέπεια στην έκκριση της εμετικής τοξίνης. Αυτό το φαινόμενο συνήθως παρατηρείται μετά από παρατεταμένη συντήρηση των θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων σε υψηλή θερμοκρασία (Bhunia et al., 2008). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η εμετική τοξίνη έχει απομονωθεί από γεύματα εστιατορίων (ή άλλων ιδιωτικών χώρων) με υψηλή περιεκτικότητα αμύλου, όπως βραστό ρύζι, μακαρόνια και πατάτες (Thorsen et al., 2009) αλλά πρόσφατα απομονώθηκε και από βιομηχανικά επεξεργασμένα τρόφιμα όπως τυρί και μπέικον (Rajkovic et al., 2007).

Το μοριακό βάρος της εμετικής τοξίνης είναι 1.2 KDa και αποτελείται από αλληλουχία τεσσάρων διαφορετικών αμινοξέων (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃ που σχηματίζουν την τοξίνη “σερεουλίδη” (cereulide). Η τοξίνη cereulide έχει κυκλική δομή (δωδεκαδεψιπεπτίδιο, dodecadepsipeptide), έχει υδρόφοβο χαρακτήρα και εκκρίνεται από ένζυμα που απαντούν στα κύτταρα ορισμένων στελεχών του *B. cereus*. Η εμετική τοξίνη cereulide παρουσιάζει υψηλή θερμοανθεκτικότητα (μπορεί να επιβιώσει θερμικής επεξεργασίας 90 λεπτών στους 121 °C!) καθώς και αντοχή σε όξινες ή αλκαλικές συνθήκες (pH ανάπτυξης 2-11). Η μέγιστη παραγωγή εμετικής τοξίνης έχει παρατηρηθεί ύστερα από την επώαση του βακτηρίου στους 12 και 22 °C, κατά την φάση στασιμότητας των κυττάρων (Bhunia et al., 2008).

β) Διαρροϊκό σύνδρομο-Εντερική τοξίνη: Προκύπτει από την κατανάλωση υψηλού πληθυσμού βλαστικών κυττάρων ή σπόρων του *B. cereus*. Η εντερική τοξίνη δεν παράγεται απευθείας στο τρόφιμο όπως στην περίπτωση της εμετικής τοξίνης, αλλά στο εσωτερικού του εντερικού σωλήνα του ανθρώπινου σώματος από τα βλαστικά κύτταρα ή τους σπόρους. Συνεπώς όλα τα τρόφιμα στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί το συγκεκριμένο βακτήριο θεωρούνται επικίνδυνα. Επίσης, η παραγωγή εντεροτοξίνης δεν φαίνεται να περιορίζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης των τροφίμων, εφόσον πολλοί ερευνητές έχουν παρατηρήσει την έκκρισή της από ψυχρότροφα στελέχη (psychrotrophic strains) του *B. cereus* κατά την ανάπτυξή τους σε προϊόντα κοτόπουλου, κόκκινου κρέατος (beef gravy) ή γάλακτος κατά την συντήρηση στους 4 °C ή 8 °C (Christiansson, 1989; Van Netten et al., 1990; Beuchat, 1997; Jaquette & Beuchat, 1998). Η παραγωγή της εντεροτοξίνης από τα βλαστικά κύτταρα ή σπόρους του *B. cereus* ξεκινά στην εκθετική φάση ανάπτυξης και η μέγιστη συγκέντρωσή της παρατηρείται συνήθως κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων της στατικής φάσης (Ultee & Smid, 2001).

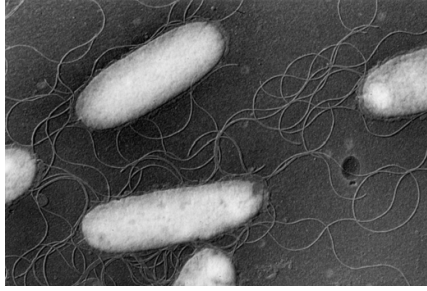
Όσον αφορά την κρίσιμη συγκέντρωση κυττάρων που μπορεί να προκαλέσει το διαρροϊκό σύνδρομο, σύμφωνα με τους Bhunia et al. (2008) κυμαίνεται μεταξύ 10^5 - 10^8 CFU/g. Ωστόσο, οι Grant et al. (1993), Mahakarnchanakul et al. (1999), Beuchat et al. (1997), FSAI (2007), και FDA (2009, <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook>) αναφέρουν ότι η ελάχιστη συγκέντρωση για την παραγωγή εντεροτοξίνης από το βακτήριο (βλαστικά κύτταρα και σπόροι) είναι η 10^6 CFU/g. Τα συμπτώματα του διαρροϊκού συνδρόμου εμφανίζονται 12 ώρες μετά την κατανάλωση του επιμολυσμένου τροφίμου και περιλαμβάνουν πόνους στην κοιλιακή χώρα, υδαρή διάρροια και περιστασιακά ναυτία (Whyte & Wong, 2004). Όλες οι εντεροτοξίνες είναι πρωτεϊνικής φύσης (Hemolysin-HBL, Nonhemolytic, Cytotoxin K) και έχουν χαμηλή θερμοανθεκτικότητα (αδρανοποίηση στους $56\text{ }^\circ\text{C}$ για 5 min)

Μέτρα πρόληψης για τον καταναλωτή (FSAI, 2007): Ψήσιμο όλων των τροφίμων σε τελική (εσωτερική) θερμοκρασία $>75\text{ }^\circ\text{C}$. Ωστόσο οι σπόροι είναι θερμοανθεκτικοί. Ιδιαίτερη προσοχή σε μαγειρεμένο ρύζι (επικίνδυνο για τον σχηματισμό εμετικής τοξίνης ή εντεροτοξίνης): υποβολή σε συντήρηση υπό ψύξη ($\theta \leq 5\text{ }^\circ\text{C}$) εντός 2 ωρών μετά την προετοιμασία του (ψήσιμο) ή διατήρηση σε θερμοκρασία $\geq 65\text{ }^\circ\text{C}$. Αποφυγή κατανάλωσης αφυδατωμένων προϊόντων τροφίμων που δεν έχουν συντηρηθεί σωστά.

2.3.8 *Salmonella* spp.

2.3.8.1 Γενικά χαρακτηριστικά - Πηγές προέλευσης

Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Salmonellae* είναι αρνητικά κατά Gram, προαιρετικά αναερόβια, μη-σπορογόνα, και έχουν ραβδόμορφο σχήμα. Είναι θετικά στην καταλάση, αρνητικά στην οξειδάση και κινούνται μέσω βλεφαρίδων που φέρουν σε όλη την επιφάνεια του βακτηριακού σώματος (peritrichous flaggela). Ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και το DNA τους παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με το αντίστοιχο άλλων βακτηρίων της ίδιας οικογένειας, όπως *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Proteus* (USDA, 2009). Στην **Εικόνα 2.9** παρουσιάζεται η *Salmonella* όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο.



Εικόνα 2.9: Η *Salmonella* έτσι όπως φαίνεται στο μικροσκόπιο

Έχουν απομονωθεί πάνω από 2.400 διαφορετικοί ορότυποι του συγκεκριμένου βακτηρίου και η ταυτοποίησή τους ως μέλη του βακτηριακού γένους *Salmonellae* βασίστηκε στην ύπαρξη 3 αντιγόνων (USDA, 2009):

(O) Σωματικό Αντιγόνο (Somatic or Cell Wall (envelope) Antigen): Είναι αντιγόνα της επιφάνειας του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων, και το μόνιό τους αποτελείται από αλυσίδες LPS-πρωτεϊνών. Είναι θερμοανθεκτικά, ανθεκτικά στην αλκοόλη και υδρόφιλα. Η *S. enterica* φέρει 46 διαφορετικά αντιγόνα O.

(H) Αντιγόνο Βλεφαρίδων (Flagellar Antigen): Είναι αντιγόνα της βλεφαρίδας των κυττάρων και έχουν δομή πρωτεΐνης. Είναι ανθεκτικά στην θέρμανση και στην αλκοόλη και ορισμένα στελέχη της *Salmonella* δύνανται να παράγουν ένα (μονοφασικό) ή δύο (διφασικό) ζευγάρια αντιγόνων.

(K) και (Vi) Αντιγόνα ελύτρου (Capsule Antigens): Το συγκεκριμένο είδος αντιγόνων απαντά σε ορισμένα μόνο στελέχη της *Salmonella*. Ο πιο γνωστός εκπρόσωπος του είδους είναι το αντιγόνο VI, το οποίο είναι θερμοευαίσθητο και παράγεται μόνο από 3 ορότυπους: *Salmonella* Typhi, Paratyphi C, Dublin.

Όλοι οι ορότυποι της *Salmonella* έχουν παθογόνο δράση. Εκείνοι που ανήκουν στην ομάδα *Salmonella enterica* αποτελούν το 99.5% του συνόλου των οροτύπων της *Salmonella* που έχουν απομονωθεί από ανθρώπους και ζώα. Οι τρεις κυριότεροι ορότυποι της *Salmonella enterica* είναι οι εξής (USDA, 2009):

- *Salmonella enterica* serovar Typhi: είναι η αιτία πρόκλησης του τυφοειδούς πυρετού (typhoid fever) και φορείς (carriers) μπορεί να είναι μόνο άνθρωποι (Typhoid Mary's of the world) και όχι ζώα: μετάδοση από άνθρωπο σε άνθρωπο (fecal-oral route)
- Non-Typhoidal Salmonellae:

- ✓ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Είναι υπεύθυνη για την πρόκληση τροφοδηλητηριάσεων σε παγκόσμια κλίμακα.
- ✓ *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Είναι η πιο κοινή αιτία πρόκλησης τροφοδηλητηριάσεων σε παγκόσμια κλίμακα. Συνήθως προσβάλλει τα πουλερικά και εξαπλώνεται στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης των προϊόντων αυτών (ασθένεια παρόμοια με την αντίστοιχη που προκαλείται από την *Salmonella* Typhimurium).

Τα τρόφιμα που έχουν χαρακτηριστεί ως κυριότερες πηγές ανεύρεσης της *Salmonella* είναι τα εξής (USDA, 2009):

- ✓ Νωπά προϊόντα πουλερικών, αυγά (η μεγαλύτερη πηγή)
- ✓ Νωπά προϊόντα κόκκινου κρέατος
- ✓ Ψάρια, γαρίδες, βατραχοπόδαρα
- ✓ Ζύμη αρτοποιείας, καρύδες, σοκολάτα, κέικ, κακάο
- ✓ Φυστικοβούτυρο
- ✓ Σάλτσες
- ✓ Φρέσκα φρούτα και λαχανικά

2.3.8.2 Χαρακτηριστικά ανάπτυξης της Non-Typhoidal *Salmonellae*

α) Επίδραση θερμοκρασίας: Ως κατώτερο όριο θερμοκρασίας ανάπτυξης αναφέρονται οι 5-8 °C (Juneja et al., 2007). Πιο συγκεκριμένα, οι Farber et al. (1989), Gill & DeLacy (1991), Szczawinska et al. (1991), FSAI (2007) αναφέρουν τους 5-5.2 °C, ως την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, ενώ οι Jay et al. (2005) ως ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των σεροτύπων *S. Heideberg* και *S. Typhimurium* τους 6.2 °C. Σύμφωνα με τους Cox et al. (1999), η *Salmonella* μπορεί να αναπτυχθεί σε εύρος θερμοκρασιών 2-54 °C, αλλά η ανάπτυξή της σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 7 °C έχει παρατηρηθεί επί το πλείστον σε μικροβιολογικά υποστρώματα και όχι σε τρόφιμα. Σε γενικές γραμμές, η *Salmonella* μπορεί να επιβιώσει σε θερμοκρασία ψύξης για μεγάλες περιόδους, ενώ η κατάψυξη δεν την καταστρέφει εφόσον έχει αναφερθεί η επιβίωσή της σε παγωτό που συντηρήθηκε στους -20 °C (Lund et al., 2000). Η *Salmonella* παρουσιάζει μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης με αποτέλεσμα να έχει μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης και μειωμένη κυτταρική ανανέωση (Koutsoumanis et al., 1999; Beales et al., 2002). Επίσης, η *Salmonella* παρουσιάζει ικανότητα επιβίωσης σε χαμηλή θερμοκρασία ψύξης (μικρότερη από την περιοχή ανάπτυξης) και αυτό πιθανόν να οφείλεται στην

δημιουργία πρωτεϊνών ψυχρής επίπληξης (cold-shock), που προστατεύουν τα κύτταρά της από περιβαλλοντικό στρες, τροποποιώντας την διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και παρακινώντας μηχανισμούς άμυνας (Beales et al., 2002).

Ως ανώτερο όριο θερμοκρασιακής ανάπτυξης θεωρούνται οι 42-50 °C (Jay, 2005) ενώ η βέλτιστη ανάπτυξη της παρατηρείται σε θερμοκρασία 37 °C (Cox, 1999).

β) Επίδραση a_w /pH/ NaCl/ατμόσφαιρας: Σύμφωνα με τον Jay (2005) μπορεί να επιβιώσει ή να αναπτυχθεί σε περιοχή pH 4.05-9.0 (βέλτιστη ανάπτυξη σε τιμή pH 7-7.5). Ωστόσο, η ελάχιστη τιμή pH στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η παρουσία οξέος ως συντηρητικού κ.λπ. (<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-typhoid-salmonellae.pdf>). Η ελάχιστη τιμή a_w για την ανάπτυξη της είναι 0.93 και η βέλτιστη 0.99 (Cox, 1999). Ωστόσο έχει αναφερθεί η ικανότητα επιβίωσής της σε σοκολάτα για διάστημα μερικών μηνών ($a_w = 0.3-0.5$). Περιεκτικότητα σε NaCl $\geq 2\%$ καθυστερεί την ανάπτυξη της *Salmonella* (Lund et al., 2000). Ωστόσο, η ανθεκτικότητα της *Salmonella* στο NaCl εξαρτάται από την θερμοκρασία συντήρησης (η μέγιστη περιεκτικότητα σε NaCl για την αναχαίτιση της ανάπτυξης της *S. typhimurium* στους 10 και 15 °C, αντίστοιχα, ήταν 2% και 6%, αντίστοιχα, Lund et al., 2000). Τέλος, η *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και μπορεί να επιβιώσει αλλά όχι να αναπτυχθεί σε συσκευασία τροφίμων με μεγάλη συγκέντρωση CO₂. Αναπτύσσεται με γρήγορο ρυθμό σε MAP με 20-50% CO₂ (Lund et al., 2000) ή σε συσκευασία κενού (Gill & DeLacy, 1991).

2.3.8.3 Σύνδρομο Σαλμονέλωσης στον άνθρωπο

Η Σαλμονέλωση μπορεί να εκδηλωθεί με την μορφή τριών διαφορετικών συνδρόμων, ανάλογα με το είδος του οροτύπου που την προκάλεσε (Hawley et al., 2004; USDA, 2009):

- **Γαστρεντερίτιδα/Εντεροκολίτιδα:** Προκαλείται από την Non-Typhoidal *Salmonella* και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό, πυρετό (συνήθως διαρκεί μόνο 48 ώρες), πονοκέφαλο, μυαλγία, κοιλιακούς πόνους και διάρροια (περιστασιακά αιματώδης, διαρκεί 3-7 ημέρες). Ο χρόνος επώασης είναι 6-48 ώρες και η δόση που μπορεί να την προκαλέσει είναι συνήθως μεγάλη ($>10^5$ κύτταρα) λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει στο όξινο περιβάλλον του στομάχου. Ωστόσο η δόση μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την κατάσταση της υγείας και την ηλικία του ατόμου, τον ορότυπο/στέλεχος του βακτηρίου, ενώ έχουν αναφερθεί περιστατικά μετά την κατανάλωση 4-45 κυττάρων

του βακτηρίου (Cox, 1999). Πρόσφατα, ο FDA (2009) πρότεινε ως επικίνδυνη δόση τα 15-20 κύτταρα.

(<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966.htm>)

- **Βακτηριαμία:** Εμφανίζεται κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και εκδηλώνεται όταν η *Salmonella* περάσει στο αίμα τους. Τα πιο κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν επίμονο πυρετό, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, λοιμώξεις των οφθαλμών
- **Τυφοειδής πυρετός.** Η πιο σοβαρή μορφή της ασθένειας προκαλείται μόνο από την *S. typhi* (η *S. paratyphi* είναι υπεύθυνη για ηπιότερη μορφή της ασθένειας που λέγεται παρατυφοειδής πυρετός). Ο χρόνος επώασης είναι 5-21 ημέρες και η ασθένεια προκαλείται από την κατανάλωση επιμολυσμένου νερού με το βακτήριο ή από επαφή με άλλα άτομα που νοσούν. Τα συμπτώματα διαρκούν 4-6 εβδομάδες και περιλαμβάνουν υψηλό πυρετό (πιθανόν με εμφάνιση κόκκινων κηλίδων, βραδυκαρδία), πονοκέφαλο, ανορεξία, αδυναμία, πνευματική σύγχυση, κοιλιακούς πόνους, δυσκοιλιότητα.

Τέλος, σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς η Σαλμονέλωση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές όπως σύνδρομο Reiter's, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, ενδοκαρδίτιδα και οστεομυελίτιδα.

Μέτρα πρόληψης για τον καταναλωτή (CDC, 2009): Καλό ψήσιμο νωπών προϊόντων κοτόπουλου και κόκκινου κρέατος (εσωτερική θερμοκρασία >70 °C), πλύσιμο χεριών, μαχαιριών, πάγκων κοπής που ήρθαν σε επαφή με νωπά τρόφιμα, αποφυγή κατανάλωσης φαγητού υπό την υποψία ότι δεν έχει υποστεί κατάλληλη θερμική επεξεργασία (στα εστιατόρια κ.λ.π.), προτίμηση μητρικού γάλακτος αντί εναλλακτικής φόρμουλας (για τα νεογνά).

3.0 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ-ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΠΟΥΛΕΡΙΚΩΝ

3.1 ΥΨΗΛΗ ΥΔΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΠΙΕΣΗ (ΥΥΠ)

Περιγραφή μεθόδου: Το προς επεξεργασία προϊόν, τοποθετείται σε μια δεξαμενή πίεσης (εντός της συσκευασίας του), όπου ασκείται υδροστατική πίεση από 100 έως 900 MPa. Η ΥΥΠ θεωρείται μια μη-θερμική μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων, εφόσον για κάθε αύξηση πίεσης της τάξης των 100 MPa απαιτείται αδιαβατική άνοδος της θερμοκρασίας μόλις 3 °C, συνεπώς για μια διεργασία που πραγματοποιείται υπό πίεση 600 MPa, η συνολική αύξηση της θερμοκρασίας είναι μόλις 15 °C (Aymerich et al. 2008).

Εμπορική Εφαρμογή: Την τελευταία δεκαετία, έχει αυξηθεί σημαντικά ο αριθμός των εταιρειών που εφαρμόζουν την μέθοδο ΥΥΠ για την επεξεργασία προϊόντων κόκκινου και λευκού κρέατος, σε παγκόσμια κλίμακα. Ορισμένα από τα προϊόντα που έχουν υποστεί επεξεργασία με ΥΥΠ (συνηθέστερα 600 MPa για 2-10 λεπτά) και είναι εμπορικά διαθέσιμα είναι τα εξής: ψητό χοιρομέρι, προμαγειρεμένα γεύματα με γαλοπούλα, λουκάνικα μεξικανικού τύπου (tapas) ή κοτόπουλο, τεμαχισμένο κοτόπουλο ή χοιρινό, παστό χοιρομέρι, ζαμπόν Parma, μορταδέλα, μπέικον και καπνιστά λουκάνικα. Η ΥΥΠ είναι μια εναλλακτική μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων με το βασικό πλεονέκτημα ότι παρουσιάζει πολύ καλό βαθμό αποδοχής από το καταναλωτικό κοινό της Ευρώπης (67% των καταναλωτών σε Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο, Baron et al. 1999)

Μηχανισμός δράσης: Η ΥΥΠ ασκεί δυσμενή επίδραση στις πρωτεΐνες του κυττάρου και μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στην μετουσίωσή τους, αδρανοποιώντας τα ενζυμικά συστήματα του. Ο πρωταρχικός της στόχος είναι οι ιοντικοί και υδροφοβικοί δεσμοί, ενώ οι δεσμοί υδρογόνου φαίνεται να μην επηρεάζονται (Heremans et al., 2001). Ως αποτέλεσμα, η θρεπτική αξία, η περιεκτικότητα σε βιταμίνες και η γεύση-οσμή των τροφίμων διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό μετά την επεξεργασία με ΥΥΠ. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες μεταβολές στο χρώμα (οξειδωση της μυοσφαιρίνης) και αύξηση της οξειδωσης του. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και εκείνα που βρίσκονται στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης εμφανίζονται πιο ευπαθή στην δράση της ΥΥΠ, σε σχέση με τα θετικά κατά Gram και εκείνα που βρίσκονται στην στατική φάση. Τέλος, οι βακτηριακοί σπόροι απαιτούν πολλοί μεγάλες πιέσεις για την αδρανοποίησή τους (>1000 MPa, Kalchayanand et al., 1998).

3.2 ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΣΗ

Η μέθοδος βασίζεται στην εφαρμογή ακτινοβολίας με συχνότητες μεγαλύτερες των 10^{18} Hz, έτσι ώστε να υπάρχει αρκετή ενέργεια για να επιτευχθεί καταστροφή ή βλάβη της κυτταρικής δομής των μικροοργανισμών. Η αντιμικροβιακή της δράση συνίσταται στην καταστροφή του κυτταρικού DNA υπό την επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας και στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών. Η πλειοψηφία των διαθέσιμων δεδομένων σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση της ακτινοβολήσης προέρχεται κυρίως από έρευνες σε προϊόντα κόκκινου κρέατος και προϊόντα πουλερικών (Farkas et al., 1998). Για παράδειγμα, η ακτινοβολήση προϊόντος κοτόπουλου (μπουτάκια) με δόση ≥ 1 KGy μείωσε την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα κατά $3,0 \log$ CFU/g. Επίσης, οι Nassar et al. (1997) αναφέρουν πλήρη θανάτωση της ενοφθαλμισμένης *Salmonella* μετά την ακτινοβολήση νωπού κοτόπουλου με δόση 7 KGy. Τέλος, σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα των Chouliara et al. (2007), η συνδυαστική εφαρμογή ακτινοβολήσης (2-4 kGy) και MAP για τη συντήρηση φρέσκου φιλέτου από κοτόπουλο, μείωσε τον πληθυσμό των μικροοργανισμών αλλοίωσης κατά 1-5 \log cfu/g, παρέτεινε τον οργανοληπτικό και μικροβιολογικό χρόνο συντήρησής του και αύξησε την ερυθρότητα του προϊόντος.

3.3 ΟΖΟΝΙΣΜΟΣ

Ο οζονισμός είναι μια διαδικασία επεξεργασίας των τροφίμων και του νερού. Η θανάτωση των βακτηρίων επιτυγχάνεται μέσω της διάχυσης όζοντος στα τρόφιμα ή στο νερό, το οποίο παράγεται κατά την έκθεση μορίων ύδατος σε υψηλή ηλεκτρική τάση. Η χρήση του όζοντος για την επεξεργασία και συντήρηση των τροφίμων εγκρίθηκε στις Η.Π.Α. το 1997 (USDA, 1997).



Εικόνα 3.1: Βιομηχανική μονάδα Οζονισμού

Έκτοτε η χρήση του έχει βρει εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων για την επίτευξη των παρακάτω στόχων: α) απολύμανση νερού πριν την εμφιάλωσή του, β) θανάτωση βακτηρίων, ζυμών και πρωτόζωων σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, γ) θανάτωση ζυμών και μυκήτων από την ατμόσφαιρα βιομηχανικών μονάδων παραγωγής τροφίμων, δ) οξείδωση οργανικών ρύπων που ανευρίσκονται στο νερό, ε) οξείδωση και αποδόμηση φυτοφαρμάκων, εντομοκτόνων κ.λ.π.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα του οζονισμού ως μέθοδος επεξεργασίας τροφίμων είναι τα εξής: α) Επιμηκύνει το χρόνο συντήρησης των τροφίμων ζωϊκής προέλευσης, β) είναι ασφαλές για την υγεία των εργαζομένων στις μονάδες, γ) δεν προκύπτουν επιβλαβή χημικά παραπροϊόντα, δ) η μονάδα επεξεργασίας έχει μικρό κόστος λειτουργίας και ε) επιτρέπει την ανακύκλωση των υγρών αποβλήτων (http://www.elementozone.com/white_paper_v1.5.pdf). Το όζον θανατώνει τους μικροοργανισμούς κυρίως μέσω προοδευτικής οξειδωσης των ενδοκυτταρικών συστατικών τους. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι ο πρωταρχικός στόχος του οζονισμού. Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης: σύμφωνα με τον πρώτο, το όζον οξειδώνει τις σουλφυδρυλικές ομάδες και τα αμινοξέα των ενζύμων, και αποικοδομεί τις πρωτεΐνες σε μικρότερα πεπτίδια. Σύμφωνα με τον δεύτερο προτεινόμενο μηχανισμό, το όζον οξειδώνει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος σε υδροπεροξειδία με αποτέλεσμα την απώλεια ενδοκυτταρικών συστατικών των βακτηρίων. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, οι λιποπρωτεΐνες και οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) είναι οι πρώτοι στόχοι, και η προσβολή τους οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και τελικά σε λύση του κυττάρου (Guzel-Seydim et al., 2004).

3.4 ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ (MAP)

Η συσκευασία αποσκοπεί στην προστασία του προϊόντος από μηχανική βλάβη, μικροβιακή επιμόλυνση και καταστροφή. Επίσης διευκολύνει τη μεταφορά, διανομή και την αποθήκευσή του. Οι σύγχρονες μέθοδοι συσκευασίες που διερευνώνται για τη συντήρηση των τροφίμων είναι η συσκευασία ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (CAP), η συσκευασία κενού (VP) και η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP). Στη συσκευασία ελεγχόμενης ατμόσφαιρας (CAP) γίνεται συνεχής και επακριβής έλεγχος της αέριας σύστασης που περικλείει το προϊόν, που δίνει τη δυνατότητα του μεγαλύτερου δυνατού χρόνου συντήρησης του προϊόντος. Στη συσκευασία υπό κενό (VP), το προϊόν τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευασία με μικρή διαπερατότητα στο οξυγόνο, στη συνέχεια αφαιρείται ο περιεχόμενος αέρας και η συσκευασία σφραγίζεται. Η συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP) προσφέρει τη δυνατότητα σημαντικής αύξησης του χρόνου συντήρησης των τροφίμων στα καταστήματα λιανικής πώλησης.

Με τον όρο τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Modified Atmospheres) νοείται η διεργασία εκείνη κατά την οποία αυξάνεται σημαντικά ο χρόνος διατήρησης ενός νωπού προϊόντος

περιβάλλοντάς το σε ατμόσφαιρα υψηλής συγκέντρωσης CO₂ που επιβραδύνει διεργασίες αλλοίωσης, όπως η ανάπτυξη μικροοργανισμών, ενώ ενισχύει ορισμένες επιθυμητές δράσεις όπως η διατήρηση του κόκκινου χρώματος στο κρέας. Η MAP ως μέθοδος συντήρησης των προϊόντων ζωϊκής προέλευσης παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα: α) εξασφαλίζει ένα ταχύ και υγιεινό σύστημα διάθεσης των προϊόντων, β) επιμηκύνει το χρόνο συντήρησής τους, γ) επιτυγχάνει εξαιρετική εμφάνιση και αποδοχή από το καταναλωτικό κοινό.

Ωστόσο τα μεγαλύτερα μειονεκτήματά της είναι τα εξής (Phillips, 1996): α) η αντιμικροβιακή επίδραση χάνεται μετά το άνοιγμα της συσκευασίας του τροφίμου, β) το κόστος της είναι υψηλό, γ) είναι απαραίτητος ο συνεχής έλεγχος της θερμοκρασίας συντήρησης του συσκευασμένου προϊόντος, δ) προϋποθέτει την ύπαρξη ειδικά εκπαιδευμένου προσωπικού και ειδικού εξοπλισμού για την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα. Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τον χρόνο συντήρησης και την ασφάλεια των συσκευασμένων τροφίμων σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**

Πίνακας 3.1: Παράγοντες που επηρεάζουν τον χρόνο συντήρησης των προϊόντων που συνηθίζονται σε MAP (Phillips, 1996)

Ενδογενείς παράγοντες	Εξωγενείς παράγοντες
Ενεργότητα ύδατος	Θερμοκρασία συντήρησης
pH	Σωστή εφαρμογή HACCP κατά την παραγωγή του προϊόντος
Μικροχλωρίδα αλλοίωσης: α) αρχική β) μετά την επεξεργασία γ) κατά την διάρκεια της συντήρησης	Ποιότητα πρώτων υλών
Διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά	Χρόνος που μεσολαβεί προ της συσκευασίας
Παρουσία (φυσικού ή μη) αντιμικροβιακού παράγοντα και η συγκέντρωση αυτού	Αρχική και τελική συγκέντρωση αερίων
Οξειδοαναγωγικό δυναμικό	Διαπερατότητα υλικών συσκευασίας στα αέρια
Παρουσία σπορογόνων βακτηριακών μορφών	Αναλογία προϊόντος/συγκέντρωσης αερίων, καθαρότητα αερίων, σχεδίαση συσκευασίας

Τα αέρια που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), το άζωτο (N₂) και το οξυγόνο (O₂). Το πιο σημαντικό είναι το CO₂, το οποίο εμφανίζει ισχυρή

παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις σε συγκεντρώσεις πάνω από 40%. Γενικά, η δράση του είναι περισσότερο αποτελεσματική σε τρόφιμα που η αλλοίωση οφείλεται σε αερόβιους μικροοργανισμούς (Hotchkiss, 1989; Phillips, 1996). Για να επιτευχθεί μέγιστη αντιμικροβιακή δράση, το προϊόν θα πρέπει να φυλάσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, διότι η διαλυτότητα του CO₂ μειώνεται δραματικά με την αύξηση της θερμοκρασίας. Η προτεινόμενη σύσταση αερίων για τη συσκευασία MAP διαφόρων προϊόντων κρέατος παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3.2** (Smith & Day, 2003).

Πίνακας 3.2: Προτεινόμενη σύσταση αερίων για την συσκευασία MAP διαφόρων προϊόντων κρέατος (λιανική διάθεση, Smith & Day, 2003).

Είδος τροφίμου	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	N ₂ (%)
Νωπό κόκκινο κρέας (χοιρινό, βοδινό, πρόβειο)	30	70	
Κρέας από αγριογούρουνο, ελάφι	20	80	
Εντόσθια	20	80	
Νωπά πουλερικά, άγρια πτηνά (κυνήγι)*	30		70
Ψητά προϊόντα κόκκινου κρέατος	30		70
Ψητά προϊόντα πουλερικών	30		70
Έτοιμα (προμαγειρεμένα) γεύματα (cook-chill)	30		70

*πλην κρέατος πουλερικών με έντονο ερυθρό χρώμα σάρκας (π.χ. κρέας γαλοπούλας) όπου η προτεινόμενη σύσταση αερίων είναι ανάλογη με του κόκκινου κρέατος, με σκοπό την διατήρηση του επιθυμητού χρώματος

Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες σχετικά με την επίδραση του CO₂ στα βακτηριακά κύτταρα. Οι θεωρίες αυτές μπορούν να συνοψιστούν ως εξής: (Daniel et al., 1985; Dixon & Kell, 1989):

1. Αναστολή βασικών μεταβολικών διεργασιών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
2. Αδρανοποίηση ενζύμων ή μείωση της ταχύτητας των ενζυμικών αντιδράσεων.
3. Διείσδυση εντός της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, προκαλώντας σημαντικές ενδοκυτταρικές μεταβολές του pH.
4. Άμεση επίδραση στις φυσικοχημικές ιδιότητες των πρωτεϊνών.

Υψηλές συγκεντρώσεις του CO₂ οδηγούν σε αποχρωματισμό και ανάπτυξη έντονης όξινης γεύσης σε ορισμένα τρόφιμα, λόγω σχηματισμού ανθρακικού οξέος από την διάλυση του στην υδατική φάση του τροφίμου. Το N₂ είναι αδρανές, άγευστο και πρακτικά αδιάλυτο στο νερό. Παρεμποδίζει την οξείδωση των λιπαρών συστατικών και

μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης μούχλας, λόγω αποκλεισμού του O₂. Το O₂ προκαλεί οξειδωση διαφόρων συστατικών και ευνοεί την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων και συνεπώς πρέπει γενικά να χρησιμοποιείται σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

Τα υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας είναι αρκετά και η επιλογή του καταλληλότερου εξαρτάται από το είδος του συσκευαζόμενου τροφίμου, τις συνθήκες και το χρόνο συντήρησης. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα υλικά είναι η αιθυλενοβινυλική αλκοόλη (EVOH) σε συνδυασμό με πολυαιθυλένιο (LDPE, HDPE, LLDPE), το πολυαμίδιο (PA), ο πολυαιθυλενοτερεφθαλικός εστέρας (PET), ή το πολυπροπυλένιο (PP), ή το πολυστυρόλιο (PS), και το πολυβινυλιδενοχλωρίδιο (PVdC).

Η οξειδωση του λίπους κατά την συντήρηση προϊόντων ζωϊκής προέλευσης σε MAP επιβραδύνεται σημαντικά σε σχέση με τη συσκευασία κενού. Ωστόσο, οι Lanari et al. (1995) αναφέρουν ότι η οξειδωση του λίπους αυξήθηκε σε σχέση με την αερόβια συσκευασία, κατά την συντήρηση προϊόντος χοιρινού κρέατος (παϊδάκια) σε MAP. Ωστόσο, τέτοια φαινόμενα μπορούν να αντιμετωπιστούν με την προσθήκη βιταμίνης E ή άλλων αντιοξειδωτικών παραγόντων στη συσκευασία του τροφίμου.

Ένα άλλο σημαντικό ζήτημα σχετικά με την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής MAP για την συντήρηση τροφίμων, είναι η επίδρασή της στην οργανοληπτική ποιότητα του προϊόντος. Σύμφωνα με τους Phillips et al. (1996) η οργανοληπτική ποιότητα των τροφίμων δεν αντικατοπτρίζει πάντοτε το μικροβιακό του φορτίο, ενώ η χρήση MAP ή VP δε σημαίνει ότι θα οδηγήσει απαραίτητα σε παράταση του οργανοληπτικού χρόνου συντήρησης. Σύμφωνα με τους Boerema et al. (1993) κατά τη συσκευασία προϊόντος χοιρινού κρέατος (χοιρομέρι) στους 10 και 3 °C και υπό κενό ή MAP, η οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος επήλθε σε πληθυσμό O.M.X. περίπου 8,0 log CFU/g, ενώ κατά τη συντήρηση στους -1.5 °C η οργανοληπτική απόρριψη του προϊόντος που συσκευάστηκε υπό κενό προηγήθηκε της μικροβιολογικής αλλοίωσης (O.M.X.<7.0 log CFU). Επίσης, όταν η θερμοκρασία συντήρησης αυξήθηκε στους 10 °C η χρήση συσκευασίας MAP δεν οδήγησε σε παράταση του χρόνου συντήρησης του προϊόντος.

Στον **Πίνακα 3.3** παρουσιάζεται η μικροχλωρίδα αλλοίωσης προϊόντων κρέατος που συσκευάστηκαν σε MAP, VP ή αερόβια συσκευασία (Nychas et al., 2008).

Πίνακας 3.3: Μικροοργανισμοί αλλοίωσης που προσδιορίστηκαν σε προϊόντα κρέατος που συσκευάστηκαν σε MAP, VP ή αερόβια συσκευασία (0-4 °C, Nychas et al., 2008)

Συσκευασία-Σύσταση Αερίων	Μικροοργανισμοί αλλοίωσης σε προϊόντα κόκκινου κρέατος και πουλερικών
Αερόβια	Ψευδομονάδες
>50% CO ₂ + O ₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
50% CO ₂	Εντεροβακτηριοειδή, οξυγαλακτικά βακτήρια
<50% CO ₂ + O ₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , οξυγαλακτικά βακτήρια
100% CO ₂	οξυγαλακτικά βακτήρια
Συσκευασία κενού	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i>

Οι ψευδομονάδες είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες στην επίδραση του διοξειδίου του άνθρακα, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση ή αναστολή της ανάπτυξής τους κατά την συντήρηση των προϊόντων κρέατος σε MAP. Η αλλοίωση κρέατος που συντηρείται σε περιβάλλον με διοξείδιο του άνθρακα αποδίδεται κυρίως στα οξυγαλακτικά βακτήρια και στον μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta*. Τα συγκεκριμένα βακτήρια προκαλούν ένα είδος αλλοίωσης (οξίνιση, souring) σε προϊόντα κρέατος που συντηρούνται σε MAP ή κενό το οποίο είναι ηπιότερο από την σήψη (putrefaction) που προκαλούν οι ψευδομονάδες, λόγω των λιγότερο δύσοσμων μεταβολιτών κατά την ανάπτυξή τους. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια γίνεται όλο και πιο σημαντικός ο ρόλος των πρωτεολυτικών ειδών της οικογένειας των Εντεροβακτηριοειδών (προαιρετικά αναερόβια) στην αλλοίωση των προϊόντων κρέατος συσκευασμένων υπό κενό ή MAP, καθώς και η συμβολή τους σε στην παραγωγή δύσοσμων μεταβολιτών.

Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία MAP για τη συντήρηση τροφίμων έχει εξελιχθεί σημαντικά, με αποτέλεσμα την θεαματική βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων και την εξαιρετική αποδοχή τους από τον καταναλωτή (Active Packaging-Ενεργή συσκευασία). Οι πιο σύγχρονες καινοτομίες της τεχνολογίας MAP καθώς και η τρέχουσα εμπορική τους εφαρμογή παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.4**.

Πίνακας 3.4: Καινοτομίες της τεχνολογίας MAP (Ενεργή συσκευασία) για την συντήρηση τροφίμων (Smith & Day, 2003)

Ενεργή Συσκευασία	Ενεργό συστατικό	Εμπορική εφαρμογή
Απορροφητές οξυγόνου	<ol style="list-style-type: none"> 1. Σίδηρος 2. Μέταλλα/οξέα 3. Μεταλλικοί καταλύτες (π.χ. πλατίνα) 4. Ασκορβικά και μεταλλικά άλατα 5. Ένζυμα 	Ψάρια, προϊόντα κρέατος, πίτσα, τυροκομικά, snack foods, προϊόντα αρτοποιείας, μαγειρεμένο ρύζι
Απορροφητές/Εκπομποί CO ₂	<ol style="list-style-type: none"> 1. Οξειδία σιδήρου/υδροξείδιο του ασβεστίου 2. Ανθρακικός σίδηρος, μέταλλο-αλογονίδια 3. Οξειδίο του ασβεστίου/ ενεργός άνθρακας 	Νωπό κρέας, νωπά ψάρια, snacks, κέικ
Απορροφητές Αιθυλενίου	<ol style="list-style-type: none"> 2. Υπερμαγγανικό κάλιο 3. Ενεργ. άνθρακας/Ζεόλιθοι 	Φρούτα και λαχανικά
Απελευθερωτές συντηρητικών	<ol style="list-style-type: none"> 1. Οργανικά άλατα 2. Ζεόλιθοι 3. Εκχύλισμα βοτάνων και μπαχαρικών 4. ΒΗΑ/ΒΗΤ αντιοξειδωτικά 5. Βιταμίνη Ε 	Κρέας, ψάρια, φρούτα, λαχανικά, προϊόντα αρτοποιείας, τυροκομικά
Εκπομποί αιθανόλης	<ol style="list-style-type: none"> 1. Αιθανόλη σε κάψουλες 	Ζύμη πίτσας, προϊόντα αρτοποιείας, ψάρια
Απορροφητές υγρασίας	<ol style="list-style-type: none"> 1. PVA 2. Μέταλλα 3. Γέλη σιλικόνης 4. Αργιλοπυριτικά υποστρώματα 	Ψάρια, κρέας, κοτόπουλο, δημητριακά, σάντουιτς, snacks, φρούτα και λαχανικά
Απορροφητές γεύσης, οσμής	<ol style="list-style-type: none"> 1. Κελλουλόζη 2. Ακετυλιωμένο χαρτί 3. Κιτρικό οξύ 4. Ασκορβικός σίδηρος, άλατα του σιδήρου 5. Ενεργός άνθρακας/ζεόλιθοι 	Χυμοί φρούτων, τηγανητά snacks, ψάρια, δημητριακά, κοτόπουλο, γαλακτοκομικά, φρούτα

3.5 “ΦΥΣΙΚΟΙ” ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Τα τελευταία χρόνια, οι καταναλωτές προσπαθούν όλο και περισσότερο να αποφύγουν την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν χημικά συντηρητικά. Το γεγονός αυτό έχει ωθήσει τη βιομηχανία τροφίμων προς τη χρήση συντηρητικών “φυσικής” προέλευσης όπως είναι το σύστημα της λακτοϋπεροξειδάσης (γάλα), η λυσοζύμη (αυγά, σύκα), οι σαπωνίνες και τα φλαβονοειδή (βότανα και μπαχαρικά), οι βακτηριοσίνες (οξυγαλακτικά βακτήρια) και η χιτοζάνη (οστρακόδερμα, μύκητες). Όλες οι παραπάνω ενώσεις έχουν επιδείξει αντιμικροβιακή δράση σε έρευνες “in vitro” ή σε πραγματικά τρόφιμα. Ωστόσο, πριν την εφαρμογή τους για την επεξεργασία και συντήρηση τροφίμων υπάρχουν δύο σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι πρέπει να λαμβάνονται υπόψη: α) η πιθανή μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων στα οποία προστίθενται (γεύση, οσμή και υφή), β) η αλληλεπίδρασή τους με τα συστατικά του τροφίμου, η οποία μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητά τους (Devlieghere et al., 2004).

3.5.1 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ

Ο όρος «βακτηριοσίνες» περιλαμβάνει ένα μεγάλο σύνολο εξωκυτταρικών αντιμικροβιακών πρωτεϊνών ή πεπτιδίων που ασκούν βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση σε άλλα συγγενή βακτήρια. Σε γενικές γραμμές θεωρείται ότι προσβάλλουν την κυτταροπλασματική μεμβράνη των μικροοργανισμών-στόχων, δημιουργούν πόρους στην φωσφολιπιδική στοιβάδα και διαταράσσουν την κινητήριο δύναμη των πρωτονίων (Devlieghere et al., 2004). Οι βακτηριοσίνες που έχουν συγκεντρώσει το μεγαλύτερο ερευνητικό ενδιαφέρον από την επιστημονική κοινότητα είναι οι εξής: η νισίνη, προερχόμενη από στελέχη του *Lactococcus lactis*, η πεδιοκίνη (από στελέχη του *Pediococcus acidilactici*) και η σακασίνη που προέρχεται από στελέχη του *Lactobacillus sakei*.

Η νισίνη είναι η μόνη εμπορικά διαθέσιμη βακτηριοσίνη και έχει αναγνωριστεί ως αποδεκτό πρόσθετο για την συντήρηση τροφίμων (E234) από την Ευρωπαϊκή κοινότητα (European Parliament of the Council, 1995). Η εμπορική ονομασία της νισίνης είναι Nisaplin® (εταιρία παραγωγής η Danisco®) και παράγεται μέσω διαδικασίας ζύμωσης στελεχών του μικροοργανισμού *Lactococcus lactis* (2,5% περιεκτικότητα σε ενεργή ουσία). Η χρήση της πεδιοκίνης PA-1 έχει πατενταριστεί από τους Marrug et al. (1991, EPO493779A1) και η εντεροκίνη A (enterocin A) από τους Hugas et al. (1991, ES 2 068 157).

Η αποτελεσματική χρήση των βακτηριοσινών για τη συντήρηση των τροφίμων μπορεί να μειωθεί σημαντικά από ένα σύνολο παραγόντων, όπως το στενό αντιμικροβιακό τους φάσμα (μη αποτελεσματικές έναντι στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια ή σε ζύμες), η μειωμένη ικανότητα διάχυσης σε στερεά τρόφιμα, αδρανοποίηση από πρωτεολυτικά ένζυμα, αλληλεπίδραση με θρεπτικά συστατικά των τροφίμων (π.χ. λιπίδια), κακή προσαρμογή των καλλιεργειών σε θερμοκρασίες ψύξης και τέλος, η πρόσφατα παρατηρούμενη ανάπτυξη ανθεκτικότητας από την πλευρά των βακτηρίων στην δράση των (Devlieghere et al., 2004). Η αντιμικροβιακή δράση των βακτηριοσινών δύναται να αυξηθεί σημαντικά αν συνδυαστεί με άλλες μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων όπως η ΥΥΠ και η ακτινοβόληση (Aymerich et al. 2008).

3.5.2 ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ (Α.Ε.)

Τα αιθέρια έλαια (Α.Ε.) είναι αρωματικές ελαιώδεις ουσίες που προέρχονται από φυτά (λουλούδια, μπουμπούκια, σπόρους, κλαράκια, φλοιούς, βότανα, δένδρα, φρούτα και ρίζες). Τα Α.Ε. εξάγονται από τα φυτά με φυσικές και χημικές μεθόδους όπως το στύψιμο, η ζύμωση, η εκχύλιση και η απόσταξη με υδρατμούς. Η τελευταία αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο για τη βιομηχανική παραγωγή τους. Ο όρος “αιθέριο έλαιο” χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά τον 16^ο αιώνα από τον Σουηδό Ιατρό Paracelsus Von Hohenheim ο οποίος ονόμασε το δραστικό συστατικό ενός φαρμάκου, *Quinta essential* (Burt, 2004).

Παρόλο που ο όρος “αιθέριο έλαιο” έχει πια καθιερωθεί μπορεί να θεωρηθεί παραπλανητικός δεδομένου ότι δεν πρόκειται για έλαια (δηλαδή μίγματα τριγλυκεριδίων) αλλά για τερπενικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους. Αιθέρια ονομάστηκαν γιατί είναι πτητικά, όπως ο αιθέρας, και έλαια γιατί είναι λιπαρά στην αφή και επιπλέουν στο νερό. Τα Α.Ε. και τα συστατικά τους έχει αποδειχθεί ότι έχουν αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντιτοξική, αντιοξειδωτική, αντιπαρασιτική και εντομοκτόνα δράση (Burt, 2004).

3.5.2.1 Σύσταση των Α.Ε.

Τα αιθέρια έλαια είναι πολυσύνθετα μίγματα οργανικών ουσιών, η σύνθεση των οποίων διαφέρει αισθητά στα διάφορα είδη ή/και ποικιλίες φυτών. Ο προσδιορισμός των συστατικών έχει μεγάλη σημασία γιατί από την παρουσία και την ποσότητά τους εξαρτάται κυρίως η ποιότητα των αιθέριων ελαίων. Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων διακρίνονται σε δυο μεγάλες ομάδες, ως εξής (Panou-Philotheou, 1999):

I) Μη οξυγονούχα συστατικά

Υδρογονάνθρακες: Αλειφατικοί ή ανοιχτής αλυσίδας, αρωματικοί, κυκλικά τερπένια (μονοτερπένια), σεσκιτερπένια, διτερπένια, αζουλένια (παράγωγα του ναφθαλίνιου).

II. Οξυγονούχα συστατικά

Παράγωγα ανώτερων υδρογονανθράκων

Αλκοόλες: Ο αριθμός και η ποσότητα αυτών σε κάθε αιθέριο έλαιο είναι παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην καλή ποιότητα αυτού.

α) αλειφατικές ή ανοιχτής αλυσίδας, β) κυκλικές τερπενικές: μονοκυκλικές, δικυκλικές και τρικυκλικές, γ) σεσκιτερπενικές, δ) αρωματικές

Αλδεΐδες: αλειφατικές ή ανοιχτής αλυσίδας, κυκλικές τερπενικές, αρωματικές, ετεροκυκλικές

Κετόνες: αλειφατικές ή ανοιχτής αλυσίδας, κυκλικές τερπενικές, σεσκιτερπενικές, αρωματικές, άλλες κετόνες

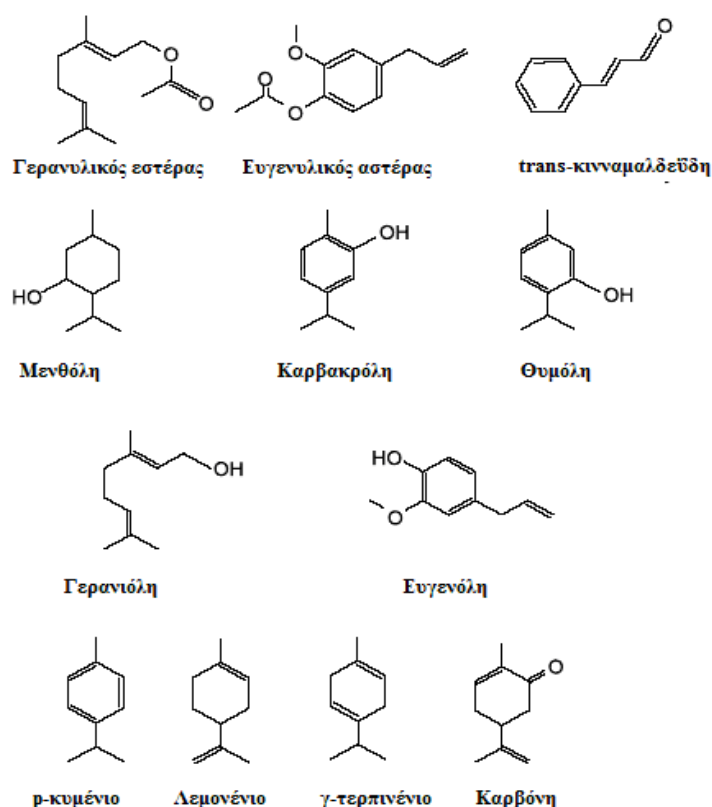
Οργανικά οξέα: αλειφατικά, αρωματικά

Εστέρες: αλειφατικοί, τερπενικοί και αρωματικοί

Φαινόλες: Είναι παράγωγα των αρωματικών υδρογονανθράκων που προέρχονται με αντικατάσταση ενός ή περισσότερων ατόμων υδρογόνου του αρωματικού δακτυλίου τους από υδροξύλια.

Λακτόνες, παράγωγα φουρανίου

Τα συστατικά των Α.Ε. διακρίνονται σε πρωτεύοντα (80% ολικής σύστασης) και δευτερεύοντα (20% ολικής σύστασης), που απαντούν σε ίχνη. Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των Α.Ε. αποδίδονται κυρίως στα φαινολικά τους συστατικά (Cosentino et al., 1999). Οι συντακτικοί τύποι των κυριότερων συστατικών των αιθέριων ελαίων παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.2.**



Εικόνα 3.2: Συντακτικοί των κυριότερων συστατικών των αιθέριων ελαίων (Burt, 2004)

3.5.2.2 Αντιβακτηριακή δράση των Α.Ε.

Τα αιθέρια έλαια έχουν επιδείξει δραστηριότητα έναντι των βακτηρίων: *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio parahaeomolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* και *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* καθώς και σε ζύμες/μύκητες όπως π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (Burt 2004; Rota et al., 2004).

Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών των Α.Ε. είναι λιγοστές. Τα φαινορικά τους συστατικά τους είναι τα κυρίως υπεύθυνα για την αντιμικροβιακή δράση.

Οι ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής των βακτηρίων που καταγράφηκαν για διάφορα Α.Ε. κατά τη διάρκεια της δοκιμής τους “in vitro” φαίνονται στον παρακάτω **Πίνακα 3.5**.

Πίνακας 3.5: Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC) των αιθέριων ελαίων *in vitro* έναντι παθογόνων βακτηρίων (Burt, 2004)

Φυτό από το οποίο έγινε η εξαγωγή του αιθέριου έλαιου	Βακτήριο	MIC (μl/ml)
Ρίγανη	<i>Escherichia coli</i>	0.5-1.2
	<i>Salmonella enterica typhimurium,</i>	1.2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.5-1.2
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.2
Γαρούφαλλο	<i>Escherichia coli</i>	0.4-2.5
	<i>Salmonella enterica, typhimurium,</i>	>20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0-2.5
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.156-0.45
Θυμάρι	<i>Escherichia coli</i>	0.45-1.25
	<i>Salmonella enterica, typhimurium,</i>	0.45-20
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.2-2.5
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0.156-0.45

Μολονότι τα Α.Ε. επέδειξαν καλή αντιβακτηριακή συμπεριφορά σε “*in vitro*” έρευνες, διαπιστώθηκε ότι για την επίτευξη της ίδιας δράσης σε τρόφιμα, απαιτείται αρκετά μεγαλύτερη συγκέντρωση. Ο λόγος που απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα Α.Ε. για να εκδηλωθεί η ίδια αντιμικροβιακή δραστηριότητα σε τρόφιμα σε σχέση με τις “*in vitro*” μετρήσεις δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Ωστόσο επικρατεί η άποψη ότι η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στο ότι τα τρόφιμα έχουν μεγαλύτερη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών από ότι τα εργαστηριακά τροφικά μοντέλα με αποτέλεσμα τα βακτήρια να μπορούν να επιδιορθώνουν γρηγορότερα τις κυτταρικές τους βλάβες. Γενικά, η ευαισθησία των μικροβίων στην αντιμικροβιακή επίδραση των Α.Ε. φαίνεται να αυξάνεται με τη μείωση του pH στο τρόφιμο, την μείωση της θερμοκρασίας συντήρησης και την ελάττωση του διαθέσιμου οξυγόνου στη συσκευασία. Σε συνθήκες χαμηλού pH, η υδροφοβικότητα του αιθέριου ελαίου αυξάνει, διευκολύνοντας έτσι τη διάλυσή τους στα λιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων (Burt, 2004; Juven et al., 1994; Holley & Patel, 2005).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι υψηλά επίπεδα λίπους και πρωτεϊνών στο τρόφιμο προστατεύουν τα βακτήρια από την επίδραση των Α.Ε. Αν τα Α.Ε. διαλυθούν στη λιπαρή φάση του τροφίμου τότε μειώνεται η ικανότητά τους να δράσουν ενάντια στα βακτήρια της υδατικής φάσης. Μια άλλη άποψη υποστηρίζει ότι η χαμηλότερη περιεκτικότητα

ύδατος, που επικρατεί στα τρόφιμα σε σχέση με τα μοντέλα τροφίμων των μελετών “in vitro”, παρακωλύει την αντιβακτηριακή δράση των Α.Ε. επάνω στα κύτταρα των μικροοργανισμών (Burt, 2004).

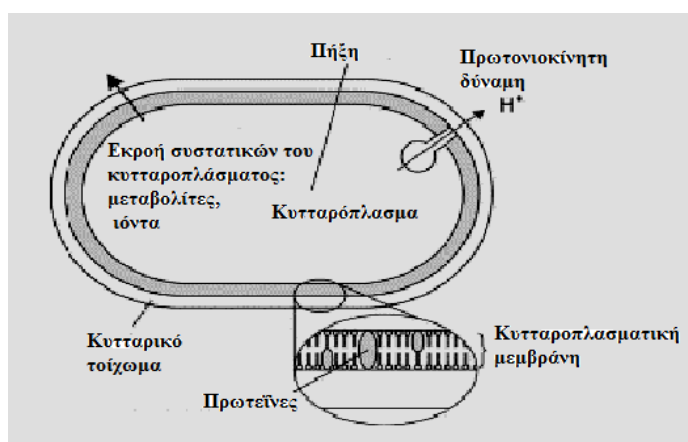
Τα αιθέρια έλαια έχουν αποδειχθεί πολύ αποτελεσματικά στη συντήρηση και ασφάλεια προϊόντων πουλερικών και κόκκινου κρέατος, ιδιαίτερα μετά το συνδυασμό τους με άλλες μεθόδους επεξεργασίας τροφίμων ή άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες (τεχνολογία εμποδίων). Στον **Πίνακα 3.6** παρουσιάζεται η αντιβακτηριακή δραστηριότητα των αιθέριων ελαίων σε διάφορα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης.

Πίνακας 3.6: Η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων σε διάφορα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης

Α.Ε./συστατικό (αναφορά)	Συγκέντρωση	Τρόφιμο	Μικροοργανισμός - Αποτέλεσμα	
Θυμαρέλαιο/Ριγανέλαιο (Chouliara & Kontominas, 2005; Chouliara et al. 2007)	0.5%/0.1-1.0% v/w	Φιλέτο κοτόπουλο (MAP, αερόβια)	Μικροχλωρίδα αλλοίωσης	Μείωση 1-5 log CFU/g
Θυμαρέλαιο (Bagamboula et al. (2003)	1% w/v	Λουκάνικα	<i>Shigella</i> spp.	Βακτηριοστατική έως μικρή επίδραση
Θυμαρέλαιο (Hao et al., 1998)	2%	Ψητό βοδινό	<i>A. hydrophila</i> <i>L. monocytogenes</i>	Μικρή επίδραση
Θυμαρέλαιο (Aureli et al. 1992)	0.02 mL/25 g	Χοιρινό φιλέτο	<i>L.monocytogenes</i>	Μείωση <1.5 log CFU/g
Θυμόλη/Καρβακρόλη (Mastromatteo et al., 2009)	0-300 ppm /0-300 ppm	Μπιφτέκια πουλερικών (MAP/αερόβια)	Μικροχλωρίδα αλλοίωσης	Μείωση 1-1.5 log CFU/g
Ριγανέλαιο (Ting & Deibel,1992)	1%	Βοδινό	<i>L. monocytogenes</i>	Μικρή επίδραση
Ριγανέλαιο (Skandamis et al., 2002)	0.8% (v/w)	Βοδινό Φιλέτο	<i>S. typhimurium</i>	Βακτηριοκτόνος δράση
Allyl isothiocyanate (Ward et al., 1998)	20 mg/mL	Ψητό χοιρινό	<i>E.coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>L. monocytogenes</i>	Βακτηριοκτόνος δράση

3.5.2.3 Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης των Α.Ε.

Δεδομένου ότι τα Α.Ε. περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών μεταξύ τους χημικών ενώσεων, είναι λογικό ότι η αντιβακτηριακή τους δραστηριότητα δεν αποδίδεται σε έναν συγκεκριμένο μηχανισμό αλλά υπάρχουν διάφοροι στόχοι μέσα στο κύτταρο (Holley & Patel, 2005). Τα Α.Ε. φαίνονται να επιδρούν στο βακτηριακό κύτταρο από διάφορες πλευρές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.3**. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν αποτελούν όλα τα τμήματα του βακτηριακού κυττάρου πρωταρχικό στόχο των Α.Ε., αλλά ορισμένα μέρη προσβάλλονται ως επακόλουθο της προσβολής ενός άλλου τμήματος που είχε τεθεί ως αρχικός στόχος.



Εικόνα 3.3: Περιοχές του βακτηριακού κυττάρου πάνω στις οποίες τα αιθέρια έλαια ασκούν την βακτηριακή τους δράση. Τα στάδια του μηχανισμού δράσης περιλαμβάνουν: Αποδόμηση κυτταρικού τοιχώματος, ρήξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης/εκροή ενδοκυτταρικών συστατικών, αδρανοποίηση ενζυμικών συστημάτων της μεμβράνης, πήξη του κυτταροπλάσματος, εξάντληση της κινητήριας δύναμης των πρωτονίων (Juven et al., 1994; Helander et al., 1998; Ultee & Smid, 2001; Lambert et al., 2001; Ultee et al., 2002).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των Α.Ε. και των συστατικών τους είναι η υδροφοβικότητά τους, ως επακόλουθο της ύπαρξης οργανικού δακτυλίου στο μόριο τους (αρωματικού ή μη), η οποία τα καθιστά ικανά να διαλύονται μέσα στη λιπαρή φάση (λιπίδια, λιποπρωτεΐνες) της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων διαταράσσοντας την δομή της και καθιστώντας την πιο διαπερατή (Sikkema et al, 1994). Από τη στιγμή που γίνεται αυτό, διευκολύνεται η εκροή μεταλλικών ιόντων και άλλων ενδοκυτταρικών θρεπτικών συστατικών (ATP, νουκλεϊκό και γλουταμινικό οξύ, αμινοξέα). Παρόλο που ένας συγκεκριμένος αριθμός συστατικών μπορούν να διαφύγουν από το βακτηριακό κύτταρο χωρίς απώλεια της βιωσιμότητάς τους, η εκτεταμένη εκροή

των κυτταρικών συστατικών ή η έξοδος κρίσιμων μορίων και ιόντων, μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο στον θάνατο (Lambert et al., 2001).

Οι χημικές δομές των επιμέρους συστατικών των Α.Ε. επηρεάζουν τον ακριβή μηχανισμό δράσης τους και την αντιβακτηριακή τους δράση. Η σημασία της ύπαρξης υδροξυλομάδων στον φαινολικό δακτύλιο των Α.Ε. έχει τονιστεί με ιδιαίτερο τρόπο. Η σχετική θέση των υδροξυλομάδων επάνω στον φαινολικό δακτύλιο δεν φαίνεται να επηρεάζει αποφασιστικά τον βαθμό της αντιβακτηριακής δράσης. Η σπουδαιότητα της ύπαρξης του φαινολικού δακτυλίου επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η μενθόλη δεν επέδειξε καμία δραστηριότητα σε σχέση με την καρβακρόλη (μη αρωματικός χαρακτήρας). Σύμφωνα με τους Dorman & Deans (2000) η προσθήκη οξικού οξέος στην γερανιόλη φάνηκε να αυξάνει την δραστηριότητα της, εφόσον ο γερανυλικός εστέρας που σχηματίστηκε φάνηκε πιο δραστικός ενάντια στα Gram-θετικά και στα Gram-αρνητικά βακτήρια. Ωστόσο, και τα μη φαινολικά συστατικά των Α.Ε. φαίνονται να έχουν ιδιαίτερη σπουδαιότητα. Συγκεκριμένα, ο τύπος της αλκυλομάδας επηρεάζει την δραστηριότητα (αλκενυλ > αλκυλ). Για παράδειγμα, το λεμονένιο είναι πιο δραστικό από το p-κυμένιο.

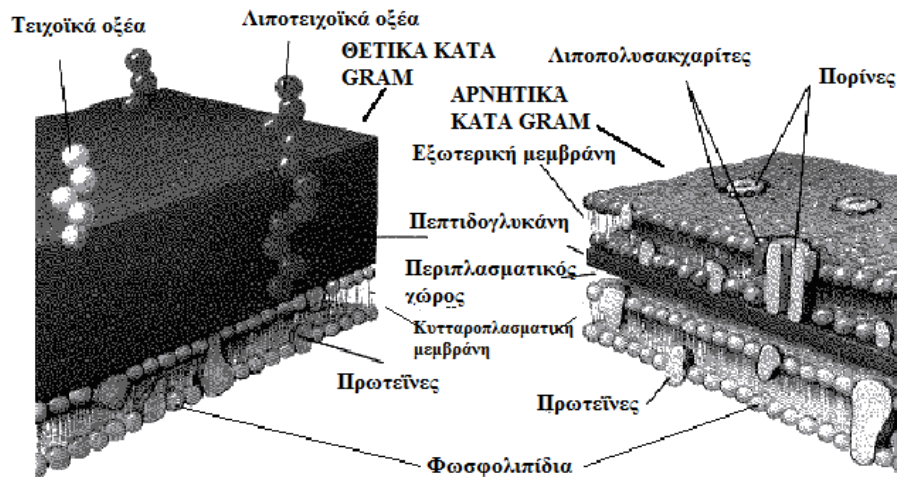
Τα συστατικά των Α.Ε. δρουν επάνω στις πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι κυκλικοί υδρογονάνθρακες δρουν επάνω στα ένζυμα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (ATP-άσες) με δυο πιθανούς μηχανισμούς: 1. Τα μόρια των λιπόφιλων υδρογονανθράκων συσσωρεύονται στη λιπαρή φάση και παρεμποδίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, 2. Σύμφωνα με τον εναλλακτικό μηχανισμό, είναι πιθανή η απευθείας αντίδραση των λιπόφιλων ενώσεων με τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών (Juven et al., 1994).

3.5.2.4 Ευαισθησία των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων έναντι της δράσης των Α.Ε.

Οι περισσότερες από τις έρευνες που έγιναν επάνω στην δράση των Α.Ε. σε μικροοργανισμούς αλλοίωσης των τροφίμων και σε παθογόνα βακτήρια, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα Α.Ε. είναι ελαφρώς πιο δραστικά ενάντια στα θετικά κατά Gram και από ότι στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Deans & Ritchie, 1987; Stecchini et al., 1993; Hao et al., 1998, Wan et al., 1998, Rota et al., 2004).

Το γεγονός αυτό οφείλεται στη διαφοροποίηση της δομής τους, η οποία αφορά κυρίως στη σύνθεση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων αποτελείται από παχιά ομοειδή στρώση πεπτιδογλυκάνης και τειχοϊκά

οξέα ενώ το αντίστοιχο των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αποτελείται από 3 διαφορετικά μέρη: εξωτερική μεμβράνη, 1-2 λεπτά στρώματα πεπτιδογλυκάνης και την κυτταροπλασματική μεμβράνη που αποτελείται από λιπίδια, φωσφολιπίδια και δομικές πρωτεΐνες. Η επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης αποτελείται κυρίως από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πρωτεΐνες (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Methods/cellwalls.html)

Η εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων εμφανίζει υδρόφιλο χαρακτήρα, με αποτέλεσμα να παρακωλύεται η εισχώρηση υδρόφοβων ενώσεων (π.χ. αιθέρια έλαια) στο εσωτερικό του κυττάρου (Vaara, 1992; Rota et al., 2004). Ωστόσο, η επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων φέρει επίσης πρωτεΐνες που διατάσσονται σε τριάδες και σχηματίζουν πόρους (πορίνες, Εικόνα 3.4). Οι πόροι αυτοί λειτουργούν ως κανάλια μεταφοράς (transport channels) τα οποία είναι αρκετά μεγάλα, μέσω των οποίων μπορεί να διέλθουν διάφορα μόρια όπως οι υποκατεστημένες φαινολικές ενώσεις των αιθέριων ελαίων. Οι εισερχόμενες μέσω των πορίνων φαινολικές ενώσεις διαπερνούν στη συνέχεια στον περιπλασματικό χώρο και μπορούν να καταλήξουν τελικά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου (Holley & Patel, 2005; Lambert et al., 2001).

Μαζί με τις δομικές διαφορές του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων που συμβάλλουν σημαντικά στην εκδήλωση αντίστασης ή ευαισθησίας απέναντι στην δράση των Α.Ε., πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και οι διαφορές του μεταβολισμού τους. Ανάμεσα στα θετικά κατά Gram βακτήρια,

συγκαταλέγονται και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία είναι τα περισσότερο ανθεκτικά. Η ανθεκτικότητα τους οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα τους να παράγουν ATP μέσω φωσφορυλίωσης. Επιπλέον, η μεγάλη ανθεκτικότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλεται στην ικανότητά τους να επιβιώνουν σε συνθήκες έντονης οσμωτικής πίεσης καθώς και στην ικανότητά τους να ανταποκρίνονται άμεσα στην εκροή ιόντων K^+ που προέρχεται από την δράση αντιμικροβιακών παραγόντων (Holley & Patel, 2005). Η εξέταση της αντιμικροβιακής δράσης διάφορων μιγμάτων αιθέριων ελαίων και συστατικών τους επάνω σε διάφορα μικροβιακά στελέχη, οδήγησε σε αξιοσημείωτα αποτελέσματα. Εναντία στις Ψευδομονάδες δοκιμάστηκαν τα αιθέρια έλαια της ρίγανης (Skandamis et al., 2002) καθώς και μίγμα λιναλόλης (linalool) και χαβικόλης (chavicol), που είναι φαινολικά συστατικά των αιθέριων ελαίων (Smith-Palmer et al., 1998). Επάνω στα μικροβιακά στελέχη του *P. aeruginosa* εφαρμόστηκε μίγμα τερπενοϊδών, καρβακρόλης και θυμόλης (Griffim et al., 1999) πιπέρι (Caeraga et al, 2003). Τέλος, ενάντια στα βακτηριακά στελέχη του βακτηρίου *P. fluorescens* δοκιμάστηκε η δράση του συστατικού “Annatto” (Εμπορική ονομασία προέλευσης αιθέριου ελαίου, Galindo-Cuspinera et al., 2003). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων των παραπάνω ερευνών οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι Ψευδομονάδες ήταν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια που έδειξαν υψηλή έως μέγιστη ανθεκτικότητα στην δράση των αντιμικροβιακών.

3.5.2.5 Αιθέριο έλαιο θυμαριού

Τα κύρια συστατικά των αιθέριων ελαίων του θυμαριού (*Thymus vulgaris*) σε αυτοφυή κατάσταση είναι τα εξής (Asslani et al., 2003): η θυμόλη (21,4-60,2%), η καρβακρόλη (1,15-3,4%), το γ-τερπινένιο (4,2-27,6%), το p-κυμένιο (7,8-44%), και το β-καρυοφιλλένιο (1,3-3,7%). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ποιοτική και την ποσοτική χημική σύσταση του αιθέριου ελαίου



ενός είδους είναι οι εξής (Panou-Philotheou, 1999): Ο γενότυπος του φυτού, το υψόμετρο της περιοχής, το στάδιο ανάπτυξης που έγινε η συγκομιδή, το βοτανικό τμήμα που συγκομίσθηκε, η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας, το έδαφος και οι κλιματολογικές συνθήκες.

3.5.3 Χιτίνη και Χιτοζάνη

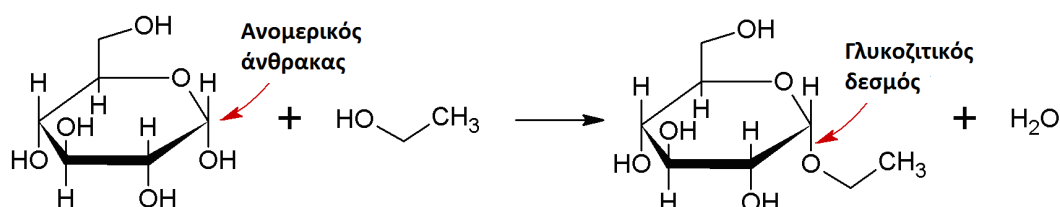
3.5.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά-Προέλευση

Η χιτίνη και το παράγωγό της, η χιτοζάνη, είναι δύο “φυσικά” πολυμερή που απαντώνται σε μεγάλο βαθμό στη φύση. Η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία βιοπολυμερές στη φύση, με πρώτο την κυτταρίνη. Αποτελεί το κυριότερο συστατικό: του κελύφους θαλάσσιων οστρακόδερμων (σταθεροποιείται μέσω διαμοριακών δεσμών με πρωτεΐνες και υδροξυφαινόλες), του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων (ισχυρά προσδεδεμένη με γλυκάνες), του εξωσκελετού των εντόμων (συνυπάρχει με καροτενοειδή), των πρωτόζωων, των αλγών (**Πίνακας 3.7**).

Πίνακας 3.7: Οι κυριότερες πηγές Χιτίνης/Χιτοζάνης (Mathur, 1990)

Θαλάσσια είδη	Έντομα	Μικροοργανισμοί
Διαιρούμενοι σκώληκες και βδέλλες (<i>Annelida</i>)	Σκορπιοί	Άλγη
Μαλάκια (<i>Mollusca</i>)	Αράχνες	Ζύμες
Μέδουσες (<i>Coelenterate</i>)	Βραχειόποδα	Μύκητες (<i>Chytridiaceae</i> , <i>Ascomydes</i> , <i>Blastocladiaceae</i>)
<u>Οστρακοειδή</u> : Αστακοί, Καβούρια, Γαρίδες, Καραβίδες	Σκαθάρια	Σπόρια μυκήτων

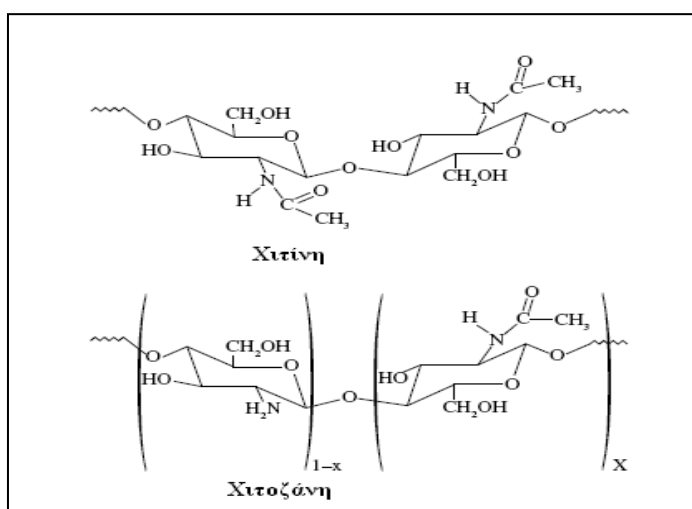
Η χιτίνη, πολύ-(β-(1-4)-N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη), είναι γραμμικό πολυμερές υψηλού μοριακού βάρους, αποτελούμενο από ολιγομερή N-ακετυλογλυκοζαμίνης, τα οποία είναι συνδεδεμένα με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς (1000-3000 units). Σημειώνεται ότι ως γλυκοζιτικός δεσμός χαρακτηρίζεται ο δεσμός που δημιουργείται μεταξύ του ανομερικού άνθρακα μιας εσωτερικής (ενδομοριακής) ημιακετάλης (άνθρακας στη θέση 1), και της υδροξυλομάδας (-OH) άλλων ενώσεων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.5**.



Εικόνα 3.5: Σχηματισμός γλυκοζιτικού δεσμού

Η χιτίνη εμφανίζεται με τη μορφή διατεταγμένων κρυσταλλικών μικροϊνιδίων που της προσδίδουν ιδιαίτερα σταθερή δομή. Χαρακτηρίζεται από εξαιρετικές ιδιότητες, καθώς είναι σκληρή και αδιάλυτη, αλλά ταυτόχρονα εύκαμπτη, και παρουσιάζει άριστη βιοσυμβατότητα. Ωστόσο, παρά την αφθονία στη φύση, η έλλειψη ικανοποιητικών τεχνικών καθαρισμού μετά την απομόνωσή της από τους φυσικούς οργανισμούς, έτσι ώστε να προκύψει ένα άχρωμο προϊόν που είναι απαλλαγμένο από κάθε είδους επιμολύνσεις και κατά συνέπεια κατάλληλο να χρησιμοποιηθεί ως βιοϋλικό, ήταν ο κύριος ανασταλτικός παράγοντας για τη χρήση της μέχρι πρόσφατα. Σήμερα έχουν ήδη υιοθετηθεί χημικές τεχνικές για την εξαγωγή της από τα κελύφη των αρθρόποδων και οστρακόδερμων, όπως επίσης και για τον καθαρισμό και τον αποχρωματισμό της.

Η **χιτοζάνη** είναι το παράγωγο της χιτίνης μετά τη (μερική) αποακετυλίωσή της σε στερεή κατάσταση, κάτω από αλκαλικές συνθήκες (συμπυκνωμένο NaOH) ή με ενζυματική υδρόλυση. Η χιτοζάνη είναι πολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από ολιγομερή των γλυκοζαμινών (αμινοσακχάρων): 2-δέοξυ-2-άμινο-D-γλυκοπυρανόζης και, σε μικρότερο βαθμό, 2-δέοξυ-2-ακετάμιδο-γλυκοπυρανόζης (Fernandes et al., 2008; Fernandez-Saiz et al., 2010). Τα (όμοια) ολιγομερή συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς (βιοπολυμερές). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.6**, η χιτοζάνη φέρει στη στερεοχημική της δομή τρεις διαφορετικούς τύπους ενεργών ομάδων: μια αμινομάδα $-NH_2$ στην θέση C-2, και τρεις υδροξυλομάδες στις θέσεις C-3 και C-6, αντίστοιχα.



Εικόνα 3.6: Στερεοχημικές δομές χιτίνης και χιτοζάνης (Goy et al., 2009)

3.5.3.2 Αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης

Η χιτοζάνη παρουσιάζει δραστηριότητα έναντι διαφόρων βακτηρίων: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacter aeromonas*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, και σε ζύμες, μύκητες όπως ο *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lambica*, *Rhodotorula glutensi*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* (Shahidi et al., 1999; Helander et al., 2001; Devlieghere et al., 2004; Inatsu et al., 2005, Marques et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Chung & Chen 2008).

Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) των βακτηρίων που καταγράφηκαν για χιτοζάνη διαφορετικού βαθμού αποακετυλίωσης/Μοριακού Βάρους κατά τη διάρκεια δοκιμών “in vitro” παρουσιάζονται στον παρακάτω **Πίνακα 3.8**.

Πίνακας 3.8: Ελάχιστες Ανασταλτικές Συγκεντρώσεις (MIC) της χιτοζάνης *in vitro* έναντι ορισμένων βακτηρίων

Βακτήριο	Είδος/Χαρακτηριστικά Χιτοζάνης	MIC (αναφ.)
<i>Staphylococcus aureus</i>	MB=628 KDa 80-85% αποακετυλιωμένη	0,15% w/v (1)
	MB=591 kDa 80-85% αποακετυλιωμένη	0,20% w/v (1)
	MB= 107 KDa 80-85% αποακετυλιωμένη	0,20% w/v (1)
	MB=άγνωστο 69% αποακετυλιωμένη	100 ppm (2)
	MB=35 KDa	0,005% w/v (3)
<i>Listeria monocytogenes</i>	MB=άγνωστο 69% αποακετυλιωμένη	100 ppm (2)
	MB=43 KDa 94% αποακετυλιωμένη	0,006-0,01% w/v (5)
<i>Salmonella typhimurium</i>	MB=άγνωστο 69% αποακετυλιωμένη	>2000 ppm
<i>Salmonella enterica</i>	MB=μεσαίο 75-85% αποακετυλιωμένη	0,03% v/v (6)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	MB=43 KDa 94% αποακετυλιωμένη	0,006% w/v (5)
<i>Enterobacter aeromonas</i>	MB=43 KDa 94% αποακετυλιωμένη	0,006% w/v (5)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	MB=43 KDa 94% αποακετυλιωμένη	0,008% w/v (5)
<i>Bacillus cereus</i>	MB=43 KDa 94% αποακετυλιωμένη	0,006% w/v (5)
	MB=άγνωστο 69% αποακετυλιωμένη	1000 ppm (2)
	MB= 1671	0,05% w/v (7)
	MB= 470	0,03% w/v (7)
	MB=224	0,05% w/v (7)
	MB=59	>0,1% w/v (7)
	MB= 8.5-9.5	0,01% w/v (8)
<i>Bacillus spp.</i>	MB= 59-1671	0,005% w/v (7)

(1) Fernandes et al., 2008, (2) Chen et al. (1998), (3) Chang et al. (1989), (4) Simpson et al. (1997), (5) Devlieghere et al. (2004), (6) Marques et al. (2008), (7) No et al. (2002), (8) Vishu Kumar et al., (2007)

3.5.3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αντιβακτηριακή δράση της Χιτοζάνης

Όπως φαίνεται στον παραπάνω Πίνακα 3.8, η MIC της χιτοζάνης ενάντια στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών δεν είναι πάντοτε η ίδια, αλλά διαφοροποιείται ανάλογα με το Μοριακό Βάρος (MB) και το βαθμό αποακετυλίωσης (DD). Εκτός όμως από το MB και DD, υπάρχουν και άλλοι δυο παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά την αντιβακτηριακή δραστηριότητα της χιτοζάνης, όπως η πηγή προέλευσής της (θαλάσσια οστρακοειδή, μύκητες, κ.λ.π.), το pH του υποστρώματος, το είδος του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των διαλυμάτων χιτοζάνης, καθώς και από το είδος/φάση ανάπτυξης του βακτηρίου που εξετάζεται κάθε φορά (Chhabra et al., 2006). Τέλος, στην περίπτωση που η αντιβακτηριακή δραστηριότητα της χιτοζάνης αξιολογείται σε αληθινά τρόφιμα (*in vivo*) και όχι σε μοντέλα αυτών (*in vitro*) η χημική σύσταση του προϊόντος και η θερμοκρασία συντήρησης, μπορεί να περιορίσει την αποτελεσματικότητά της. Ορισμένοι από τους παραπάνω παράγοντες αναλύονται περαιτέρω ως εξής:

α) Μοριακό Βάρος (MB) της Χιτοζάνης

Το MB της χιτοζάνης έχει αναφερθεί να επηρεάζει σημαντικά την δραστηριότητά της. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι ανάλογα με το μικροοργανισμό-στόχο η χιτοζάνη μικρού (LMW), μεγάλου (HMW) ή μεσαίου (MMW) MB παρουσιάζει διαφορετική δραστηριότητα κάθε φορά. Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα των ερευνών σχετικά με την επίδραση του MB στην αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης, ποικίλουν και μπορεί να είναι αντιφατικά. Σε ορισμένες από αυτές τις έρευνες αναφέρονται τα εξής συμπεράσματα:

- Σύμφωνα με τους Dutta et al. (2009) χιτοζάνη MB χαμηλότερου από 10 kDa, φάνηκε να παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με την χιτοζάνη κανονικού MB (native).
- Οι Tsai et al. (2006) αναφέρουν ότι χιτοζάνη LMW παρουσίασε (ελαφρώς) μικρότερη δραστηριότητα από την αντίστοιχη HMW σε pH=6.0 αλλά σε pH=7.0 η χιτοζάνη LMW υπέρσχυσε σημαντικά της HMW
- Οι Fernandes et al. (2009) παρατήρησαν ότι κατά την εφαρμογή χιτοζάνης LMW (100 KDa) ενάντια στην ανάπτυξη των βλαστικών (vegetative) μορφών του *B. cereus*, η μείωση των κυττάρων κυμάνθηκε από 1 έως 2,5 log CFU/g, ενώ η χρήση χιτοζάνης με μεγαλύτερο MB (628 KDa) οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα (σταθερή μείωση κατά 3,0 log CFU/g). Εντούτοις, η χρήση ολιγομερούς της χιτοζάνης οδήγησε σε

μείωση κατά 1,0 log CFU/g των σπόρων του βακτηρίου, ενώ οι υπόλοιπες δεν είχαν καμία επίδραση.

- Οι Devlieghere et al. (2004) αναφέρουν ότι η χιτοζάνη LMW (43 kDa) ήταν περισσότερο δραστική στην αναχαίτιση της ανάπτυξης αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ($MIC \leq 0,006\% \text{ w/v}$) σε σχέση με ορισμένα Gram-θετικά οξυγαλακτικά βακτήρια ($MIC > 0,05\% \text{ w/v}$).
- Οι Lin & Chao (2001) αναφέρουν ότι η χιτοζάνη LMW (150 kDa), ήταν πιο δραστική στην μείωση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας λουκάνικων, σε σχέση με χιτοζάνη HMW (1250 kDa) ή MMW (600 kDa), κατά την συντήρηση υπό ψύξη.
- Οι Liu et al. (2001) αναφέρουν ότι αύξηση του MB της χιτοζάνης (>91.6 kDa) οδήγησε σε μείωση της αντιβακτηριακής της δράσης.
- Σύμφωνα με τους Fernandes et al., (2008) χιτοζάνη MB 107, 591 ή 628 kDa επέδειξε την ίδια δραστηριότητα ενάντια στην ανάπτυξη του *E. coli*, η οποία ωστόσο ήταν ασθενέστερη της αντίστοιχης των ολιγοσακχαριδίων αυτής ($MB \leq 5 \text{ kDa}$), ενώ στην περίπτωση του *S. aureus* παρατηρήθηκε ότι χιτοζάνη LMW, HMW ή MMW, ξεπέρασε κατά πολύ σε δραστηριότητα τα ολιγοσακχαρίδια. Οι ερευνητές απέδωσαν την διαφορά δραστηριότητας στο ότι τα ολιγοσακχαρίδια πιθανόν να διεισδύουν ευκολότερα στο κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων σε σχέση με την χιτοζάνη LMW, HMW ή MMW. Ωστόσο, η χιτοζάνη LMW, HMW, MMW θεωρήθηκε ότι είναι περισσότερο αποτελεσματική ενάντια στα Gram θετικά, λόγω καλύτερης ικανότητας απορρόφησης συστατικών που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή τους (Fernandes et al., 2008).

β) Επίδραση του pH:

Σε γενικές γραμμές, η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης αυξάνεται, όσο το pH του υποστρώματος μειώνεται, λόγω του γεγονότος ότι όσο αυξάνει η οξύτητα του υποστρώματος, τόσο αυξάνει ο αριθμός των θετικά φορτισμένων (protonated) ελεύθερων αμινομάδων της χιτοζάνης ($-NH_3^+$). Οι “πρωτονιωμένες” αμινομάδες της χιτοζάνης αλληλεπιδρούν με την ηλεκτραρνητική επιφάνεια των βακτηρίων (λιποπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, τειχοϊκά οξέα, λιπίδια), με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής τους μεμβράνης και την απώλεια ενδοκυτταρικών συστατικών που οδηγεί τελικά στο θάνατό τους (Devlieghere et al., 2004) όπως θα περιγραφεί αναλυτικότερα στην επόμενη παράγραφο **3.5.3.4**.

Σύμφωνα με τους Helander et al. (2001), η αντιβακτηριακή δράση ενάντια στα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι πιο έντονη σε περιοχή $\text{pH} < 6,3$, λόγω μεγαλύτερου αριθμού θετικά φορτισμένων αμινομάδων στο μοριακό πλέγμα της χιτοζάνης. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Tsai et al. (2006) η χιτοζάνη χαμηλού MB (LMWC) μπορεί να διατηρήσει σε μεγάλο βαθμό την δραστηριότητά της ακόμη και σε ουδέτερο $\text{pH} = 7,0$, σε αντίθεση με την συμβατική (native) χιτοζάνη. Συγκεκριμένα, οι Tsai et al. (2006) παρατήρησαν ότι η χρήση χιτοζάνης LMWC μείωσε τον βακτηριακό πληθυσμό μίγματος στελεχών του *B. cereus* κατά $3-4 \log \text{CFU/g}$ σε $\text{pH} = 6$ ή $\text{pH} = 7$. Η αντίστοιχη αντιμικροβιακή δράση της συμβατικής (native) «native» χιτοζάνης ενώ ήταν σημαντική σε $\text{pH} = 6$ (μείωση $> 3,0 \log \text{CFU/g}$) σε ουδέτερο pH έπαψε να είναι πλέον ορατή (Tsai et al., 2006). Συνεπώς, η χαμηλού MB χιτοζάνη δε φαίνεται να επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το pH του υποστρώματος, λόγω της διαφορετικής τιμής pKa των αμινομάδων της, σε σχέση με την συμβατική χιτοζάνη (Tsai et al., 2006), τουλάχιστον σε ότι αφορά την αντιμικροβιακή της δράση της ενάντια σε Gram-θετικά βακτήρια.

γ) Βαθμός ακετυλίωσης:

Σε γενικές γραμμές, η πλειοψηφία των ερευνών αναφέρει ότι η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης ενισχύεται σημαντικά με την αύξηση του βαθμού αποακετυλίωσης, λόγω των περισσότερων διαθέσιμων ελεύθερων δραστικών αμινομάδων και της μεγαλύτερης διαλυτότητάς της (Aider et al., 2010, Vishu Kumar et al., 2007).

δ) Χημική σύσταση προϊόντος (in vivo έρευνες):

Η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά όταν εξετάζεται σε αληθινά τρόφιμα αντί μοντέλα αυτών, λόγω αλληλεπίδρασης με τα θρεπτικά τους συστατικά, όπως προαναφέρθηκε και στην περίπτωση των αιθέριων ελαίων. Οι Ausar et al. (2002) αναφέρουν ότι η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης ενάντι της ανάπτυξης οξυγαλακτικών βακτηρίων ζύμωσης περιορίστηκε όταν η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε γάλα αντί σε μοντέλο αυτού. Επίσης, οι Devlieghere et al. (2004) αναφέρουν ότι η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης μπορεί να περιοριστεί όσο αυξάνει η περιεκτικότητα των τροφίμων σε χλωριούχο νάτριο και άμυλο, αλλά δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τη λιποπεριεκτικότητα του τροφίμου. Ωστόσο, οι Chung et al. (2003) αναφέρουν ότι αύξηση της περιεκτικότητας σε άλας αυξάνει την αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης, λόγω φαινομένων ιονισμού. Τέλος, οι Devlieghere et al. (2004) αναφέρουν

ότι η επίδραση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στην αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης εξαρτάται από το pH του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι όσο το pH του υποστρώματος είναι χαμηλότερο από το ισοηλεκτρικό σημείο (IEP) των πρωτεϊνών, τότε η χιτοζάνη διατηρεί τη δραστηριότητά της σε μεγάλο βαθμό, επειδή λόγω του θετικού φορτίου αμφοτέρων, δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (άπωση). Αν οι πρωτεΐνες αποκτήσουν αρνητικό φορτίο ($\text{pH} > \text{pI}$), τότε οι αμινομάδες ($-\text{NH}_3^+$) χάνουν την κατιονική τους υπόσταση και δεν είναι πια διαθέσιμες να αλληλεπιδράσουν με αρνητικά φορτισμένα μόρια της επιφάνειας των βακτηρίων (Devlieghere et al., 2004).

ε) Φάση ανάπτυξης και πληθυσμός των μικροοργανισμών-στόχων:

Η βακτηριακή φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών-στόχων, επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης ενάντια στην ανάπτυξή τους. Συγκεκριμένα, βακτηριακά κύτταρα τα οποία βρίσκονταν στα τελευταία στάδια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, φάνηκαν να είναι πιο ευαίσθητα στην επίδραση της χιτοζάνης σε σχέση με εκείνα που βρίσκονταν στη στατική φάση (Tsai et al., 2006). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο ότι κύτταρα της εκθετικής φάσης έχουν περισσότερα αρνητικά φορτισμένα μόρια στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος από τα αντίστοιχα της στατικής φάσης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τα μόρια χιτοζάνης (Tsai et al. (2006).

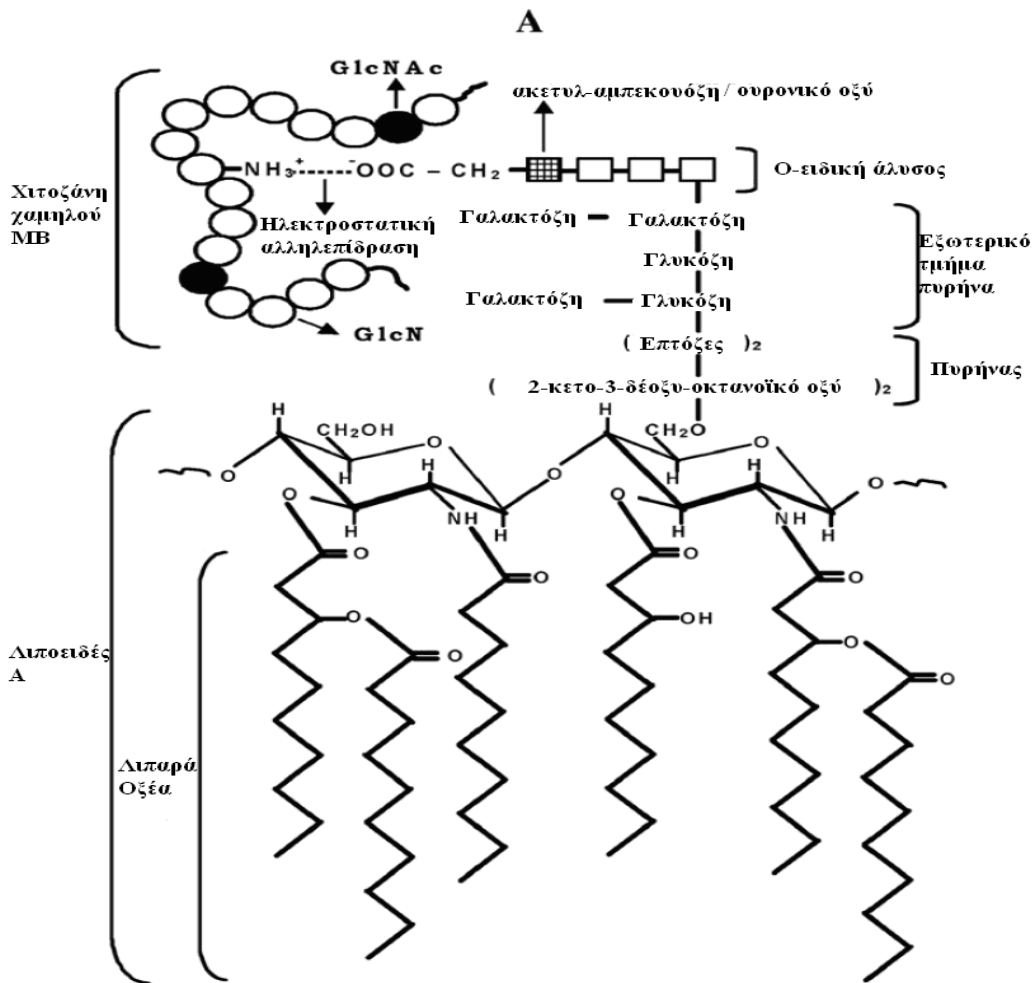
Επίσης, η αρχική συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού των μικροοργανισμών-στόχων επηρεάζει σημαντικά την αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης ενάντια στην ανάπτυξή τους. Σύμφωνα με τους Fernandes et al. (2008), αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης ενάντια στο βακτήριο *E. coli*, μειώθηκε σημαντικά όταν η συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος αυξήθηκε από 10^3 σε 10^5 ή 10^7 CFU/mL (τα ολιγοσακχαρίδια της χιτοζάνης δεν φάνηκαν να επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό). Επανάληψη της ίδιας διαδικασίας στο βακτήριο *S. aureus* έδειξε ότι η χιτοζάνη HMW κατάφερε να διατηρήσει την αντιμικροβιακή της δράση σε υψηλή συγκέντρωση ενοφθαλμίσματος, σε σχέση με την αντίστοιχη LMW (Fernandes et al., 2008).

3.5.3.4 Μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης της χιτοζάνης

Ο μηχανισμός της αντιβακτηριακής δράσης της χιτοζάνης, δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Ωστόσο, έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες, και δεν αποκλείεται ο αντιβακτηριακός μηχανισμός της χιτοζάνης να είναι ένας συνδυασμός των παρακάτω δράσεων:

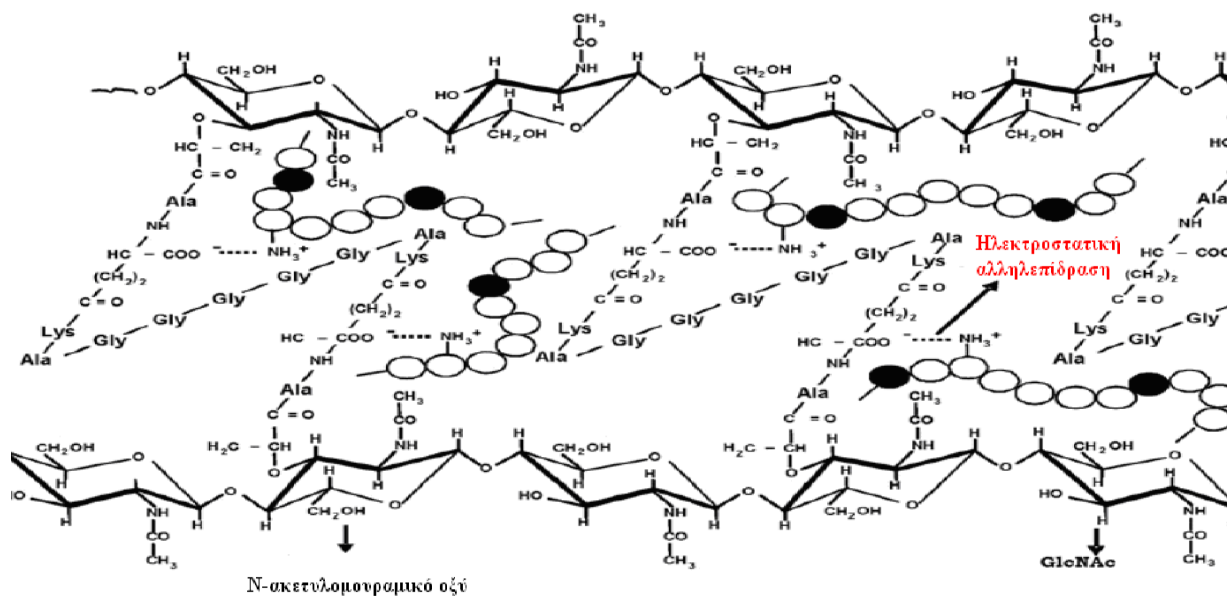
α) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των ενεργών μορίων της χιτοζάνης (αμινομάδων – NH_3^+) με αρνητικά φορτισμένα μόρια της επιφάνειας του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

Αρνητικά κατά Gram βακτήρια: Το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων αποτελείται από 3 διαφορετικά μέρη: εξωτερική μεμβράνη, 1-2 λεπτά στρώματα πεπτιδογλυκάνης και την κυτταροπλασματική μεμβράνη που αποτελείται από λιπίδια, φωσφολιπίδια και δομικές πρωτεΐνες. Η εξώτατη επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης αποτελείται κυρίως από λιποπολυσακχαρίτες (LPS) και πρωτεΐνες. Οι LPS αποτελούνται από 3 διαφορετικά μέρη: την Ο-ειδική αλυσίδα, τον πυρήνα και το λιποειδές Α. Η Ο-ειδική αλυσίδα αποτελείται από γλυκόζη, γαλακτόζη, ουρονικό οξύ και άλλες αλληλουχίες σακχάρων (Abe-Man-Rha-Gal) που φέρουν αρνητικό φορτίο. Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων αρνητικά φορτισμένων μορίων με τα θετικά φορτισμένα ενεργά μόρια της χιτοζάνης (αμινομάδες $-\text{NH}_3^+$) οδηγεί σε δέσμευση των δευτέρων στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό δίνει το πρώτο έναυσμα για την απαρχή μιας σειράς μεταβολών της κυτταρικής δομής των βακτηρίων: απελευθέρωση LPS από την εξωτερική μεμβράνη που οδηγεί σε εκτεταμένη εκροή ιόντων (Ca^{+2} , Mg^{+2}) και ύδατος, με αποτέλεσμα την «αποκόλληση» της από το κυτταρικό τοίχωμα. Το κυτταρικό τοίχωμα/κυτταροπλασματική μεμβράνη υποβάλλονται σε συνθήκες έντονου οσμωτικού στρες με αποτέλεσμα την εκροή ενδοκυτταρικών συστατικών του και θρόμβωση του κυτταροπλάσματος που οδηγούν το κύτταρο στο θάνατο (Chung & Chen, 2008, Vishu Kumar et al., 2007, **Εικόνα 3.7**). Επιπρόσθετα, η χιτοζάνη διαταράσσει την φυσιολογική αντλία ροής-εκροής ηλεκτρονίων του κυττάρου, με αποτέλεσμα παρεμποδίζεται η σωστή παροχή οξυγόνου, και να εξαναγκάζεται σε αναερόβιο μεταβολισμό (Rafaat et al., 2008, Chung & Chen, 2008).



Εικόνα 3.7: Αλληλεπίδραση της χιτοζάνης χαμηλού ΜΒ (LMWC) με την εξωτερική μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Vishu Kumar et al., 2007)

Θετικά κατά Gram βακτήρια: Το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων δεν περιβάλλεται από εξωτερική μεμβράνη όπως την περίπτωση των αρνητικών κατά Gram, αλλά από παχιά ομοειδή στρώση πεπτιδογλυκάνης, η οποία αποτελείται από: N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ συνδεδεμένα με β, 1-4, γλυκοζιτικό δεσμό, αμινοξέα και τειχοϊκά οξέα (πολυμερή της ριβιτόλης και γλυκερόλης). Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των συγκεκριμένων αρνητικά φορτισμένων μορίων με τα θετικά φορτισμένα ενεργά μόρια της χιτοζάνης (αμινομάδες $-\text{NH}_3^+$) οδηγεί σε δέσμευση των δευτέρων στην πεπτιδογλυκάνη (υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης) με αποτέλεσμα την εκροή ιόντων καλίου και άλλων πρωτεϊνικών ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκό οξύ, γλυκόζη, αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος, Goy et al., 2009). Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση χιτοζάνης- πεπτιδογλυκάνης των Gram-θετικών βακτηρίων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.8**.



Εικόνα 3.8: Αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με το κυτταρικό τοίχωμα των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Vishu Kumar et al., 2007)

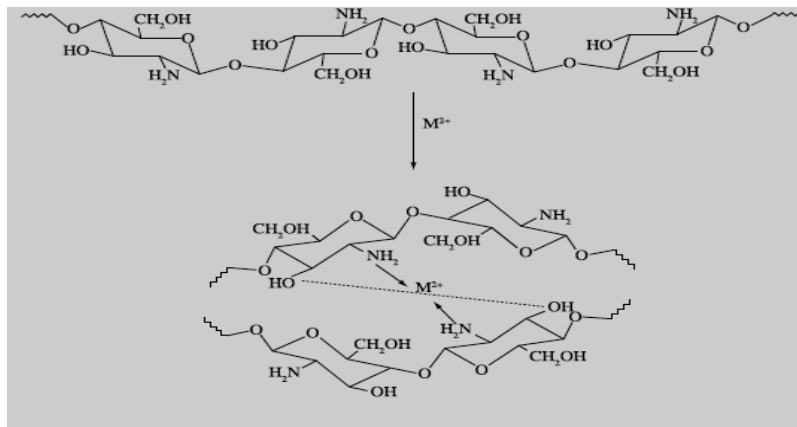
Σημειώνεται ότι η χιτοζάνη φαίνεται να δρα με παρόμοιο τρόπο και στην περίπτωση της θανάτωσης των μυκήτων (Helander et al., 2001; Coma et al., 2002; Vishu Kumar et al., 2007; Raafat et al., 2008; Chung & Chen, 2008;).

Σύμφωνα με το μηχανισμό «ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης», όσο περισσότερες είναι οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες της χιτοζάνης, τόσο υψηλότερη αναμένεται να είναι και η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τους Goy et al. (2009), αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των κατιονικών ομάδων που είναι διαθέσιμες για την δέσμευση επί της επιφάνειας των βακτηρίων. Συνεπώς, κατά τη μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης της χιτοζάνης σε *in vitro* ή *in vivo* έρευνες, είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός της κατάλληλης συγκέντρωσης της χιτοζάνης, έτσι ώστε να διατηρεί τις ιδιότητές της σε ικανοποιητικό βαθμό. Οι έρευνες που έγιναν επάνω στην δράση της χιτοζάνης σε μικροοργανισμούς αλλοίωσης των τροφίμων και σε παθογόνα βακτήρια, δεν έχουν καταλήξει σε ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τον αν η χιτοζάνη είναι πιο δραστική ενάντια στα θετικά από ότι στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Goy et al., 2009). Ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι η χιτοζάνη, σε γενικές γραμμές, έχει επιδείξει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στα θετικά κατά Gram βακτήρια όπως η *L. monocytogenes*, *Bacillus spp.*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. vulgaris* κ.λ.π, από ότι στα

αρνητικά κατά Gram βακτήρια (*E.coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahaemolyticus* κ.λ.π.). Αντιθέτως, οι Chung et al. (2004) αναφέρουν ότι η εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων καθιστά την βακτηριακή επιφάνεια ισχυρά υδρόφιλη με αποτέλεσμα να καθίστανται πιο επιρρεπή στην επίδραση της χιτοζάνης. Επίσης, στην ίδια έρευνα διαπιστώθηκε ότι το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με το αντίστοιχο των θετικών κατά Gram βακτηρίων που εξετάστηκαν, με αποτέλεσμα τα πρώτα, να είναι πιο ευαίσθητα στην επίδραση της χιτοζάνης. Ανάμεσα στα αρνητικά κατά Gram που εξετάστηκαν, το σύνολο του αρνητικού φορτίου του κυτταρικού τοιχώματος μειώνεται με την εξής σειρά: *Pseudomonas aeruginosa* > *Salmonella typhimurium* > *Escherichia coli*. Η αντίστοιχη σειρά για τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι η εξής: *Staphylococcus aureus* > *Streptococcus faecalis* (Chung et al., 2004). Το ηλεκτρονιακό φορτίο της επιφάνειας των βακτηρίων αποτελεί και τον καθοριστικό παράγοντα για την ποσότητα της χιτοζάνης που προσροφάται κάθε φορά από την κυτταρική μεμβράνη. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω είναι προφανές ότι η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης, καθώς και ο μηχανισμός με τον οποίο χωρεί κάθε φορά, εξαρτάται κυρίως από το είδος του μικροοργανισμού-στόχου.

β) Η χιτοζάνη στερεί από τα βακτηριακά κύτταρα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό τους, όπως ιχνοστοιχεία, μέταλλα, κ.α., μέσω σχηματισμού σταθερών χηλικών συμπλόκων με αυτά (**Εικόνα 3.9**). Επίσης με αυτόν τον τρόπο παρεμποδίζεται η παραγωγή τοξινών από τους μικροοργανισμούς. Σε γενικές γραμμές, ο συγκεκριμένος μηχανισμός, συμβαίνει συνήθως σε υψηλή τιμή pH, όπου οι αμινομάδες της χιτοζάνης είναι μη πρωτονιωμένες με αποτέλεσμα το μονήρες ηλεκτρονιακό ζεύγος να μετατοπίζεται προς το μεταλλικό ιόν:

- Σε $pH < 6$ η συμπλοκοποίηση περιλαμβάνει μόνο μία ομάδα $-NH_2$ και τρεις ομάδες $-OH$, ενώ σε υψηλότερη τιμή $pH > 6.7$ είναι πιο πιθανή η συμμετοχή δύο ομάδων $-NH_2$ (Goy et al., 2009).
- Σε περιοχή $pH 7-9$ η συμπλοκοποίηση περιλαμβάνει δύο ομάδες $-NH_2$ και δύο υδροξύλια $-OH$
- Σύμφωνα με τον μηχανισμό που πρότειναν οι Wang et al. (2005), το μεταλλικό κατιόν M^{2+} ενεργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων που συνδέεται με την ομάδα $-NH_2$ και σχηματίζει γέφυρες με τα υδροξύλια $-OH$ (**Εικόνα 3.9**)



Εικόνα 3.9: Μηχανισμός σχηματισμού συμπλόκων χιτοζάνης-μεταλλικών στοιχείων (Wang et al., 2005)

γ) Τα μόρια της χιτοζάνης σχηματίζουν πολυμερικό στρώμα που επικαλύπτει τα βακτηριακά κύτταρα με αποτέλεσμα την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από την επιφάνεια των, αλλά και την παρεμπόδιση εισροής νέων θρεπτικών ουσιών στο εσωτερικό του κυττάρου.

δ) Τα ολιγομερή της χιτοζάνης μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό του κυττάρου (λόγω μικρότερης μοριακής αλυσίδας, σε σχέση με την “native” χιτοζάνη) και να παρεμποδίσουν την σύνθεση RNA (Shahidi et al., 1999), πιθανόν σύμφωνα με τον εξής μηχανισμό: 1) Σχηματισμός συμπλόκου χιτοζάνης-εξωκυτταρικού DNA, 2) Σύνδεση συμπλόκου χιτοζάνης- DNA σε κατάλληλους υποδοχείς της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, 3) Παθητική μεταφορά συμπλόκου χιτοζάνης- DNA στο εσωτερικό του κυττάρου, 4) Αλληλεπίδραση με ενζυμικά συστήματα του πυρήνα, αναστολή σύνθεσης mRNA και πρωτεϊνών.

ε) Τέλος, η χιτοζάνη έχει προταθεί ότι μειώνει την πρόσληψη νερού από τα βακτήρια και παρεμποδίζει την λειτουργία των ενζυμικών συστημάτων του κυττάρου (Shahidi et al., 1999).

3.5.3.5 Εφαρμογές στην σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων

Η χιτίνη και τα παράγωγά της, όπως η χιτοζάνη, είναι ελάχιστα τοξικές, βιοδιασπώμενες, αδρανείς στο γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ένα εύρος εφαρμογών σε διάφορους επιστημονικούς τομείς, όπως η βιοϊατρική (π.χ. επούλωση πληγών και εγκαυμάτων), η συντήρηση και τεχνολογία

τροφίμων (π.χ. καθυστέρηση μικροβιολογικής αλλοίωσης των τροφίμων, διαύγαση χυμών φρούτων), τεχνολογία πολυμερών (π.χ. δημιουργία βιοαποικοδομήσεων υλικών συσκευασίας), αντιρρύπανση (επεξεργασία υγρών αποβλήτων, καθαρισμός ύδατος), φαρμακευτική (π.χ. σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών) και άλλα (Shahidi et al., 1999). Ορισμένες από τις κυριότερες εφαρμογές της χιτίνης και χιτοζάνης στην σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων, συνοψίζονται ως εξής (Shahidi et al., 1999):

α) Χρήση ως πρόσθετου τροφίμων: διαύγαση χυμών, φυσικό ενισχυτικό γεύσης, γαλακτωματοποιητής, σταθεροποιητής

β) Χρήση ως αντιμικροβιακού παράγοντα: αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική δράση,

γ) Χρήση ως υλικού συσκευασίας τροφίμων: Ελεγχόμενη μεταφορά υγρασίας από το περιβάλλον στα τρόφιμα, ελεγχόμενη διάχυση αντιμικροβιακών παραγόντων ή/και αντιοξειδωτικών ουσιών, θρεπτικών συστατικών, ενισχυτών γεύσης από την συσκευασία στα τρόφιμα, ελεγχόμενος ρυθμός αναπνοής φρούτων και λαχανικών και περιορισμός ενζυμικής αμαύρωσης.

Επιπρόσθετα, η χιτοζάνη είναι μια διαιτητική ίνα, που μειώνει την απορρόφηση λίπους από τον οργανισμό, γι' αυτό και τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής (ενηλίκων και νεογνών) και για την εκτροφή ζώων και ιχθύων (εμπλουτισμός της διατροφής των). Επίσης θεωρείται ότι έχει δράση έναντι της γαστρίτιδας. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας αντιρρύπανσης σε βιομηχανίες τροφίμων (απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων, παρασιτοκτόνων, φαινολών και χρωστικών από τα υγρά απόβλητα) ή για την ακινητοποίηση ενζύμων (Shahidi et al., 1999).

Η χιτοζάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την βιομηχανία τροφίμων σε τρεις διαφορετικές μορφές: **α)** ως “φυσικό” συντηρητικό που προστίθεται απευθείας στα τρόφιμα (λουκάνικα, κιμά κ.λ.π.) σε (στερεή) μορφή σκόνης (Georgantelis, 2007, Georgantelis, 2008, Soultos et al., 2008, Lin & Chao, 2001), **β)** ως “φυσικό” συντηρητικό που προστίθεται απευθείας στα τρόφιμα σε μορφή διαλύματος (dipping, spraying κ.λ.π.). Ως διαλύτες, χρησιμοποιούνται διαλύματα οργανικών οξέων (κυρίως οξικό οξύ, Nobile et al., 2009; Yingyuad et al., 2006; Sago et al., 2002, Inatsu et al., 2005, Ojagh et al., 2010). Στον **Πίνακα 3.9** παρουσιάζονται παραδείγματα εφαρμογών της χιτοζάνης ως αντιμικροβιακού παράγοντα τροφίμων, υπό μορφή σκόνης ή διαλύματος.

Πίνακας 3.9: Η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης σε διάφορα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης

Είδος Χιτοζάνης	Τρόπος εφαρμογής	Είδος τροφίμου (αναφορά)	Αποτέλεσμα
Chitosan glutamate D.D.=75-85% (Drammen, Norway)	Εμβάπτιση σε διάλυμα 1,0% w/v	Λουκάνικα (Sagoo et al., 2002)	Αύξηση μικροβιολογικού και οργανοληπτικού χρόνου συντήρησης από 7 σε 15 ημέρες
Chitosan glutamate D.D.=75-85% (Drammen, Norway)	Προσθήκη διαλύματος → τελική C = 0,3%, 0,6% w/w	Χοιρινός κιμάς (Sagoo et al., 2002)	Μείωση της Ο.Μ.Χ. γαλακτικών βακτηρίων, ζυμών-μυκήτων έως και 3,0 log CFU/g
Commercial grade chitosan (Seafresh Co., Thailand)	Εμβάπτιση σε διάλυμα 2,0- 2,5% w/v	Ψητό χοιρινό (VP) (Yingyuad et al., 2006)	Παράταση μικροβιολογικού και οργανοληπτικού χρόνου συντήρησης κατά 14 ημέρες
Food grade chitosan MW= 4,5*10 ⁵ (Dalian Co., China)	Προσθήκη σε στερεά μορφή 0,5, 1% w/w	Λουκάνικα (Soultos et al., 2008)	Αύξηση μικροβιολογικού και οργανοληπτικού, μείωση Ο.Μ.Χ., γαλακτικών, ψευδομονάδων, κ.λ.π. (1-2 log CFU/g)
Food grade chitosan MW= 4,5*10 ⁵ (Dalian Co., China)	Προσθήκη σε στερεά μορφή 0,5, 1% w/w	Λουκάνικα (Georgantelis et al., 2007)	Διαπλασιασμός μικροβιολογικού και οργανοληπτικού, μείωση Ο.Μ.Χ, γαλακτικών, ψευδομονάδων κ.λ.π. 1,5-2,0 log CFU/g
High Molecular Weight chitosan	Προσθήκη διαλύματος→ τελική C = 0,012 % w/w	Τυρί (DeI Nobile et al., 2009)	Μείωση ψευδομονάδων κατά 2 log CFU/g

γ) ως αντιμικροβιακά βιο-φιλμ (bio-based films) για την συσκευασία τροφίμων (Dutta et al., 2009, Aider 2010).

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων έχει αρχίσει να στρέφεται στη χρήση εδώδιμων (edible) ή μη μεμβρανών και επιστρωμάτων (coatings) από χιτοζάνη για την επέκταση του χρόνου συντήρησης τροφίμων ζωϊκής προέλευσης, φρούτων και λαχανικών, επειδή είναι φιλικά προς το περιβάλλον (οικολογικά) και βιοαποικοδομήσιμα. Οι εξωτερικές επιστρώσεις και οι μεμβράνες από χιτοζάνη παρέχουν στα τρόφιμα προστασία από τη μικροβιολογική, φυσικοχημική και οργανοληπτική αλλοίωση. Η χιτίνη και η χιτοζάνη έχουν ήδη

χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε διάφορες εφαρμογές (food wraps). Οι Η.Π.Α. και ο Καναδάς, έχουν εγκρίνει την χρήση φιλμ από N,O,-καρβόξυ-μεθυλ-χιτίνη για τη συσκευασία φρούτων, από το 1989 (Shahidi et al., 1999). Η χιτοζάνη διαθέτει την ικανότητα να σχηματίζει ημι-διαπερατές μεμβράνες, τα οποία περιορίζουν την μικροβιολογική ή ενζυμική αλλοίωση φρούτων, λαχανικών και άλλων τροφίμων (Shahidi et al., 1999).

Δύσκαμπτα φιλμ χιτοζάνης μπορούν να σχηματιστούν με την χρήση ενώσεων που μεταβάλλουν τις φυσικές ιδιότητες του πολυμερούς (πλαστικοποιητές), έτσι ώστε να διευκολύνουν την συνένωση των μοριακών αλυσίδων μέσω ιοντικών ή ομοιοπολικών δεσμών. Οι ενώσεις ονομάζονται “cross-linking agents” και οι κυριότεροι εκπρόσωποί τους είναι η γλουταραλδεΐδη, γλυκερόλη, πολύ-ηλεκτρολύτες, ανιονικοί πολυσακχαρίτες ή δισθενή μεταλλικά ιόντα (Shahidi et al., 1999). Η παρασκευή μεμβράνης από χιτοζάνη για τη συσκευασία-συντήρηση τροφίμων έχει πραγματοποιηθεί από πολλούς ερευνητές, και ορισμένα από εκείνα που αναφέρονται στη διαθέσιμη βιβλιογραφία είναι τα εξής:

- Μεμβράνη χιτοζάνης με άμυλο (Chitosan-starch films, Tripathi et al. 2008, Zhai et al., 2004, Durango et al., 2006)
- Μεμβράνη χιτοζάνης εμπλουτισμένη με ριγανέλαιο, θυμαρέλαιο (\pm EDTA), γαρυφαλλέλαιο, έλαιο κανέλλας, έλαιο τσαγιό-δενδρου (Zivanovic et al., 2005, Hosseini et al., 2008, Ojagh et al., 2010, Sanchez-Gonzalez et al., 2010)
- Μεμβράνη χιτοζάνης εμπλουτισμένη με έλαιο σκόρδου ή σορβικό κάλιο ή νισίνη (Pranoto et al., 2005)
- Μεμβράνη χιτοζάνης εμπλουτισμένη με λυσοζύμη (Kim et al., 2008)
- Μεμβράνη χιτοζάνης εμπλουτισμένη με νισίνη, σορβικό κάλιο, γαλακτικό νάτριο (Ye et al., 2008).
- Μεμβράνη από χιτοζάνη εμπλουτισμένα με ολεϊκό οξύ (Vargas et al., 2006) ή οξικό/προπιονικό/λαυρικό όξύ, κινναμμαλδεΐδη (Ouattara et al., 2000)

4.0 ΘΕΡΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ

Η θερμική επεξεργασία των τροφίμων αποσκοπεί στην πρόκληση χημικών και δομικών μεταβολών στα τρόφιμα, που διευκολύνουν την κατανάλωσή τους. Η θερμική επεξεργασία των τροφίμων που διατίθενται στο εμπόριο σε νωπή μορφή, τις περισσότερες φορές πραγματοποιείται σε οικιακή κλίμακα από τους ίδιους τους καταναλωτές και μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους όπως π.χ. με χρήση θερμού ατμού, με τηγάνισμα σε λάδι/μαγειρικό λίπος, χρήση ζεστού νερού, χρήση μικροκυμάτων κ.λ.π. Με τις παραπάνω μεθόδους επιτυγχάνεται ουσιαστικά παστερίωση των τροφίμων, δηλαδή ελάττωση του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων των παθογόνων βακτηρίων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών, σε τέτοιο επίπεδο ώστε να μην αποτελούν σημαντικό κίνδυνο για την υγεία (James & James, 2004).

Η χρήση μικροκυμάτων είναι μια μέθοδος θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων η οποία εφαρμόζεται σε εμπορική κλίμακα, με σκοπό την παστερίωση, και την μείωση του βακτηριακού φορτίου των τροφίμων αλλά και της συσκευασίας αυτών, καθώς και σε οικιακή κλίμακα με σκοπό το ξεπάγωμα ή/και το ψήσιμο των τροφίμων.

4.1 ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ-ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΥΛΗ

Τα μικροκύματα είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία χαμηλής ενέργειας ($\nu = 10^8 - 10^{12}$ Hertz, ενέργεια 2,85 cal/mole, ταχύτητα στο κενό $3 \cdot 10^8$ m/sec). Οι συσκευές μικροκυμάτων που προορίζονται για οικιακή χρήση λειτουργούν συνήθως σε συχνότητα 2450 ± 25 MHz (MHz). Τα περισσότερα τρόφιμα περιέχουν μεγάλη ποσότητα μορίων ύδατος. Τα μόρια του ύδατος έχουν διπολική μορφή, λόγω της διαφοράς ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των ιόντων υδρογόνου και οξυγόνου. Υπό την επίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας των μικροκυμάτων, τα μόρια ύδατος τείνουν να περιστραφούν κατά την διεύθυνση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου των μικροκυμάτων (orientational polarization), με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και την παραγωγή θερμότητας (μετατροπή της κινητικής ενέργειας των μορίων σε θερμότητα, Stolle & Schalch 1999).

Η θερμότητα που παράγεται στην επιφάνεια των τροφίμων, μεταφέρεται σταδιακά στο εσωτερικό της μάζας τους μέσω αγωγής (μεταφορά θερμότητας με επαφή). Με άλλα λόγια, η μεταφορά θερμότητας με την χρήση μικροκυμάτων ακολουθεί δύο διαφορετικά (θερμικά) μοντέλα: απορρόφηση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από την επιφάνεια του τροφίμου με αποτέλεσμα την παραγωγή θερμότητας και ακολούθως, διάχυση της παραγόμενης θερμότητας στο εσωτερικό του τροφίμου (αγωγή). Ο συνδυασμός των δύο διαφορετικών μοντέλων

παραγωγής θερμότητας είναι η αιτία που οδηγεί σε μεγαλύτερη καταστροφή των βακτηρίων των τροφίμων, σε σχέση με τις υπόλοιπες συμβατικές μεθόδους θερμικής επεξεργασίας (Huang & Sites, 2007).

Το κύριο μειονέκτημα που προκύπτει από την χρήση μικροκυμάτων είναι η ανομοιογενής διάχυση της θερμότητας στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία θερμών και ψυχρών περιοχών στην μάζα τους. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο ότι η παραγόμενη ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, καθώς προσπίπτει την επιφάνεια των τροφίμων ή της συσκευασίας αυτών υπάρχει περίπτωση να ανακλαστεί με αποτέλεσμα τη δημιουργία θερμών ή ψυχρών περιοχών. Το ποσό της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που απορροφάται από τα τρόφιμα μπορεί να προσδιοριστεί από την αύξηση της εσωτερικής θερμοκρασίας αυτών (Stolle & Scalch, 1999). Επίσης, η χρήση μικροκυμάτων μπορεί να επιφέρει μεταβολές στη δομή και διατροφική αξία των τροφίμων, η οποία ωστόσο δεν διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη που προκαλείται από την χρήση συμβατικού φούρνου, όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.1**:

Πίνακας 4.1: Επίδραση μικροκυμάτων στα τρόφιμα και τα συστατικά τους (Stolle & Schalch, 1999).

Τρόφιμα/ Συστατικά τροφίμων	Επίδραση μικροκυμάτων
Γάλα	Τελικό περιεχόμενο σε αμινοξέα ανάλογο με αυτό που προκύπτει από συμβατικό ψήσιμο
Πρωτεΐνες	Ελάχιστη μεταβολή της σύστασης των αμινοξέων- ανάλογη δράση με συμβατικό ψήσιμο
Λιπαρά οξέα	Επιτάχυνση της οξειδωσης του λίπους σε κατεψυγμένα φιλέτα ψαριών. Όχι επίδραση σε φρέσκα ψάρια
Μεταλλικά στοιχεία, σίδηρος, ασκορβικό οξύ, θειαμίνη	Η μεταβολή τους είναι ίδια με αυτή που προκύπτει από το συμβατικό ψήσιμο
Pyridoxine (Βιταμίνη Β₆)	Μείωση μικρότερη σε σχέση με συμβατικό ψήσιμο
Ριβοφλαβίνη	Μείωση πολύ μεγαλύτερη από αυτή που προκαλεί το συμβατικό ψήσιμο

4.2 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Η μείωση του πληθυσμού των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών που απαντούν στα διάφορα τρόφιμα υπό την επίδραση των μικροκυμάτων, έχει αποδοθεί σε θερμικά (thermal) και μη-θερμικά φαινόμενα (a-thermal effect). Στην περίπτωση των μη θερμικών φαινομένων, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος των περισσότερων παθογόνων βακτηρίων ταλαντεύεται έντονα υπό την επίδραση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, με αποτέλεσμα την δημιουργία πόρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και κατά συνέπεια την ολοκληρωτική της ρήξη (de Oliveira Mima et al., 2008). Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκή διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα που να επιβεβαιώνουν την συγκεκριμένη άποψη (Aymerich et al., 2008).

Η πιο κοινή αποδεκτή άποψη για την επίδραση των μικροκυμάτων στους μικροοργανισμούς είναι η δημιουργία θερμικών φαινομένων (thermal effects). Τα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης είναι πολύπλοκα συστήματα, λόγω της παρουσία λιπών, πρωτεϊνών και άλλων συστατικών στην μάζα τους (Huang & Sites, 2007). Η περιεχόμενη υγρασία και η περιεκτικότητα σε άλατα αποτελούν σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις διηλεκτρικές ιδιότητες των διαφόρων τροφίμων. Επίσης, έρευνες αναφέρουν ότι αύξηση της λιποπεριεκτικότητας των τροφίμων οδηγεί σε μείωση της διηλεκτρικής σταθεράς με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοανθεκτικότητας των βακτηρίων που απαντούν σε αυτά (Gunasekaran et al., 2005). Ωστόσο, άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι αύξηση της περιεκτικότητας σε λίπος μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη υψηλότερων θερμοκρασιών στην μάζα των τροφίμων με αποτέλεσμα την μεγαλύτερη μείωση των βακτηρίων υπό την επίδραση των μικροκυμάτων (Aymerich et al., 2008).

Στον **Πίνακα 4.2** συνοψίζονται ορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα για την επίδραση των μικροκυμάτων σε παθογόνα βακτήρια και μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση στα τρόφιμα.

Πίνακας 4.2: Επίδραση των μικροκυμάτων σε μικροοργανισμούς

Μικροοργανισμός	Υπόστρωμα	Αποτέλεσμα	Διεργασία (MW)	Αναφορά
<i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i>	Ζαμπόν σε συσκευασία κενού	Μείωση πληθυσμού > 4,0 log CFU/g	27.12 MHz, 600 W, 600 sec	(1*)
<i>Salmonella enteritidis</i>	Φρέσκα μπουτάκια κοτόπουλου	Μείωση πληθυσμού κατά 6,4 log CFU/g	2450 MHz, 800 W, 95 sec	(2*)
<i>E. coli</i> O157:H7	Κομμάτια κοτόπουλου	Μείωση πληθυσμού κατά 6,0 log CFU/g	2450 MHz, 650 W, 35 sec	(3*)
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα <i>E. coli</i> O157:H7 <i>S. aureus</i>	Κεφτεδάκια	Μείωση πληθυσμού κατά 6,0 log CFU/g Μείωση πληθυσμού >4,0 log CFU/g Μείωση πληθυσμού >3,5 log CFU/g	2450 MHz, 800 W, 300 sec	(4*)
<i>L. monocytogenes</i>	Συσκευασμένα Λουκάνικα Φρανκφούρτης	Μείωση πληθυσμού κατά 0,94 log (CFU/ρΚ)/min	2450 MHz, 550 W, 360 sec	(5*)

(1*) Orsat et al. (2004), (2*) Pucciarelli & Benassi (2005), (3*) Apostolou et al. (2005), (4*) Yilmaz et al. (2005), (5*) Huang & Sites (2007)

Οι μικροοργανισμοί διαίρονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες με βάση την θερμοευαισθησία τους (Enfors 2008):

1) **Βακτηριακοί σπόροι:** παράγονται από βακτήρια του είδους *Bacillus* spp. και *Clostridium* spp., και είναι εξαιρετικά ανθεκτικοί στην θέρμανση, την ακτινοβολία με UV, την ξήρανση και στην επίδραση χημικών συντηρητικών. Απαιτείται θέρμανση σε θερμοκρασία >100 °C προκειμένου να επιτευχθεί η θανάτωσή/αδρανοποίησή τους

2) **Βλαστικά κύτταρα και σπόρια μυκήτων:** Τα σπόρια των μυκήτων είναι πολύ ανθεκτικά στην ξήρανση (drying) αλλά εμφανίζουν ελαφρώς μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα από την αντίστοιχη των βλαστικών κυττάρων. Προκειμένου να αδρανοποιηθούν/θανατωθούν τα σπόρια και τα βλαστικά κύτταρα υπό την επίδραση της θερμικής επεξεργασίας, η θερμοκρασία που απαιτείται ποικίλει από 50 °C έως και 90 °C (παστερίωση), ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού.

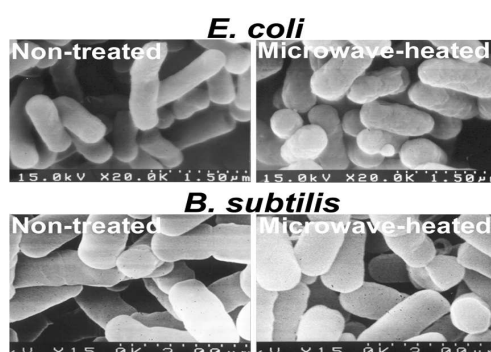
Σύμφωνα με τους Stolle & Schach (1999) η χρήση μικροκυμάτων έχει αποδειχτεί ιδιαίτερα αποτελεσματική για την μείωση του πληθυσμού των περισσοτέρων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που σχετίζονται με την υγιεινή των τροφίμων. Ωστόσο, οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι στο παρελθόν έχουν αναφερθεί περιστατικά Σαλμονέλλωσης από την κατανάλωση τροφίμων που το ζέσταμά τους ή το ψήσιμο τους στα μικροκύματα δεν έγινε με τον κατάλληλο τρόπο. Επίσης, ορισμένοι αρνητικοί κατά Gram ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί που ανευρίσκονται στα τρόφιμα, όπως το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* έχουν αποδειχτεί ιδιαίτερα ανθεκτικά στην επίδραση των μικροκυμάτων (Stolle & Schach, 1999). Ανάμεσα στα θετικά κατά Gram βακτήρια, οι *enterococci*, *Lactobacilli* και τα βακτήρια του είδους *Listeria* spp. έχουν επιδείξει υψηλή θερμοανθεκτικότητα στην επίδραση των μικροκυμάτων (James & James, 2004). Επίσης είναι αξιοσημείωτη η υψηλή θερμοανθεκτικότητα των σπόρων των θετικών κατά Gram βακτηρίων, εφόσον για την μείωσή τους απαιτείται ψήσιμο σε θερμοκρασία >100 °C (Stolle & Schach, 1999) .

4.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

Για τον ακριβή μηχανισμό δράσης των μικροκυμάτων (θερμικά φαινόμενα) στα βακτηριακά κύτταρα έχουν προταθεί διάφορες απόψεις. Οι Stolle & Schach (1999) αναφέρουν ότι επίδραση των μικροκυμάτων στα κύτταρα του *S. aureus* είχε ως αποτέλεσμα την καταστροφή του RNA και την αδρανοποίηση ενζυμικών συστημάτων του κυττάρου. Οι Woo et al. (2000) μελέτησαν την συμπεριφορά των βακτηρίων *E. coli* και *Bacillus subtilis* υπό την επίδραση μικροκυμάτων και παρατήρησαν ότι ο μηχανισμός δράσης ήταν σε κάποια σημεία διαφορετικός για τα δύο βακτήρια. Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι μετά την επίδραση μικροκυμάτων στα συγκεκριμένα βακτήρια παρατηρήθηκε εκροή νουκλεϊνικού οξέος, πρωτεϊνών, πυριμιδίων, πουρίνων και νινυδρίνης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη που υποδεικνύει την δημιουργία πόρων σε αυτή. Ωστόσο, παρόλο που και τα δυο βακτήρια απελευθέρωσαν την ίδια ποσότητα νουκλεϊνικού οξέος, ο *B. subtilis* απελευθέρωσε λιγότερη πρωτεΐνη από την *E. coli*. Επίσης αναφέρεται ότι η απελευθέρωση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών μπορεί να γίνει και από τραυματισμένα κύτταρα των μικροοργανισμών.

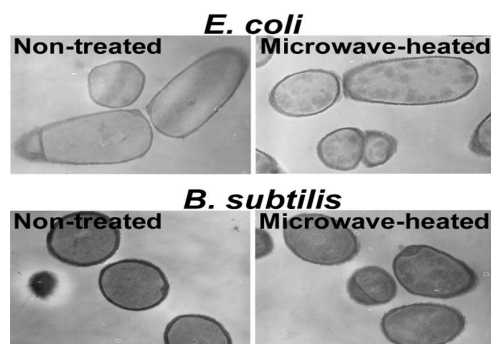
Η έρευνα των Woo et al. (2000) επεκτάθηκε και σε χρήση scanning electron microphotograph προκειμένου να διαπιστωθούν ενδεχόμενες βλάβες στην επιφάνεια των

δύο βακτηρίων. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις τους, η επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος της *E. coli* είχε υποστεί εκτεταμένες βλάβες αλλά η αντίστοιχη του *B. subtilis* δεν επέδειξε σημαντικές μεταβολές από την αρχική της μορφή (προ θερμικής επεξεργασίας). Η βακτηριακή επιφάνεια της *E. coli* και *B. subtilis* προ και μετά την επίδραση μικροκυμάτων παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4.1**. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα υποδεικνύει ότι τα κύτταρα του *B. subtilis* που είχαν υποστεί θερμική επεξεργασία δεν υπέστησαν λύση, παρόλο που αδρανοποιήθηκαν από τα μικροκύματα. Επίσης, οι ερευνητές τόνισαν ότι η καταστροφή της κυτταρικής επιφάνειας της *E. coli* δεν είναι απαραίτητο να είναι η κύρια αιτία για την απώλεια της βιωσιμότητάς του.



Εικόνα 4.1: Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία βακτηριακών κυττάρων πριν και μετά την επίδραση μικροκυμάτων (70 °C, Woo et al., 2000)

Τέλος, η παρατήρηση των ενδοκυτταρικών μεταβολών του *E. coli* και *B. subtilis* έδειξε ότι και τα δύο βακτήρια παρουσίασαν μαύρες κηλίδες στο κυτταρόπλασμα τους, οι οποίες αποδόθηκαν στην μετουσίωση των πρωτεϊνών τους υπό την επίδραση των μικροκυμάτων, καθώς και στην δημιουργία πρωτεϊνών θερμής επίπληξης (heat-shock) που αυξάνουν την θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών (**Εικόνα 4.2**).

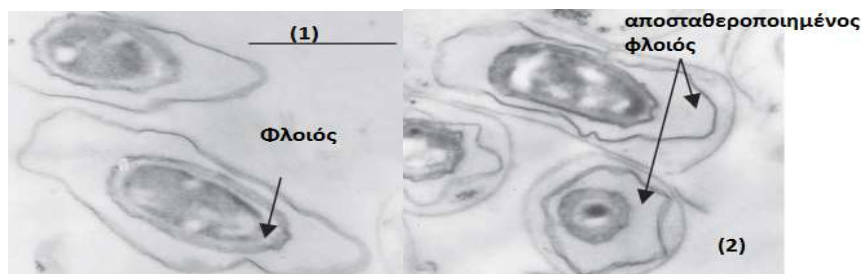


Εικόνα 4.2: Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία βακτηριακών κυττάρων πριν και μετά την επίδραση μικροκυμάτων (70 °C, Woo et al., 2000)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι βακτηριακοί σπόροι είναι πολύ δύσκολο να θανατωθούν υπό την επίδραση των μικροκυμάτων, εφόσον είναι εξαιρετικά

θερμοανθεκτικοί και απαιτούνται θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 100°C προκειμένου να αδρανοποιηθούν (Huang & Sites, 2007; Enfors, 2008). Ωστόσο, υπό την προϋπόθεση ότι έχει επιτευχθεί ο κατάλληλος συνδυασμός υψηλής θερμοκρασίας/χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα, τότε ο μηχανισμός της επίδρασης της θερμικής επεξεργασίας στους βακτηριακούς σπόρους συνίσταται στην καταστροφή του γενετικού τους υλικού (DNA) και στην μετουσίωση των πρωτεϊνών του πυρήνα και όχι στην αποσταθεροποίηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που παρατηρείται στην περίπτωση των βλαστικών κυττάρων (Enfors, 2008).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η θερμοανθεκτικότητα των βλαστικών βακτηριακών κυττάρων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την ικανότητά τους να παράγουν πρωτεΐνες θερμικής επίπληξης (heat-shock), οι οποίες προστατεύουν από την θερμική μετουσίωση όλων των πρωτεϊνών του κυττάρου ενώ η θερμοανθεκτικότητα των βακτηριακών σπόρων είναι συνάρτηση πολλών περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. διαθεσιμότητα του υποστρώματος σε θρεπτικά συστατικά κατά την διάρκεια της σπορογονίας). Γενικά, μεγάλη διαθεσιμότητα σε ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την θερμοανθεκτικότητα των βακτηριακών σπόρων (Enfors, 2008). Στην **Εικόνα 4.3** απεικονίζεται η δομή των βακτηριακών σπόρων του *Bacillus subtilis* πριν και μετά την θερμική επεξεργασία με χρήση μικροκυμάτων ή εμβάπτιση σε υδατόλουτρο. Διαπιστώνεται ότι η χρήση υδατόλουτρου οδήγησε σε αποσταθεροποίηση του φλοιού (cortex) των σπόρων, ενώ τα μικροκύματα δεν άσκησαν καμία επίδραση στη συγκεκριμένη περιοχή, υποδεικνύοντας ότι τα MW προώθησαν την δημιουργία συμπλόκου Ca^{2+} -διπικολινικού οξέος που αυξάνει την θερμοανθεκτικότητα των βακτηριακών σπόρων (Celandroni et al., 2004).



Εικόνα 4.3: Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία των σπόρων του *Bacillus subtilis* μετά την θερμική επεξεργασία (1) με μικροκύματα (2) με υδατόλουτρο (Celandroni et al., 2004)

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ/ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ

Ο σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής συνοπτικά ήταν: α) η επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης ενός νωπού Ελληνικού παραδοσιακού προϊόντος πουλερικών (Σουβλάκι: Κοτόπουλο/Πιπεριά) με τη χρήση συσκευασίας και «φυσικών» αντιμικροβιακών παραγόντων, β) η διερεύνηση της μικροβιολογικής ασφάλειας (πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης παθογόνων βακτηρίων) του υπό εξέταση προϊόντος κατά την διάρκεια της συντήρησής του σε θερμοκρασίες ψύξης (4, 8 °C) και γ) η μελέτη της επίδρασης θερμικής επεξεργασίας μικροκυμάτων στην ασφάλεια του προϊόντος.

Ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται στο **Κεφάλαιο 1** ήταν η μελέτη της επιβίωσης/ανάπτυξης τριών παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* subsp. *enterica* serovar Montevideo και *Bacillus cereus*) σε νωπό προϊόν κοτόπουλου διατηρημένο σε αερόβιες συνθήκες (4 °C).

Ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται **Κεφάλαιο 2** ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβια/τροποποιημένη ατμόσφαιρα) και της προσθήκης χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου ως “φυσικών” αντιμικροβιακών παραγόντων στην επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του εξεταζόμενου προϊόντος, κατά την συντήρησή του υπό ψύξη (4 °C). Η ολική ποιότητα του προϊόντος αξιολογήθηκε μικροβιολογικά, φυσικοχημικά (pH, χρώμα, οξείδωση του λίπους) και οργανοληπτικά (οσμή και γεύση).

Το αντικείμενο της μελέτης στο **Κεφάλαιο 3**, ήταν η επίδραση των προαναφερθέντων αντιμικροβιακών παραγόντων στην πορεία ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. Montevideo και *Bacillus cereus*) κατά την συντήρηση του εξεταζόμενου προϊόντος στους 4 ή/και και 8 °C (συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε θεωρητικός προσδιορισμός της συμπεριφοράς των τριών παθογόνων μικροοργανισμών με την χρήση δυο μοντέλων πρόβλεψης (Gamma® και Combase®).

Τέλος, ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται στο **Κεφάλαιο 4** ήταν η μελέτη της επίδρασης μικροκυμάτων (MW) στην επιβίωση/θανάτωση των παραπάνω τριών παθογόνων βακτηρίων που ενοφθαλμίστηκαν στο προϊόν. Επίσης, έγινε συσχέτιση μεταξύ του χρόνου θερμικής επεξεργασίας (0, 1, 2, 3, 4, 5 λεπτά στα 800 W) και του κατάλληλου συνδυασμού χρόνου ψησίματος/τελικής εσωτερικής θερμοκρασίας του προϊόντος για την διασφάλιση της υγιεινής του.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: «*Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της Listeria monocytogenes, Salmonella spp. και Bacillus cereus στα επιμέρους συστατικά (κοτόπουλο/πιπεριά) και στο ολόκληρο προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρησή για διάστημα έξι ημερών, στους 4 °C (αερόβιες συνθήκες)*».

1.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο ήταν η μελέτη της ανάπτυξης τριών παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus*) που αποτελούν κύριους παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση τροφοδηλητηριάσεων/τροφοτοξινώσεων σε νωπά προϊόντα κοτόπουλου που μπορεί να περιέχουν λαχανικά. Λόγω της ύπαρξης δυο διαφορετικών συστατικών στο εξεταζόμενο προϊόν (Σουβλάκι Κοτόπουλο με Πιπεριά) τα οποία μάλιστα βρίσκονται σε άμεση επαφή αυξάνοντας τον κίνδυνο της μεταξύ τους επιμόλυνσης (cross-contamination), κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της συμπεριφοράς των τριών παθογόνων μικροοργανισμών/μικροχλωρίδας αλλοίωσης στα επιμέρους συστατικά (κοτόπουλο/πιπεριά) αλλά και στο μίγμα αυτών (κοτόπουλο + πιπεριά), προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν αποκλίσεων μεταξύ των.

2.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Παραγωγή του προϊόντος

Η παραγωγή του προϊόντος (Σουβλάκι Κοτόπουλο με Πιπεριά) έγινε από την Εταιρία Τυποποίησης πουλερικών «Πίνδος» (Ροδοτόπι Ιωαννίνων). Η διαδικασία παραγωγής του προϊόντος έγινε με χειρωνακτικό τρόπο που περιλάμβανε το πέρασμα μικρών τεμαχίων κοτόπουλου (κυρίως από μπούτι), μαζί με τεμάχια πράσινης πιπεριάς σε ένα ξυλάκι, με τελικό βάρος 90-125 gr. Τα έτοιμα προϊόντα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων, μέσα σε διάστημα λίγων ωρών από την παραγωγή τους, σε φορητά ψυγεία με πάγο.

2.2 Καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών-προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος

α) Προέλευση χρησιμοποιούμενων στελεχών: Τα βακτηριακά στελέχη της *Listeria monocytogenes* Scott A WT (strain 0001), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo και *Bacillus cereus* που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη ήταν μια ευγενική χορηγία του Καθηγητή M. Zwietering, University of Wageningen, (The Netherlands). Στη περίπτωση του *B. cereus* χρησιμοποιήθηκε μίγμα τεσσάρων στελεχών με ικανότητα σπορογονίας >80%: *B. cereus* PAL 22 (ψυχρότροφο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία <7°C με μικρή φάση προσαρμογής, βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 28-30 °C, μεγάλος χρόνος διπλασιασμού στους 37 °C, Wijnands et al. 2007), *B. cereus* PAL 25 (μεσόφιλο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία >7°C, μικρός χρόνος διπλασιασμού στους 37°C), *B. cereus* ATCC 14579 (μεσόφιλο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία >7°C); *B. cereus* ATCC 10987 (μεσόφιλο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία >7°C) (Stetten et al., 1998).

Πίνακα 1.1: Πληροφορίες για τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Μικροοργανισμός	Στέλεχος	Προέλευση/Απομόνωση	Πηγή
<i>Listeria monocytogenes</i>	Scott A	Κλινική/ κατανάλωση γάλακτος (Barakat et al., 1999)	United States Food Drug Administration (US)
<i>Salmonella enterica</i>	Montevideo	Τροφική/απομόνωση από μοσχαρίσιο κρέας (Juneja et al., 2007)	Food Safety and Inspection Service (US)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10987	Τροφική/Αλλοιωμένο τυρί τύπου cheddar (Mols et al., 2007)	American Type Culture Collection (US)
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	Περιβαλλοντική/ χώρος στέγασης (εκτροφείο) αγελάδων (Mols et al., 2007)	American Type Culture Collection
<i>Bacillus cereus</i>	PAL 22 (Z4222)	Τροφική/Γεύμα έτοιμο προς κατανάλωση (cook-chill food, Wijnands et al., 2007)	L'Institut National de la Recherche Agronomique Avignon (Fr)
<i>Bacillus cereus</i>	PAL 25 (NCTC 11143)	Κλινική (εμετική επιδημία) Tourasse al., 2005	National Collection of Type Cultures (UK)

β) Στερεή Ανακαλλιέργεια των βακτηρίων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus*

Χρησιμοποιήθηκε κεκλιμένη καλλιέργεια (slant culture) με άγαρ (Brain Heart Infusion Agar, BHIA) και αποξήθηκαν κύτταρα (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*) με τη βοήθεια ενός μικροβιολογικού κρίκου. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που αποξήθηκαν με τον μικροβιολογικό κρίκο, μεταφέρθηκαν σε νέο τρυβλίο BHIA με τη μέθοδο των γραμμώσεων. Τελικά, τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες ώστε να αναπτυχθούν οι νέες αποικίες των κυττάρων (30 °C για 24 ώρες στην περίπτωση του *Bacillus cereus*).

γ) Υγρή καλλιέργεια των βακτηρίων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus*.

Μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων αποξήθηκε από το στερεό θρεπτικό υλικό (τρυβλίο) με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου, ο οποίος στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL υγρού θρεπτικού υλικού (Brain Heart Infusion Broth). Όλη η διαδικασία έγινε υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο σωλήνας με το βακτηριακό εναιώρημα επώαστηκε στους 37 °C για 24-48 ώρες (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*) ή στους 30 °C για το ίδιο χρονικό διάστημα (*Bacillus cereus*). Στην περίπτωση που μετά το πέρας της επώασης, στον πυθμένα του σωλήνα είχαν καταβυθιστεί κύτταρα του βακτηρίου, ο σωλήνας να ανακινήθηκε καλά ώστε αυτά να αναδιασπαρθούν στο διάλυμα. Η συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων που περιέχονται στο σωλήνα με το βακτηριακό εναιώρημα μετά το πέρας των 24-48 ωρών ήταν περίπου 10^8 - 10^9 CFU/mL (αρχικό ενοφθάλμισμα). Η καταμέτρηση των αποικιών έγινε με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και της επιφανειακής επίστρωσης σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό για τον κάθε μικροοργανισμό. Συγκεκριμένα, η καταμέτρηση των αποικιών της *Listeria monocytogenes* έγινε σε τρυβλία με Agar *Listeria* Ottaviani and Agosti (ALOA) της *Salmonella enterica* σε Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) και του *Bacillus cereus* σε *Bacillus Cereus* Medium (PREP εμπλουτισμένο με egg yolk and polymyxin B). Τα τρυβλία ALOA και XLD επώαστηκαν στους 37 °C (24h) ενώ τα τρυβλία PREP στους 30 °C (48h).

2.3 Ενοφθαλμισμός των παθογόνων βακτηρίων επί του προϊόντος

Στην περίπτωση του *B. cereus* ως αρχικό ενοφθάλμισμα χρησιμοποιήθηκε μικτή καλλιέργεια των τεσσάρων διαφορετικών στελεχών *Bacillus cereus* PAL 22; *Bacillus cereus* PAL 25, *Bacillus cereus* ATCC 14579; *Bacillus cereus* ATCC 10987). Το αρχικό ενοφθάλμισμα της *L. monocytogenes* ή της *S. enterica* ή του *B. cereus* (αρχική συγκέντρωση κυττάρων περίπου 10^8 - 10^9 CFU/ml) αραιώθηκε δεκαδικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 ml πεπτονόχου διαλύματος 0.1% wt/vol (pH=7.0) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των βακτηρίων να είναι 10^{5-6} CFU/ml (τελικό ενοφθάλμισμα). Σημειώνεται ότι πριν τον ενοφθαλμισμό επί του προϊόντος, κάθε υγρή καλλιέργεια συντηρήθηκε σε θερμοκρασία 4 °C, για διάστημα 36-48h, προκειμένου να προσαρμοστούν τα κύτταρα των μικροοργανισμών σε συνθήκες ψύξης. Στη συνέχεια, 10 gr κοτόπουλου, 10 gr πιπεριάς καθώς και 10 gr που αποτελούσαν κομμάτια κοτόπουλου και πιπεριάς (ολόκληρο προϊόν) ζυγίστηκαν ασηπτικά σε αποστειρωμένες σακούλες stomacher και ακολούθησε εμβολιασμός ποσότητας 0.1 ml από το τελικό ενοφθάλμισμα. Ο τελικός βακτηριακός πληθυσμός επί των μεταχειρίσεων κυμάνθηκε μεταξύ 10^{3-4} CFU/gr. Σημειώνεται ότι κάθε μικροοργανισμός ενοφθαλμίστηκε χωριστά από τους υπόλοιπους σε κάθε μεταχείριση, εφόσον δεν ήταν αντικείμενο της παρούσης έρευνας η ταυτόχρονη πορεία ανάπτυξής τους στα δείγματα. Επομένως, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε ξεχωριστό μικροοργανισμό που ενοφθαλμίστηκε. Στη συνέχεια, οι τρεις ομάδες δειγμάτων, με τα ενοφθαλμισμένα στελέχη, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων του εμβολίου στην επιφάνεια των μεταχειρίσεων. Με το πέρας των 15 λεπτών, τα δείγματα διατηρήθηκαν εντός ψυγείου (4 ± 0.5 °C) υπό αερόβιες συνθήκες (σε σακούλες stomacher) και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν ανά ημέρα για τους παθογόνους μικροοργανισμούς (0, 1, 2, 3, 4, 5 και 6^η) και κάθε δύο ημέρες για τους μη παθογόνους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση (0, 2, 4, και 6^η).

2.4 Μικροβιολογική ανάλυση

Εξετάστηκαν τα ακόλουθα είδη μικροοργανισμών (εκτός των ενοφθαλμισμένων στελεχών): Ψευδομονάδες, Οξυγαλακτικά βακτήρια, Εντεροβακτηριοειδή, Ζύμες-Μύκητες, *Brochothrix thermosphacta* και η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), σύμφωνα με τις μεθόδους που προτείνονται από την ΑΡΗΑ (2001).

Τα ενοφθαλμισμένα δείγματα (10 gr) ομογενοποιήθηκαν με 90 mL διαλύματος πεπτονόχου διαλύματος πυκνότητας 0.1% και τοποθετήθηκαν για 60 δευτερόλεπτα σε Lab Blender stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical) σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της επιφανειακής επίστρωσης ή ενσωμάτωσης του δείγματος σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, ανάλογα με τον προσδιοριζόμενο, κάθε φορά, μικροοργανισμό.

- ❖ Για τον προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X) χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (PCA, Merck, Germany) στο οποίο οι αποικίες αναπτύσσονται στους 30 °C μετά από διάστημα 48 ωρών. Στην περίπτωση αυτή, καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες που αναπτύχθηκαν.
- ❖ Οι ψευδομονάδες προσδιορίστηκαν με τη χρήση του θρεπτικού υλικού Pseudomonas Agar Base (Oxoid, Basingstoke, UK), προσθήκη γλυκερόλης (5 ml) και αντιβιοτικού (SR 103, Oxoid) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 48 ώρες. Για την επιβεβαίωση των ψευδομονάδων πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της οξειδάσης με την χρήση κατάλληλων ταινιών (Merck, Germany), όπου ανάπτυξη έντονου μωβ χρώματος (1 min) υποδεικνύει την ύπαρξη ψευδομονάδων (θετικός έλεγχος).
- ❖ Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε με τη χρήση του θρεπτικού υλικού de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS, pH=6,2, Oxoid) μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 72 ώρες, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ενσωμάτωσης (βλέπε παρακάτω). Μετρήθηκαν μόνο οι αποικίες που είχαν χαρακτηριστικό ελλειψοειδές (φακοειδές) σχήμα.
- ❖ Τα εντεροβακτηριοειδή προσδιορίστηκαν με το θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Oxoid) μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Μετρήθηκαν οι αποικίες με χαρακτηριστική ρόδινη άλω.
- ❖ Τέλος, οι ζύμες-μύκητες προσδιορίστηκαν στο επιλεκτικό υλικό Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Merck, Germany) και επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 3-5 ημέρες. Λόγω του αρνητικού γεωτροπισμού που παρουσιάζουν ορισμένοι μύκητες τα τρυβλία δεν επώαστηκαν ανεστραμμένα, και μετρήθηκαν μόνο οι λευκές, υπόλευκες και σε ορισμένες περιπτώσεις έγχρωμες (ροζ) αποικίες. Έγινε προσπάθεια να μην καταμετρηθούν τρυβλία με αριθμό αποικιών >100, επειδή

πολλές φορές παρουσιάζεται έντονη αλληλοεπικάλυψη των αποικιών λόγω μεγάλου μεγέθους.

- ❖ Η καταμέτρηση των αποικιών της *Listeria monocytogenes* έγινε σε τρυβλία με επιλεκτικό υλικό Agar *Listeria* Ottaviani and Agosti (ALOA, LABM, UK) εμπλουτισμένο με 5 mL πολυμιξίνης B (X072, LABM, UK) και 25 mL επιλεκτικού διαγνωστικού συμπληρώματος (κυκλοεξιμίδη/ναλιδιξικό οξύ/φωσφατιδουλοϊνοσιτόλη) που είχε προ-θερμανθεί σε τελική θερμοκρασία 48-50 °C (*Listeria* selective diagnostic supplement, X010, LABM, UK) τα οποία επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες. Μετρήθηκαν μόνο οι μπλε αποικίες που περιβάλλονται από χαρακτηριστικό αδιαφανές δακτύλιο (opaque halo).
- ❖ Η *Salmonella* spp. προσδιορίστηκε σε επιλεκτικό υλικό Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, LABM, UK) μετά από επώαση στους 37 °C για 24 ώρες. Καταμετρήθηκαν οι μαύρες αποικίες, καθώς και οι ροζ διαφανείς αποικίες με η χωρίς μαύρο κέντρο.
- ❖ Τέλος, τα στελέχη *Bacillus* spp. (του μίγματος) προσδιορίστηκαν σε επιλεκτικό υλικό *Bacillus Cereus* (PREP, Phenol Red Egg Yolk Polymixic Agar, LABM, UK) εμπλουτισμένο με 50 mL διαλύματος (vial) κρόκου αυγού και πολυμιξίνη B (LAB73, LABM, Bury, UK). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 °C για 48 ώρες και καταμετρήθηκαν οι ροζ αποικίες με χαρακτηριστικό λευκό δακτύλιο.

Ο προσδιορισμός της O.M.X., των ψευδομονάδων, των ζυμών-μυκήτων, του *Br. thermosphacta* και όλων των παθογόνων βακτηρίων έγινε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, ενώ των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των εντεροβακτηριοειδών με την μέθοδο της ενσωμάτωσης. Σύμφωνα με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης ποσότητα 0,1 mL εναιωρήματος εξαπλώνεται, από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση στην επιφάνεια του εκάστοτε στερεού θρεπτικού υλικού και τα τρυβλία επωάζονται σε κλίβανο για διάστημα ορισμένων ημερών και θερμοκρασίας, αναλόγως του υπό εξέταση βακτηριακού είδους.

Στην τεχνική της ενσωμάτωσης τοποθετείται ποσότητα περίπου 1 mL εναιωρήματος εντός τρυβλίων και στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα υγρού θρεπτικού υλικού (περίπου 10 mL, θερμοκρασία 45-47 °C). Ακολούθως, και αφού στερεοποιηθεί το υλικό, προστίθεται μια δεύτερη στρώση του ίδιου θρεπτικού υλικού (8-10 mL) και τα τρυβλία επωάζονται σε κλίβανο για διάστημα ορισμένων ημερών και θερμοκρασίας, αναλόγως του

υπό εξέταση βακτηριακού είδους. Για την εκάστοτε επιβεβαίωση του βακτηριακού είδους, χρησιμοποιούνται η δοκιμή της κατά Gram χρώσης και της μικροσκοπικής εξέτασης.

Σημειώνεται ότι η καταμέτρηση των αποικιών γίνεται σύμφωνα με τους κανόνες της ΑΡΗΑ (2001) και όλα τα μικροβιολογικά δεδομένα μετατρέπονται σε λογαρίθμους (\log_{10}) του αριθμού των αποικιών ανά γραμμάριο δείγματος (\log CFU/g).

2.5 Μέτρηση του pH

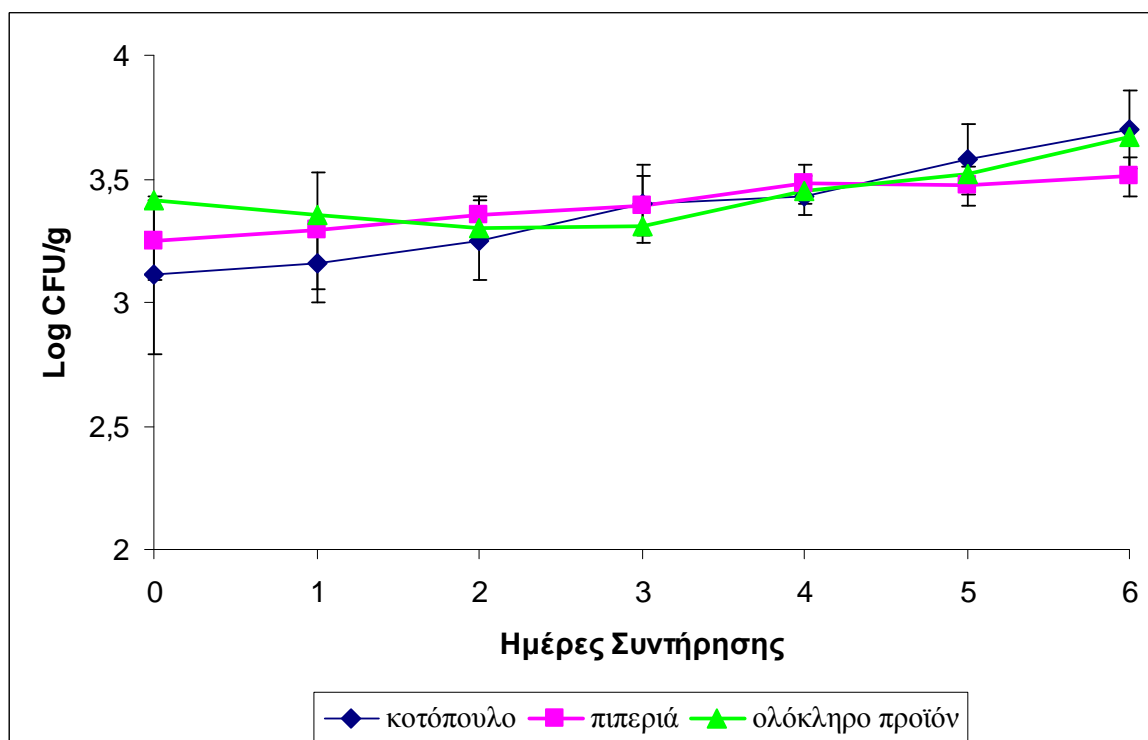
Η μέτρηση του pH έγινε την 0, 2, 4, και 6^η ημέρα συντήρησης με τη χρήση πεχάμετρου (Inolab, USA) ως εξής: 10 gr δείγματος ομογενοποιήθηκαν με 90 ml απεσταγμένου ύδατος και στο ομογενές διάλυμα έγινε εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του οργάνου.

3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* στο ολόκληρο προϊόν και στα επιμέρους συστατικά του-Μεταβολή της Μικροχλωρίδας αλλοίωσης παρουσία της *Listeria monocytogenes*

Η πορεία ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* και του *B. cereus* μελετήθηκε στα επιμέρους συστατικά του ολικού προϊόντος καθώς και στο μίγμα αυτών (κοτόπουλο, πιπεριά) προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν διαφορές στη πορεία ανάπτυξης των βακτηρίων ανάλογα με τα συστατικά του προϊόντος, ως διαφορετικό υπόστρωμα για του μικροοργανισμούς. Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης, μέχρι και -1.5 °C (<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>). Η *L. monocytogenes* απαντά σε πολλά τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως κρέας, ψάρι και πουλερικά, αλλά και σε πολλά γεωργικά προϊόντα π.χ. λαχανικά.

Στο **Γράφημα 3.1.1** παρουσιάζεται η πορεία ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, στο κοτόπουλο, την πιπεριά καθώς και στο ολόκληρο προϊόν, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 °C), σε αερόβιες συνθήκες.

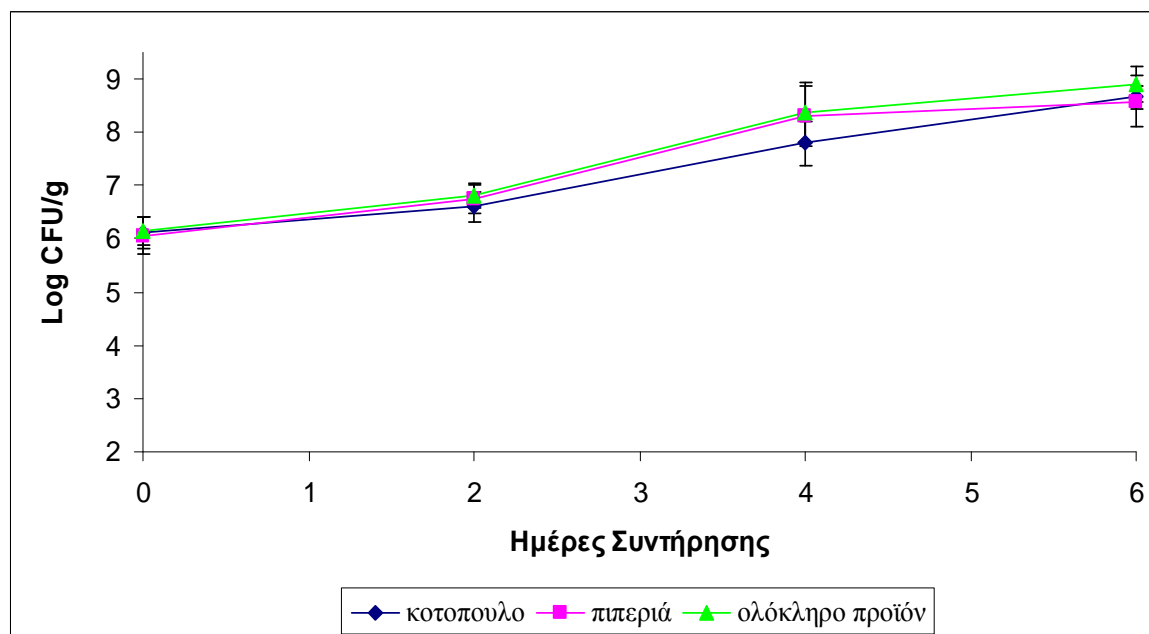


Γράφημα 3.1.1: Πορεία ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.1**, από την αρχική έως την 6^η ημέρα της συντήρησης των τριών μεταχειρίσεων, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* σε όλες τις περιπτώσεις, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ($p > 0,05$). Συγκεκριμένα, στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο + πιπεριά) παρατηρήθηκε αύξηση του αρχικού πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 0,26 log CFU/g, ενώ η αύξηση στην πιπεριά, όταν εξετάστηκε μόνη της, κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα (0,26 log CFU/g). Επίσης, ο πληθυσμός του βακτηρίου στο προϊόν χωρίς πιπεριά, εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση από τις άλλες μεταχειρίσεις κατά 0,59 log CFU/g χωρίς ωστόσο να σημειώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων ($p > 0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η πορεία ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού ήταν περίπου η ίδια ανεξαρτήτως συστατικού του προϊόντος.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.1**, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αυξήθηκε μόλις κατά 0,3-0,6 log CFU/g, ακολουθώντας πολύ αργό ρυθμό. Το γεγονός αυτό δεν ήταν αναμενόμενο εφόσον η *L. monocytogenes* είναι ένα ψυχρότροφο βακτήριο που

αναπτύσσεται εύκολα και γρήγορα σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης (Lungu et al., 2009). Συνεπώς, η περιορισμένη ανάπτυξή του πιθανόν να οφείλεται στη ανάπτυξη φαινομένων ανταγωνισμού μεταξύ του παθογόνου και της αυτόχθονης μικροχλωρίδας αλλοίωσης για θρεπτικά συστατικά αλλά και σημεία προσκόλλησης επάνω στην επιφάνεια των τροφίμων (Mataragas et al., 2006). Η βραδεία και μικρή αύξηση του μικροοργανισμού είναι πιθανό να οφείλεται στην παράλληλη ανάπτυξη της OMX σε υψηλά επίπεδα (από 6,0 έως 9,0 log CFU/g) κατά τη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος (Γράφημα 3.1.2).



Γράφημα 3.1.2. Μεταβολή της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), μετά τον ενοφθαλισμό τους με 10^3 CFU/g *L. monocytogenes* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Η παραπάνω άποψη ενισχύεται από τον Jay et al. (1998), σύμφωνα με τον οποίο, ένα προϊόν που έχει αρχική μικροβιακή χλωρίδα της τάξης των 5 log CFU/g (ανάλογη με την αρχική μικροβιακή χλωρίδα του εξεταζόμενου προϊόντος), είναι λιγότερο πιθανό να επιτρέψει τον πολλαπλασιασμό χαμηλών πληθυσμών παθογόνου μικροοργανισμού, από ένα τρόφιμο που έχει αρχική μικροχλωρίδα της τάξης των 3 log CFU/g. Σε πολλές έρευνες που είναι διαθέσιμες στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών που συνυπάρχουν σε ένα τροφικό περιβάλλον μπορεί να οδηγήσουν σε βακτηριοστατικά φαινόμενα που μπορεί να οφείλονται σε φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ των μικροοργανισμών αλλοίωσης και του παθογόνου μικροοργανισμού. Η

εκδήλωση των συγκεκριμένων φαινομένων μπορεί αν οφείλεται σε ανταγωνισμό για διαθέσιμα θρεπτικά υποστρώματα, ανταγωνισμό για διαθέσιμα σημεία προσκόλλησης επάνω στην επιφάνεια του τροφίμου, ή στην παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού από τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης με αντιμικροβιακή δράση όπως π.χ. οργανικά οξέα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανασταλτικά ένζυμα, μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους, βακτηριοσίνες, σιδηροφόρα (Mellefont et al. 2008) ή ακόμη σε μεταβολές στις φυσικοχημικές ιδιότητες του τροφίμου (Jay et al., 1998; Mellefont et al., 2008; Lungu et al., 2009).

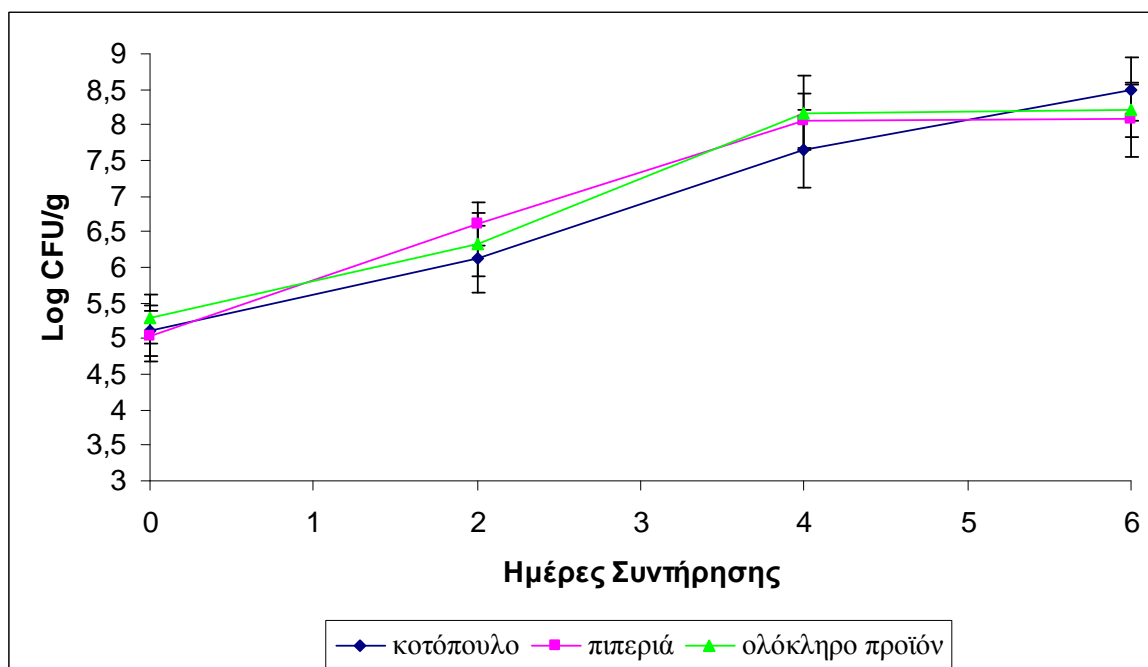
Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.2**, η αρχική ολική μεσόφιλη χλωρίδα των μεταχειρίσεων (O.M.X.) ήταν περίπου $6.0 \log \text{CFU/g}$, δηλαδή κατά $3.0 \log \text{CFU/g}$ υψηλότερη από τον αντίστοιχο της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes*, και η διαφορά αυτή έφτασε τους $5.0-6.0 \log \text{CFU/g}$ στο τέλος της περιόδου συντήρησης, περιορίζοντας σημαντικά την ανάπτυξη του παθογόνου (O.M.X. περίπου $9.0 \log \text{CFU/g}$ την 6^η ημέρα συντήρησης). Από την άλλη πλευρά, οι Barakat & Harris (1999) αναφέρουν ότι τα επίπεδα της αυτόχθονης μικροχλωρίδας που απαρτιζόταν κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια και *Brochothrix thermosphacta* σε μαγειρεμένο κοτόπουλο συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα δεν επηρέασαν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση υπό ψύξη, αλλά η διαφορά των πληθυσμών τους ήταν μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στην παρούσα έρευνα ($1-2 \log \text{CFU/g}$).

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, όσον αφορά την πορεία ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στο κοτόπουλο, συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Wimpfheimer et al. (1990) όπου η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* Scott A, σε νωπό κοτόπουλο με αυτόχθονη μικροχλωρίδα στους 4°C για διάστημα 6 ημερών, παρουσίασε μια εκτεταμένη φάση προσαρμογής σημειώνοντας αύξηση κατά $0.68 \log \text{CFU/g}$ την 5^η ημέρα συντήρησης και κατά $1.43 \log \text{CFU/g}$ την 6^η ημέρα συντήρησης, σε σχέση με τον αρχικό βακτηριακό πληθυσμό. Επίσης, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* παρέμεινε σταθερός για διάστημα 8 ημερών, μετά των εμβολιασμό του σε κιμά από μοσχαρίσιο κρέας με αυτόχθονη μικροχλωρίδα (οξυγαλακτικά βακτήρια) που συντηρήθηκε σε αερόβια συσκευασία στους 4°C (Nissen et al., 2000). Τέλος, σύμφωνα με τους Radin et al. (2006), ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* εμβολιασμένης σε λουκάνικα τύπου φρανκφούρτης απουσία αυτόχθονης μικροχλωρίδας παρουσίασε αύξηση κατά $1.0 \log \text{CFU/g}$ σε 14 ημέρες συντήρησης στους 10°C , ενώ επανάληψη του ίδιου πειράματος παρουσία αυτόχθονης μικροχλωρίδας στο προϊόν οδήγησε σε διαφορετικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη αυτόχθονης

μικροχλωρίδας της τάξης των 10^4 ή 10^6 log CFU/g παρέτεινε την φάση προσαρμογής του μικροοργανισμού στις 24 ημέρες, από 10 ημέρες που ήταν στο στείρο υπόστρωμα. Μάλιστα, στην περίπτωση της υψηλής μικροχλωρίδας (10^6 log CFU/g), η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ήταν βραδύτερη και οι τελικοί πληθυσμοί χαμηλότεροι από τις άλλες περιπτώσεις.

Η πορεία ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στην πιπεριά, ήταν ελαφρώς χαμηλότερη (διαφορά κατά 0.4 log CFU/g) από ότι στα κομμάτια κοτόπουλου αλλά η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$). Σύμφωνα με τους Nguyen-the & Carlin (1994) η αυτόχθονη μικροχλωρίδα στην επιφάνεια των φρέσκων λαχανικών, παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ασφάλειας και υγιεινής των, μέσω εκδήλωσης φαινομένων ανταγωνισμού με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, υπερτερώντας στην εκμετάλλευση των θρεπτικών συστατικών ή παράγοντας ενώσεις που έχουν σημαντική επίδραση έναντι της ανάπτυξης των βακτηρίων (Liao & Fett, 2001; Parish et al., 2003). Για παράδειγμα, οι Babic et al. (1997) αναφέρουν ότι η αυτόχθονη μικροχλωρίδα περιόρισε σημαντικά την ανάπτυξη της ψυχρότροφης *L. monocytogenes*, σε σπανάκι που συντηρήθηκε στους 5 °C. Επίσης, σύμφωνα με τους Francis & Beirne (1997) ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* ή *Listeria innocua* εμβολιασμένης σε λάχανο με υψηλή αυτόχθονη μικροχλωρίδα (7 log CFU/g) που συντηρήθηκε αερόβια στους 3 °C και 8 °C μειώθηκε σταδιακά κατά 1.5 log CFU/g και 1.0 log CFU/g στο τέλος της περιόδου συντήρησης. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι κατά την συντήρηση του προϊόντος σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, οι τελικοί πληθυσμοί της *Listeria* ήταν υψηλότεροι από ότι στην αερόβια συσκευασία εξαιτίας των χαμηλότερων πληθυσμών της μικροχλωρίδας στην συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας που διατάραξε την ανταγωνιστική ισορροπία μεταξύ *Listeria* και αυτόχθονης μικροχλωρίδας. Επίσης αναφέρεται ότι η εμβάπτιση του προϊόντος σε αντιμικροβιακά διαλύματα αντί να περιορίσει την ανάπτυξη της *Listeria*, όπως θα ήταν αναμενόμενο, οδήγησε σε προώθηση της. Η απροσδόκητη αυτή συμπεριφορά αυτή αποδόθηκε στο ότι τα αντιμικροβιακά διαλύματα μείωσαν τον πληθυσμό της μικροχλωρίδας του προϊόντος, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να ανταγωνιστούν το ίδιο ισχυρά την *Listeria* και κατά συνέπεια δίνοντας το πλεονέκτημα στον παθογόνο μικροοργανισμό να επικρατήσει της μικροχλωρίδας αλλοίωσης. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Carlin et al. (1996), οι οποίοι αναφέρουν ότι η προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα στην επιφάνεια αντιδιού ναι μεν μείωσε την αυτόχθονη μικροχλωρίδα, αλλά οδήγησε σε πιο γρήγορη ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

Στο **Γράφημα 3.1.3** παρουσιάζεται η μεταβολή των Ψευδομονάδων στα επιμέρους συστατικά του προϊόντος και στο ολόκληρο προϊόν, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με την *L. monocytogenes*, και κατά την συντήρησής τους στους 4 °C για διάστημα 6 ημερών.



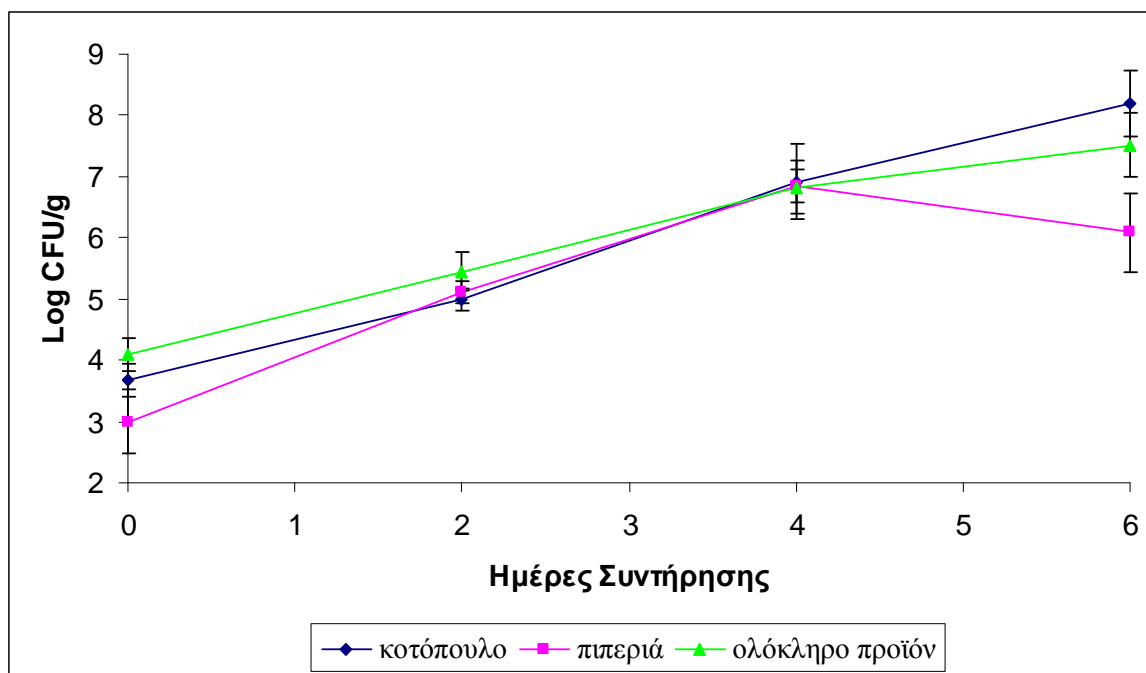
Γράφημα 3.1.3. Μεταβολή των Ψευδομονάδων στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *L. monocytogenes* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.3**, οι ψευδομονάδες κυμάνθηκαν σε πολύ υψηλούς πληθυσμούς κατά τη διάρκεια συντήρησης των τριών μεταχειρίσεων. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από 5-5.3 log CFU/g την 0η μέρα συντήρησης, προσέγγισαν τους 8.1-8.5 log CFU/g την 6^η ημέρα συντήρησης (**Γράφημα 3.1.3**). Όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις οι διαφορές μεταξύ των τριών μεταχειρίσεων δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p \geq 0.05$). Η επικράτηση των ψευδομονάδων στις τρεις μεταχειρίσεις κατά την συντήρησή τους σε αερόβιες συνθήκες ήταν αναμενόμενη εφόσον είναι αρνητικά κατά Gram ψυχρόφιλα βακτήρια που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση προϊόντων κρέατος πουλερικών (Mauer, 1993), αλλά αποτελούν και μεγάλο ποσοστό της μικροχλωρίδας αλλοίωσης των φρέσκων λαχανικών (Francis et al. 1999). Ο υψηλός πληθυσμός των Ψευδομονάδων μόλις μέσα σε διάστημα έξι ημερών και στις 3 περιπτώσεις είναι πολύ

πιθανό να περιορίσει τον πολλαπλασιασμό της *L. monocytogenes*, ασκώντας φαινόμενα ανταγωνισμού. Η παραπάνω άποψη φαίνεται να συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μελέτης των Neumeyer et al. (1997) και των Pin & Baranyi (1998), όπου αναφέρεται η κυριαρχία των *Pseudomonas* spp., σε ενοφθαλμισμένο με *L. monocytogenes* (ή μη) τρόφιμο, αλλά και σε μοντέλο τροφίμου (θρεπτικός ζωμός), κατά την συντήρησή τους σε αερόβιες συνθήκες και υπό ψύξη. Οι ψευδομονάδες όχι μόνο ανταγωνίζονται άλλα βακτήρια για θρεπτικά υποστρώματα (Wei et al. 2006) αλλά επίσης ορισμένα στελέχη αυτών είναι δυνατόν να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που ονομάζονται σιδηροφόρα. Τα σιδηροφόρα είναι ενώσεις που δημιουργούν χηλικά σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου, τα οποία είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό της *L. monocytogenes*. Η *L. monocytogenes* στις μέχρι τώρα έρευνες δεν φαίνεται να έχει την ικανότητα να παράγει απευθείας σιδηροφόρα για την δέσμευση του σιδήρου από το θρεπτικό περιβάλλον, αλλά έχει την ικανότητα να χρησιμοποιεί για το ίδιο σκοπό κατεχόλες και κατεχολαμίνες (Lungu et al., 2009). Τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ψευδομονάδων και της *L. monocytogenes* έχουν περιγράψει πολλοί μελετητές, αλλά τα αποτελέσματα φαντάζουν αντιφατικά. Συγκεκριμένα, κάποιες έρευνες αναφέρουν ότι η παρουσία των ψευδομονάδων σε ένα θρεπτικό περιβάλλον (αερόβιες συνθήκες) είναι δυνατό να παρεμποδίσει την ανάπτυξη της συνυπάρχουσας *L. monocytogenes*, ενώ άλλες αναφέρουν το αντίθετο φαινόμενο (Farag et al, 1989; Freedman et al., 1989; Marshall & Schmidt, 1988, Marshall & Schmidt, 1991). Η έρευνα των Freedman et al. (1989) έδειξε ότι στελέχη ψευδομονάδων απομονωμένα από φυτικούς οργανισμούς παρεμπόδισαν την ανάπτυξη θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων μέσω της παραγωγής σιδηροφόρων ουσιών. Επίσης σύμφωνα με τους Wei et al. (2006) και Liao et al. (2009) όσο αυξανόταν η αναλογία Ψευδομονάδων και *L. monocytogenes* εμβολιασμένης σε λάχανο ή σε τεμαχισμένη πράσινη πιπεριά, τόσο μειωνόταν πληθυσμός της δεύτερης, υποδεικνύοντας ότι η αναλογία μη παθογόνων μικροοργανισμών αλλοίωσης/παθογόνου παίζει σημαντικό ρόλο, γιατί περιορίζει την διαθεσιμότητα σημείων δέσμευσης επάνω στην επιφάνεια των τροφίμων. Ωστόσο, σύμφωνα με την έρευνα των Marshall & Schmidt (1991) οι ψευδομονάδες μπορούν να υδρολύσουν τις πρωτεΐνες που υπάρχουν σε ένα τροφικό υπόστρωμα με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων υδρόλυσης που διεγείρουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, αλλά η συγκεκριμένη έρευνα πραγματοποιήθηκε σε γάλα. Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ο βαθμός αλληλεπίδρασης μεταξύ των δυο αυτών μικροοργανισμών εξαρτάται και από την συσκευασία στην οποία βρίσκεται το τρόφιμο,

π.χ. αερόβια, τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή κενού, όπως θα δούμε και σε επόμενο κεφάλαιο της παρούσης εργασίας (Κεφάλαιο 3). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, είναι σαφές ότι δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την αλληλεπίδραση ψευδομονάδων και *L. monocytogenes* στην παρούσα εργασία, εφόσον δεν έχει γίνει εκτενής μελέτη του μηχανισμού της πιθανής ανταγωνιστικής δράσης του, παρά μόνο να διατυπωθούν κάποιες υποθέσεις με βάση τα αποτελέσματά μας.

Στο **Γράφημα 3.1.4** παρουσιάζεται η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις, μετά τον ενοφθαλμισμό στα επιμέρους συστατικά με το παθογόνο *L. monocytogenes*. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ξεκινώντας από αρχικούς πληθυσμούς 3.7, 3.0 και 4.1 log CFU/g στο κοτόπουλο, την πιπεριά και στο ολόκληρο προϊόν, αντίστοιχα, κατέληξαν σε υψηλούς πληθυσμούς της τάξης των 8.2, 6.1 και 7.5 log CFU/g.



Γράφημα 3.1.4. Μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο μίγμα τους, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *L. monocytogenes* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

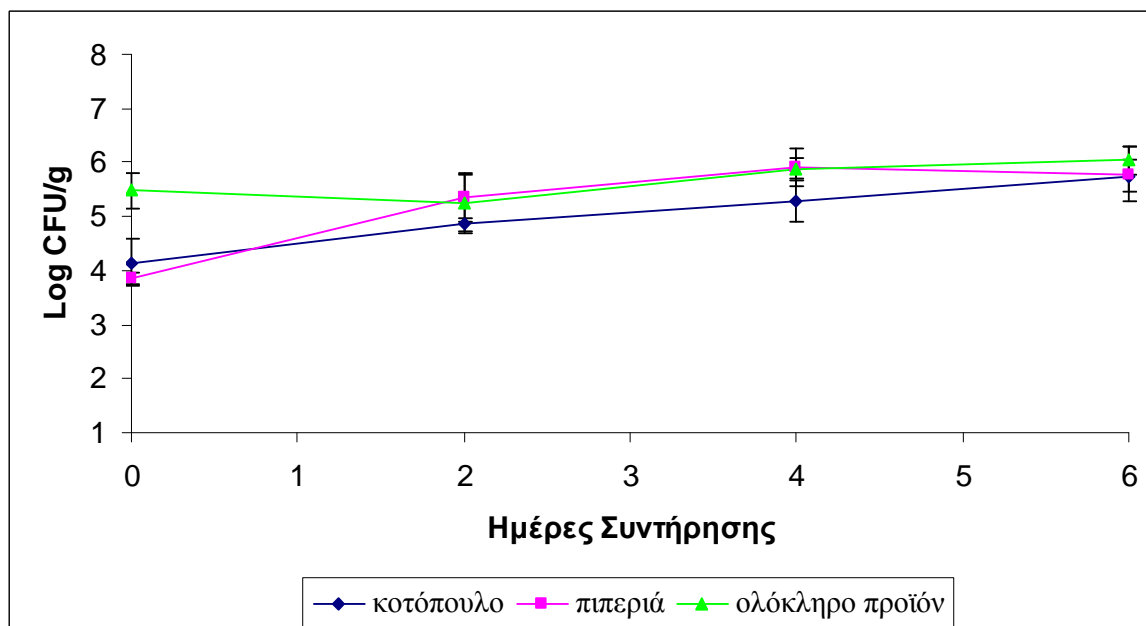
Όπως φαίνεται από το **Γράφημα 3.1.4**, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ακολούθησαν την ίδια πορεία ανάπτυξης και στις τρεις μεταχειρίσεις κατά την διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων, ξεπερνώντας τους 7.0 log CFU/g την 4^η ημέρα συντήρησης, με εξαίρεση την 6^η ημέρα συντήρησης όπου παρατηρήθηκε πτωτική τάση του πληθυσμού των βακτηρίων

στην περίπτωση της πιπεριάς, για αδιευκρίνιστη αιτία. Η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την διάρκεια των πρώτων 4 ημερών συντήρησης, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ($p>0.05$).

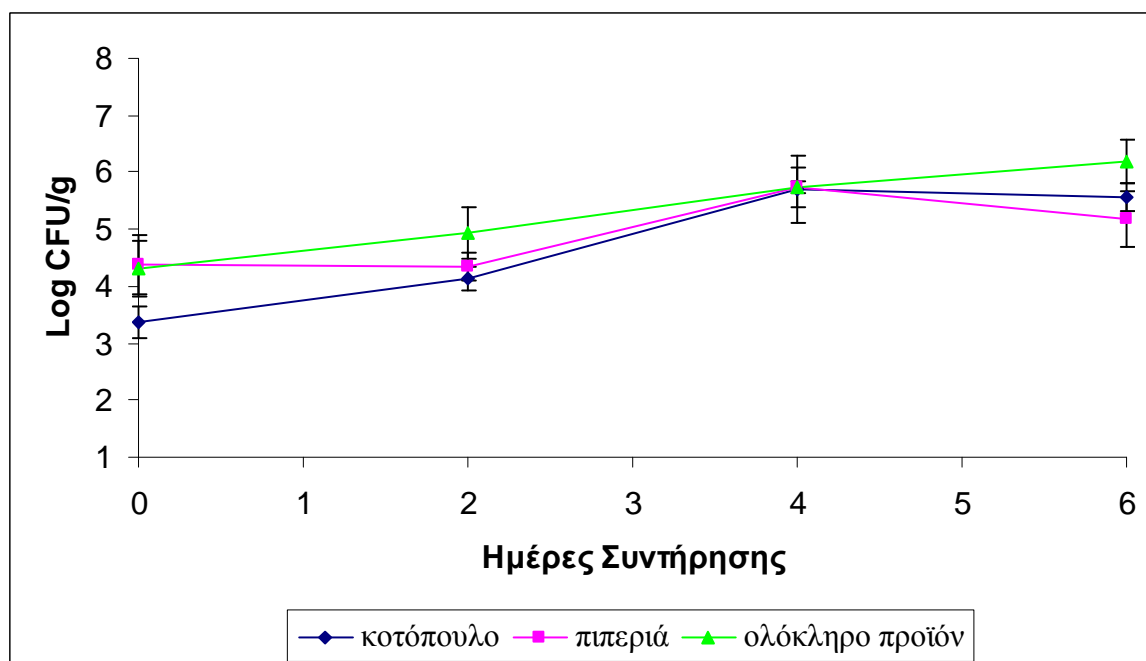
Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Radin et al. (2006) σύμφωνα με τους οποίους η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε λουκάνικα τύπου “Frankfurters” εμβολιασμένα με *L. monocytogenes* κυμάνθηκε από 4 log CFU/g έως 7.5 log CFU/g την 10^η ημέρα συντήρησης. Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν παρόμοια με εκείνη της μεσόφιλης αερόβιας χλωρίδας. Επιπρόσθετα, στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι η υψηλή μικροχλωρίδα αλλοίωσης των λουκάνικων, η οποία απαρτιζόταν κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια, επηρέασε την πορεία ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση υπό ψύξη, παρατείνοντας την λογαριθμική φάση προσαρμογής. Οι Francis et al. (1999) αναφέρουν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης των λαχανικών ενδέχεται να δράσουν ανταγωνιστικά με τους παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά ωστόσο τονίζεται ότι δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να στηρίζουν ισχυρά αυτή την άποψη. Σύμφωνα με την έρευνα των Mellefont et al. (2008) η ταυτόχρονη ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και του βακτηρίου *Lactobacillus plantarum* παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις κατά την διάρκεια συντήρησής του σε θρεπτικό μοντέλο. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη του *L. plantarum* ανέστειλε αρχικά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* αλλά στην συνέχεια κατάφερε να επιβιώσει και να πολλαπλασιαστεί σε τέτοιο βαθμό ώστε να αναστείλει με την σειρά της την ανάπτυξη του *L. plantarum*. Στη ίδια έρευνα αναφέρεται ότι η μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *L. plantarum* συνοδεύτηκε από λύση των κυττάρων του με αποτέλεσμα την απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών τα οποία μεταβολιστήκαν από την *L. monocytogenes* προωθώντας την ανάπτυξή της. Επίσης τονίστηκε ότι ήταν πιθανό η μείωση του pH και παραγωγή γαλακτικού οξέος από τον *L. plantarum* να ήταν ανεπαρκείς για την αναχαίτιση της *L. monocytogenes*. Σε μια άλλη έρευνα επίσης αναφέρεται ότι η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* μετά τον ενοφθαλμισμό της σε μαγειρεμένο χοιρομέρι δεν επηρεάστηκε από την παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρά μόνο όταν τα επίπεδα τους ξεπέρασαν τους 7.0 log CFU/g (Devlieghere et al. 2001).

Στα **Γραφήματα 3.1.5** και **3.1.6** απεικονίζεται η μεταβολή των Εντεροβακτηριοειδών (Enterobacteriaceae) και των Ζυμών-Μυκήτων, αντίστοιχα, στα δύο διαφορετικά

συστατικά του προϊόντος και στο ολόκληρο προϊόν, κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, παρουσία της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes*.



Γράφημα 3.1.5. Μεταβολή των Εντεροβακτηριοειδών στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *L. monocytogenes* και κατά την συντήρησή τους στους 4°C , για διάστημα έξι ημερών.



Γράφημα 3.1.6. Μεταβολή των Ζυμών-Μυκήτων στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *L. monocytogenes* και κατά την συντήρησή τους στους 4°C , για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με τα **Γράφηματα 3.1.5 και 3.1.6**, Οι πορείες ανάπτυξης των Εντεροβακτηριοειδών και των Ζυμών-Μυκήτων, παρουσίασαν του μικρότερους τελικούς πληθυσμούς από τα υπόλοιπα είδη βακτηρίων που εξετάστηκαν, και στις τρεις μεταχειρίσεις. Συγκεκριμένα, τα Εντεροβακτηριοειδή ξεκίνησαν από αρχικούς πληθυσμούς 3.9, 4.1 και 5.5 στο κοτόπουλο την πιπεριά και μίγμα αυτών, αντιστοίχως, και κατέληξαν σε τελικούς πληθυσμούς 5.8-6.0 log CFU/g μετά από έξι ημέρες συντήρησης (**Γράφημα 3.1.5**). Αντίστοιχα σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.6**, οι Ζύμες-Μυκήτες, ξεκινώντας από αρχικό πληθυσμό 3.4 (κοτόπουλο), 4.4 (πιπεριά) και 4.3 (ολόκληρο προϊόν) κατέληξαν σε τελικό πληθυσμό 5.6 (κοτόπουλο), 5.2 (πιπεριά) και 6.2 (ολόκληρο προϊόν).

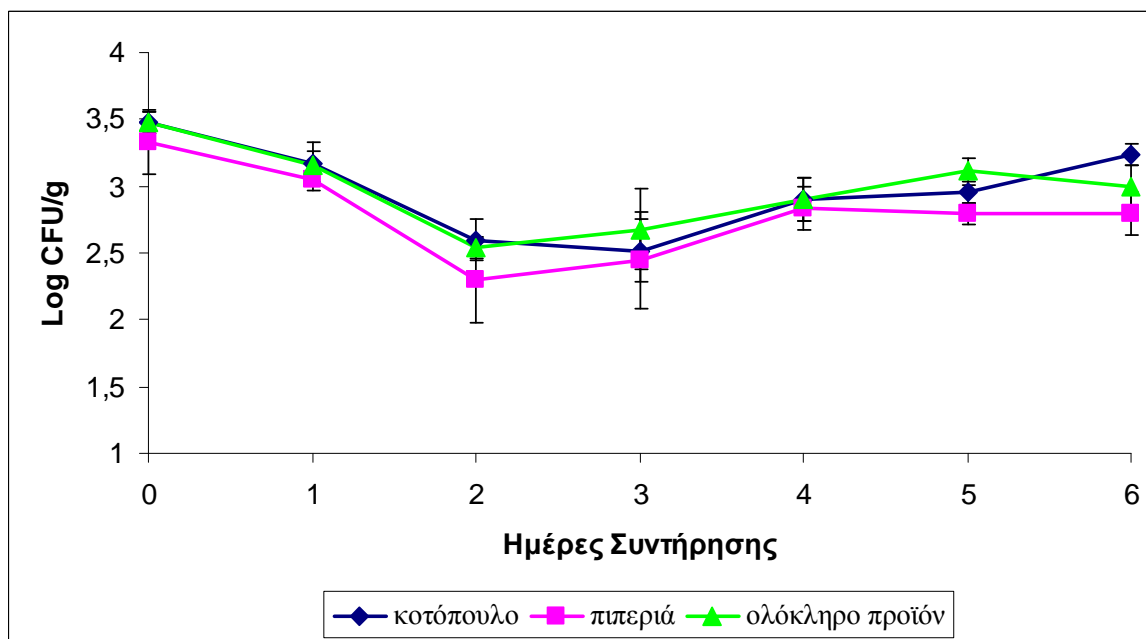
Κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης οι πληθυσμοί των Εντεροβακτηριοειδών και των Ζυμών-Μυκήτων δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ($p < 0,05$). Σύμφωνα με τους Bennik et al. (1996) και Francis et al. (1996) τα Εντεροβακτηριοειδή ως μέρος της αυτόχθονης μικροχλωρίδας λαχανικών επέδειξαν φαινόμενα ανταγωνισμού με την *L. monocytogenes*. Σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να υποδεικνύουν φαινόμενα ενδεχόμενου ανταγωνισμού μεταξύ παθογόνων μικροοργανισμών και Ζυμών-Μυκήτων. Ωστόσο, οι Huhtanen et al. (1976) τονίζουν ότι η ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων σε ένα τρόφιμο μπορεί να επιφέρει σημαντική αύξηση του pH, καθιστώντας το θρεπτικό περιβάλλον πιο ευνοϊκό για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών και την παραγωγή τοξινών.

3.2 Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της *Salmonella enterica* ser. Montevideo στο ολόκληρο προϊόν και στα επιμέρους συστατικά του-Μεταβολή της μικροχλωρίδας αλλοίωσης παρουσία της *Salmonella*

Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* spp. είναι μεσόφιλα, προαιρετικά αναερόβια που μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες με περιορισμένη διαθεσιμότητα σε οξυγόνο. Η ανάπτυξη τους περιορίζεται σημαντικά σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 5-7 °C, χωρίς αυτό να σημαίνει όμως ότι δεν μπορούν να επιβιώσουν σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης (Garcia de Fernando et al., 1995; Gill & DeLacy 1991; Szcawinska et al., 1991, Cox et al., 1999). Η *Salmonella* έχει απομονωθεί από πολλά τρόφιμα ζωικής προέλευσης (πουλερικά, βοοειδή, ψάρια κ.α.), ενώ έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να ανευρεθεί στην και να αναπτυχθεί εύκολα στην επιφάνεια των λαχανικών (Francis e al. 1999). Ωστόσο η

Salmonella που προέρχεται από τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης παραμένει μία από τις κύριες αιτίες τροφολοιμώξεων σε παγκόσμιο επίπεδο (Mead et al., 1999).

Στο **Γράφημα 3.2.1** απεικονίζεται η πορεία ανάπτυξης της *Salmonella enterica* στο κοτόπουλο, την πιπεριά καθώς και στο ολόκληρο προϊόν, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 °C) σε αερόβιες συνθήκες.



Γράφημα 3.2.1. Πορεία ανάπτυξης της *Salmonella enterica* στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), κατά την συντήρησή τους στους 4 °C για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.1**, η *Salmonella enterica* κατάφερε να επιβιώσει αλλά δεν αναπτύχθηκε κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, σε καμιά από τις μεταχειρίσεις. Το γεγονός της επιβίωσης αλλά μη ανάπτυξης της *Salmonella enterica* δεν μας προκαλεί έκπληξη, εφόσον η πλειοψηφία των βακτηρίων του είδους Non-Typhoidal *Salmonellae*, μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 5 °C αλλά η ανάπτυξή τους αναστέλλεται ή είναι πολύ αργή (Farber et al. 1989; Lee, 1989; Gill & DeLacy 1991; Szczawinska et al. 1991; Francis et al., 1999; Cox et al., 1999, Abushelaibi et al. 2003, Hanes et al., 2004, Juneja et al., 2007; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-typhoid-salmonellae.pdf>) λόγω μειωμένης μεταβολικής δραστηριότητας και κυτταρικής ανανέωσης, σε χαμηλές θερμοκρασίες (Koutsoumanis et al., 1999; Beal et al., 2002; Hayouni et al., 2008). Από την αρχική έως την 6^η ημέρα συντήρησης των τριών μεταχειρίσεων, παρατηρήθηκε μικρή μείωση του αρχικά ενοφθαλμισμένου πληθυσμού

της *Salmonella enterica*, σε όλες τις περιπτώσεις. Συγκεκριμένα, στο ολόκληρο προϊόν παρατηρήθηκε μείωση του αρχικού πληθυσμού της *Salmonella* κατά 0.48 log CFU/g, ενώ η μείωση στο κοτόπουλο, έφτασε τα 0.24 log CFU/g. Επίσης, ο πληθυσμός του βακτηρίου στην πιπεριά όταν εξετάστηκε μόνη της, εμφάνισε την μεγαλύτερη μείωση από την αρχική της τιμή σε σχέση με τις άλλες μεταχειρίσεις κατά 0.53 log CFU/g. Στο τέλος της περιόδου συντήρησης, οι τελικές τιμές των τριών μεταχειρίσεων ήταν 3.24, 2.80 και 3.0 log CFU/g στο κοτόπουλο, την πιπεριά και το ολόκληρο προϊόν, αντιστοίχως ($p > 0,05$). Αξίζει να σημειωθεί ότι όπως και την περίπτωση της *L. monocytogenes*, δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων, εφόσον το p κυμάνθηκε από 0.2 ως 1.0, υποδεικνύοντας ότι η πορεία ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού ήταν η ίδια ανεξαρτήτως συστατικού του προϊόντος κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης.

Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Szczawinska et al. (1991) οι οποίοι αναφέρουν επιβίωση, αλλά όχι ανάπτυξη των *S. enteritidis*, *S. typhimurium* and *S. dublin* μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε μηχανικά αποστεωμένο κοτόπουλο διατηρημένου αερόβια στους 5 °C, για 9 ημέρες. Επίσης, σύμφωνα με τους Skandamis & Nychas (2002) δεν παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού ενοφθαλμισμένης *S. typhimurium* κατά την αερόβια συντήρηση μοσχαρίσιου κρέατος στους 5 °C, σε αερόβια συσκευασία, VP ή MAP. Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κοτόπουλο το οποίο συντηρήθηκε υπό ψύξη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ενώ η ενοφθαλμισμένη *Salmonella* αυξήθηκε κατά 1.5 log CFU/g στους 8 °C, σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (2 °C και 6 °C) δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί και μειώθηκε κατά 1.0 log CFU/g από την αρχική της τιμή (Jimenez et al., 2007). Τέλος οι Anang et al. (2007) αναφέρουν ότι πληθυσμός ενοφθαλμισμένης *S. Enteritidis* σε φιλέτο κοτόπουλου παρέμεινε αμετάβλητος τις πρώτες ημέρες 10 συντήρησης στους 4 °C.

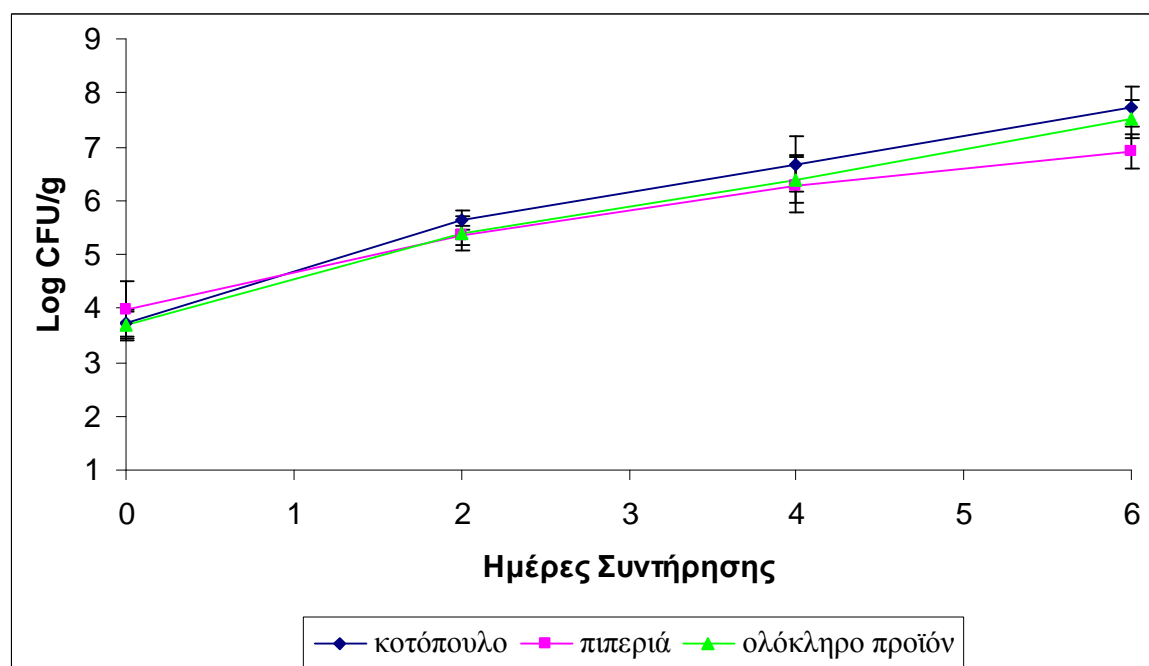
Η *S. enterica* επιβίωσε κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης της πιπεριάς αλλά δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του κοτόπουλου. Γενικά, τα τεμαχισμένα λαχανικά, όπως τα κομμάτια πιπεριάς στην προκειμένη περίπτωση είναι πιο επιρρεπή στην μικροβιολογική αλλοίωση εξαιτίας του γεγονότος ότι κατά τη διαδικασία του τεμαχίσματος, οι κυτταρικοί τους ιστοί καταστρέφονται με αποτέλεσμα την ευκολότερη διάθεση των απελευθερωμένων θρεπτικών συστατικών (σάκχαρα, μεταλλικά στοιχεία, βιταμίνες κ.α) στους μικροοργανισμούς αλλοίωσης ή στα παθογόνα βακτήρια (Froder et al., 2007). Έτσι, στην περίπτωση που υπάρξουν παθογόνοι

μικροοργανισμοί στη επιφάνεια των λαχανικών, το τεμάχισμα μπορεί όχι μόνο να ευνοήσει την ανάπτυξή τους σε υψηλά επίπεδα αλλά και να οδηγήσει σε εξάπλωση της επιμόλυνσης και σε άλλα προϊόντα με τα οποία μπορούν να έρθουν σε επαφή (στο κοτόπουλο στην περίπτωση του εξεταζόμενου προϊόντος). Ωστόσο, η ανάπτυξη της εμβολιασμένης *Salmonella* δεν φάνηκε να ευνοείται στην επιφάνεια της τεμαχισμένης πιπεριάς, πιθανόν λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας συντήρησης (4 °C) στην οποία ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός παρουσιάζει μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα και κυτταρική ανανέωση, με αποτέλεσμα να έχει μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης (Beal et al., 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με την πρόσφατη οδηγία του FDA (2008) τα τεμαχισμένα λαχανικά που προορίζονται για κατανάλωση, πρέπει να διατηρούνται σε θερμοκρασίες ≤ 5 °C για την αποφυγή τροφοδηλητηριάσεων. Επίσης στη ίδια οδηγία αναφέρεται ότι η δυνατότητα των παθογόνων να επιβιώσουν ή να αναπτυχθούν σε επικίνδυνα επίπεδα για τον καταναλωτή στην επιφάνεια των φρέσκων λαχανικών, εξαρτάται από την περιεχόμενη υγρασία, τα θρεπτικά συστατικά των λαχανικών, την απουσία θερμικής επεξεργασίας κατά την παραγωγή τους, αλλά και το ενδεχόμενο αύξησης της θερμοκρασίας επάνω από τα προτεινόμενα επίπεδα (temperature abuse) κατά την επεξεργασία τους ή την συντήρησή τους.

Σύμφωνα με την έρευνα των Kakiomenou et al. (1998) ο πληθυσμός της *S. enteridis* εμβολιασμένης σε τεμαχισμένα καρότα ή λάχανο, μειώθηκε από την αρχική του τιμή, κατά την αερόβια συντήρηση των λαχανικών σε χαμηλή θερμοκρασία (4 °C). Επίσης, οι Weissinger et al. (2000) παρατήρησαν ότι η *S. bairdson* εμβολιασμένη σε λάχανο ή τομάτα, κατάφερε να επιβιώσει κατά την συντήρηση στους 4 °C (αερόβια) για διάστημα 12 ημερών, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε και μείωση από την αρχική της τιμή. Τέλος οι Zhuang et al. (1995) αναφέρουν ότι πληθυσμός της *S. Montevideo* εμβολιασμένης στην επιφάνεια νωπή τομάτας δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την συντήρηση στους 10 °C για 18 ημέρες.

Η μεταβολή της OMX στα δείγματα εμβολιασμένα με *Salmonella* δεν παρουσίασε διαφορές σε σχέση με την αντίστοιχη των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με *Listeria* και παρουσιάστηκαν στο **Γράφημα 3.1.1**. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των Ψευδομονάδων, των Εντεροβακτηριοειδών και των Ζυμών-Μυκήτων (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται λόγω αντιστοιχίας, **Γραφήματα 3.1.3, 3.1.5 και 3.1.6**). Ωστόσο η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσίασε κάποιες μικρές διαφορές σε σχέση

με την αντίστοιχη μεταβολή στα δείγματα που ενοφθαλμίστηκαν με *Listeria*, κυρίως στο τέλος της περιόδου συντήρησης, και παρουσιάζονται στο **Γράφημα 3.2.2**.



Γράφημα 3.2.2. Μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο + πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *Salmonella enterica* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.2**, ο αρχικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις τρεις μεταχειρίσεις οι οποίες ενοφθαλμίστηκαν με *Salmonella* spp., ήταν 3.7 log CFU/g (κοτόπουλο), 4.0 log CFU/g (πιπεριά) και 3.7 log CFU/g (κοτόπουλο + πιπεριά). Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν ίδιος και στις τρεις μεταχειρίσεις ($p > 0.05$). Ωστόσο, την 6^η ημέρα συντήρησης η διαφορά μεταξύ πιπεριάς και υπόλοιπων μεταχειρίσεων ήταν 0.8 και 0.6 log CFU/g, σε αντίθεση με την περίπτωση της *L. monocytogenes* όπου ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην πιπεριά παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τις άλλες μεταχειρίσεις (**Γράφημα 3.2.2**). Συνολικά, η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p > 0.05$).

Η πιθανότητα εμφάνισης φαινομένων ανταγωνισμού μεταξύ οξυγαλακτικών βακτηρίων και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως η *Salmonella*, δεν είναι απόλυτα

εξακριβωμένη. Παρόλο που κάποιες έρευνες αναφέρουν αντιμικροβιακή δράση των γαλακτικών βακτηρίων ενάντια στην ανάπτυξη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, στις περισσότερες από αυτές η προέλευση των φαινομένων ανταγωνισμού έμεινε αδιευκρίνιστη και δεν αποδόθηκε στην παραγωγή βακτηριοσινών (Maragkoudakis et al. 2009). Σε μια πρόσφατη έρευνα των Maragkoudakis et al (2009) η προσθήκη προστατευτικής καλλιέργειας οξυγαλακτικών βακτηρίων σε κιμά κοτόπουλου εμβολιασμένου με *Salmonella* μείωσε τον πληθυσμό του παθογόνου κατά 0.5-1.3 log CFU/g μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 8-10 °C. Ωστόσο τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν ήταν μέρος της αυτόχθονης μικροχλωρίδας του κοτόπουλου, αλλά προστέθηκαν σε αυτό ως προστατευτική καλλιέργεια, λόγω της διαπιστωμένης (εργαστηριακά) ικανότητάς τους να παράγουν βακτηριοσίνες .

Η μεταβολή των ψευδομονάδων στην περίπτωση των δειγμάτων ενοφθαλισμένων με *Salmonella* ήταν ανάλογη με την αντίστοιχη στην περίπτωση της *Listeria monocytogenes* (**Γράφημα 3.1.3**). Συγκεκριμένα ξεκινώντας από αρχικούς πληθυσμούς 5.2 log CFU/g (κοτόπουλο), 5.5 (πιπεριά) και 5.4 log CFU/g (κοτόπουλο + πιπεριά) κατέληξε σε υψηλές τιμές της τάξης των 8.5 log CFU/g σε όλες τις μεταχειρίσεις ($p > 0.05$, τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται).

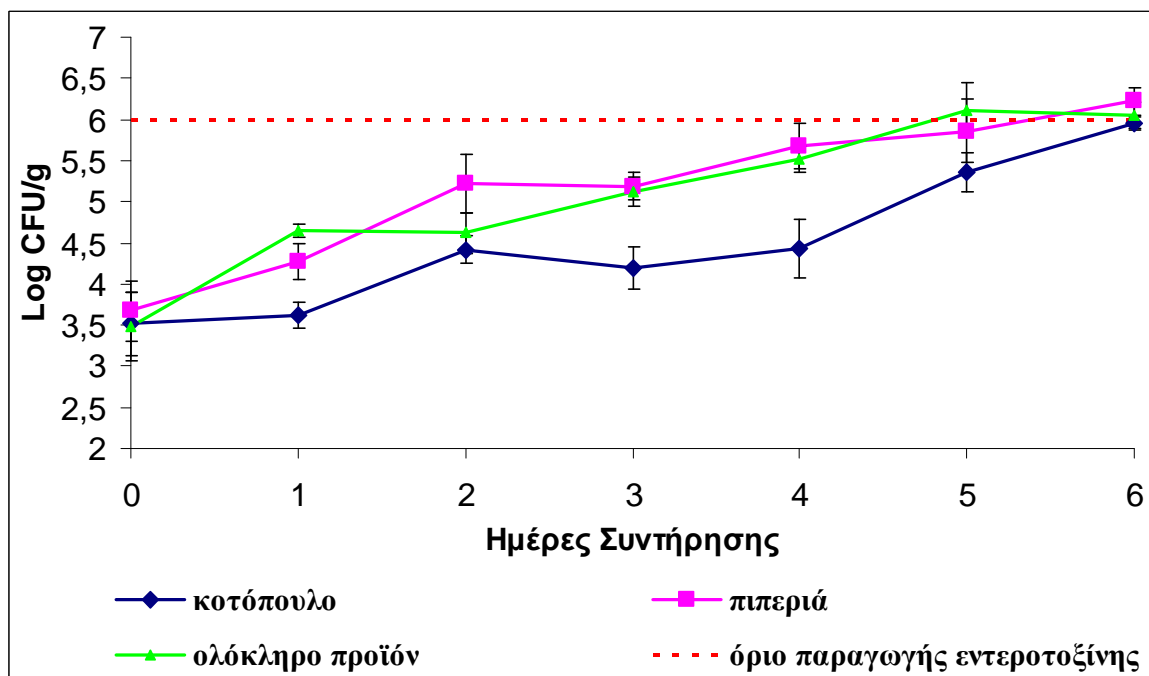
Όσον αφορά πιθανά φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ ψευδομονάδων και *Salmonella*, δεν υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα δεδομένα στην βιβλιογραφία. Ωστόσο, οι Liao et al. (2009) αναφέρουν ότι πληθυσμοί αρνητικών κατά Gram παθογόνων βακτηρίων ενοφθαλισμένων σε τεμαχισμένες πράσινες πιπεριές (*Salmonella* και *E. coli*) δεν επηρεάστηκαν μετά την συν-καλλιέργειά τους με τον μικροοργανισμό *Pseudomonas fluorescens*. Επιπρόσθετα, η εμφάνιση φαινομένων ανταγωνισμού μεταξύ ψευδομονάδων και *Salmonella* εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία συντήρησης, η ικανότητα (ή μη) των ψευδομονάδων να παράγουν χρωμοφόρες ενώσεις (pigments) οι οποίες παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών (strain-dependant), η πληθυσμιακή αναλογία ψευδομονάδων/παθογόνου στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου, καθώς και η συσκευασία του τροφίμου (αερόβια, τροποποιημένης ατμόσφαιρα) μετά την παραγωγή του, η οποία σε ένα βαθμό επηρεάζει τα είδη μικροοργανισμών που μπορεί να επικρατήσουν στο τρόφιμο (Oscar et al. 2007), όπως διατυπώθηκε νωρίτερα και στην περίπτωση του ανταγωνισμού *Listeria*/ψευδομονάδων. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Pseudomonas putida* παρεμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της *S. typhimurim* σε αερόβιες συνθήκες, αλλά κάτω από συνθήκες περιορισμένης

διαθεσιμότητας σε οξυγόνο παρατηρήθηκε αντίστροφο ανταγωνιστικό φαινόμενο (Thomas and Wimpenny 1996). Επίσης, οι Oblinger & Kraft (1970) αναφέρουν ότι το στέλεχος *Pseudomonas fluorescens* F-21 που απομονώθηκε από προϊόν κοτόπουλου (poultry strain) παράγει μια χρωμοφόρα ουσία (pigment) η οποία παρεμποδίζει την ανάπτυξη της *Salmonella*, αλλά τόνισαν ότι η παραγωγή της συγκεκριμένης ουσίας εξαρτάται από την θερμοκρασία συντήρησης.

3.3 Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του *Bacillus cereus* στο ολόκληρο προϊόν και στα επιμέρους συστατικά του-Μεταβολή της Μικροχλωρίδας αλλοίωσης παρουσία του *Bacillus cereus*

Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην οικογένεια του *Bacillus cereus* συχνά απαντούν στο φυσικό περιβάλλον (έδαφος, φυτά) και στα τρόφιμα όπως το παστεριωμένο και μη γάλα, τα αμυλούχα τρόφιμα (ρύζι, μακαρόνια, πατάτες κ.α.), τα δημητριακά (καλαμπόκι, σιτάρι) τα προϊόντα κρέατος (νωπά και μη), τα φρέσκα λαχανικά (καρότα, πράσινες πιπεριές, τομάτες κ.α.), τα γεύματα έτοιμα προς κατανάλωση που αποτελούνται από λαχανικά (Valero et al. 2002) και τα μπαχαρικά. Στο **Γράφημα 3.3.1** απεικονίζεται η πορεία ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Bacillus cereus* μετά τον ενοφθαλμισμό του στο κοτόπουλο, την πιπεριά και το ολόκληρο προϊόν, και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C για διάστημα 6 ημερών. Στην παρούσα έρευνα, για την παρασκευή του βακτηριακού μίγματος του *B. cereus* που χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό των μεταχειρίσεων, αναμίχθηκε ένα ψυχρότροφο στέλεχος (PAL 22) με 3 μεσόφιλα στελέχη (ATCC 10987, ATCC 14579, PAL 25), όλα με μεγάλη ικανότητα σπορογονίας (>80%). Αυτό έγινε γιατί η παρουσία του βακτηρίου στα νωπά (μη επεξεργασμένα) πουλερικά οφείλεται κυρίως σε ανθεκτικούς σπόρους του μικροοργανισμού, που προέρχονται από τα αγροκτίματα αναπαραγωγής ή επιμόλυνση κατά την σφαγή (Floristean et al., 2007). Επίσης, τα τυπικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για την τροφή του κοτόπουλου, έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να περιέχουν *B. cereus*. Το πέρασμα του συγκεκριμένου προϊόντος από διάφορα στάδια επεξεργασίας της αλυσίδας παραγωγής (αποστέωση, τεμαχισμός, προσθήκη καρυκευμάτων ή λαχανικών κ.λ.π) μέχρι την τελική του συσκευασία, αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα και την συχνότητα εμφάνισης του βακτηρίου (βλαστικών κυττάρων και σπορίων) η οποία οφείλεται σε συνδυασμό παραγόντων: την επιβίωση των σπόρων από τα νωπά (ολόκληρα) πουλερικά, των σπόρων από τα συστατικά που προστίθενται στα προϊόντα κρέατος (καρυκεύματα, λαχανικά, πρωτεϊνικά συμπληρώματα), και σε

επιμόλυνση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (Valero 2002; Floristean et al., 2007). Επίσης, τα υλικά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων μπορεί να αποτελέσουν πηγή ανεύρεσης του *B. cereus* (Pirttijavri et al., 2000).



Γράφημα 3.3.1. Πορεία ανάπτυξης του *Bacillus cereus* στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.3.1**, ο αρχικός πληθυσμός του *Bacillus cereus* στις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις την 0η ημέρα συντήρησης ήταν 3.52 (κοτόπουλο), 3.67 (πιπεριά) και 3.48 log CFU/g (κοτόπουλο + πιπεριά). Από την 0η έως την 4^η ημέρα συντήρησης, ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού ήταν ταχύτερος στην πιπεριά και στο μίγμα κοτόπουλου/πιπεριάς από ότι στο κοτόπουλο (διαφορά κατά 1.25 log CFU/g, $p < 0.05$). Συγκεκριμένα, ο αριθμός των κυττάρων του *B. cereus* στο σκέτο κοτόπουλο, παρουσίασε αύξηση κατά 0.9 log CFU/g τις πρώτες δύο μέρες συντήρησης υπό ψύξη, ενώ από την 2^η έως την 4^η ημέρα συντήρησης δεν παρουσίασε μεταβολή ($p < 0.05$). Ωστόσο, από την 4^η ημέρα συντήρησης και μετά, ο πληθυσμός του *B. cereus* στο κοτόπουλο άρχισε να αυξάνει με γρηγορότερο ρυθμό, υποδεικνύοντας ότι με το πέρας του χρόνου συντήρησης ο μικροοργανισμός άρχισε να προσαρμόζεται καλύτερα στο τροφικό

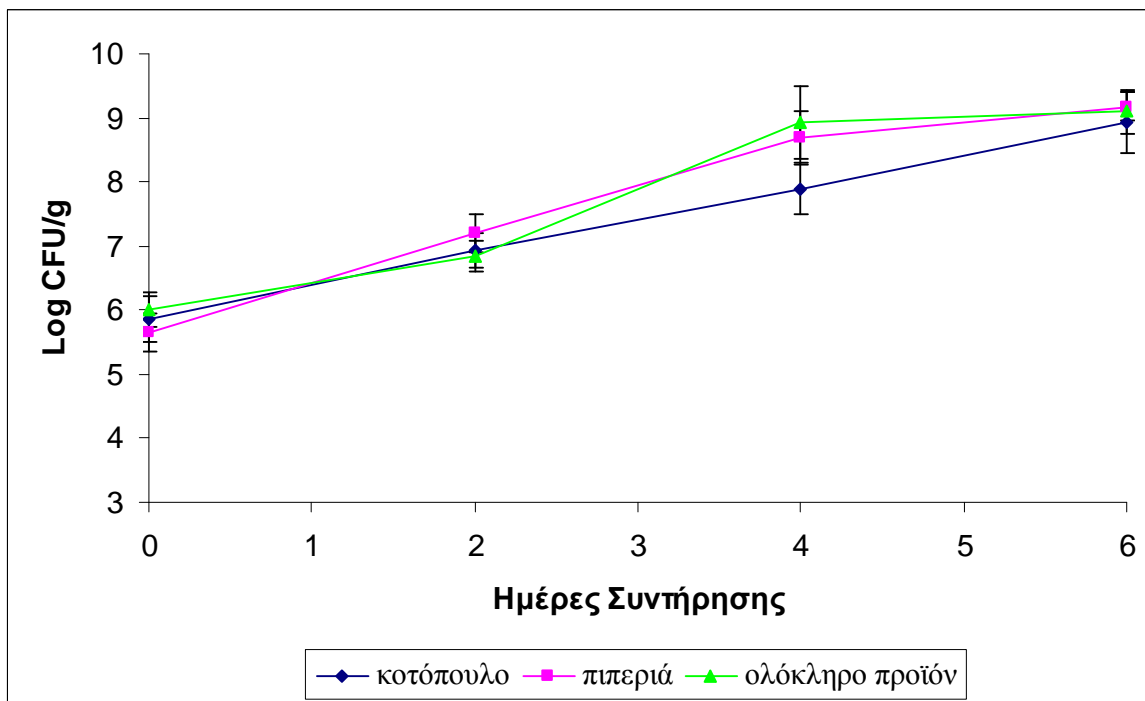
περιβάλλον του κοτόπουλου και να αυξάνεται η μεταβολική του δραστηριότητα (συνολική αύξηση κατά 2.5 log CFU/g). Την 6^η ημέρα συντήρησης, ο τελικός πληθυσμός του *B. cereus* ήταν 5.96 log CFU/g στο κοτόπουλο, 6.22 log CFU/g στην πιπεριά και 6.05 log CFU/g στο κοτόπουλο + πιπεριά, χωρίς να εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων ($p > 0.05$). Συνολικά, η αριθμητική αύξηση του μικροοργανισμού από την 0η ημέρα συντήρησης έως την 6^η ημέρα συντήρησης, ήταν 2.50 log CFU/g (κοτόπουλο), 2.55 log CFU/g (πιπεριά) και 2.57 log CFU/g (κοτόπουλο + πιπεριά) με την μεγαλύτερη στατιστική διαφορά να παρατηρείται μεταξύ κοτόπουλου και υπολοίπων μεταχειρίσεων ($p < 0.05$) τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης. Το γεγονός ότι ο πληθυσμός του *B. cereus* την 6^η ημέρα συντήρησης ήταν της τάξης των 6.0 log CFU/g σε όλες τις μεταχειρίσεις είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό για την ασφάλεια του τροφίμου, εφόσον έχει αποδειχτεί ότι ο αριθμός αυτός αποτελεί την ελάχιστη συγκέντρωση για την παραγωγή διαρροϊκής τοξίνης (Grant et al., 1993; Mahakarnchanakul et al., 1999; Finlay et al., 2002;). Αυτό σημαίνει ότι κατά την παραγωγή του προϊόντος θα πρέπει να λαμβάνονται τα κατάλληλα μέτρα υγιεινής (π.χ. πιστή εφαρμογή συστήματος HACCP, καλή ποιότητα πρώτης ύλης) για την εξασφάλιση της απουσίας του μικροοργανισμού στο τρόφιμο ή τουλάχιστον την ύπαρξη του σε μικρούς αρχικούς πληθυσμούς ($\leq 10^2$ CFU/g).

Τα ενοφθαλμισμένα κύτταρα του *B. cereus* παρουσίασαν γρήγορη προσαρμογή στο τροφικό περιβάλλον τόσο του κοτόπουλο όσο και της πιπεριάς από τις δυο πρώτες ημέρες συντήρησης, εφόσον η ανάπτυξη τους έγινε γρήγορα, χωρίς τη μεσολάβηση φάσης προσαρμογής (lag phase). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη ψυχρότροφου στελέχους (PAL 22) στο μίγμα που χρησιμοποιήθηκε (Wijnands et al., 2005; 2007) το οποίο πιθανόν να παρουσιάζει γρήγορο ρυθμό πολλαπλασιασμού στους 4 °C, με αποτέλεσμα τον υψηλό τελικό πληθυσμό του μίγματος στις μεταχειρίσεις. Πολλά στελέχη του *B. cereus* είναι ψυχρότροφα και ψυχροανθεκτικά και μπορούν να αναπτυχθούν στους 4 °C (Andersen-Borge et al., 2001; Ultee & Smid 2001) ή και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως 2 °C (Fernandes, 2008), ενώ έχει τονιστεί ότι ακόμη και μεσόφιλα στελέχη του μικροοργανισμού έχουν εμφανίσει την ικανότητα να προσαρμόζονται σε θερμοκρασίες ψύξης (μέσω δημιουργίας πρωτεϊνών cold shock) με αποτέλεσμα να εμφανίσουν ψυχρότροφο χαρακτήρα (Mahakarnchanakul et al., 1999). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε εμπορικά διαθέσιμα παγωτά συντηρημένα στους -20 °C, απομονώθηκαν στελέχη του *B. cereus* από το 40% των δειγμάτων, υποδεικνύοντας την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού ακόμη και συνθήκες

κατάψυξης (Warke et al., 2000). Τέλος, οι Nauta et al. (2003) αναφέρουν ότι η συντήρηση των τροφίμων σε σταθερή θερμοκρασία ίση με 4 °C δεν είναι επαρκής για να παρεμποδίσει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε κρίσιμους πληθυσμούς για την υγεία (>10⁵ CFU/g).

Σύμφωνα με την έρευνα των van Netten et al. (1990) ψυχρότροφα στελέχη του *B. cereus* απομονωμένα από μπακαλιάρο, πατέ ψαριού και παστεριωμένο γάλα που ήταν υπεύθυνα για την πρόκληση δηλητηριάσεων από την κατανάλωσή τους, παρουσίασαν ορατή ανάπτυξη μετά από διατήρηση για διάστημα 5-7 ημερών στους 4 °C, συνοδευόμενη από παραγωγή εντεροτοξίνης. Επίσης, οι Carlin et al. (2006) αναφέρουν ότι τα 50 από τα 83 στελέχη *B. cereus* που απομονώθηκαν από τρόφιμα αναπτύχθηκαν στους 4 °C ή στους 7 °C, χωρίς όμως να παράγουν εντεροτοξίνες. Σύμφωνα με την πρόσφατη έρευνα των Aires et al. (2009) ο πληθυσμός του *B. cereus* σε παστεριωμένο γάλα που συντηρήθηκε στους 4 °C αυξήθηκε κατά 1.5 και 5.0 log CFU/g από την αρχική του τιμή μετά από 7 και 14 ημέρες, αντίστοιχα. Αντιθέτως, οι Kannatt et al. (2008) και Little & Knochel (1994) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του *B. cereus* που ενοφθαλμίστηκε σε τυρί τύπου Brie (pH =6.8) και σε αρνίσιο κρέας, δεν παρουσίασε αύξηση από την αρχική του τιμή, κατά την συντήρηση στους 0-3 °C και 4 °C, αντίστοιχα, χωρίς όμως να διευκρινίζεται αν τα στελέχη που χρησιμοποιήσαν ήταν ψυχρότροφα ή όχι. Τέλος, οι Valero et al. (2000) αναφέρουν ανάπτυξη ενός ψυχρότροφου στελέχους του *B. cereus* σε θερμοκρασία 5 °C (ρυθμός ανάπτυξης 0.027 log CFU/g ανά ώρα). Γενικά, ο αριθμός των ερευνών που έχουν επικεντρωθεί στην δυνατότητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε χαμηλές θερμοκρασίες ψύξης είναι πολύ περιορισμένες. Ωστόσο, στην έρευνα των Griffiths & Phillips (1990) που πραγματοποιήθηκε σε θερμικά επεξεργασμένο γάλα, ο πληθυσμός των ψυχρότροφων κυττάρων *B. cereus* κυμάνθηκε μεταξύ 10²-10⁴ CFU/mL, 10⁴-10⁵ CFU/mL και 10⁵-10⁶ CFU/mL στο 41.5%, 17.5% και 7.5% αντίστοιχα, των δειγμάτων που εξετάστηκαν μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 6 °C, ενώ ποσοστό δειγμάτων 2.1% ξεπέρασε τους 10⁶ CFU/mL. Στη ίδια έρευνα αναφέρεται ότι μετά από 14 ημέρες συντήρησης στους 6 °C το 89.4% των δειγμάτων ξεπέρασε τους 10⁶ CFU/mL. Τέλος, οι Rajkovic et al. (2005) αναφέρουν αύξηση του *B. cereus* κατά 4.5 log CFU/g από την αρχική του τιμή, μετά τον εμβολιασμό του σε πουρέ πατάτας, και κατά την συντήρησή στους 7 °C, για 8 ημέρες.

Στο **Γράφημα 3.3.2** παρουσιάζεται η μεταβολή της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με το μίγμα στελεχών του *B. cereus* και κατά την συντήρηση στους 4 °C για διάστημα 6 ημερών.

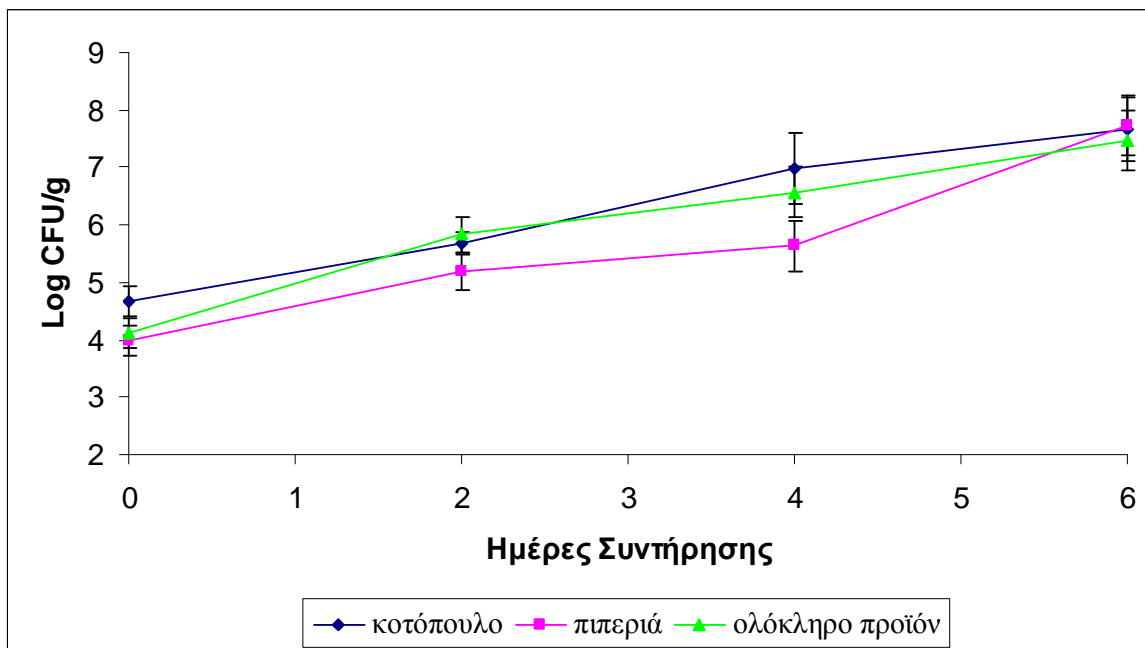


Γράφημα 3.3.2 Μεταβολή της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *B. cereus* και κατά την συντήρησή τους στους 4°C , για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.3.2** η Ο.Μ.Χ. την αρχική ημέρα συντήρησης, μετά τον ενοφθαλμισμό με τα στελέχη του *B. cereus*, ήταν 5.86 (κοτόπουλο), 5.65 (πιπεριά) και 6.01 log CFU/g, χωρίς να διαφέρουν σημαντικά από τις αντίστοιχες τιμές που σημειώθηκαν στην περίπτωση των άλλων δυο παθογόνων ($p > 0.05$). Η ανάπτυξη της Ο.Μ.Χ. ακολούθησε την ίδια πορεία και στις τρεις μεταχειρίσεις, καταλήγοντας σε υψηλούς πληθυσμούς στο τέλος της περιόδου συντήρησης. Συγκεκριμένα οι τελικοί πληθυσμοί της Ο.Μ.Χ στο κοτόπουλο ήταν 9.0 log CFU/g, στην πιπεριά 9.2 log CFU/g και στο ολόκληρο προϊόν 9.1 log CFU/g ($p > 0.05$). Κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την σύγκρισή των μεταχειρίσεων, όπως διαπιστώθηκε και στην περίπτωση των μεταχειρίσεων που εμβολιάστηκαν με *L. monocytogenes* ή *Salmonella* ($p > 0.05$). Παρόλο που η Ο.Μ.Χ. κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα και στις τρεις μεταχειρίσεις κατά την διάρκεια της συντήρησης, αυτό δεν φάνηκε να επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων του *B. cereus*, εφόσον πραγματοποιήθηκε με γρήγορο ρυθμό (1-1.5 log CFU/g αύξηση μόλις από την 2^η

ημέρα συντήρησης) καταλήγοντας σε υψηλούς τελικούς πληθυσμούς (6.0-6.2 log CFU/g). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο τελικός πληθυσμός του *B. cereus* ήταν κατά 3.0 log CFU/g χαμηλότερος από τον αντίστοιχο της Ο.Μ.Χ. στο τέλος της περιόδου συντήρησης, και στις τρεις περιπτώσεις. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την έρευνα των Grant et al. (1993) όπου παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή της μεσόφιλης χλωρίδας ήταν παράλληλη με αυτή του ενοφθαλισμένου *B. cereus* σε ψημένο μοσχαρίσιο κρέας με σάλτσα (gravy), κατά την συντήρηση στους 15 °C, για διάστημα 7 ημερών. Συγκεκριμένα, όταν η Ο.Μ.Χ έφτασε τους 8 log CFU/g, η συγκέντρωση του *B. cereus* ήταν κατά 3 log CFU/g χαμηλότερη, όπως παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Επίσης, οι Rajkovic et al. (2005) αναφέρουν ότι τα ενοφθαλισμένα κύτταρα *B. cereus* σε πουρέ πατάτες αυξήθηκαν κατά τουλάχιστον 4.0 log CFU/g, χωρίς να επηρεάζονται από την παρουσία της αυτόχθονης μικροχλωρίδας.

Η μεταβολή των ψευδομονάδων στα δείγματα ενοφθαλισμένα με *B. cereus* δεν παρουσίασε διαφορές σε σχέση με την αντίστοιχη των δειγμάτων που εμβολιάστηκαν με *Listeria* ή *Salmonella* και παρουσιάστηκαν στο **Γράφημα 3.1.3**. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των Εντεροβακτηριοειδών και των Ζυμών-Μυκήτων (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται λόγω αντιστοιχίας). Ωστόσο στην περίπτωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων η πορεία ανάπτυξης τους προσομοιάζει καλύτερα με την αντίστοιχη στην περίπτωση της *Salmonella* (**Γράφημα 3.2.2**) και παρουσιάζεται στο **Γράφημα 3.3.3**.



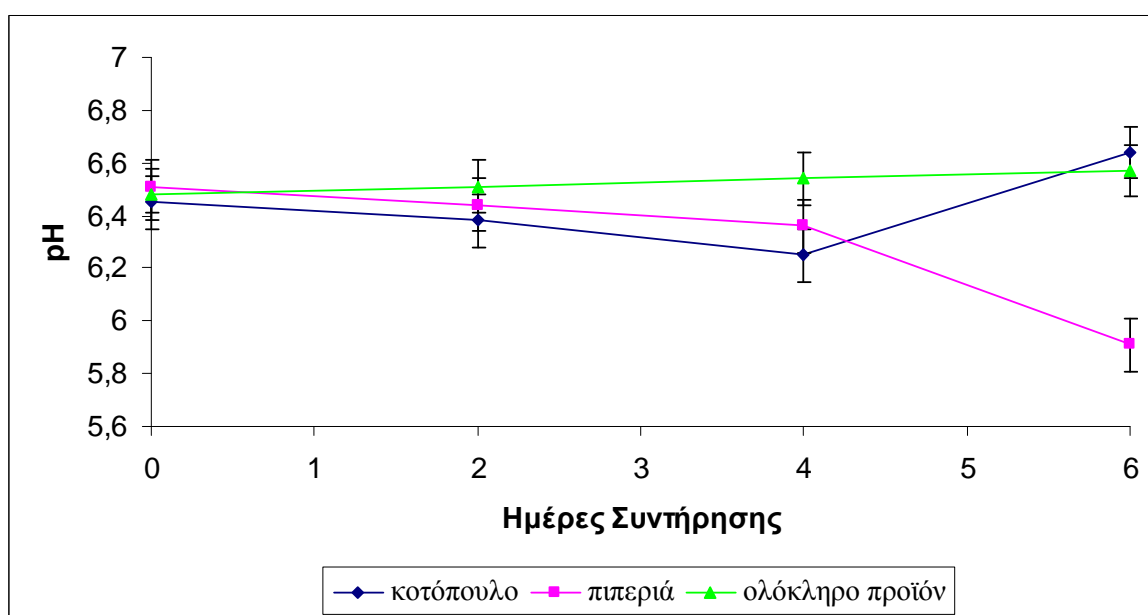
Γράφημα 3.3.3: Μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *B. cereus* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.3.3**, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ξεκινώντας από αρχικό πληθυσμό 4.7 (κοτόπουλο), 4.0 (πιπεριά) και 4.1 (κοτόπουλο + πιπεριά), αυξήθηκαν σημαντικά καταλήγοντας στους 7.7, 7.7 και 7.5 log CFU/g την 6^η ημέρα συντήρησης. Σε γενικές γραμμές η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν περίπου η ίδια και στις τρεις μεταχειρίσεις ($p>0,05$) κατά την διάρκεια συντήρησης, εκτός από την 4^η ημέρα όπου η πιπεριά είχε κατά 0.9-1.3 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς από τις άλλες δυο μεταχειρίσεις ($p<0,05$). Το ίδιο φαινόμενο είχε παρατηρηθεί και στα δείγματα πιπεριάς, που είχαν εμβολιαστεί με *Salmonella* (**Γράφημα 3.2.2**) την ίδια ημέρα συντήρησης, καθώς και στην αντίστοιχη περίπτωση της *Listeria*, αλλά δυο μέρες αργότερα (6^η ημέρα συντήρησης, **Γράφημα 3.1.4**). Ωστόσο, όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.3.3**, την 6^η ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις τρεις μεταχειρίσεις εμβολιασμένες με *B. cereus* δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p>0,05$).

3.4 Μεταβολή του pH των δειγμάτων μετά τον ενοφθαλμισμό τους με *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. Montevideo ή *Bacillus cereus* και κατά την συντήρηση για έξι ημέρες στους 4 °C

Παράλληλα με την μικροβιολογική ανάλυση των μεταχειρίσεων, έγινε και προσδιορισμός της μεταβολής του pH, κατά την συντήρηση στους 4 °C για διάστημα 6 ημερών.

Στο **Γράφημα 3.4.1** παρουσιάζεται η μεταβολή του pH στις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις, μετά τον ενοφθαλμισμό της *Listeria monocytogenes*, και κατά την συντήρησης στους 4 °C για διάστημα 6 ημερών.



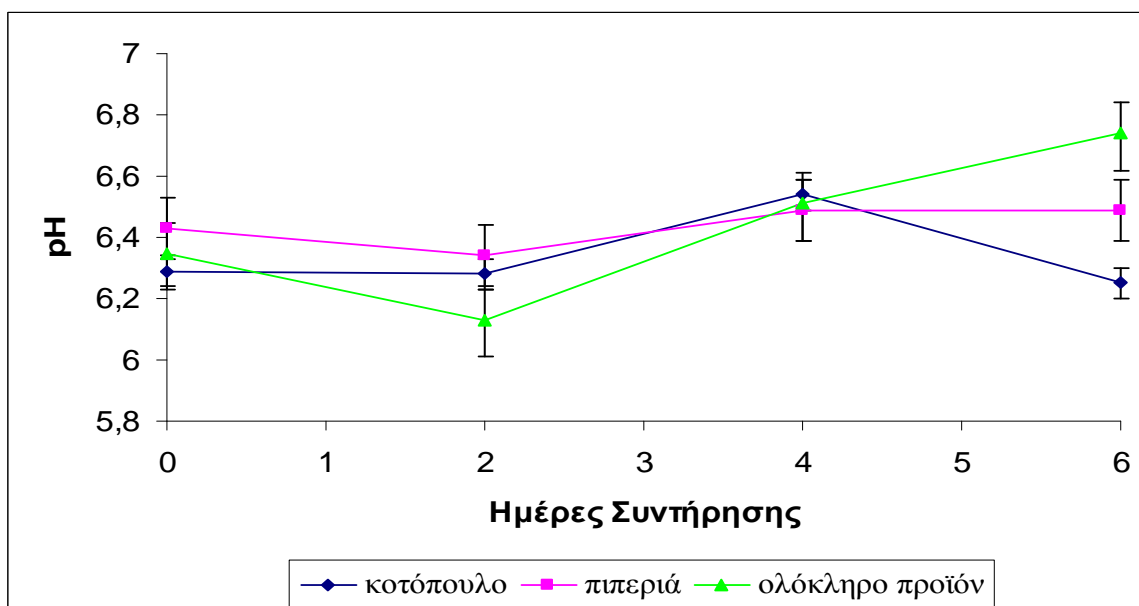
Γράφημα 3.4.1: Μεταβολή του pH στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο+πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *Listeria monocytogenes* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.4.1**, η τιμή του pH την 0η ημέρα συντήρησης ήταν 6.45 στο κοτόπουλο, 6.51 στην πιπεριά και 6.48 στο ολόκληρο προϊόν ($p > 0.05$). Την 4^η ημέρα συντήρησης η τιμή του pH κυμάνθηκε μεταξύ 6.25-6.54 χωρίς να παρουσιάζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Ωστόσο, από την 4^η ημέρα συντήρησης η τιμή του pH στην περίπτωση της πιπεριάς άρχισε να παρουσιάζει μια ελαφρά μείωση, φτάνοντας την τιμή 6.0 στο τέλος της περιόδου συντήρησης. Την ίδια ημέρα συντήρησης οι υπόλοιπες δυο μεταχειρίσεις (κοτόπουλο, κοτόπουλο + πιπεριά)

είχαν περίπου την ίδια τιμή pH (6.64 και 6.57). Η παρατηρούμενη μείωση του pH στην περίπτωση της πιπεριάς δεν φαίνεται να συμβαδίζει με την μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων (**Γράφημα 3.4.1**), η οποία ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τα άλλα δείγματα στο τέλος της περιόδου συντήρησης, οπότε και θα αναμενόταν λιγότερη παραγωγή γαλακτικού οξέος το οποίο αυξάνει την τελική συγκέντρωση των υδρογονοκατιόντων.

Γενικά το pH κυμάνθηκε μεταξύ 6.0-6.6, υποδεικνύοντας ότι παρόλο τους υψηλούς τελικούς πληθυσμούς των οξυγαλακτικών βακτηρίων και στις τρεις μεταχειρίσεις (10^6 - 10^8 CFU/g), η παραγωγή του γαλακτικού οξέος δεν ήταν αρκετή ώστε να μειώσει σημαντικά την τιμή του pH στις τρεις μεταχειρίσεις, αν και δεν προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η μικροχλωρίδα των δειγμάτων απαρτιζόταν και από άλλους μικροοργανισμούς πλην των οξυγαλακτικών βακτηρίων οι οποίοι παράγουν βασικές ενώσεις, ως προϊόντα μεταβολισμού, οι οποίες αυξάνουν το τελικό pH του υποστρώματος. Για παράδειγμα, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια της μικροχλωρίδας του κοτόπουλου και της πιπεριάς έχει βρεθεί να παράγουν κατά τον μεταβολισμό τους αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη, 2-μεθυλο-προπανόλη, 2-μέθυλο-βουτανόλη, 3- μέθυλο-βουτανόλη), αμμωνία, μεθυλαμίνη, πουτρεσκίνη και καδαβερίνη, ενώσεις που αυξάνουν την τιμή του pH (προς ουδέτερη τιμή). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η ελάχιστη τιμή για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* είναι pH = 4.3 (Tienungoon et al., 2000), συνεπώς η αναχαίτιση της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη (Γράφημα 3.1.1) δεν μπορεί να αποδοθεί στην μεταβολή του pH.

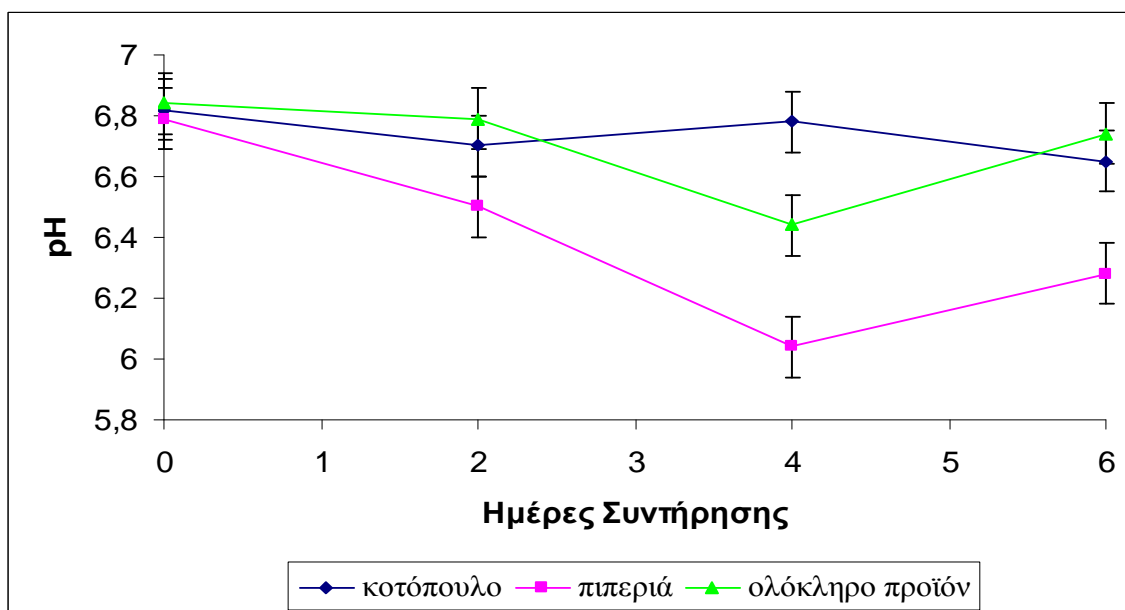
Στο **Γράφημα 3.4.2** παρουσιάζεται η μεταβολή του pH στις τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις, μετά τον ενοφθαλμισμό της *Salmonella*, και κατά την συντήρησης στους 4 °C για διάστημα 6 ημερών.



Γράφημα 3.4.2: Μεταβολή του pH στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *Salmonella enterica* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.2**, η αρχική τιμή του pH στις τρεις μεταχειρίσεις ήταν 6.3-6.4, και κυμάνθηκε μεταξύ 6.3-6.7 κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Όπως ειπώθηκε και στην περίπτωση της *Listeria monocytogenes* το pH των δειγμάτων ήταν αρκετά υψηλότερο από την ελάχιστη δυνατή τιμή ανάπτυξης του μικροοργανισμού (4.4-4.8) σε θερμοκρασίες ψύξης. Μάλιστα, το pH σε κάποιες περιπτώσεις έφτασε ή ξεπέρασε την τιμή 6.5, που θεωρείται ιδανική για την βέλτιστη ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Τέλος στο **Γράφημα 3.4.3** απεικονίζεται η μεταβολή του pH συναρτήσει του χρόνου συντήρησης, στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το μίγμα στελεχών του *B. cereus*.



Γράφημα 3.4.3: Μεταβολή του pH στα δύο διαφορετικά συστατικά του προϊόντος (κοτόπουλο, πιπεριά) καθώς και στο ολόκληρο προϊόν (κοτόπουλο +πιπεριά), μετά τον ενοφθαλμισμό τους με 10^3 CFU/g *B.cereus* και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C, για διάστημα έξι ημερών.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.3** η αρχική τιμή του pH στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με τον μικροοργανισμό *B.cereus* ήταν ελαφρώς υψηλότερη (6.8) από την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε στα δείγματα με *L. monocytogenes* (6.5) και *Salmonella spp.* (6.3-6.4). Κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης η τιμή του pH μειώθηκε προοδευτικά στην μεταχείριση της πιπεριάς (μείωση κατά 0.5), ενώ στα άλλα δείγματα παρέμεινε σχεδόν σταθερή. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στα δείγματα πιπεριάς που είχαν εμβολιαστεί με *L. monocytogenes* (**Γράφημα 3.4.1**). Ωστόσο, η τελική τιμή του pH δεν ήταν τόσο χαμηλή ώστε να επηρεάσει την ανάπτυξη του *B.cereus*, εφόσον έχει διαπιστωθεί ότι η κρίσιμη τιμή pH για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού είναι χαμηλότερη (pH = 5.0, Røssland et al., 2005).

4.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η *L. monocytogenes* παρουσίασε μικρή και βραδεία αύξηση από τον αρχικά ενοφθαλμισμένο πληθυσμό της κατά την συντήρηση στους 4 °C για διάστημα 6 ημερών, πιθανόν λόγω εμφάνισης φαινομένων ανταγωνισμού μεταξύ του

παθογόνου/ μικροχλωρίδας. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.

- Η ενοφθαλμισμένη *Salmonella enterica* κατάφερε να επιβιώσει αλλά δεν αναπτύχθηκε κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, σε καμιά από τις μεταχειρίσεις, λόγω της χαμηλής μεταβολικής της δραστηριότητας σε χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης, σε συνδυασμό με πιθανά φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ του παθογόνου/ μικροχλωρίδας.
- Ο πολλαπλασιασμός των ενοφθαλμισμένων κυττάρων του *B. cereus* (μίγμα ψυχρότροφου/μεσόφιλων στελεχών) έγινε με ταχύ ρυθμό στην περίπτωση της πιπεριάς και του ολόκληρου προϊόντος, ενώ στο κοτόπουλο ακολούθησε βραδύτερο ρυθμό, καταλήγοντας ωστόσο σε τελικό πληθυσμό κρίσιμο για την παραγωγή εντεροτοξίνης ($6.0 \log \text{CFU/g}$) σε όλες τις μεταχειρίσεις.
- Ανάμεσα στους τρεις παθογόνους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν, ο *B. cereus* επέδειξε την ευκολότερη προσαρμογή στο θρεπτικό περιβάλλον των τριών μεταχειρίσεων στην αρχή της περιόδου συντήρησης, και παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση από τον αρχικό του πληθυσμό ($2.4-2.6 \log \text{CFU/g}$).
- Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα κατά την διάρκεια συντήρησης ($6.0-9.0 \log \text{CFU/g}$) όλων των δειγμάτων, ενώ η πορεία ανάπτυξής της έγινε με τον ίδιο ρυθμό και στις τρεις μεταχειρίσεις.
- Οι ψευδομονάδες ξεκινώντας από αρχική τιμή $5.0 \log \text{CFU/g}$ κατέληξαν σε υψηλούς τελικούς πληθυσμούς ($8.1-8.5 \log \text{CFU/g}$) και στις τρεις μεταχειρίσεις, ενώ η μεταβολή τους ήταν η ίδια σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτως του ενοφθαλμισμένου παθογόνου ή/και μεταχείρισης. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των Εντεροβακτηριοειδών και Ζυμών -Μυκήτων.
- Η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που εμβολιάστηκαν με *Salmonella* spp. ή *B. cereus* ακολούθησε τον ίδιο ρυθμό (τελικός πληθυσμός $7.0-7.7 \log \text{CFU/g}$) ενώ παρουσιάστηκαν κάποιες διαφοροποιήσεις με τα δείγματα της *L. monocytogenes*, κυρίως την 6^η ημέρα συντήρησης.
- Το pH των δειγμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 6.0-6.8 και ήταν μεγαλύτερο από την ελάχιστη δυνατή τιμή για την ανάπτυξη των τριών παθογόνων μικροοργανισμών, υποδεικνύοντας ότι δεν μπορούσε να ασκήσει αρνητική επίδραση στην ανάπτυξή τους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: «*Επίδραση του συνδυασμού α) συσκευασίας (αερόβιας, τροποποιημένης ατμόσφαιρας) και β) χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου στο χρόνο συντήρησης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση στους 4 °C*».

1.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβιας/τροποποιημένης ατμόσφαιρας) και της προσθήκης χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (σε συνδυασμό ή μη) ως φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης ενός Ελληνικού παραδοσιακού προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 °C). Η ολική ποιότητα του προϊόντος αξιολογήθηκε μικροβιολογικά, φυσικοχημικά (pH, χρώμα, οξείδωση του λίπους) και οργανοληπτικά (οσμή και γεύση).

2.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία του προϊόντος

Η επεξεργασία του προϊόντος πραγματοποιήθηκε όπως έχει ήδη περιγραφεί στο **Κεφάλαιο 1** του Πειραματικού μέρους, **παράγραφος 2.1**.

2.2 Παρασκευή διαλύματος χιτοζάνης

Για την παρασκευή του διαλύματος, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

α) Χιτοζάνη χαμηλού Μοριακού Βάρους σε μορφή σκόνης (Low Molecular Weight Chitosan, CAS number 9012-76-4, Aldrich, Athens, Greece) με τα εξής χαρακτηριστικά (στοιχεία κατασκευαστή, [http: www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

- **Ιξώδες (viscosity)** : 20-200 cP, 1 % σε 1% οξικό οξύ
- **Μοριακό Βάρος:** 50-190 KDa (με βάση το ιξώδες)
- **Διαλυτότητα (solubility)** : Διαλυτή σε υδατικά διαλύματα ασθενών οργανικών οξέων 1%
- **Φυσική κατάσταση** : 75-85 % από-ακετυλιωμένη (deacetylation degree)
- **Υγρασία (%)** : μικρότερη από 10%

II) Διάλυμα οξικού οξέος 1% w/v. Για την παρασκευή του διαλύματος οξικού οξέος 1% (w/v), χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ (glacial acetic acid, CAS number 64-19-7, Sigma-Aldrich, Greece) και απεσταγμένο νερό, το οποίο προηγουμένως είχε αποστειρωθεί προκειμένου να εξασφαλιστεί η στειρότητα του διαλύματος χιτοζάνης που θα προκύψει. Τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου οξικού οξέος ήταν τα εξής:

- **Πυκνότητα (density)** : 1.049 g/mL στους 25 °C(lit.)
- **Σημείο βρασμού (boiling point)**: 117-118 °C(lit.)
- **Συγκέντρωση (molarity)**: 17.4 M

Το διάλυμα χιτοζάνης παρασκευάστηκε με διάλυση ποσότητας 2 g χιτοζάνης σε μορφή σκόνης, σε 100 ml του υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 1% w/v. Ακολούθησε ανάδευση με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, για την βέλτιστη διαλυτοποίησή του, η οποία υποβοηθήθηκε από ελαφρά θέρμανση (≤ 50 °C).

2.3 Αιθέριο Έλαιο Θυμαριού

Χρησιμοποιήθηκε αιθέριο έλαιο θυμαριού (Mane Fils Company, Le Bar Sur Loup, France) της ποικιλίας *Thymus vulgaris* με την εξής περιεκτικότητα σε ενεργά συστατικά (στοιχεία κατασκευαστή):

- Θυμόλη 57,7%
- p-κυμένιο 18,7%
- Καρβακρόλη 2,8%

2.4 Προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (χιτοζάνης/θυμαρέλαιου) στα δείγματα

Πριν την προσθήκη του διαλύματος στα δείγματα, κάθε σουβλάκι (καθαρό βάρος 90-125 gr) τοποθετήθηκε μέσα σε μια σακούλα συσκευασίας αποτελούμενη από πολυστρωματικό υλικό συσκευασίας (χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο/πολυαμίδιο/χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο, LDPE/PA/LDPE) πάχους 75 μm . Η διαπερατότητα του υλικού συσκευασίας στο οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα ήταν $52.2 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{day}/\text{Atm}$ και $191 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{day}/\text{Atm}$, αντίστοιχα σε συνθήκες σχετικής υγρασίας 75% και θερμοκρασία 25 °C, ενώ η διαπερατότητα σε υδρατμούς υπολογίστηκε να είναι $2.4 \text{ g}/\text{m}^2/\text{day}$ σε σχετική υγρασία 100% και θερμοκρασία 25 °C. Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων στις ανοιχτές σακούλες συσκευασίας, ακολούθησε ψεκασμός κατάλληλης ποσότητας του

διαλύματος χιτοζάνης-οξικού οξέος σε κάθε δείγμα, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος επί του προϊόντος να είναι 1.5 % v/w. Η τελική ποσότητα της ενεργής (διαλυμένης) ουσίας (χιτοζάνης) ανά 100 gr προϊόντος, υπολογίστηκε σε 0.03% gr/gr (0.03% w/w) ή αλλιώς 30% mg/gr (μεταχείριση A-X, M-X και M-X-Θ). Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου έγινε με την χρήση μικροπιπέττας σταθερού όγκου, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στα δείγματα να είναι 0.2% v/w (μεταχείριση A-Θ και M-Θ). Για την περίπτωση των δειγμάτων που περιείχαν χιτοζάνη σε συνδυασμό με θυμαρέλαιο (μεταχειρίσεις A-X-Θ και M-X-Θ), αρχικά έγινε η προσθήκη του διαλύματος χιτοζάνης (τελική συγκέντρωση στο προϊόν 1.5 % v/w=0.03% w/w) όπως περιγράφηκε παραπάνω, και ακολούθησε η προσθήκη του θυμαρέλαιου (τελική συγκέντρωση στο προϊόν 0.2% v/w). Σε όλες τις περιπτώσεις ακολούθησε μάλαξη του προϊόντος (εξωτερικά της συσκευασίας) έτσι ώστε να επιτευχθεί ομογενής διασπορά των αντιμικροβιακών παραγόντων στα δείγματα. Σημειώνεται ότι η προσθήκη του διαλύματος χιτοζάνης και του θυμαρέλαιου έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες (χρήση αποστειρωμένων γαντιών, ύπαρξη λύχνου Bunsen, αποστειρωμένα σκεύη, αποστειρωμένο νερό για την παρασκευή διαλυμάτων) προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση των δειγμάτων.

2.5 Συσκευασία των δειγμάτων-Μεταχειρίσεις

Τα δείγματα στα οποία έγινε η προσθήκη χιτοζάνης, θυμαρέλαιου ή συνδυασμού αυτών, χωρίστηκαν σε δυο ομάδες:

(α) δείγματα αερόβιας συσκευασίας

(β) δείγματα συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

Στα δείγματα της ομάδας (α) εφαρμόστηκε απλή θερμοσυγκόλληση του υλικού συσκευασίας με την χρήση μηχανήματος συσκευασίας (Boss model, N48 sealer, Boss, Bad Homburg, Germany). Ο χρόνος θερμοσυγκόλλησης ρυθμίστηκε στα 1.2 λεπτά. Αντίστοιχα, για την συσκευασία των δειγμάτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αρχικά έγινε ρύθμιση του επιθυμητού μίγματος αερίων (30% CO₂/70% N₂) με την χρήση κατάλληλου μίκτη αερίων (PBI-Dansensor model 9000, Ringsted, Denmark) και ακολούθησε ρύθμιση του μηχανήματος συσκευασίας έτσι ώστε ο χρόνος θερμοσυγκόλλησης να είναι 1.2 λεπτά.

Πειραματικές Μεταχειρίσεις:

α) δείγματα αερόβιας συσκευασίας:

- A = δείγματα που συσκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων, μάρτυρας
- A-Θ = δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη θυμαρέλαιου 0.2% v/w
- A-X= δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος σε τελική συγκέντρωση στο προϊόν 1.5% v/w (=0.03% w/w)
- A-X-Θ= δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος 1.5% v/w (=0.03% w/w) και θυμαρέλαιου 0.2% v/w

β) δείγματα συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂/70% N₂):

- M= δείγματα που συσκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων
- M-Θ =δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη θυμαρέλαιου 0.2% v/w
- M-X= δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος 1.5% v/w (= 0.03% w/w)
- M-X-Θ= δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος 1.5% v/w (=0.03% w/w) και θυμαρέλαιου 0.2% v/w.

Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν εντός ψυγείου (4 ± 0.5 °C) και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν μετά από 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 και 14 ημέρες.

2.6 Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε βάσει των επισήμων μεθόδων ανάλυσης της American Public Health Association (APHA, 2001). Μελετήθηκαν τα ακόλουθα είδη μικροοργανισμών αλλοίωσης:

- α) Ολική μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.)
- β) Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.)
- γ) Οξυγαλακτικά βακτήρια
- δ) *Brochothrix thermosphacta*
- ε) Εντεροβακτηριοειδή (*Enterobacteriaceae*)
- στ) Ζύμες-Μύκητες

Πειραματική πορεία: ποσότητα 25 g από κάθε σουβλάκι κοτόπουλου/πιπεριάς μεταφέρθηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher (Seward Medical, London, UK) και ακολούθησε προσθήκη 225 ml πεπτονόχου υδατικού διαλύματος συγκέντρωσης 0.1% w/v. Το μίγμα ομογενοποιήθηκε επί 60 δευτερόλεπτα με τη χρήση του Lab Blender Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical) σε θερμοκρασία δωματίου.

Η αρίθμηση της O.M.X., των ψευδομονάδων, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των εντεροβακτηριοειδών, των ζυμών-μυκήτων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο που περιγράφεται στην **παράγραφο 2.4 του Κεφαλαίου 1**. Η αρίθμηση του *Brochothrix thermosphacta* έγινε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης σε επιλεκτικό υλικό που παρασκευάστηκε από τα επιμέρους συστατικά στο εργαστήριο, σύμφωνα με τη μέθοδο των Atlas et al. (2006), προσθήκη αντιβιοτικού STAA (Streptomycin Sulphate–Thallos Acetate–cycloheximide (actidione), Oxoid) και επώαση των τρυβλίων στους 30 ° C για 48 ώρες και πραγματοποιήθηκε το τεστ οξειδάσης (αρνητική αντίδραση μετά από 60 δευτερόλεπτα). Καταμετρήθηκαν μόνο οι λευκές αποικίες.

2.7 Φυσικοχημική Ανάλυση

Οι φυσικοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν ο προσδιορισμός του θειοβαρβιτουρικού οξέος (Thiobarbituric acid. TBA), η μεταβολή του pH και η μεταβολή του χρώματος.

2.7.1 Προσδιορισμός TBA ενεργών ενώσεων (TBARS= Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

Οι ενώσεις TBARS είναι δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων που παράγονται κατά την διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων. Ο προσδιορισμός των TBARS ενώσεων έγινε σύμφωνα με την μέθοδο των Schmedes & Holmer (1989), και σύμφωνα με τις τροποποιήσεις των Sallam (2007) και Sallam et al. (2004).

Πειραματική πορεία απομόνωσης **TBA** ενεργών ενώσεων (TBARS= Thiobarbituric Acid Reactive Substances), με την χρήση υδατικού διαλύματος οργανικού οξέος (aqua acid extraction method):

Ποσότητα 10 gr κρέατος κοτόπουλου μεταφέρθηκαν σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες και έγινε προσθήκη 25 mL διαλύματος τριγλωροξικού οξέος 20% w/v (TCA, Merck). Ακολούθησε ομογενοποίηση του μίγματος για 30 δευτερόλεπτα, με την χρήση

ενός μίξερ χειρός. Στη συνέχεια, ακολούθησε διήθηση υπό κενό και ποσότητα 2 mL από το παραγόμενο διήθημα μεταφέρθηκε ποσοτικά σε δοκιμαστικό σωλήνα. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες με το περιεχόμενο διήθημα προστέθηκαν 2 mL υδατικού διαλύματος 2-θειοβαρβιτουρικού οξέος 0.02 M (3 gr/L, TBA, Merck). Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες πωματίστηκαν και επώαστηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 ώρες. Με το πέρας των 20 ωρών, μετρήθηκε η απορρόφηση του δείγματος σε φασματοφωτόμετρο UV-vis (model UV-1200, Shimadzu, Japan) στα 532 nm με τη χρήση διαλύματος τυφλού. Η μηλονική αλδεϋδη (MDA) αποτελεί το κύριο προϊόν της οξειδωσης των λιπιδίων και αντιδρά με το TBA προς σχηματισμό ερυθρού συμπλόκου με απορρόφηση στα 532 nm. Ωστόσο, εκτός της MDA, άλλες αλδεϋδες ή κετόνες που αποτελούν επίσης δευτερογενή προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων, αντιδρούν με το TBA προς παραγωγή ενώσεων με κίτρινο, πορτοκαλί ή ερυθρό χρώμα και απορρόφηση σε μήκος κύματος 455, 495 και 532 nm, αντίστοιχα (Guillen-Sans & Guzmán-Chozas, 1998). Με τον γενικό όρο TBARS (Thiobarbituric Reactive Substances ή TBA ενεργές ενώσεις) εκφράζεται το σύνολο των ενώσεων που αντιδρά με το TBA.

2.7.2 Προσδιορισμός του pH

Η μέτρηση του pH έγινε την 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 και 14^η ημέρα συντήρησης με τη χρήση πεχάμετρου (Inolab, USA) ως εξής: 10 gr δείγματος ομογενοποιήθηκαν με 90 ml απεσταγμένου ύδατος (pH=7.0) και στο διάλυμα έγινε εμφύσηση του ηλεκτροδίου του οργάνου, προσδιορίζοντας το pH.

2.7.3 Προσδιορισμός του χρώματος

Ο προσδιορισμός του χρώματος πραγματοποιήθηκε με χρωματόμετρο (HunterLab, model DP-9000, Reston, Virginia, USA) με την μέθοδο του Du et al. (2002). Μετρήθηκε το χρώμα του προϊόντος, στις μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν και εκτιμήθηκαν οι παράμετροι L^* (φωτεινότητα, Lightness), a^* (ερυθρότητα, redness) b^* (κίτρινη απόχρωση, yellowness). Οι μετρήσεις έγιναν 20 λεπτά μετά από το άνοιγμα της συσκευασίας των δειγμάτων.

Από τις τιμές των παραπάνω παραμέτρων (L^* , a^* , b^*) προσδιορίστηκαν επίσης η συνολική χρωματική μεταβολή ΔE^* , και η μεταβολή της έντασης του χρώματος που εκφράζει ο παράγοντας *Chroma*, σύμφωνα με τις παρακάτω εξισώσεις:

- $\Delta E^* = [(L^*-L_0)^2 + (a^*-a_0)^2 + (b^*-b_0)^2]^{1/2}$ όπου $L_0, a_0, b_0 =$ οι τιμές των παραμέτρων L^*, a^*, b^* των δειγμάτων την 0η ημέρα συντήρησης
- $Chroma = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$

2.8 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Μια ομάδα επτά μελών του Εργαστηρίου Χημείας και Μικροβιολογίας Τροφίμων αξιολόγησε το προϊόν ως προς την οσμή και την γεύση. Χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

Ένα ολόκληρο σουβλάκι κοτόπουλο/πιπεριά, αποψύχθηκε για 1 λεπτό σε φούρνο μικροκυμάτων και στη συνέχεια μαγειρεύτηκε για 5 λεπτά (800 W). Στη συνέχεια έγινε εξέταση της οσμής και γεύσης κάθε δείγματος σε σύγκριση πάντοτε με έναν μάρτυρα, δηλαδή με δείγμα που είχε φρεσκοκαταψυχθεί στους $-17\text{ }^\circ\text{C}$, την 0^η ημέρα συντήρησης. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε οι κριτές να μην επηρεάζονται μεταξύ τους και μεταξύ των δοκιμών καταναλώθηκε νερό και ψωμί προκειμένου να υπάρχει ξεκάθαρη διάκριση των γεύσεων.

Η ομάδα των κριτών αξιολόγησε την οσμή και την γεύση των μαγειρεμένων δειγμάτων χρησιμοποιώντας ηδονική κλίμακα βαθμολογίας (hedonic scale) από το 0 έως το 9 (0-9), όπου βαθμός =9 ισοδυναμεί με άριστη οσμή και γεύση, 8= πολύ καλή, 7= καλή, 6 = οριακά αποδεκτή, <6 = προϊόν αλλοιωμένο (μη αποδεκτό). Η οργανοληπτική αξιολόγηση έγινε με βάση την κλίμακα αξιολόγησης που χρησιμοποιήθηκε από τους Patsias et al. (2006) και Rio et al. (2007) για προϊόντα κοτόπουλου.

3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

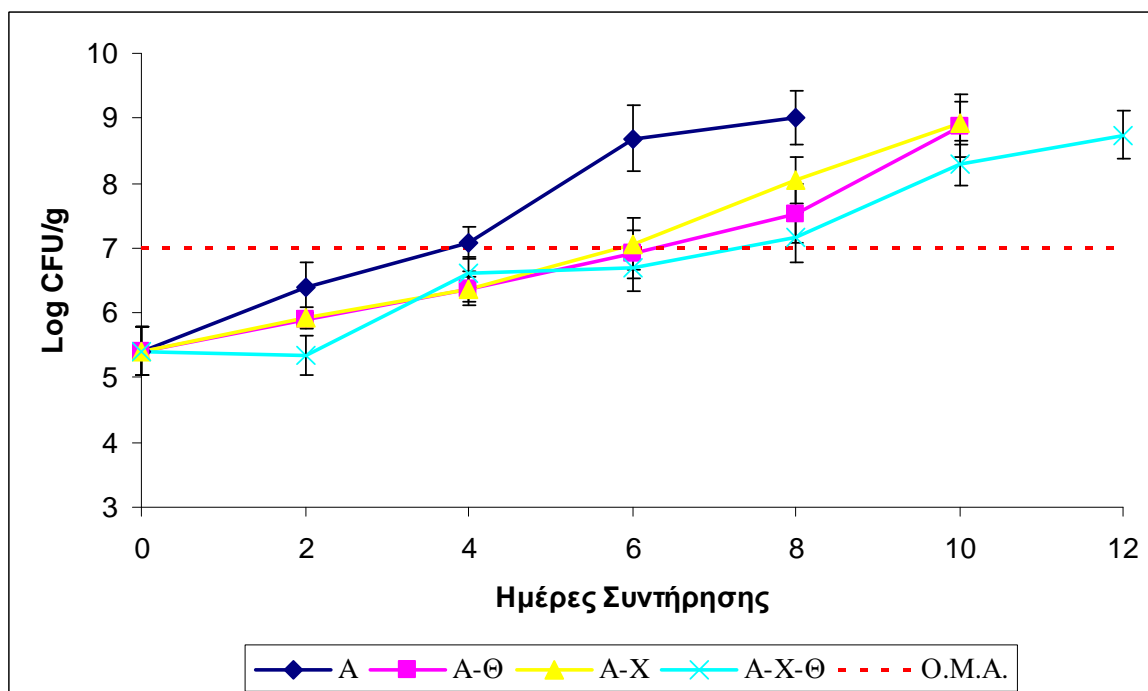
3.1 Μικροβιολογική ανάλυση

3.1.1 Μεταβολή της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.) χρησιμοποιείται ως δείκτης αποδοχής της ποιότητας των προϊόντων κρέατος με ανώτατο όριο τους 7 log CFU/g σύμφωνα με το IFST (1999). Επίσης, σύμφωνα με τους Artes et al. (2007), η ίδια τιμή των 7 log CFU/g θεωρείται ως το ανώτατο μικροβιολογικό όριο αποδοχής την στιγμή της κατανάλωσης φρέσκων λαχανικών τα οποία έχουν υποστεί ελάχιστη επεξεργασία (minimally processed vegetables) και η αναφορά αυτή γίνεται εφόσον το εξεταζόμενο προϊόν περιέχει και πράσινη πιπεριά. Στο **Γράφημα 3.1.1(α)** και **3.1.1(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή της Ο.Μ.Χ. των διαφορετικών δειγμάτων του προϊόντος (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την διατήρηση (**α**) σε αερόβια συσκευασία και (**β**) σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, και υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C).

α) Αερόβια Συσκευασία

Στο **Γράφημα 3.1.1(α)** απεικονίζεται η μεταβολή της Ο.Μ.Χ. στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά που συντηρήθηκαν σε αερόβια συσκευασία χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα (δείγματα Α, μάρτυρας), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w = 0.03% w/w, δείγματα Α-Χ), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, δείγματα Α-Θ) ή με τον συνδυασμό χιτοζάνης (1.5% v/w = 0.03% w/w)/θυμαρέλαιου (0.2% v/w) (δείγματα Α-Χ-Θ).



Γράφημα 3.1.1(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.) δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X = δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ = δείγμα με τον συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου. O.M.A = όριο μικροβιολογικής αλλοίωσης (7 log CFU/g).

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.1(α)**, το δείγμα του μάρτυρα (αερόβια συσκευασία, A) ξεκίνησε την 0η ημέρα συντήρησης από O.M.X. 5.4 log CFU/g, τιμή η οποία θεωρείται σχετικά υψηλή για φρέσκο προϊόν κοτόπουλου. Η υψηλή O.M.X. των φρέσκων δειγμάτων πιθανόν να οφείλεται στον τρόπο επεξεργασίας του προϊόντος, ο οποίος περιλαμβάνει τον τεμαχισμό κρέατος κοτόπουλου και πιπεριάς, και το πέρασμά τους σε ξυλάκι με χειρωνακτικό τρόπο. Η αρχική O.M.X. των δειγμάτων είναι υψηλότερη από την αντίστοιχη των 4.3 log CFU/g που αναφέρεται από τους Chouliara et al. (2007), Patsias et al. (2008), Senter et al., 2000 (3.5-4.1 log CFU/g), Sallam & Samejima, 2004 (3.6 log CFU/g) για φρέσκο στήθος κοτόπουλου, καθώς από τους Kim & Marshall (1999), Elliot et al. (1985) για κρέας από μπούτι κοτόπουλου (3-4 log CFU/g). Ωστόσο, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, προϊόντα νωπού κρέατος τα οποία έχουν υποστεί περαιτέρω επεξεργασία (τεμαχισμός μικρών κομματιών), όπως το Σουβλάκι/Κοτόπουλου Πιπεριάς, ξεκίνησαν από υψηλότερες τιμές O.M.X. Συγκεκριμένα, οι Sarantopoulos et al. (1998) και Kannatt et al.

(2005) αναφέρουν αρχική Ο.Μ.Χ. 5.5-5.7 log CFU/g για κομμάτια κρέατος κοτόπουλου από μπούτι (chicken leg cuts) και σουβλάκι από αρνίσιο κρέας (mutton kebab). Επίσης η αρχική χλωρίδα λουκάνικου από κρέας κοτόπουλου ήταν υψηλότερη από 4.7 log CFU/g (Lee et al., 1997). Τέλος, οι Soldatou et al. (2009) αναφέρουν ότι η αρχική τιμή Ο.Μ.Χ. σε σουβλάκι από πρόβειο κρέας ήταν 4.9 log CFU/g.

Το εξεταζόμενο προϊόν, όπως αναφέρθηκε, αποτελείται επίσης από πιπεριές σε άμεση επαφή με τα κομμάτια κοτόπουλου, οι οποίες έχουν προηγουμένως τεμαχιστεί. Γενικά, τα τεμαχισμένα λαχανικά είναι πιο επιρρεπή στην μικροβιολογική αλλοίωση από τα ολόκληρα, εφόσον κατά το στάδιο του τεμαχίσματος ελευθερώνονται θρεπτικά συστατικά (σάκχαρα, μεταλλικά στοιχεία, βιταμίνες) τα οποία είναι ευκολότερα διαθέσιμα στους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (Froder et al., 2007). Σύμφωνα με τους Ragaert et al., (2007) η αρχική Ο.Μ.Χ. των επεξεργασμένων λαχανικών κυμαίνεται από 3 έως 6 log CFU/g. Πράγματι, οι Uyttendaele et al. (2004) και Jacxsens et al. (2003) αναφέρουν υψηλή αρχική μικροχλωρίδα (5.3-6.5 log CFU/g) για πράσινες και ανάμικτες πιπεριές, μετά την επεξεργασία τους (τεμάχισμα).

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.1(α)**, το δείγμα του μάρτυρα (Α) επέδειξε γρήγορο ρυθμό μικροβιολογικής αλλοίωσης, εφόσον η Ο.Μ.Χ. ξεπέρασε τους 7.0 log CFU/g την 4^η ημέρα συντήρησης υπό ψύξη. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η έρευνα των Senter et al. (2004), Balamatsia et al. (2006), Sarantopoulos et al. (1998), σύμφωνα με τους οποίους η Ο.Μ.Χ. αποστεωμένου στήθους κοτόπουλου και τεμαχισμένου κρέατος κοτόπουλου από μπούτι (chicken leg cuts) ξεπέρασε τους 7.0 log CFU/g μετά από 4-5 ημέρες συντήρησης, στους 4 °C. Επίσης, οι Oral et al. (2009) αναφέρουν ότι ο μικροβιολογικός χρόνος συντήρησης συσκευασμένου νωπού προϊόντος κοτόπουλου (μπουτάκια κοτόπουλου/drumstics) στους 4 °C, ήταν μόλις 3 ημέρες. Σε άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε προϊόντα από κρέας πουλερικών, ο μικροβιολογικός χρόνος συντήρησης φιλέτων ή λουκάνικων από κοτόπουλο υπολογίστηκε σε 5-6 ημέρες στους 4 °C (Chouliara et al., 2007, Sallam & Samejima, 2004, Lee et al., 1997). Επίσης, οι Soldatou et al. (2009) αναφέρουν ότι ο μικροβιολογικός χρόνος συντήρησης προϊόντος από αρνίσιο κρέας (σουβλάκι) υπολογίστηκε σε 5 ημέρες (4 °C).

Όσον αφορά τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης τεμαχισμένης πιπεριάς, υπολογίστηκε σε λιγότερο από 4 ημέρες κατά την συντήρηση στους 7 °C (Jacxsens et al., 2003, Bagamboula et al., 2002), ενώ σε χαμηλότερη θερμοκρασία (4 °C) ήταν περίπου 7 ημέρες (Uyttendaele et al., 2004). Τέλος, οι Kang & Lee (1997) αναφέρουν ότι ο χρόνος

συντήρησης πιπεριάς που είχε υποστεί ελάχιστη επεξεργασία (minimally processed) υπολογίστηκε σε 4 ημέρες, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (5 °C).

Στην παρούσα μελέτη, τα δείγματα στα οποία έγινε προσθήκη θυμαρέλαιου 0.2% v/w (A-Θ) ξεπέρασαν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης την 6 ημέρα συντήρησης υπό ψύξη, παρατείνοντας τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος κατά 2 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα (**Γράφημα 3.1.1(α)**). Η μείωση της O.M.X. σε σχέση με τον μάρτυρα κυμάνθηκε στα 1.5-1.8 log CFU/g μεταξύ 6^{ης} και 8^{ης} ημέρας συντήρησης. Η παρατηρούμενη παράταση του χρόνου συντήρησης οφείλεται στην αντιμικροβιακές ιδιότητες των φαινολικών συστατικών του θυμαρέλαιου (όπως θυμόλη, p- κυμένιο, καρβακρόλη, γ-τερπινένιο κ.α.). Τα συστατικά του θυμαρέλαιου ασκούν την αντιμικροβιακή τους δράση αρχικά επιδρώντας στην φωσφολιπιδική στοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών, προκαλώντας έτσι αύξηση της διαπερατότητάς τους και κατά συνέπεια την απώλεια των ενδοκυτταρικών θρεπτικών συστατικών. Στην συνέχεια αδρανοποιούν μεγάλο αριθμό ενζυμικών συστημάτων και τελικά απενεργοποιούν ή ακόμη και καταστρέφουν το γενετικό υλικό των βακτηρίων (Lambert et al., 2001; Burt et al., 2004; Holley & Patel 2005). Σε παρόμοιες μελέτες, οι Chouliara & Kontominas (2006) αναφέρουν ότι η προσθήκη θυμαρέλαιου 0.5% v/w σε στήθος κοτόπουλου παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο ζωής του κατά 9 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα (4 °C). Επίσης, οι Zinoviadou et al., (2009) αναφέρουν ότι η προσθήκη ριγανέλαιου 0.5% και 1.5% σε μοσχαρίσιο κρέας παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησής του κατά 2 και 6 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα στους 5 °C ενώ σύμφωνα με τους Oral et al. (2009) η προσθήκη ταινιών εμποτισμένων με ριγανέλαιο 1.5% στη συσκευασία νωπού τεμαχισμένου προϊόντος κοτόπουλου (μπουτάκια) παρέτεινε τον χρόνο ζωής τους κατά 2 ημέρες στους 4 °C. Τέλος, όσον αφορά την επίδραση αιθέριων ελαίων στον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης λαχανικών, δεν υπάρχουν πολλές διαθέσιμες έρευνες στην βιβλιογραφία. Ωστόσο, οι Uyttendaele et al. (2004) αναφέρουν ότι η κατεργασία τεμαχισμένης πιπεριάς με διάλυμα θυμαρέλαιου 0.5% παρέτεινε των μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης της κατά 3 ημέρες στους 7 °C και μείωσε την O.M.X κατά 3.0 log CFU/g.

Τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε αερόβια συσκευασία με την προσθήκη χιτοζάνης (A-X) έφτασαν σε τιμή O.M.X. 7.1 log CFU/g και 8.05 log CFU/g μετά από 6 ημέρες και 8 ημέρες συντήρησης, αντίστοιχα, στους 4 °C (1.6-1.0 log CFU/g χαμηλότερη O.M.X. σε σχέση με τον μάρτυρα). Επομένως, παρατηρήθηκε παράταση του μικροβιολογικού χρόνου

συντήρησης κατά 2 ημέρες, σε σχέση με τον μάρτυρα, όπως προαναφέρθηκε και για την περίπτωση των δειγμάτων Α-Θ. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η χρήση χιτοζάνης είχε το ίδιο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα με την χρήση του θυμαρέλαιου, εφόσον τα δείγματα επέδειξαν παρόμοιους πληθυσμούς Ο.Μ.Χ την 6^η και 8^η ημέρα συντήρησης ($p > 0.05$).

Η επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης στην περίπτωση των δειγμάτων Α-Χ μπορεί να αποδοθεί στην αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης ενάντια στους μικροοργανισμούς αλλοίωσης. Για τον τρόπο της αντιμικροβιακής δράσης της χιτοζάνης έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί, οι οποίοι συνοψίζονται ως εξής: αλληλεπίδραση των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της χιτοζάνης με αρνητικά φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την απώλεια ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών και άλλων συστατικών, εκλεκτική δέσμευση ιχνοστοιχείων (δημιουργία χηλικών συμπλόκων) με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και παραγωγής τοξινών από αυτούς, την αδρανοποίηση ενζυμικών συστημάτων που δρουν ως αμυντικοί μηχανισμοί στα μικροβιακά κύτταρα καθώς και την αναστολή της σύνθεσης κυτταρικού RNA από τους μικροοργανισμούς (Shahidi et al., 1999).

Τα αποτελέσματα της μελέτης είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Darmadji & Izumimoto (1994) οι οποίοι αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης υπό μορφή σκόνης (1% w/w) σε μπιφτέκια από μοσχαρίσιο κιμά (minced beef patties), μείωσε την Ο.Μ.Χ. κατά 1-2 log CFU/g κατά την συντήρηση στους 4 °C. Επίσης, σύμφωνα με τους Georgantelis et al. (2007) η προσθήκη στερεής χιτοζάνης σε λουκάνικα από χοιρινό κρέας (1% w/w), μείωσε την Ο.Μ.Χ. κατά 1.0 και 2.0 log CFU/g τις πρώτες 5 και 10 ημέρες συντήρησης στους 4 °C, αντιστοίχως. Επίσης, οι Soutos et al. (2008) αναφέρουν ότι η προσθήκη στερεής χιτοζάνης σε λουκάνικα από χοιρινό κρέας (1% w/w) μείωσε την Ο.Μ.Χ. κατά 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα τις πρώτες 7 ημέρες συντήρησης στους 4 °C. Σύμφωνα με τους Sagoo et al. (2002), η εμφάνιση λουκάνικων σε διάλυμα χιτοζάνης 1.0% οδήγησε σε αξιοσημείωτη αύξηση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησής τους κατά 7 ημέρες στους 7 °C. Τέλος, οι Ojagh et al. (2010) αναφέρουν ότι η εμφάνιση φιλέτων πέστροφας σε διάλυμα χιτοζάνης 2.0% οδήγησε σε παράταση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησής της (περισσότερο από 6 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα) κατά την συντήρηση στους 4 °C. Όσον αφορά την επίδραση της χιτοζάνης στον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης λαχανικών, οι Inatsu et al. (2005) αναφέρουν ότι η

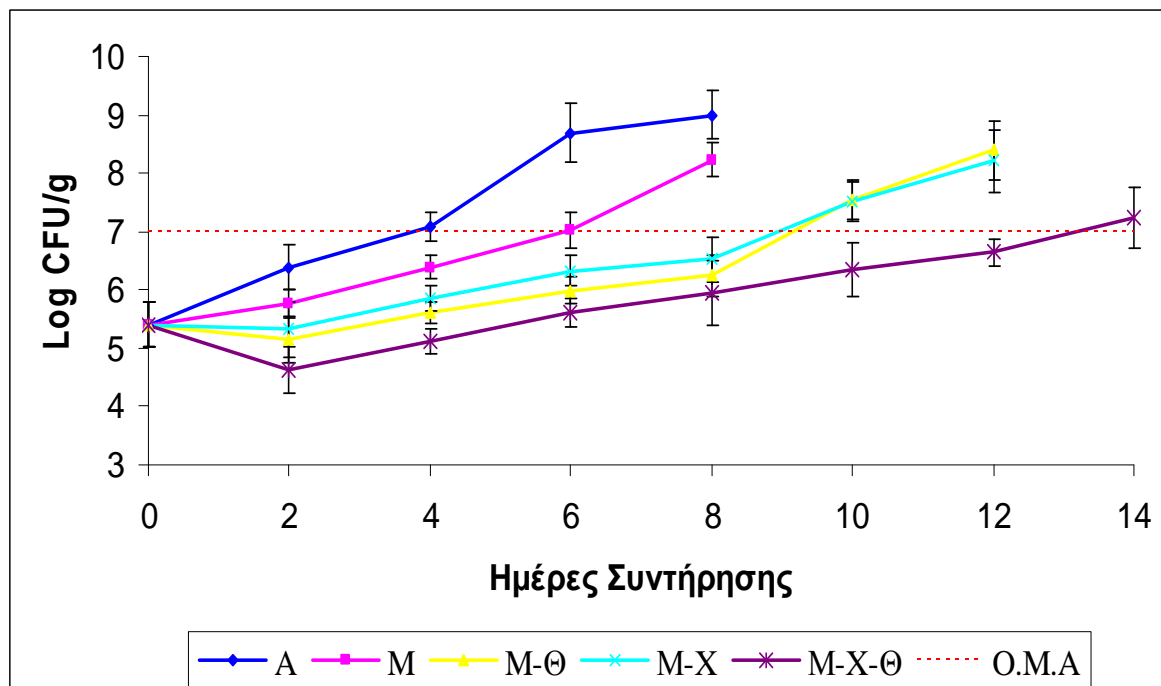
προσθήκη χιτοζάνης 0.1% σε κινέζικο λάχανο που είχε υποστεί ελαφρά ζύμωση (lightly fermented Chinese cabbage) μείωσε την O.M.X. κατά 1.0 log CFU/g, σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 10 °C για 4 ημέρες, ενώ σύμφωνα με τους Durango et al. (2006) η εμβάπτιση τεμαχισμένων καρότων σε διάλυμα χιτοζάνης/άμυλου/γλυκερόλης μείωσε την O.M.X. κατά 1.3 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 10 °C για 15 ημέρες.

Τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε αερόβια συσκευασία με τον συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (A-X-Θ) ξεπέρασαν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης των 7 log CFU/g την 7^η ημέρα συντήρησης, δηλαδή 1 και 3 ημέρες αργότερα από τα δείγματα A-Θ, A-X και τον μάρτυρα A, αντίστοιχα. Η επιμήκυνση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησης οφείλεται στην συνδυαστική χρήση των αντιμικροβιακών παραγόντων του θυμαρέλαιου και της χιτοζάνης, οι οποίοι έχει διαπιστωθεί ότι έχουν την ικανότητα να επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών, προκαλώντας έτσι αύξηση της διαπερατότητάς τους και κατά συνέπεια την απώλεια των ενδοκυτταρικών θρεπτικών συστατικών, όπως αναφέρεται και στις προηγούμενες παραγράφους. Οι Georgantelis et al. (2007) διαπίστωσαν επίσης ότι δείγματα λουκάνικου από χοιρινό κρέας που περιείχαν δενδρολίβανο σε συνδυασμό με χιτοζάνη παρουσίασαν χαμηλότερους μικροβιακούς πληθυσμούς από εκείνα που περιείχαν μόνο χιτοζάνη, κατά την συντήρηση στους 4 °C. Επίσης, οι Ojagh et al. (2010) αναφέρουν ότι η εμβάπτιση φιλέτων πέστροφας σε διάλυμα χιτοζάνης (2.0%)/αιθέριου ελαίου κανέλας (1.5% v/v) παρέτεινε τον χρόνο συντήρησής τους κατά τουλάχιστον 6 ημέρες, κατά την συντήρηση στους 4 °C, ενώ σύμφωνα με τους Zivanovic et al. (2005) η προσθήκη ριγανέλαιου σε διάλυμα χιτοζάνης βελτίωσε την αντιμικροβιακή δράση του διαλύματος κατά την συντήρηση μορταδέλας. Οι Inatsu et al. (2005) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης 0.1% σε κινέζικο λάχανο μείωσε την O.M.X. κατά 1.0 log CFU/g μετά από 4 ημέρες συντήρησης στους 10 °C, ενώ η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και AIT (Allylisoithiocyanate) μείωσε την O.M.X. κατά 1.0 log CFU/g επιπλέον.

Στην παρούσα μελέτη, πιστεύεται ότι η χρήση είτε των μονών εμποδίων (θυμαρέλαιου ή χιτοζάνης), είτε του συνδυασμού τους, θα οδηγούσε σε καλύτερα αποτελέσματα (μεγαλύτερο μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης), αν η αρχική μικροχλωρίδα του προϊόντος ήταν χαμηλότερη από 5.4 log CFU/g, όπως προτάθηκε και από τους Lopez-Caballero et al. (2005).

β) Συσκευασία Τροποποιημένης Ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.1.1(β)** απεικονίζεται η μεταβολή της Ο.Μ.Χ. στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά που συντηρήθηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα (δείγματα Μ), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w = 0.03% w/w, δείγματα Μ-Χ), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, δείγματα Μ-Θ) ή με τον συνδυασμό χιτοζάνης (1.5% v/w = 0.03% w/w)/θυμαρέλαιου (0.2% v/w) (δείγματα Μ-Χ-Θ).



Γράφημα 3.1.1(β). Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP 30% CO₂/70% N₂) και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (Ο.Μ.Χ.) δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). Α= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), Μ = δείγμα σε συσκευασία MAP, Μ-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, Μ-Χ= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), Μ-Χ-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου. Ο.Μ.Α= Όριο Μικροβιολογικής αλλοίωσης (7 log CFU/g).

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.1(β)**, τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (30% CO₂/70% N₂), χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα (Μ), ξεπέρασαν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης των 7 log CFU/g την 6^η ημέρα συντήρησης υπό ψύξη, παρατείνοντας τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης κατά 2 ημέρες, σε σχέση

με τον μάρτυρα (Α). Η συσκευασία τροποποιημένης δεν κατάφερε να παρατείνει τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος περισσότερο από δυο ημέρες, πιθανόν λόγω της υψηλής αρχικής αυτόχθονης μικροχλωρίδας του προϊόντος (5.4 log CFU/g). Παρομοίως, οι Sarantopoulos et al. (1998) αναφέρουν ότι η υψηλή αρχική μικροχλωρίδα τεμαχισμένου κρέατος από μπούτι κοτόπουλο (5.8 log CFU/g) περιόρισε την επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας με σύσταση 80% CO₂/20 % N₂ στην παράταση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησης του προϊόντος (από 5 σε 10 ημέρες). Επίσης, οι Soldatou et al. (2009) αναφέρουν ότι δείγματα από σουβλάκι που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (30% CO₂/70% N₂), ξεπέρασαν το μικροβιολογικό όριο της αλλοίωσης μόλις 2 ημέρες αργότερα σε σχέση με τον μάρτυρα. Σύμφωνα με τους Patsias et al. (2008) και Chouliara et al. (2006, 2007) η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας με το ίδιο μίγμα αερίων (30% CO₂/70% N₂) για την συντήρηση φιλέτου κοτόπουλου οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα από αυτά της παρούσης μελέτης, εφόσον παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησής του κατά 4 και 6 ημέρες αντίστοιχα στους 4 °C. Ωστόσο, η αρχική O.M.X. του προϊόντος στις παραπάνω μελέτες ήταν κατά 1.0 log CFU/g χαμηλότερη από την αντίστοιχη της παρούσης μελέτης.

Τέλος, οι Gonzalez-Aguilar (2004) αναφέρουν ότι κατά την συντήρηση πράσινης πιπεριάς σε συσκευασία κενού ο πληθυσμός της O.M.X. αυξήθηκε σε 7 log CFU/g, μετά από 10 ημέρες συντήρησης (5 °C), ενώ οι Kang & Lee (1997) και Jacxsens et al. (2002) αναφέρουν μικρότερο μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης για τεμαχισμένες πιπεριές που έχουν υποστεί ελάχιστη επεξεργασία και έχουν συντηρηθεί σε EMA στην ίδια θερμοκρασία (4 ημέρες).

Τα δείγματα Μ-Θ στα οποία έγινε προσθήκη θυμαρέλαιου 0.2% v/w έφτασαν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης την 9^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C. Η παράταση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησης, παρουσία θυμαρέλαιου, υπολογίστηκε σε 5 και 3 ημέρες, σε σχέση με τον μάρτυρα Α και τα δείγματα Μ, αντίστοιχα. Επίσης, ο συνδυασμός τροποποιημένης ατμόσφαιρας και θυμαρέλαιου οδήγησε σε μεγαλύτερο μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος από όταν συσκευάστηκε σε αερόβια συσκευασία με θυμαρέλαιο (Α-Θ), υποδεικνύοντας ότι η τροποποιημένη ατμόσφαιρα έδρασε συνεργιστικά με το θυμαρέλαιο στην αναχαίτιση της ανάπτυξης των βακτηρίων, κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και από τους Mastromatteo et al. (2009), κατά την συντήρηση προϊόντος από κρέας διαφόρων πουλερικών (ostrich/chicken/turkey patties) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε συνδυασμό με προσθήκη θυμόλης/καρβακρόλης. Η

παρατηρούμενη συνεργιστική δράση οφείλεται πιθανόν στο ότι τα βακτηριακά κύτταρα σε μικροαερόφιλες συνθήκες πραγματοποιούν το μεταβολισμό τους αναερόβια και έτσι καθίστανται πιο επιρρεπή στην αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων (Paster et al., 1990). Η εμφάνιση συνεργιστικής αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ αιθέριων ελαίων και τροποποιημένης ατμόσφαιρας παρατηρήθηκε επίσης από τους Skandamis & Nychas (2002), σύμφωνα με τους οποίους η συνδυαστική χρήση MAP (40% CO₂/30% N₂/30% O₂) και ριγανέλαιου κατέστειλε σημαντικά την μικροβιακή ανάπτυξη σε μοσχαρίσιο κιμά, ενώ σε αερόβιες συνθήκες δεν παρατηρήθηκε σημαντική αναχίτιση των μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, οι Chouliara et al. (2007) αναφέρουν ότι η προσθήκη ριγανέλαιου 0.1% v/w σε φιλέτο από στήθος κοτόπουλου δεν είχε σημαντική επίδραση στον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησής τους σε αερόβια συσκευασία, ενώ όταν συνδυάστηκε με MAP (30% CO₂/70% N₂) η παράταση του χρόνου συντήρησης έφτασε τις 9 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα και τις 3 ημέρες σε σχέση με δείγματα MAP. Τέλος, σύμφωνα με τους Zhang et al. (2009) ο μικροβιολογικός χρόνος συντήρησης σε χοιρινά παϊδάκια που συντηρήθηκαν σε MAP 80% O₂/20% CO₂ ήταν 10 ημέρες (4 °C) ενώ η προσθήκη δενδρολίβανου μαζί με γλυκόριζα διατήρησε την O.M.X. σε τιμές χαμηλότερες από το όριο αλλοίωσης, για παραπάνω από 28 ημέρες. Επιπλέον, σύμφωνα με την μελέτη των Bevilacqua et al. (2007) η συνδυαστική χρήση θυμόλης και τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂/65% N₂/5% O₂) για την συντήρηση σαλάτας τύπου Caprese (τυρί μοτσαρέλα και τομάτες) παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησής της κατά 8 ημέρες, σε σχέση με την αερόβια συσκευασία.

Τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης (M-X) παρέτειναν τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος κατά 5 και 3 ημέρες, σε σχέση με τον μάρτυρα και τα δείγματα M, αντίστοιχα (**Γράφημα 3.1.1(β)**). Ωστόσο, όπως φαίνεται από το **Γράφημα 3.1.1(β)**, η πορεία ανάπτυξης της O.M.X. στα δείγματα M-X ήταν ανάλογη με αυτή των δειγμάτων M-Θ, χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, όπως άλλωστε διαπιστώνεται και από το γεγονός ότι κατέληξαν στον ίδιο μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης στους 4 °C ($p>0.05$). Επίσης, τα δείγματα M-X παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές O.M.X. σε σχέση με τα δείγματα M ($p<0.05$), και η διαφορά έφτασε τους 1.7 log CFU/g, την 8^η ημέρα συντήρησης. Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Yingyuad et al. (2006) οι οποίοι αναφέρουν ότι η χρήση συσκευασίας κενού για την συντήρηση ψητού χοιρινού που είχε εμβλαπτιστεί σε διάλυμα

χιτοζάνης 2%, μείωσε την O.M.X. κατά 2.2 log CFU/g σε σχέση με τα δείγματα σε συσκευασία κενού (χωρίς χιτοζάνη) και κατά 5.2 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα (αερόβια συσκευασία χωρίς χιτοζάνη), την 14 ημέρα συντήρησης στους 2-3 °C. Επίσης, οι Duan et al. (2010) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας και χιτοζάνης για την συσκευασία φιλέτων ψαριού μείωσε την O.M.X. κατά 2.2-4.2 log CFU/g κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 2-3 °C.

Όσον αφορά στη συνδυαστική χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας και χιτοζάνης στην συντήρηση φρούτων και λαχανικών, οι Devlieghere et al. (2004) και Campaniello et al. (2008) αναφέρουν ότι η προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης σε φράουλες συσκευασμένες σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα μείωσε σημαντικά την O.M.X. και τους πληθυσμούς των ψυχρότροφων βακτηρίων, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (1-2 και 3 log CFU/g, αντίστοιχα), ενώ η εμφύσηση λάχανου σε διάλυμα χιτοζάνης μείωσε κατά 2.0 log CFU/g τον πληθυσμό της O.M.X. κατά τις πρώτες 2-3 ημέρες συντήρησης στους 7 °C, αλλά μετά από 4 ημέρες η αντιμικροβιακή επίδραση δεν ήταν πλέον εμφανής.

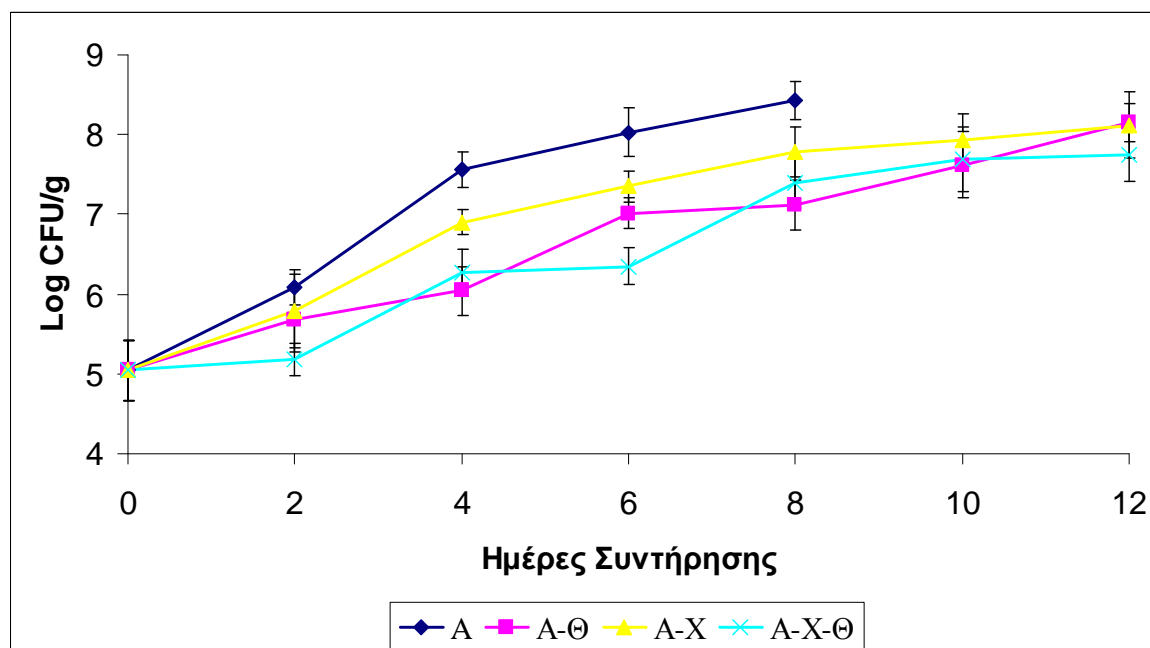
Τα δείγματα M-X-Θ στα οποία έγινε προσθήκη χιτοζάνης σε συνδυασμό με θυμαρέλαιο παρουσίασαν τις χαμηλότερες τιμές O.M.X. σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ($p < 0.05$) και ξεπέρασαν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης των 7 log CFU/g την 13^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C. Είναι αξιοσημείωτο ότι την 10-12^η ημέρα συντήρησης, η O.M.X. των δειγμάτων M-X-Θ ήταν κατά 1.2-1.6 log CFU/g χαμηλότερη σε σχέση με τα δείγματα M-X και M-Θ ($p < 0.05$). Συνολικά, η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε συνδυασμό με χιτοζάνη και θυμαρέλαιο παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης των δειγμάτων κατά 9 και 7 ημέρες σε σχέση με τα δείγματα A και M αντίστοιχα, και κατά 3 ημέρες σε σχέση με τα δείγματα M-X και M-Θ. Αυτό σημαίνει ότι η τροποποιημένη ατμόσφαιρα έδρασε (πιθανόν) συνεργιστικά (ή αθροιστικά) με το θυμαρέλαιο και την χιτοζάνη την αναχαίτιση των βακτηρίων που προκαλούν αλλοίωση στο προϊόν, κάτι το οποίο είναι συμβατό με την θεωρία της τεχνολογίας των εμποδίων για την συντήρηση τροφίμων, η οποία διατυπώθηκε από τον Leistner (2000). Σε συμφωνία με την παρούσα έρευνα, οι Duan et al. (2010) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση διαλύματος χιτοζάνης (3% w/v), krill-oil (20% w/w χιτοζάνης), έλαιο κανέλλας (0.1 μL/mL) και MAP/VP για την συσκευασία φρέσκου φιλέτου ψαριού (lingcod), μείωσε τον πληθυσμό της O.M.X. κατά 2.2-4.25 log CFU/g, κατά την συντήρηση στους 2 °C για 21 ημέρες.

3.1.2. Μεταβολή των Ψευδομονάδων

Οι Ψευδομονάδες θεωρούνται ένας από τους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης σε προϊόντα κρέατος τα οποία συντηρούνται σε αερόβιες συνθήκες (Nychas and Drosinos, 1999) και σε φρέσκα λαχανικά που έχουν υποστεί μικρή επεξεργασία (τεμάχισμα, και έκπλυση) και διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ragaert et al. 2007; Francis et al., 1999).

α) Αερόβια Συσκευασία

Στο **Γράφημα 3.1.2(α)** απεικονίζεται η μεταβολή των ψευδομονάδων στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά που συντηρήθηκαν σε αερόβια συσκευασία απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου. Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.2(α)**, ο αρχικός πληθυσμός των ψευδομονάδων στο φρέσκο προϊόν ήταν $5.05 \log \text{CFU/g}$ και κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης του προϊόντος.



Γράφημα 3.1.2(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των ψευδομονάδων στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη ($4 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X = δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w ($=0.03\% \text{ w/w}$), A-X-Θ = δείγμα με τον συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.2(α)**, την 6^η ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των Ψευδομονάδων έφτασε τους $8.0 \log \text{CFU/g}$, 7.0 , 7.4 και $6.35 \log \text{CFU/g}$ στα δείγματα A,

A-Θ, A-X και A-X-Θ, αντίστοιχα. Τα δείγματα A παρουσίασαν υψηλούς τελικούς πληθυσμούς Ψευδομονάδων, εφόσον έφτασαν τους 8.0 log CFU/g την 6^η ημέρα συντήρησης. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, οι Patsias et al. (2008), Kim & Song (2004) και Chouliara et al. (2007) αναφέρουν ότι οι Ψευδομονάδες στο τέλος της περιόδου συντήρησης φιλέτου από κοτόπουλο, κατέληξαν σε πληθυσμούς ίσους με 8.0 (6^η ημέρα συντήρησης), 8.0 (10^η ημέρα) και 7.2 log CFU/g (9^η ημέρα), αντιστοίχως (4 °C).

Τα δείγματα A-X, είχαν κατά 0.6 CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς ψευδομονάδων, την 6^η και 8^η ημέρα συντήρησης, σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$). Σε συμφωνία με την παρούσα έρευνα, οι Soultos et al. (2008) αναφέρουν ότι η προσθήκη στερεής χιτοζάνης 0.5 και 1% (w/w) σε χοιρινά λουκάνικα, μείωσε τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 0.5 και 1.0 log CFU/g, αντίστοιχα, κατά την συντήρηση στους 4 °C. Η προσθήκη θυμαρέλαιου στο προϊόν (δείγματα A-Θ) οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα εφόσον η μείωση του πληθυσμού των ψευδομονάδων σε σχέση με τα δείγματα A ήταν 1 και 1.3 log CFU/g την 6^η και την 8^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα ($p < 0.05$). Οι Chouliara & Kontominas (2006) αναφέρουν μεγαλύτερη επίδραση του θυμαρέλαιου στον πληθυσμό των ψευδομονάδων φρέσκου κρέατος κοτόπουλου (μείωση κατά 2.8 log CFU/g την 9^η ημέρα συντήρησης) αλλά η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ήταν μεγαλύτερη από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα (0.5%). Επίσης, σύμφωνα με τους Mastromatteo et al. (2009) η προσθήκη θυμόλης και καρβακρόλης (200/50 ppm) σε μπιφτέκια (patties) από μίγμα κρέατος πουλερικών (στρουθοκάμηλο, γαλοπούλα, κοτόπουλο) μείωσε τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 0.8-1.2 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την αερόβια συντήρηση στους 3 °C, για 7 ημέρες.

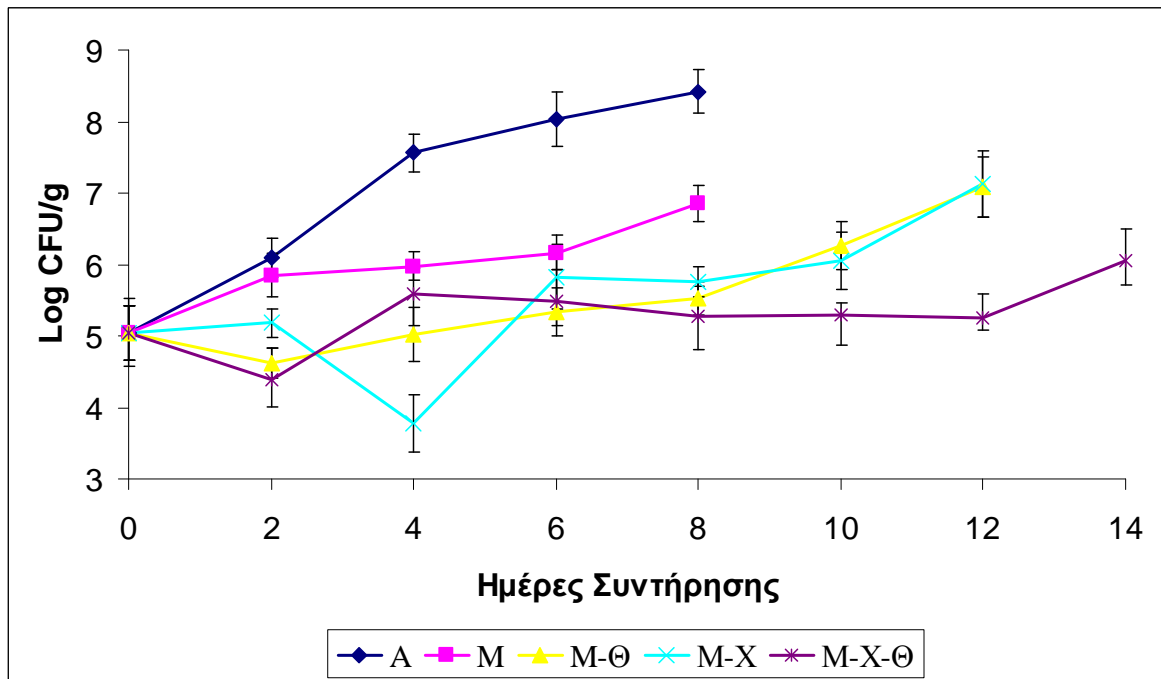
Τα δείγματα A-X-Θ είχαν κατά 1.6 CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς ψευδομονάδων σε σχέση με τον μάρτυρα την 6^η ημέρα συντήρησης. Την ίδια ημέρα, η μεταχείριση A-X-Θ είχε κατά 0.7-1.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς ψευδομονάδων σε σχέση με τα A-X και A-Θ, αλλά στην συνέχεια (8^η -12^η ημέρα) επέδειξε παρόμοιους πληθυσμούς με τα δείγματα A-Θ ($p > 0.05$), υποδεικνύοντας ότι η (πιθανή) συνεργιστική δράση μεταξύ χιτοζάνης-θυμαρέλαιου στην μείωση των ψευδομονάδων, περιορίστηκε σημαντικά μετά την 6^η ημέρα συντήρησης. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι οι ψευδομονάδες είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην επίδραση φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων όπως είναι το θυμαρέλαιο ή η χιτοζάνη. Η ανθεκτικότητά αυτών οφείλεται στην ύπαρξη εξωτερικής μεμβράνης η οποία περιβάλλει

το κυτταρικό τους τοίχωμα, περιορίζοντας την διάχυση των αντιμικροβιακών παραγόντων διαμέσω της λιποπολυσακχαρικής της στοιβάδας (Burt, 2004). Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι ψευδομονάδες εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στην αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων (Tsigarida et al., 2000; Mexis et al., 2009).

Σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία, δεν έχει μελετηθεί έως την δεδομένη στιγμή η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και θυμαρέλαιου για την συντήρηση προϊόντων πουλερικών. Όσον αφορά στην συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων για την αναστολή των ψευδομονάδων σε άλλα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, οι Georgantelis et al. (2007) και Soultos et al. (2008) αναφέρουν η προσθήκη συνδυασμού/δενδρολίβανου ή χιτοζάνης/νιτρικών αλάτων σε χοιρινά λουκάνικα μείωσε τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 1.3 log CFU/g μετά από 10 και 7 ημέρες συντήρησης στους 4 °C.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο Γράφημα **Γράφημα 3.1.2(β)** απεικονίζεται η μεταβολή των ψευδομονάδων στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με ή χωρίς θυμαρέλαιο και χιτοζάνη. Σύμφωνα με το γράφημα, την 8^η ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των Ψευδομονάδων έφτασε τους 8.4, 6.9, 5.5, 5.8 και 5.3 log CFU/g στα δείγματα A, M, M-Θ, M-X και M-X-Θ, αντίστοιχα.



Γράφημα 3.1.2(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP 30% CO₂/70% N₂) και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των ψευδομονάδων στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου. Ο.Μ.Α= Όριο Μικροβιολογικής αλλοίωσης (7 log CFU/g).

Οι ψευδομονάδες στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα (M) κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα (A), κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Συγκεκριμένα, την 6^η-8^η ημέρα συντήρησης, οι πληθυσμοί τους στην μεταχείριση M ήταν κατά 1.5-1.8 log CFU/g χαμηλότεροι από τους αντίστοιχους του A ($p < 0.05$). Στη βιβλιογραφία μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί πολυάριθμες μελέτες, στις οποίες η χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων CO₂ είναι αποτελεσματική έναντι της ανάπτυξης των ψευδομονάδων σε φρέσκα προϊόντα κοτόπουλου και σε λαχανικά (Elliot et al., 1985; Sawaya et al., 1995; Kakiomenou et al. 1996; Smolader et al., 2004; Chouliara et al., 2007; Patsias et al., 2008). Σύμφωνα με ορισμένες από αυτές, η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας 30% CO₂/70% N₂ για την συντήρηση φρέσκου φιλέτου κοτόπουλου μείωσε

τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 1.0 log CFU/g την 9^η ημέρα συντήρησης (Chouliara et al., 2007) ενώ κατά την συντήρηση ολόκληρου κοτόπουλου η μείωση ξεπέρασε τους 2.0 log CFU/g (Sawaya et al. 1995).

Τα δείγματα M-Θ επέδειξαν κατά 2.9 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς ψευδομονάδων σε σχέση με τον μάρτυρα, την 8^η ημέρα συντήρησης ($p < 0.05$). Συγκριτικά με τα δείγματα M, η μείωση των ψευδομονάδων ήταν 1.4 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης, υποδεικνύοντας βελτίωση της αντιμικροβιακής δράσης της MAP σε συνδυασμό με το θυμαρέλαιο. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η έρευνα των Tsigarida et al. (2000) σύμφωνα με τους οποίους η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή κενού σε συνδυασμό με ριγανέλαιο 0.8% ανέστειλε σημαντικά τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά την συντήρηση μοσχαρίσιου κρέατος. Επίσης, οι Chouliara et al. (2007) αναφέρουν ότι η συσκευασία MAP 30% CO₂/70% N₂ σε συνδυασμό με θυμαρέλαιο 0.5% μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 3.4 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα (9^η ημέρα συντήρησης) και κατά 2.3 log CFU/g σε σχέση με τα δείγματα MAP, ενώ οι Zhang et al. (2009) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των ψευδομονάδων σε χοιρινά παϊδάκια που συσκευάστηκαν σε MAP με συνδυαστική χρήση δενδρολίβανου και γλυκόριζας, μειώθηκαν κατά 1.0-1.5 σε σχέση με τα δείγματα MAP, μετά από 14 ημέρες συντήρησης.

Η μεταβολή των ψευδομονάδων στα δείγματα M-X και M-Θ ακολούθησε την ίδια πορεία κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, υποδεικνύοντας παρόμοια αντιμικροβιακή επίδραση της χιτοζάνης και του θυμαρέλαιου ενάντια στους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς ($p > 0.05$), όταν συνδυάστηκαν με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Συγκεκριμένα, τα δείγματα M-X μείωσαν σημαντικά τον πληθυσμό των ψευδομονάδων σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα (μείωση κατά 2.6 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης) και κατά 1.0 log CFU/g σε σύγκριση με τα δείγματα M (8^η ημέρα συντήρησης). Η συνδυαστική χρήση MAP και χιτοζάνης για την μείωση των ψευδομονάδων σε προϊόντα κοτόπουλου δεν έχει μελετηθεί έως τη δεδομένη στιγμή. Ωστόσο, οι Del Nobile et al. (2009) αναφέρουν ότι ο συνδυασμός 0.012% χιτοζάνης (σε μορφή διαλύματος)/αλγινικού στρώματος (alginate coating)/ MAP για την συσκευασία τυριού, μείωσε τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 2.5 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 7η ημέρα συντήρησης στους 4 °C.

Τέλος, τα δείγματα M-X-Θ παρουσίασαν τους χαμηλότερους τελικούς πληθυσμούς ψευδομονάδων σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που συσκευάστηκαν σε MAP, ιδιαίτερα

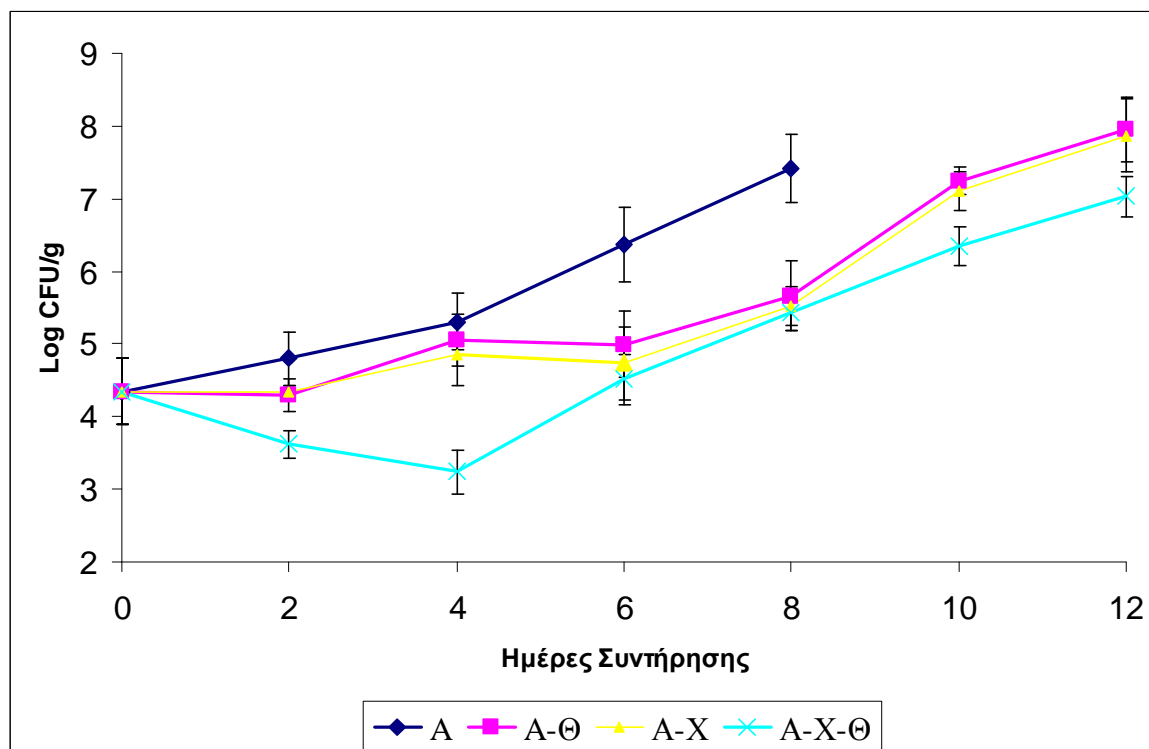
από την 8η ημέρα συντήρησης και μετά ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, οι τελικοί πληθυσμοί των ψευδομονάδων στα δείγματα M-X-Θ δεν ξεπέρασαν τους 6.0 log CFU/g κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης (14 ημέρες), ενώ παρατηρήθηκε βακτηριοστατική επίδραση ενάντια στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων βακτηρίων, έως την 12^η ημέρα συντήρησης ($p > 0.05$). Επιπρόσθετα, οι πληθυσμοί των ψευδομονάδων στα δείγματα M-X-Θ, ήταν κατά 1.0 και 1.8 log CFU/g χαμηλότεροι σε σχέση με τους αντίστοιχους των δειγμάτων M-X και M-Θ ($p < 0.05$) την 10 και 12^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα.

Οι Del Nobile et al. (2009) αναφέρουν ότι η χιτοζάνη (σε μορφή διαλύματος) 0.012% έδρασε συνεργιστικά με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα και την προσθήκη αλγινικού στρώματος (alginate coating) και λυσοζύμης (0.25 mg/mL) για την μείωση των ψευδομονάδων σε τυρί που συντηρήθηκε στους 4 °C (3.0 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης) ενώ σύμφωνα με τους Georgantelis et al. (2007) η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και δενδρολίβανου μείωσε τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 1.5 log CFU/g, σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση χοιρινών λουκάνικων για 20 ημέρες.

3.1.3. Μεταβολή των Οξυγαλακτικών βακτηρίων

α) Αερόβια Συσκευασία

Η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που συντηρήθηκαν αερόβια με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου ή/και χιτοζάνης, στους 4 °C, παρουσιάζεται στο **Γράφημα 3.1.3(α)**.



Γράφημα 3.1.3(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X= δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ= δείγμα με τον συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.1.3(α)**, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας του προϊόντος, κάτι το οποίο δικαιολογείται από το γεγονός ότι θετικοί κατά Gram μικροοργανισμοί, όπως τα συγκεκριμένα βακτήρια, αποτελούν συχνά σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας των νωπών προϊόντων κρέατος, ιδιαίτερα όταν έχουν υποστεί επεξεργασία όπως το τεμάχισμα ή μετατροπή τους σε κιμά (Cervený et al., 2009). Επιπρόσθετα, η παρουσία της πιπεριάς στο προϊόν αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης υψηλών πληθυσμών γαλακτικών βακτηρίων, εφόσον είναι πλούσιες σε σάκχαρα, με αποτέλεσμα η μικροχλωρίδα αλλοίωσης να κυριαρχείται από οξυγαλακτικά βακτήρια με γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης (Bagamboula et al., 2002; Gutierrez et al. 2008). Σύμφωνα με τους Jacxsens et al. (2002), ο αρχικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φρέσκες τεμαχισμένες πιπεριές ήταν 5.96 log CFU/g.

Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων του φρέσκου προϊόντος την 0η ημέρα συντήρησης ήταν 4.35 log CFU/g και έφτασε τους 6.4, 5.0, 4.7 και 4.5 log CFU/g την 6^η ημέρα συντήρησης στα δείγματα A, A-Θ, A-X και A-X-Θ, αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Patsias et al. (2008) και Chouliara et al. (2007) οι οποίοι αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκε αερόβια για 6 ημέρες έφτασε τους 6.0-6.4 log CFU/g. Επίσης, οι Jacxsens et al. (2002) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την συντήρηση τεμαχισμένης πιπεριάς στους 4 °C για 6 ημέρες, ξεπέρασε τους 8.0 log CFU/g.

Τα δείγματα A-Θ μείωσαν σημαντικά τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων εφόσον ήταν κατά 1.4 log CFU/g χαμηλότερος σε σχέση με τον μάρτυρα την 6^η-8^η ημέρα συντήρησης ($p < 0.05$). Τα δείγματα A-X παρουσίασαν ανάλογη αντιμικροβιακή δράση με τα A-Θ, εφόσον η μείωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμάνθηκε περίπου στα ίδια επίπεδα ($p > 0.05$) και ήταν συγκεκριμένα 1.7 σε σχέση με τον μάρτυρα (6^η-8^η ημέρα συντήρησης). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης και του θυμαρέλαιου ενάντια στην ανάπτυξη των συγκεκριμένων βακτηρίων ήταν εμφανής από την 4^η ημέρα συντήρησης και μετά. Ανάλογες έρευνες έχουν αποδείξει την επιτυχημένη χρήση χιτοζάνης ή θυμαρέλαιου για την μείωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε διάφορα προϊόντα ζωικής προέλευσης. Σε ορισμένες από αυτές, αναφέρεται ότι η προσθήκη χιτοζάνης (σε στερεή μορφή) 1% w/w σε χοιρινά λουκάνικα μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά 1.65 log CFU/g την 7^η ημέρα συντήρησης υπό ψύξη (Soultos et al., 2008) ενώ σύμφωνα με τους Mastromatteo et al. (2009) η προσθήκη θυμόλης (200 ppm) μαζί με καρβακρόλη (50 ppm) μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά 0.7-1.7 log CFU/g κατά την συντήρηση μπιφτεκιών από κρέας πουλερικών, για 7 ημέρες στους 3 °C.

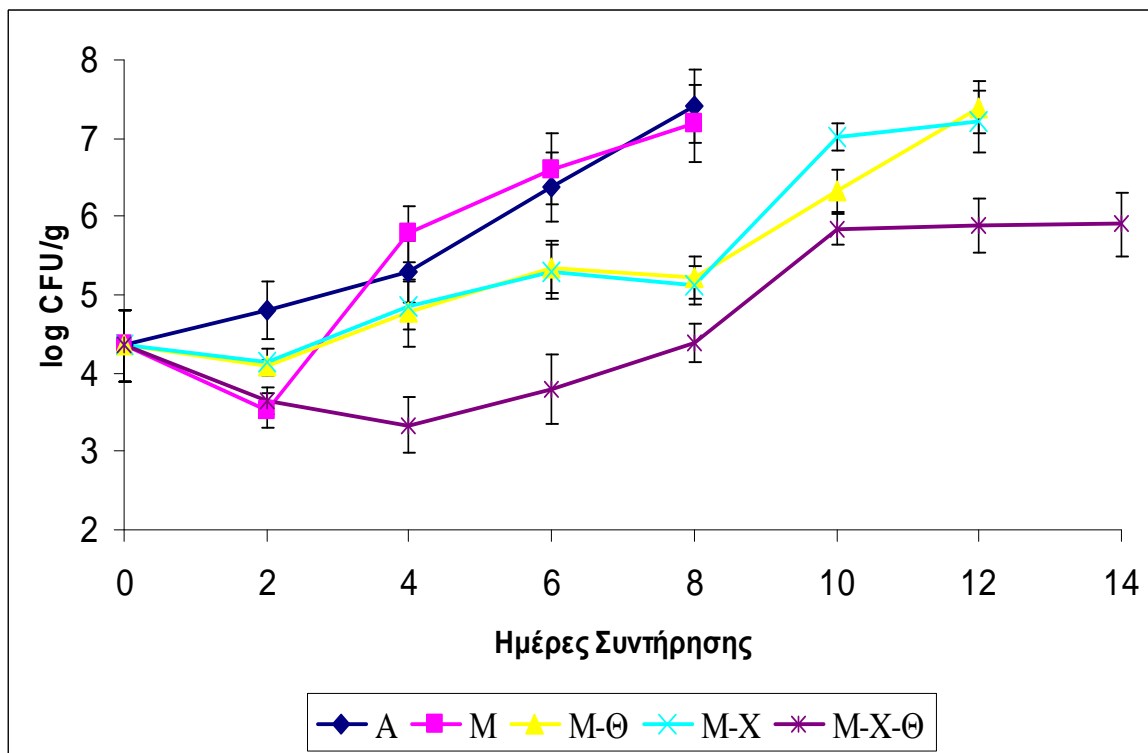
Η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης, στα δείγματα A-X-Θ, οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την μείωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο προϊόν, εφόσον η μείωση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο προϊόν έφτασε τους 2.0 log CFU/g την 4^η και 6^η ημέρα συντήρησης (σε σχέση με τον μάρτυρα A). Επίσης, τα ίδια δείγματα είχαν κατά 2.0 και 1.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα δείγματα A-X και A-Θ την 4^η και 10^η-12^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το θυμαρέλαιο και η χιτοζάνη πιθανόν να έδρασαν συνεργιστικά στην αναχαίτιση της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (ιδίως τις

πρώτες 4 ημέρες συντήρησης), κάτι το οποίο δεν ήταν τόσο εμφανές στην περίπτωση των ψευδομονάδων. Αξίζει να σημειωθεί ότι στα δείγματα A-X-Θ ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ξεπέρασε τους 7.0 log CFU/g, δύο ημέρες αργότερα σε σχέση με τα δείγματα A-X και A-Θ. (12^η ημέρα συντήρησης).

Σύμφωνα με τους Roller et al. (2002) κατά την συντήρηση λουκάνικων από χοιρινό κρέας για 25 ημέρες, παρατηρήθηκε μείωση του των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που συσκευάστηκαν με συνδυασμό γλουταμινικής χιτοζάνης 0.6% w/w (στερεή μορφή) και θειωδών αλάτων (170 ppm), η οποία ξεπέρασε τα 2.5 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ η αντίστοιχη μείωση σε σχέση με τα δείγματα που συσκευάστηκαν μόνο με γλουταμινική χιτοζάνη ήταν 1.0 log CFU/g. Επιπλέον, οι Georgantelis et al. (2007) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης 1% w/w και δενδρολίβανου σε λουκάνικα μείωσε τον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων κατά 2.5 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 10^η ημέρα συντήρησης. Τέλος, οι Inatsu et al. (2005) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης 0.1% w/v (διαλυτή μορφή) και AIT-hop (αντιμικροβιακή ουσία που περιέχει Allyl isothiocyanate και λυκίσκο) μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά περίπου 2.0 log CFU/g (σε σχέση με τον μάρτυρα) σε κινέζικο λάχανο που συντηρήθηκε στους 10 °C.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας των προϊόντων κοτόπουλου καθώς και των λαχανικών που συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Nychas and Drosinos, 1999; Kakiomenou et al., 1996). Στο **Γράφημα 3.1.3(β)** παρουσιάζεται η επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας και θυμαρέλαιου/χιτοζάνης κατά την συντήρηση του προϊόντος.



Γράφημα 3.1.3(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP 30% CO₂/70 % N₂) και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έφτασε τους 7.2, 5.2, 5.1 και 4.4 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης στα δείγματα M, M-Θ, M-X και M-X-Θ, αντίστοιχα. Τα γαλακτικά βακτήρια μαζί με τον μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta* (επόμενη παράγραφος 3.1.4), κυμάνθηκαν στους υψηλότερους πληθυσμούς από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς κατά την συντήρηση του προϊόντος σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, σε αντίθεση με την αερόβια συσκευασία όπου κυριάρχησαν οι ψευδομονάδες.

Όπως φαίνεται από το **Γράφημα 3.1.3(β)**, τα δείγματα M κατέληξαν σε υψηλούς τελικούς πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων (7.2 log CFU/g) την 8^η ημέρα συντήρησης. Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Patsias et al. (2008) και Chouliara et al. (2007) οι οποίοι αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων σε φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκε σε MAP

30% CO₂/70% N₂ για 9 ημέρες έφτασε τους 7.2-7.5 log CFU/g. Ακόμη, οι Patsias et al., (2006) αναφέρουν υψηλούς τελικούς πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων σε προμαγειρεμένο φιλέτο κοτόπουλου που συσκευάστηκε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (7.5-8.1 log CFU/g). Επιπλέον, οι Bagamboula et al. (2002) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τεμαχισμένες πιπεριές που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, έφτασε τους 8.1 log CFU/g την 7^η ημέρα συντήρησης στους 7 °C.

Η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά 1.3 log CFU/g, σε σχέση με τον μάρτυρα την 2^η ημέρα συντήρησης, αλλά επακολούθησε γρήγορη ανάπτυξή τους με αποτέλεσμα να καταλήξουν σε επίπεδα ανάλογα με εκείνα του μάρτυρα ($p>0.05$). Συνεπώς η χρήση της MAP δεν ήταν αποτελεσματική στο να αναχαιτίσει την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, πιθανόν λόγω της υψηλής ανθεκτικότητας αυτών στην επίδραση του CO₂ (μικροαερόφιλλοι μικροοργανισμοί). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Patsias et al. (2008) και Skandamis and Nychas (2002) σύμφωνα με τους οποίους ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κρέας ή σε φιλέτο κοτόπουλου ήταν ο ίδιος ανεξαρτήτως συσκευασίας (MAP ή αερόβιας).

Τα δείγματα M-Θ και M-X μείωσαν τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά περίπου 2.0 log CFU/g, αντίστοιχα, σε σχέση με τα δείγματα M και A (8^η ημέρα συντήρησης). Η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων ακολούθησε τον ίδιο ρυθμό και στις δύο διαφορετικές μεταχειρίσεις, εφόσον δεν σημείωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p>0.05$), κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της αερόβιας συσκευασίας. Σύμφωνα με τους Mastromatteo et al. (2009) η προσθήκη θυμόλης (200 ppm) μαζί με καρβακρόλη (50 ppm) μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά 0.8-1.4 log CFU/g κατά την συντήρηση προϊόντος από κρέας πουλερικών (μπιφτέκια) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα για 7 ημέρες στους (3 °C), ενώ οι Chouliara & Kontominas (2006) αναφέρουν μεγαλύτερη μείωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την συντήρηση φιλέτου κοτόπουλου σε MAP με θυμαρέλαιο 0.5% (4.7 log CFU/g). Τέλος, οι Del Nobile et al. (2009) αναφέρουν ότι ο συνδυασμός χιτοζάνης, διαλυτοποιημένης σε γαλακτικό οξύ (0.012% w/w), MAP και αλγινικού στρώματος για την συντήρηση τυριού μείωσε τον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων κατά 2 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 8 ημέρα (4 °C), ενώ οι Georgantelis et al. (2007) αναφέρουν ανάλογη μείωση του πληθυσμού των γαλακτικών

βακτηρίων σε λουκάνικα που συντηρήθηκαν με την προσθήκη χιτοζάνης 1% w/w για 15 ημέρες, στην ίδια θερμοκρασία.

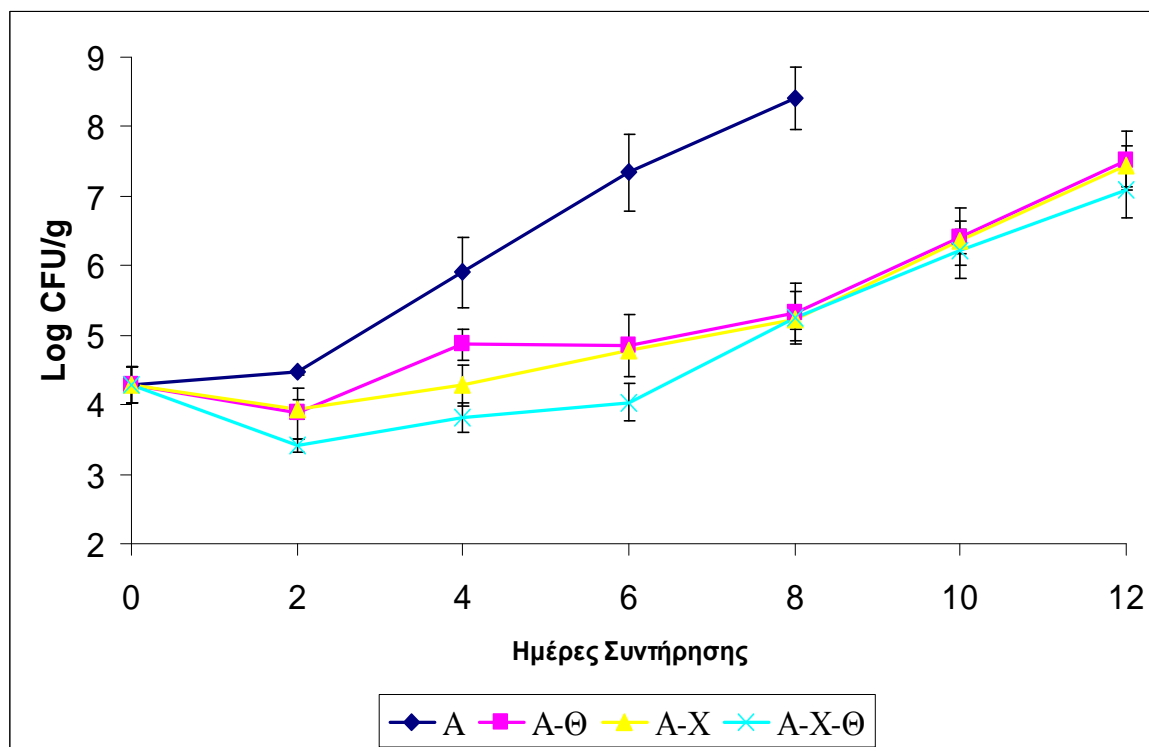
Τα δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη χιτοζάνης και θυμαρέλαιου (M-X-Θ) διατήρησαν χαμηλούς πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, οι οποίοι δεν ξεπέρασαν τους 6.0 log CFU/g, ενώ οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων των δειγμάτων M-X και M-Θ ξεπέρασαν τους 7.0 log CFU/g την 10^η και 12^η ημέρα συντήρησης αντίστοιχα. Τα δείγματα M-X-Θ είχαν κατά (τουλάχιστον) 3.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς γαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με τον μάρτυρα την 8^η ημέρα συντήρησης. Επίσης, τα δείγματα M-X-Θ είχαν χαμηλότερους πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με τα δείγματα M-Θ και M-X καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p < 0.05$). Για παράδειγμα, είχαν κατά 1.3-1.5 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα δείγματα M-Θ και M-X την 6^η και 12^η ημέρα συντήρησης ($p < 0.05$), υποδεικνύοντας (πιθανή) συνεργιστική δράση μεταξύ θυμαρέλαιου και χιτοζάνης για την αναχαίτιση της ανάπτυξης των συγκεκριμένων μικροοργανισμών, στην συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της συνδυαστικής τους χρήσης στην αερόβια συσκευασία.

3.1.4. Μεταβολή του *Brochothrix thermosphacta*

α) Αερόβια Συσκευασία

Ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* είναι προαιρετικά αναερόβιος και αναπτύσσεται σε νωπά προϊόντα κρέατος κατά την συντήρησή τους σε αερόβια ή/και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Labadie et al., 1999).

Στο **Γράφημα 3.1.4(α)** παρουσιάζεται η μεταβολή του *B. thermosphacta* σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε αερόβια συσκευασία.



Γράφημα 3.1.4(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό του *Brochothrix thermosphacta* στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X= δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ= δείγμα με τον συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.1.4(α)**, το βακτήριο *B. thermosphacta* ξεκινώντας από πληθυσμό 4.3 log CFU/g έφτασε τους 7.3, 4.9, 4.8 και 4.0 log CFU/g στα δείγματα A, A-Θ, A-X και A-X-Θ, αντίστοιχα, την 6^η ημέρα συντήρησης. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, οι Balamatsia et al. (2006) και Chouliara et al. (2007), αναφέρουν υψηλές τιμές του μικροοργανισμού την 8^η ημέρα συντήρησης φιλέτου από κοτόπουλου (7.8 log CFU/g). Επιπλέον, σύμφωνα με τους Tsigarida et al. (2000) ο πληθυσμός του *B. thermosphacta* σε μοσχαρίσιο κρέας που συσκευάστηκε σε αερόβιες συνθήκες, ξεπέρασε τους 8.0 log CFU/g την 6^η ημέρα συντήρησης στους 5 °C.

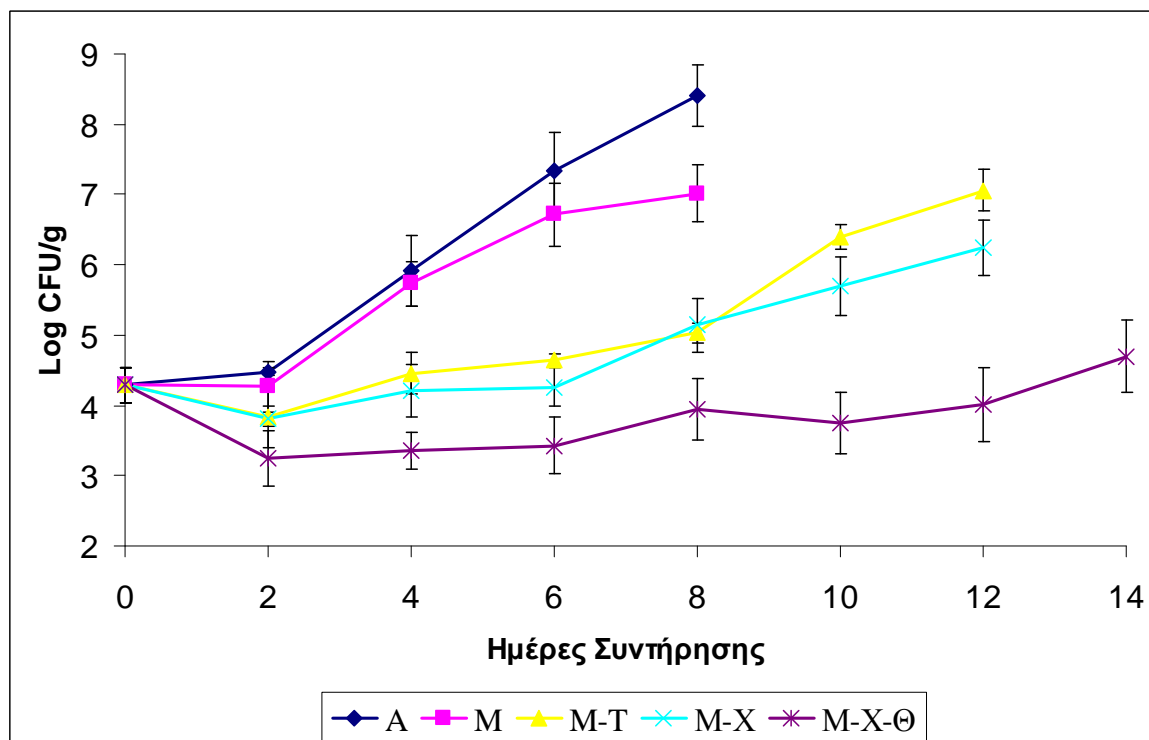
Η προσθήκη θυμαρέλαιου ή χιτοζάνης στα δείγματα A-Θ και A-X οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερες τιμές του μικροοργανισμού σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, ενώ την 2^η ημέρα συντήρησης η διαφορά των πληθυσμών του μικροοργανισμού μεταξύ των δειγμάτων A-Θ, A-X και των δειγμάτων του μάρτυρα ήταν

μικρή (0.5-0.6 log CFU/g) την 6^η ημέρα συντήρησης, η μείωση έφτασε τους 2.4-2.5 log CFU/g ($p < 0.05$). Ο *B. thermosphacta* φάνηκε να είναι πιο ευαίσθητος στην επίδραση του θυμαρέλαιου και της χιτοζάνης σε σχέση με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αφού παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού τους κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έρχονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Chouliara & Kontominas (2006) οι οποίοι αναφέρουν ότι η προσθήκη θυμαρέλαιου 0.5% σε φρέσκο φιλέτο κοτόπουλου μείωσε τον πληθυσμό του μικροοργανισμού κατά 3.0 log CFU/g, την 9^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C. Όσον αφορά την επίδραση της χιτοζάνης στο ίδιο μικροοργανισμό, δεν υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα δεδομένα στην βιβλιογραφία. Ωστόσο, οι Soultos et al. (2008) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης 1% w/w (αδιάλυτη μορφή) σε χοιρινά λουκάνικα, μείωσαν τον πληθυσμό του μικροοργανισμού κατά 1.6 log CFU/g, σε σχέση με τον μάρτυρα την 7^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C.

Η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και θυμαρέλαιου στα δείγματα A-X-Θ, μείωσε τον πληθυσμό του *B. thermosphacta* κατά 3.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 6^η και 8^η ημέρα συντήρησης, ($p < 0.05$). Τα δείγματα A-X-Θ, την 6^η ημέρα συντήρησης είχαν κατά περίπου 1.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα δείγματα A-X και A-Θ, υποδεικνύοντας (πιθανή) συνεργιστική δράση μεταξύ των δυο αντιμικροβιακών παραγόντων στα αρχικά στάδια της συντήρησης του προϊόντος, αλλά από την 8^η και ως την 12^η ημέρα συντήρησης επέδειξαν παρόμοιους πληθυσμούς ($p > 0.05$).

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.1.4.(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή των πληθυσμών του *B. thermosphacta* σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας.



Γράφημα 3.1.4(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP 30% CO₂/70% N₂) και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό του *Brochothrix thermosphacta* στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 4.1.4(β)**, ο πληθυσμός του *B. thermosphacta* ήταν 7.0, 5.0, 5.1 και 3.9 log CFU/g στα δείγματα M, M-Θ, M-X και M-X-Θ, αντίστοιχα, την 8^η ημέρα συντήρησης.

Η χρήση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας για την συντήρηση του προϊόντος, δεν κατάφερε να περιορίσει την ανάπτυξη του *B. thermosphacta*, εφόσον οι πληθυσμοί του κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με τα αντίστοιχα του μάρτυρα, κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p > 0.05$). Ωστόσο, την 8^η ημέρα συντήρησης παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου κατά 1.4 log CFU/g. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Tsigarida et al. (2000), όπου οι πληθυσμοί του μικροοργανισμού σε μοσχαρίσιο κρέας που συντηρήθηκε στους 5 °C σε αερόβιες συνθήκες, κυμάνθηκαν

περίπου στα ίδια επίπεδα με τους αντίστοιχους των δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ή σε συσκευασία κενού.

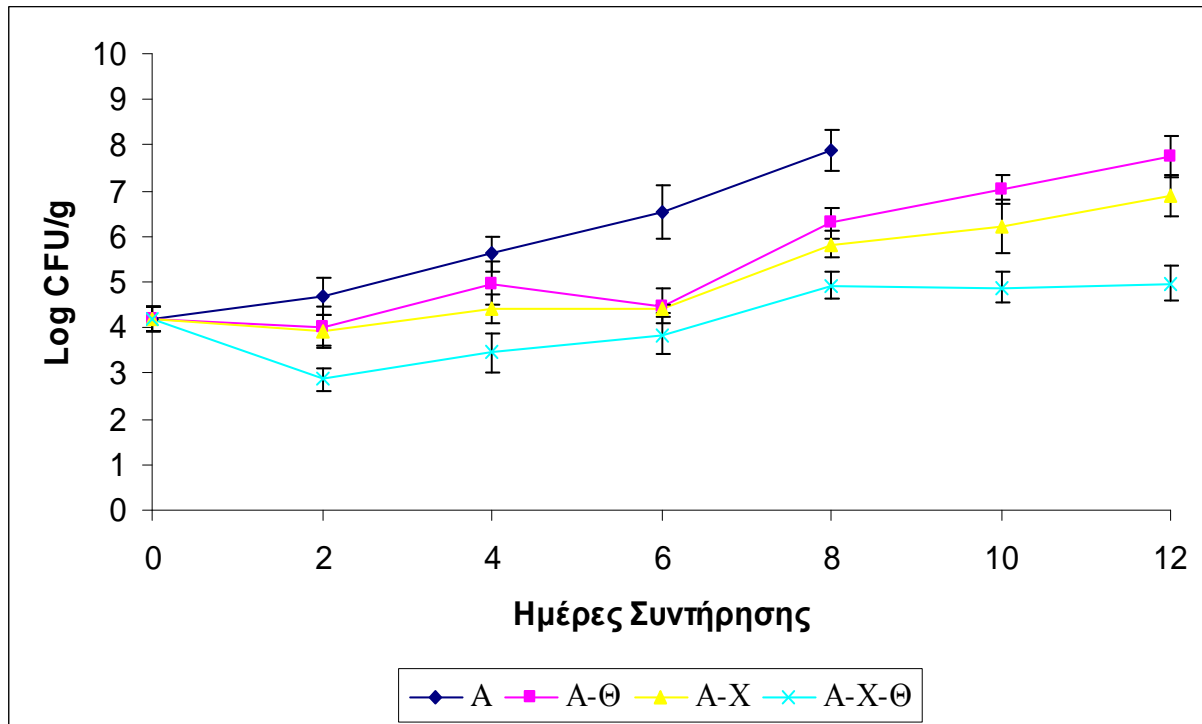
Τα δείγματα M-Θ και M-X παρουσίασαν παρόμοιους πληθυσμούς του *B. thermosphacta* κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p>0.05$). Την 8^η ημέρα συντήρησης, οι πληθυσμοί του συγκεκριμένου βακτηρίου ήταν κατά περίπου 2.0 log CFU/g χαμηλότεροι σε σχέση με τα δείγματα M, και κατά περίπου 3.3 log CFU/g σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα ($p<0.05$). Οι Chouliara & Kontominas (2006) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και τροποποιημένης ατμόσφαιρας για την συντήρηση φρέσκου φιλέτου από κοτόπουλο μείωσε τον πληθυσμό του *B. thermosphacta* κατά 3.3 log CFU/g, την 9^η ημέρα συντήρησης. Η επίδραση του συνδυασμού MAP και χιτοζάνης στην ανάπτυξη του *B. thermosphacta* δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα, σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία.

Ο πληθυσμός του *B. thermosphacta* στα δείγματα M-X-Θ δεν ξεπέρασε τους 4.7 log CFU/g κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, σημειώνοντας σημαντική μείωση κατά 4.5 log CFU/g, σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα ($p<0.05$). Επιπρόσθετα, οι πληθυσμοί του μικροοργανισμού στα δείγματα M-X-Θ ήταν χαμηλότεροι σε σχέση με τα δείγματα M-X και M-Θ. Συγκεκριμένα, τα δείγματα M-X-Θ είχαν κατά 1.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς *B. thermosphacta* σε σχέση με τα δείγματα M-X και M-Θ, έως και την 8^η ημέρα συντήρησης, ενώ μεταξύ 10-12^{ης} ημέρας συντήρησης η διαφορά πληθυσμών αυξήθηκε στους 2.2-3.0 log CFU/g. Η επίδραση του συνδυασμού MAP/χιτοζάνης/αιθέριου ελαίου στην ανάπτυξη του *B. thermosphacta* δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα, σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία.

3.1.5. Μεταβολή των Εντεροβακτηριοειδών

a) Αερόβια συσκευασία

Στο **Γράφημα 3.1.5(α)** παρουσιάζεται η μεταβολή των **Εντεροβακτηριοειδών** κατά την διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων σε αερόβια συσκευασία με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου και χιτοζάνης.



Γράφημα 3.1.5(α). Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X= δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ= δείγμα με το συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.5(α)**, η αρχική τιμή των Εντεροβακτηριοειδών στα δείγματα A ήταν 4.2 log CFU/g, και ήταν αρκετά υψηλότερη από την αντίστοιχη που αναφέρεται από τους Chouliara et al. (2007) και Patsias et al. (2008) για φρέσκο προϊόν κοτόπουλου (2-2.3 log CFU/g). Ωστόσο, οι Balamatsia et al. (2006) αναφέρουν ότι ο αρχικός πληθυσμός φρέσκου φιλέτου κοτόπουλου ήταν της τάξης των 3.6 log CFU/g. Ο υψηλός αρχικός πληθυσμός των Εντεροβακτηριοειδών που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του εξεταζόμενου προϊόντος, πιθανόν να οφείλεται στην μέθοδο επεξεργασίας του, ο οποίος περιλαμβάνει τεμάχισμα κοτόπουλου και πιπεριάς και πέρασμά τους μέσα από ένα ξυλάκι, με χειρωνακτικό τρόπο. Σύμφωνα με τους Cerveny et al. (2009) η αρχική μικροχλωρίδα προϊόντων νωπών προϊόντων κρέατος τα οποία έχουν υποστεί επεξεργασία όπως το τεμάχισμα ή η μετατροπή τους σε κιμά, κυριαρχείται από υψηλούς πληθυσμούς ψυχρότροφων Εντεροβακτηριοειδών, τα οποία έχουν την ιδιότητα να μεταβολίζουν τα

θρεπτικά συστατικά του κρέατος και να αναπτύσσονται σε περιοχή pH 5.5-7.0. Επιπλέον η παρουσία τεμαχισμένης πιπεριάς στο προϊόν, είναι πιθανόν να αυξάνει τον αρχικό πληθυσμό των εντεροβακτηριοειδών του, εφόσον τα Εντεροβακτηριοειδή αποτελούν έναν από τους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης σε λαχανικά που έχουν υποστεί επεξεργασία, όπως το τεμάχισμα (κυρίως *Erwinia herbicola* και *Rahnella aquatilis*, Ragaert et al., 2007). Γενικά, το τεμάχισμα των τροφίμων διευκολύνει την μικροβιολογική αλλοίωση, εφόσον ελευθερώνονται θρεπτικά συστατικά και υγρασία, όχι μόνο στην επιφάνεια των τροφίμων αλλά και στα εργαλεία τεμαχισμού (π.χ. μαχαίρια) και διευκολύνεται έτσι η ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Francis et al., 1999).

Τα δείγματα Α επέδειξαν υψηλούς πληθυσμούς Εντεροβακτηριοειδών την 6^η και 8^η ημέρα (6.5 και 7.9 log CFU/g, αντίστοιχα), σε συμφωνία με τους Chouliara et al. (2007) και Balamatsia et al. (2006) οι οποίοι αναφέρουν ανάλογες τιμές κατά την συντήρηση φιλέτου κοτόπουλου για 6 και 8 ημέρες στους 4 °C (6.1 και 7.8 log CFU/g, αντίστοιχα).

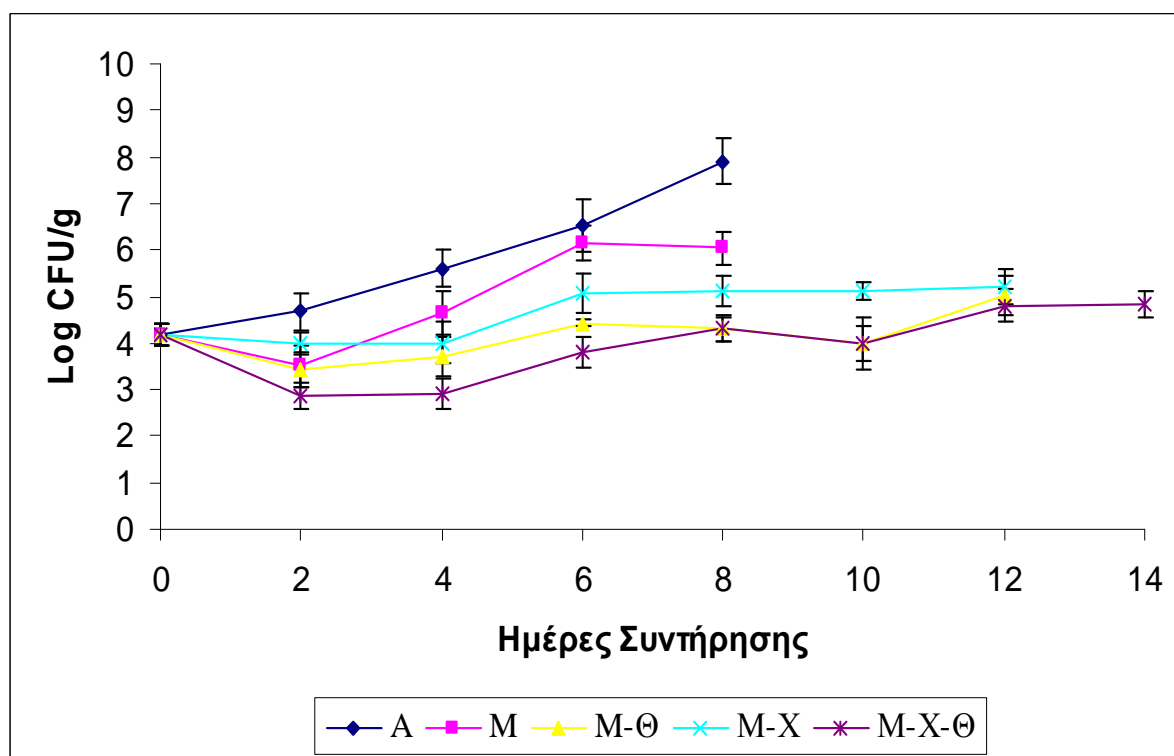
Η χρήση θυμαρέλαιου ή χιτοζάνης στα δείγματα Α-Θ και Α-Χ μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών κατά περίπου 2.0 log CFU/g, την 6^η-8^η ημέρα συντήρησης. Σύμφωνα με τους Chouliara & Kontominas (2006) η προσθήκη θυμαρέλαιου 0.5% σε φιλέτο κοτόπουλο μείωσε τον τελικό πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών κατά 5.2 log CFU/g την 9^η ημέρα συντήρησης, ενώ οι Mastromatteo et al. (2009) αναφέρουν ότι η προσθήκη θυμόλης σε μπιφτέκια από ανάμικτο κρέας πουλερικών μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών κατά 0.9-1.6 log CFU/g κατά την συντήρηση στους 3 °C για 7 ημέρες. Οι Soutos et al. (2008) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης 1% w/w σε χοιρινά λουκάνικα, μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών κατά 1.8 log CFU/g την 7^η-14 ημέρα συντήρησης στους 4 °C, ενώ οι Ouattara et al. (2000) αναφέρουν ότι η χρήση χιτοζάνης αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική στην μείωση των εντεροβακτηριοειδών κατά την συντήρηση προϊόντων κρέατος (bologna, pastrami, μαγειρεμένο χοιρινό).

Ο συνδυασμός χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στα δείγματα Α-Χ-Θ, μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών, μόλις από την 2^η ημέρα συντήρησης (μείωση κατά 1.8 log CFU/g). Ακολούθως, ο συνδυασμός Α-Χ-Θ επέδειξε βακτηριοστατική δράση στα εντεροβακτηριοειδή, εφόσον δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του πληθυσμού τους έως την και την 6^η ημέρα ($p > 0.05$), ενώ την 8^η ημέρα παρατηρήθηκε άνοδος του πληθυσμού κατά 1.0 log CFU/g ($p < 0.05$). Συνολικά, τα δείγματα Α-Χ-Θ παρουσίασαν κατά 2.7-3.0 log CFU/g χαμηλότερο πληθυσμό Εντεροβακτηριοειδών σε σχέση με τον μάρτυρα, μεταξύ της 6^{ης}-8^{ης} ημέρας συντήρησης ($p < 0.05$). Επιπλέον, μεταξύ 2-12^{ης} ημέρας

συντήρησης ο πληθυσμός των Εντεροβακτηριοειδών στα δείγματα A-X-Θ ήταν κατά 1.0-2.0 log CFU/g χαμηλότερος σε σχέση με τα δείγματα A-X και A-Θ, υποδεικνύοντας ότι οι δυο αντιμικροβιακοί παράγοντες πιθανόν να έδρασαν συνεργιστικά για την αναχαίτιση της ανάπτυξης των Εντεροβακτηριοειδών, όταν συνδυάστηκαν. Ανάλογο φαινόμενο διαπιστώθηκε και από τους Georgantelis et al. (2007), οι οποίοι αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση δενδρολίβανου και χιτοζάνης για την συντήρηση χοιρινών λουκάνικων επέδειξε συνεργιστική δράση στην αναχαίτιση της ανάπτυξης των Εντεροβακτηριοειδών.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.1.5.(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή των πληθυσμών των Εντεροβακτηριοειδών κατά την συντήρηση των δειγμάτων σε MAP.



Γράφημα 3.1.5.(β): Επίδραση συσκευασίας MAP (30% CO₂/70 % N₂) και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.1.5(β)**, τα Εντεροβακτηριοειδή επέδειξαν πληθυσμούς ίσους με 7.9, 6.0, 4.3, 5.1 και 4.3 log CFU/g στα δείγματα A, M, M-Θ, M-X και M-X-Θ, αντίστοιχα, την 8^η ημέρα συντήρησης.

Τα δείγματα M, είχαν κατά 1.9 log CFU/g πληθυσμούς Εντεροβακτηριοειδών την 8^η ημέρα συντήρησης, και είχαν σημαντικά χαμηλότερους πληθυσμούς Εντεροβακτηριοειδών σε σχέση με τα δείγματα A ($p < 0.05$) καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Αντίστοιχα, οι Chouliara et al. (2007) αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί των Εντεροβακτηριοειδών σε φιλέτο κοτόπουλου που συσκευάστηκε στην ίδια τροποποιημένη ατμόσφαιρα ήταν κατά 0.7-1.1 log CFU/g χαμηλότεροι σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης.

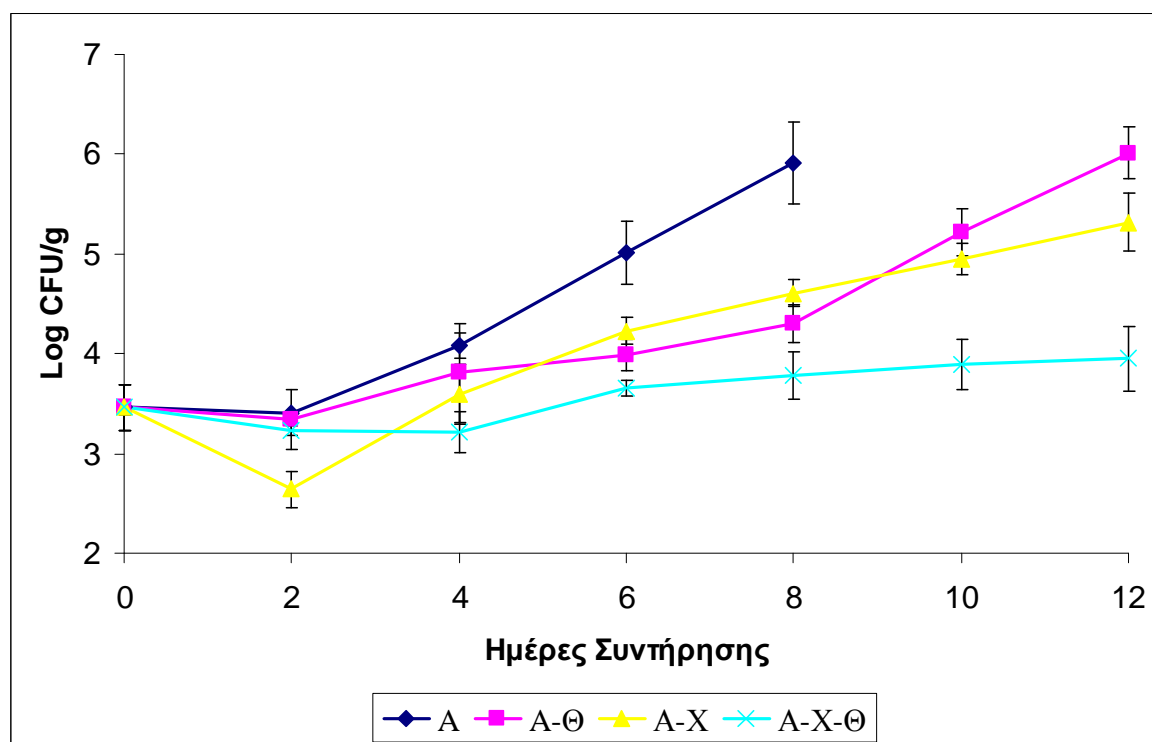
Τα δείγματα M-X μείωσαν τον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών κατά 2.7 και 0.9 log CFU/g σε σχέση με τα δείγματα A και M, αντίστοιχα την 8^η ημέρα συντήρησης ($p < 0.05$). Τα δείγματα M-Θ είχαν χαμηλότερους πληθυσμούς Εντεροβακτηριοειδών από τους αντίστοιχους των δειγμάτων M-X την 8^η-10^η ημέρα συντήρησης (διαφορά κατά περίπου 1.0 log CFU/g) αλλά στη συνέχεια και ως την 12^η ημέρα συντήρησης κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα ($p > 0.05$). Σύμφωνα με τους Chouliara & Kontominas (2006) ο συνδυασμός MAP και θυμαρέλαιου 0.5% μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηριοειδών κατά 5.5 log CFU/g σε φιλέτο από κοτόπουλο (σε σχέση με τον μάρτυρα) ενώ οι Mastromatteo et al. (2009) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των Εντεροβακτηριοειδών σε μπιφτέκια από κρέας πουλερικών που συντηρήθηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με την προσθήκη θυμόλης και καρβακρόλης μειώθηκε κατά 1.7 και 0.9 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 1^η και 7^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα.

Ο συνδυασμός τροποποιημένης ατμόσφαιρας, θυμαρέλαιου και χιτοζάνης (M-X-Θ) αποδείχτηκε ο πιο αποτελεσματικός για την αναχαίτιση της ανάπτυξης των Εντεροβακτηριοειδών στο εξεταζόμενο προϊόν εφόσον μείωσε τον πληθυσμό τους μόλις από την 2^η ημέρα συντήρησης (μείωση κατά 1.8 log CFU/g). Επιπλέον, οι πληθυσμοί των Εντεροβακτηριοειδών δεν ξεπέρασαν τους 4.85 log CFU/g ως το τέλος της περιόδου συντήρησης. Συνολικά, ο πληθυσμός των Εντεροβακτηριοειδών στα δείγματα M-X-Θ ήταν κατά 4 log CFU/g χαμηλότερος, σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$).

3.1.6. Μεταβολή των Ζυμών-Μυκήτων

α) Αερόβια συσκευασία

Στο **Γράφημα 3.1.6(α)** παρουσιάζεται η μεταβολή των ζυμών-μυκήτων κατά την διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων σε αερόβια συσκευασία με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου και χιτοζάνης. Γενικά, αν και οι ζύμες θεωρείται ότι αποτελούν μέρος της αυτόχθονης μικροχλωρίδας των νωπών προϊόντων κρέατος (natural contaminants), υπάρχουν λίγες διαθέσιμες έρευνες στην βιβλιογραφία σχετικά με την ανάπτυξή τους σε αυτά (Nychas & Drosinos, 1999). Επιπλέον, οι ζύμες αποτελούν τους αμέσως επόμενους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης μετά τα οξυγαλακτικά βακτήρια, σε λαχανικά που είναι πλούσια σε σάκχαρα (σουκρόζη, φρουκτόζη, γλυκόζη κ.α.), όπως οι πιπεριές (κυριότερα οι *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Pichia* και *Torulaspora*, Ragaert et al., 2007).



Γράφημα 3.1.6(α). Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των Ζυμών-Μυκήτων στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X = δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ = δείγμα με το συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται από το **Γράφημα 3.1.6(α)**, ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών-μυκήτων στο προϊόν ήταν 3.5 log CFU/g και βρίσκεται σε συμφωνία με τον αντίστοιχο που αναφέρεται από τους και Sallam & Samejina (2004) και Kim & Song (2004) για φρέσκο φιλέτο κοτόπουλου (3.5 και 4.5 log CFU/g, αντίστοιχα). Επιπλέον, οι Bagamboula et al. (2002) αναφέρουν ότι ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών σε φρέσκιες τεμαχισμένες πιπεριές, ήταν 3.5 log CFU/g.

Οι πληθυσμοί των ζυμών-μυκήτων την 6^η ημέρα συντήρησης ήταν 5.0, 4.0, 4.2 και 3.5 log CFU/g στα δείγματα A, A-Θ, A-X και A-X-Θ αντίστοιχα. Επιπλέον, την 8^η ημέρα συντήρησης οι πληθυσμοί των ζυμών-μυκήτων στα δείγματα A, A-Θ, A-X και A-X-Θ ήταν 5.9, 4.3, 4.6, 3.8 log CFU/g, αντίστοιχα. Οι ζύμες-μύκητες αποτέλεσαν την ομάδα μικροοργανισμών με τους χαμηλότερους πληθυσμούς κατά την διάρκεια συντήρησης του προϊόντος. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, οι Kim & Song (2004) και Soldatou et al. (2009) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των ζυμών-μυκήτων σε φιλέτο κοτόπουλου και σουβλάκι από πρόβειο κρέας που συντηρήθηκαν αερόβια υπό ψύξη (4 °C) έφτασε τους 5.5 log CFU/g την 6^η-7^η ημέρα συντήρησης. Τέλος, οι Jacxsens et al. (2003) και Bagamboula et al. (2002) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των ζυμών σε τεμαχισμένες πιπεριές που συντηρήθηκαν υπό ψύξη σε EMA (equilibrium modified atmosphere) έφτασε τους 5 log CFU/g και 6.7 CFU/g, αντίστοιχα, την 7^η ημέρα συντήρησης. Γενικά, οι μύκητες (moulds) δεν διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση των λαχανικών, επειδή το pH των λαχανικών (από ελαφρά όξινο έως ουδέτερο) ευνοεί την ανάπτυξη των ζυμών εις βάρος των πρώτων (Ragaert et al., 2007).

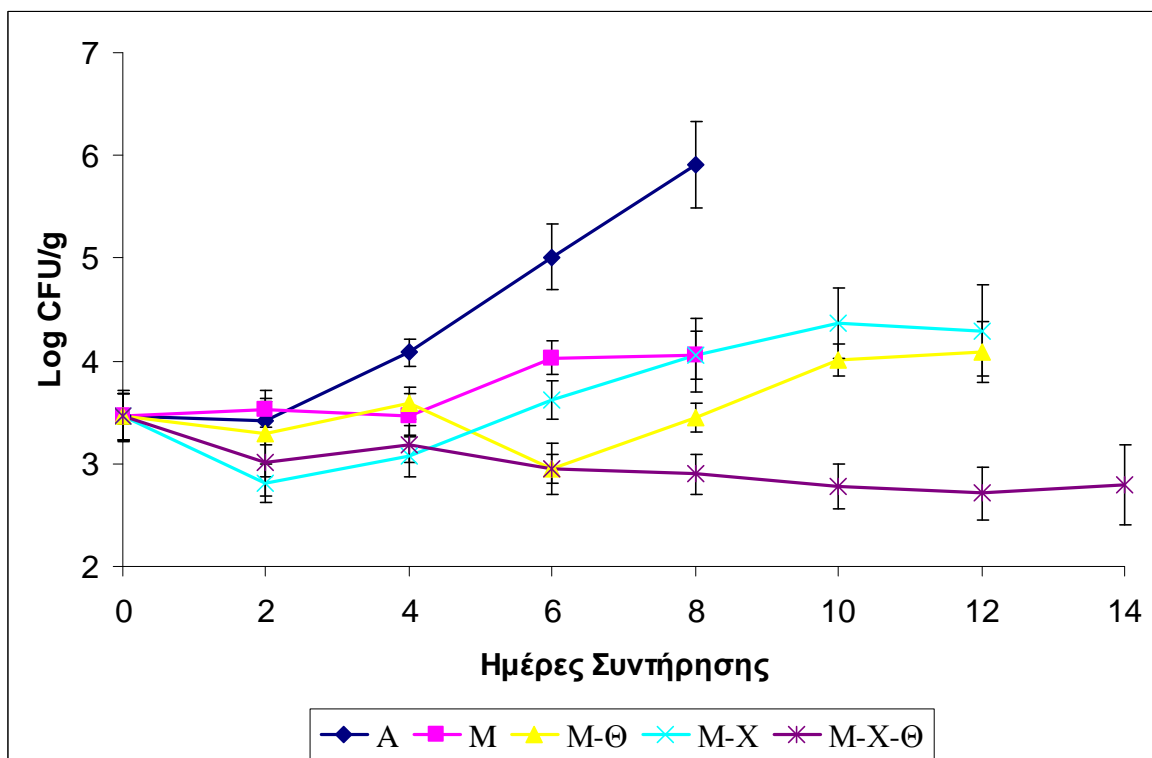
Τα δείγματα A-X και A-Θ επέδειξαν παρόμοιους πληθυσμούς ζυμών-μυκήτων κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p>0.05$). Συνολικά, οι πληθυσμοί τους ήταν κατά 0.8-1.0 log CFU/g και 1.3-1.6 log CFU/g χαμηλότεροι σε σχέση με τον μάρτυρα ($p<0.05$), την 6^η και 8^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα. Σύμφωνα με τους Holley & Patel (2005) τα αιθέρια έλαια παρουσιάζουν ισχυρή αντιμυκητιασική δράση. Οι Chouliara et al. (2007) αναφέρουν ότι η προσθήκη ριγανέλαιου 0.1% v/w κατά την συντήρηση φιλέτου από κοτόπουλο σε αερόβια συσκευασία, μείωσε τον πληθυσμό των ζυμών-μυκήτων κατά 0.8 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα (9^η ημέρα συντήρησης). Επιπλέον, η χιτοζάνη έχει βρεθεί να αναστέλλει την ανάπτυξη των ζυμών-μυκήτων σε προϊόντα ζωϊκής ή φυτικής προέλευσης (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). Για παράδειγμα, οι Sagoo et al. (2002) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης για την συντήρηση χοιρινού κιμά, μείωσε τον

πληθυσμό των ζυμών-μυκήτων κατά 2.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ οι Cheah & Page (1997) αναφέρουν ότι η εμφάνιση καρότων σε διάλυμα χιτοζάνης 2% και 4% (w/v) μείωσε την ανάπτυξη των μυκήτων κατά 28-88%. Επίσης, οι Devlieghere et al. (2004) αναφέρουν ότι παρουσία χιτοζάνης 0.005% w/v (διάλυμα χιτοζάνης-οξικού οξέος) παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού της ζύμης *Candida lambica* κατά περίπου 3 log CFU/g, μετά από επώαση στους 7 °C για 8 ημέρες.

Ο πληθυσμός των ζυμών-μυκήτων στα δείγματα A-X-Θ δεν ξεπέρασε τους 4.0 log CFU/g κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης (12 ημέρες). Συγκεκριμένα, ο συνδυασμός A-X-Θ επέδειξε βακτηριοστατική δράση ενάντια στην ανάπτυξη των ζυμών-μυκήτων, καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, εφόσον ο πληθυσμός τους δεν μεταβλήθηκε σημαντικά από την αρχική τιμή (3.5 log CFU/g), στα συγκεκριμένα δείγματα ($p>0.05$). Σύμφωνα με τους Georgantelis et al. (2007), η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και δενδρολίβανου για την συντήρηση λουκάνικων μείωσε τον πληθυσμό των ζυμών-μυκήτων κατά 1.7 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης, οι Kim et al. (2008) αναφέρουν ότι συνδυασμός χιτοζάνης-λυσοζύμης για την επικάλυψη και συντήρηση βραστών αυγών στους 10 °C, μείωσε τον πληθυσμό των μυκήτων κατά τουλάχιστον 2.2 log CFU/g (10¹¹ ημέρα συντήρησης), ενώ σύμφωνα με τους Roller et al. (2002) η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης καιθειικών αλάτων για την συντήρηση λουκάνικων μείωσε τον πληθυσμό των ζυμών-μυκήτων κατά 1-1.5 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.1.6(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή των πληθυσμών των ζυμών-μυκήτων σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας.



Γράφημα 3.1.6(β). Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP 30% CO₂/70 % N₂) και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στον πληθυσμό των Ζυμών-Μυκήτων στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.1.6(β)**, οι ζύμες-μύκητες επέδειξαν πληθυσμό ίσο με 5.9, 4.1, 3.5, 4.1, και 2.9 log CFU/g στα δείγματα A, M, M-Θ, M-X και M-X-Θ, αντίστοιχα, την 8^η ημέρα συντήρησης.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.6(β)**, όλα τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα επέδειξαν χαμηλότερους πληθυσμούς ζυμών-μυκήτων σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, τα δείγματα M μείωσαν τον πληθυσμό των συγκεκριμένων μικροοργανισμών κατά 1.0-2.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα μεταξύ της 6^{ης} και 8^{ης} ημέρας συντήρησης, αποδεικνύοντας ότι η χρήση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας ήταν αποτελεσματική στην αναχαίτιση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Ανάλογη συμπεριφορά διαπιστώθηκε και από τους Patsias et al. (2008)

οι οποίοι παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός των ζυμών-μυκήτων σε φρέσκο φιλέτο κοτόπουλου που συσκευάστηκε στην ίδια τροποποιημένη ατμόσφαιρα μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα. Επίσης, οι Gonzalez-Aguilar (2004) αναφέρουν ότι κατά την συντήρηση πράσινης πιπεριάς υπό συσκευασία κενού, οι ζύμες αυξήθηκαν στους 4 log CFU/g μετά από 7 ημέρες συντήρησης σε MAP (5 °C), ενώ οι μύκητες δεν ξεπέρασαν τους 1.5 log CFU/g.

Τα δείγματα M-X παρουσίασαν τους ίδιους τελικούς πληθυσμούς ζυμών-μυκήτων με τα δείγματα M ($p > 0.05$) την 8^η ημέρα συντήρησης. Την ίδια ημέρα συντήρησης τα δείγματα M-Θ είχαν κατά 0.6 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα δείγματα M, ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η χιτοζάνη δεν έδρασε συνεργιστικά με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα για την αναχαίτιση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών, κάτι που δεν παρατηρήθηκε με τις άλλες κατηγορίες μικροοργανισμών. Τα δείγματα με θυμαρέλαιο, ενώ είχαν κατά 0.7-1.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα δείγματα M, μεταξύ 6^{ης}-8^{ης} ημέρας, στην συνέχεια (10-12^η ημέρα) δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές με τον πληθυσμό των δειγμάτων M-X.

Τέλος, τα δείγματα M-X-Θ μείωσαν τον πληθυσμό των ζυμών-μυκήτων μόλις από την 2^η ημέρα συντήρησης (μείωση κατά 0.5 log CFU/g) και έκτοτε ανέστειλαν την ανάπτυξή τους καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, εφόσον ο πληθυσμός τους δεν ξεπέρασε τους 3.0 log CFU/g μέχρι την 14^η ημέρα συντήρησης, στα συγκεκριμένα δείγματα (βακτηριοστατική επίδραση). Συνολικά, παρουσίασαν κατά > 3.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα δείγματα A ($p < 0.05$). Αξίζει να σημειωθεί ότι έως και την 6^η ημέρα τα δείγματα M-X-Θ επέδειξαν παρόμοιους πληθυσμούς ζυμών-μυκήτων με τα δείγματα M-X και M-Θ ($p > 0.05$), αλλά στην συνέχεια και έως το τέλος της περιόδου συντήρησης είχαν συγκριτικά χαμηλότερους πληθυσμούς (κατά 1.4-1.6 log CFU/g σε σχέση με M-X και M-Θ την 10^η ημέρα).

3.2 Φυσικοχημική ανάλυση

Στις φυσικοχημικές αναλύσεις προσδιορίστηκαν η οξειδωση του λίπους (μεταβολή TBARS), η μεταβολή του pH και η μεταβολή του χρώματος.

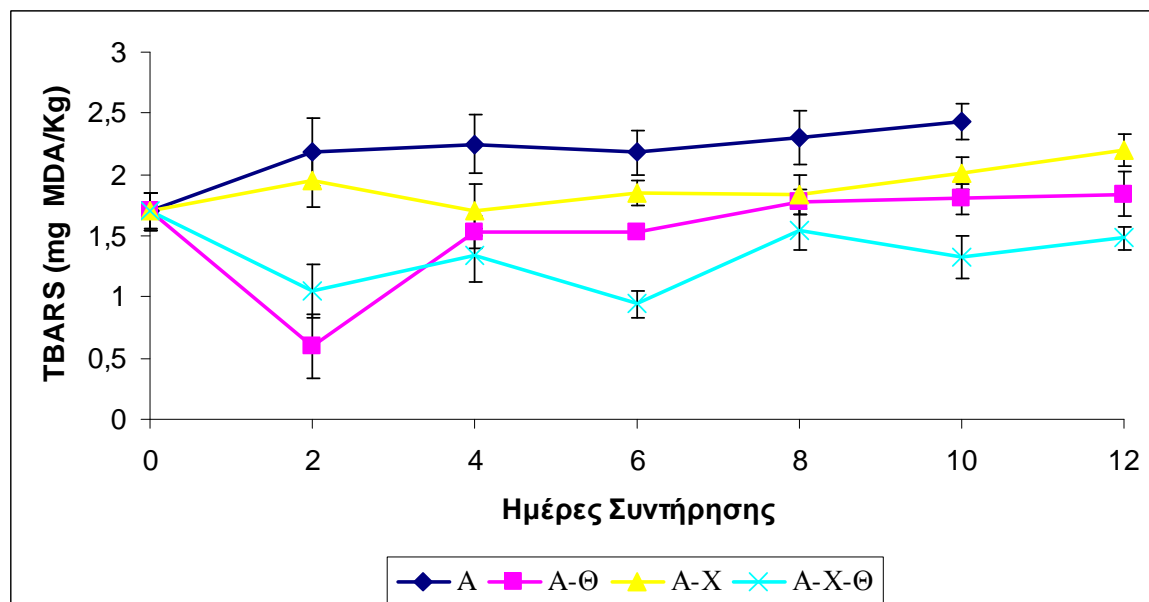
3.2.1. Μεταβολή των TBA ενεργών ενώσεων (TBARS= Thiobarbituric Acid Reactive Substances)

Η οξείδωση του λίπους αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες που σχετίζονται με την ποιοτική υποβάθμιση του κρέατος πουλερικών, κυρίως όταν προέρχεται από περιοχές του ζώου με υψηλό περιεχόμενο σε λίπος όπως το μπούτι ή δέρμα (dark chicken meat). Η οξείδωση των λιπιδίων επηρεάζει κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και οδηγεί στην παραγωγή ενώσεων που ασκούν δυσμενή επίδραση στο χρώμα, το άρωμα, την γεύση την υφή και την διατροφική αξία των προϊόντων κρέατος (Fernandez et al., 1997). Η αυτοοξείδωση των λιπιδίων είναι η κυριότερη αντίδραση οξείδωσης που λαμβάνει χώρα στα προϊόντα ζωικής προέλευσης και καταλύεται από ελεύθερες ρίζες. Το τεστ του 2-Θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό του βαθμού οξείδωσης των λιπιδίων σε προϊόντα κρέατος. Τα υδροϋπεροξειδία είναι τα κύρια προϊόντα της αυτοοξείδωσης των λιπιδίων (κυρίως των φωσφολιπιδίων παρά των τριγλυκερίδιων) και αποτελούν πολύ ασταθείς ενώσεις μεταβλητής φύσης που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και διασπώνται σε δευτερεύουσες ενώσεις (παραπροϊόντα) όπως ορισμένες αλδεΐδες (π.χ. πεντανάλη, εξανάλη, 4-υδροξυ-νονενάλη) ή κετόνες και η μηλονική διαλδεΐδη (MDA, Fernandez et al., 1997). Η παραγόμενη MDA αντιδρά γρήγορα με το 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (2-TBA), σε αναλογία mole 1:2, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ερυθρού συμπλόκου που απορροφά σε μήκος κύματος 532 nm (Shahidi & Wanasundura, 1996). Ωστόσο, το TBA δεν αντιδρά μόνο με την MDA αλλά και με άλλα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων (π.χ. αλδεΐδες, σάκχαρα, αλκα-2,4-διενάλες, φουρφουράλη, αλκενάλες, κετόνες) με αποτέλεσμα την δημιουργία συμπλόκων κίτρινου, πορτοκαλί ή ερυθρού χρώματος που συμπίπτουν με την απορρόφηση της MDA στα 532 nm (Botsoglou et al. 1994). Με τον γενικό όρο TBARS (Thiobarbituric Reactive Substances ή TBA ενεργές ενώσεις) εκφράζεται το σύνολο των ενώσεων που αντιδρά με το TBA. Συνεπώς, ο προσδιορισμός του βαθμού οξείδωσης του λίπους κατά την συντήρηση του προϊόντος βασίστηκε στην μεταβολή των τιμών TBARS.

α) Αερόβια Συσκευασία

Τα επίπεδα των αποτελούν δείκτη οξείδωσης στα προϊόντα κρέατος πουλερικών. Σημειώνεται ότι στην παρούσα μελέτη, ο προσδιορισμός των TBARS ενώσεων έγινε μόνο στο κρέας κοτόπουλου του προϊόντος και όχι στον φυτικό ιστό της πιπεριάς.

Στο **Γράφημα 3.2.1(α)** παρουσιάζεται η μεταβολή των τιμών TBARS στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε αερόβια συσκευασία, με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου και χιτοζάνης.



Γράφημα 3.2.1(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή των τιμών TBARS στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X= δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ= δείγμα με το συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται από το **Γράφημα 3.2.1(α)**, η αρχική τιμή TBARS στα δείγματα του μάρτυρα (A) ήταν 1.7 mg MDA/Kg, σε συμφωνία με την αντίστοιχη που αναφέρεται από τους Kanatt et al. (2005) για κοτόπουλο πικάντικου τύπου (chilly) και σουβλάκι από πρόβειο κρέας (1.5-1.7 mg MDA/Kg). Επίσης, οι Soldatou et al. (2009) αναφέρουν ότι η αρχική τιμή TBARS σε σουβλάκι από πρόβειο κρέας ήταν 1.8 mg MDA/Kg. Οι Chouliara et al. (2007) αναφέρουν χαμηλότερες τιμές TBARS για φρέσκο φιλέτο από κοτόπουλο (0.28 mg MDA/Kg) αλλά το προϊόν που μελετήθηκε στην παρούσα μελέτη περιείχε κομμάτια κρέατος από άλλα μέρη του κοτόπουλου όπως το μπούτι, ενώ είχε και σε μεγάλο ποσοστό ορατό λίπος, με αποτέλεσμα η τιμή TBARS να παρουσιάζεται αυξημένη. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Pearson & Dutson (1994), στα διάφορα προϊόντα κρέατος, η οξείδωση των λιπιδίων εξαρτάται όχι μόνο από το περιεχόμενο ποσοστό σε λιπαρά οξέα,

αλλά και από την μέθοδο επεξεργασίας που έχουν υποστεί. Για παράδειγμα, διεργασίες όπως ο τεμαχισμός του κρέατος ή η μετατροπή του σε κιμά προκαλεί διάσπαση της μεμβράνης των μυών και κατά συνέπεια εισχώρηση ατμοσφαιρικού οξυγόνου στους μυϊκούς ιστούς. Ως αποτέλεσμα, οι κυτταρικοί ιστοί καθίστανται πιο ευπαθείς σε φαινόμενα οξειδωσης και διευκολύνεται η αλληλεπίδραση των προ-οξειδωτικών με τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, οδηγώντας στην δημιουργία ελεύθερων ριζών και στην διάδοση αλυσιδωτών αντιδράσεων οξειδωσης (Limbo et al., 2010; Viuda-Martos et al., 2010; Pearson & Dutson, 1994). Άλλοι παράγοντες που ενδεχομένως να συσχετίζονται με την υψηλή αρχική τιμή TBARS της παρούσης μελέτης, πιθανόν να είναι η μέθοδος απομόνωσης TBARS ενώσεων (extraction method) που χρησιμοποιήθηκε, η οποία οδηγεί σε υψηλότερη τιμή TBARS από τις αντίστοιχες που προκύπτουν από μεθόδους απόσταξης (distillation methods) ή στην διαρκή έκθεση των δειγμάτων σε φως λαμπτήρα (τα δείγματα συντηρήθηκαν σε εμπορικό ψυγείο με διαρκή φωτισμό), που μπορεί να καταλύσει την λιπιδική οξειδωση στο κρέας πουλερικών (Seydim et al., 2006).

Οι τιμές TBARS ακολούθησαν ανοδική πορεία στην περίπτωση των δειγμάτων του μάρτυρα, ιδίως κατά την διάρκεια των πρώτων 4 ημερών συντήρησης ($p < 0.05$). Τελικά, η τιμή TBARS την 12^η ημέρα συντήρησης ήταν 2.48 mg MDA/Kg. Η αύξηση των τιμών TBARS στα δείγματα του μάρτυρα δικαιολογείται από το γεγονός ότι η χρήση συσκευασίας με υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (π.χ. αερόβια) σχετίζεται άμεσα με αυξημένες τιμές TBARS κατά την συντήρηση προϊόντων κρέατος (Limbo et al., 2010). Πολλοί ερευνητές έχουν συσχετίσει με επιτυχία τις τιμές TBARS με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής ανάλυσης, προκειμένου να εντοπίσουν την απαρχή της οξειδωτικής τάγγισης σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, όπως το γάλα, το χοιρινό κρέας και τα μαγειρεμένα φιλέτα γαλοπούλας (Fernandez et al., 1997). Οι Melton et al. (1983) αναφέρουν ότι η ανάπτυξη ταγκής γεύσης (oxidized flavor) σε κοτόπουλο και γαλοπούλα ξεκίνησε τη στιγμή που οι τιμές TBA ξεπέρασαν τα 1-2 mg MDA/Kg και 3 mg MDA/Kg, αντίστοιχα. Ωστόσο, σύμφωνα με τους Fernandez et al. (1997) αυτές οι τιμές δεν πρέπει να θεωρούνται πάντοτε ως δείκτες οργανοληπτικής ποιότητας στα διάφορα προϊόντα κρέατος, εφόσον οι τιμές του TBA επηρεάζονται και από δευτερογενείς παράγοντες όπως η διατροφή του ζώου, η ηλικία του πριν τη σφαγή, το αν το κρέας είναι νωπό ή μαγειρεμένο καθώς και από την μέθοδο της ανάλυσης TBA που εφαρμόζεται κάθε φορά. Επίσης, νεότερη έρευνα αναφέρει ότι ο εντοπισμός ανεπιθύμητης γεύσης σε προϊόντα κρέατος,

γίνεται αντιληπτή από τον άνθρωπο όταν το TBA προσεγγίσει την τιμή 5 mg MDA/Kg (Insausti et al. 2001).

Τα δείγματα A-X εμφάνισαν κατά 0.4-0.5 mg MDA/Kg χαμηλότερες τιμές TBARS σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα μεταξύ της 2^{ης} και 10^{ης} ημέρας συντήρησης, υποδεικνύοντας ότι η χρήση της χιτοζάνης είχε αντιοξειδωτική δράση όταν προστέθηκε στο προϊόν ($p < 0.05$). Η χιτοζάνη έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να παρεμποδίσει την οξείδωση του λίπους σε διάφορα προϊόντα κρέατος όπως π.χ. λουκάνικα (Georgantelis et al., 2007; Soultos et al. 2008), μπιφτέκια από μοσχαρίσιο κρέας (Georgantelis et al., 2007), αλλά και σε ψάρια (Fan et al., 2009; Ojagh et al. 2010). Η αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης έχει προταθεί ότι οφείλεται στην ικανότητά της να δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα με τα ελεύθερα ιόντα μετάλλων (π.χ. ιόντα σιδήρου, χαλκού) που απαντούν στον μυϊκό ιστό των τροφίμων ζωικής προέλευσης και είναι υπεύθυνα για την εκκίνηση αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης που οδηγούν με την σειρά τους στην παραγωγή δύσοσμων ενώσεων (Yen et al., 2008).

Τα δείγματα A-Θ εμφάνισαν μεγάλη μείωση των τιμών TBARS από τα αρχικά τους επίπεδα την 2^η ημέρα συντήρησης, η οποία έφτασε τα 1.6 mg MDA/Kg. Ωστόσο, στην συνέχεια οι τιμές TBARS άρχισαν να αυξάνονται, καταλήγοντας στα 1.8 mg MDA/Kg την 12^η ημέρα συντήρησης (0.6 mg MDA/Kg μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Patsias et al. (2006) οι οποίοι αναφέρουν ότι οι τιμές TBARS σε προμαγειρεμένο φιλέτο κοτόπουλου που συσκευάστηκε αερόβια, εμφάνισαν ύφεση από τα αρχικά τους επίπεδα τις πρώτες ημέρες συντήρησης, αλλά στη συνέχεια αυξήθηκαν σημαντικά. Επίσης, οι O'Sullivan et al. (2004) αναφέρουν ότι ενώ η τιμή TBARS σε προϊόντα κοτόπουλου (nuggets) που συντηρήθηκαν υπό ψύξη (4 °C) αυξήθηκε από την αρχική τιμή 2.5 σε 12.5 mg MDA/Kg, στην περίπτωση των δειγμάτων που περιείχαν βιταμίνη E και «φυσικά» αντιοξειδωτικά (κατεχίνες, δενδρολίβανο, φασκόμηλο) παρατηρήθηκε σημαντική ύφεση του TBARS κατά την διάρκεια της συντήρησης (9 ημέρες).

Το φαινόμενο της μείωσης των τιμών του TBARS που παρατηρήθηκε στα δείγματα A-Θ, πιθανόν να οφείλεται στο ότι η ύπαρξη αντιοξειδωτικού παράγοντα (θυμαρέλαιο) στην συγκεκριμένη μεταχείριση παρείχε προστασία στο μυϊκό ιστό του κρέατος από φαινόμενα οξείδωσης, με αποτέλεσμα οι τιμές να διατηρούνται σε χαμηλά επίπεδα. Η απουσία αντίστοιχου αντιοξειδωτικού παράγοντα στα δείγματα του μάρτυρα (A) οδήγησε σε αυξημένες τιμές TBARS, εφόσον δεν υπήρχε τρόπος να αποφευχθούν οξειδωτικά

φαινόμενα. Μια λύση για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου προβλήματος θα μπορούσε να αποτελέσει η προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα όπως το BHT (Butylated Hydroxy Toluene) στο αρχικό στάδιο της προετοιμασίας των δειγμάτων για την απομόνωση των TBARS ενώσεων. Επιπλέον, θα ήταν χρήσιμο να περιορίζεται στο ελάχιστο ο τεμαχισμός του κρέατος κατά την δειγματοληψία, εφόσον η μεταλλική επιφάνεια των εργαλείων τεμαχισμού αλληλεπιδρά με τον μυϊκό ιστό, καταλύοντας φαινόμενα αυτοξειδωσης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η παρατηρούμενη μείωση των τιμών TBARS μπορεί να οφείλεται εκτός των άλλων και στους παρακάτω λόγους:

- Οξείδωση των TBARS ουσιών (κυρίως της μηλονικής διαλδεύδης, MDA) σε άλλες οργανικές ενώσεις (π.χ. αλκοόλες, οργανικά οξέα, αλδεύδες) που δεν μπορούν να ανιχνευθούν από το τεστ TBA (Georgantelis et al. 2007).
- Δέσμευση των TBARS ουσιών (κυρίως της MDA) με αμινοξέα, πρωτεΐνες, γλυκογόνο και άλλα συστατικά των τροφίμων, η οποία μειώνει την απορρόφηση TBARS ενώσεων στα 532 nm (Fernandez et al., 1997).

Συνολικά, τα δείγματα A-Θ είχαν κατά 0.6-0.7 mg MDA/Kg, σε σχέση με τον μάρτυρα, μεταξύ της 4ης και 10^{ης} ημέρας συντήρησης ($p < 0.05$). Γενικά, το θυμαρέλαιο εμφάνισε καλύτερη αντιοξειδωτική δράση από την χιτοζάνη, εφόσον οι τιμές TBARS των δειγμάτων A-Θ κυμανθήκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από τις αντίστοιχες των δειγμάτων A-X, κατά την διάρκεια της συντήρησης. Η διατήρηση των τιμών TBARS σε χαμηλά επίπεδα σε σχέση με τον μάρτυρα, οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών του θυμαρέλαιου, και ιδιαίτερα στην θυμόλη και την καρβακρόλη.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η θυμόλη έχει εμφανίσει καλύτερες αντιοξειδωτικές ιδιότητες από την καρβακρόλη σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε *in vitro* (Yanishlieva et al., 1999). Οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες του θυμαρέλαιου όπως το γ-τερπινένιο, κατέχουν επίσης αντιοξειδωτικές ιδιότητες, οι οποίες οφείλονται στην ενεργές μεθυλενικές τους ομάδες είναι όμως ασθενέστερες από τις αντίστοιχες των οξυγονούχων μονοτερπενίων (Tere et al., 2005). Η αντιοξειδωτική δράση των οξυγονούχων φαινολικών συστατικών του θυμαρέλαιου οφείλεται στην δομή τους, η οποία συνδυάζει την ύπαρξη αρωματικού χαρακτήρα με την παρουσία υδροξυλομάδας (Farag et al., 1989). Κατά την αποβολή του πρωτονίου H^+ από την υδροξυλομάδα του φαινολικού δακτυλίου (ArOH) δημιουργείται μια ελεύθερη ρίζα $ArO\cdot$ η οποία σταθεροποιείται μέσω συντονισμού (απεντοπισμός ηλεκτρονίων) και δρα ως δεσμευτής των ελεύθερων ιόντων μετάλλων (π/χ. ιόντα σιδήρου

και χαλκού) που καταλύουν τις αντιδράσεις οξειδωσης στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης ή απενεργοποιεί τα ενζυμικά συστήματα που είναι υπεύθυνα για την εκκίνηση οξειδωτικών αντιδράσεων (Viuda-Martos et al., 2010).

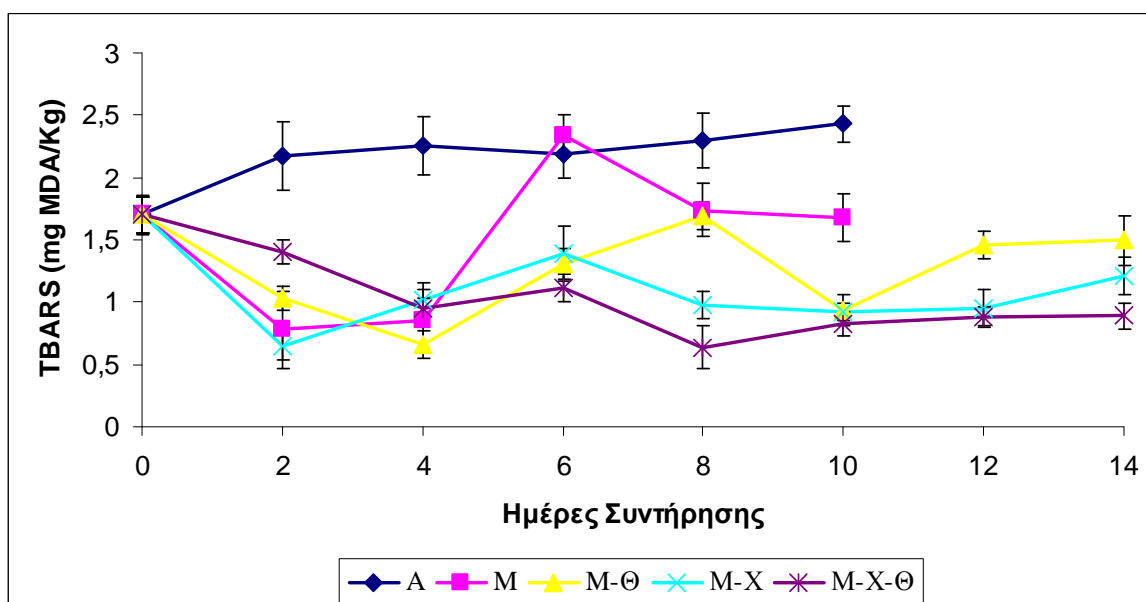
Η αντιοξειδωτική δράση της θυμόλης και καρβακρόλης επιβεβαιώνεται και από τους Mahmoud et al. (2006) οι οποίοι αναφέρουν ότι η εμφύσηση φιλέτων κυπρίνου σε διάλυμα καρβακρόλης και θυμόλης 1% είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των τιμών TBA σε σχέση με τον μάρτυρα. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Kykkidou et al. (2009) κατά την συντήρηση ξιφία σε αερόβια ή MAP συσκευασία με την προσθήκη θυμαρέλαιου. Επίσης, οι Fasseas et al. (2007) αναφέρουν ότι προϊόντα κρέατος στα οποία προστέθηκε ριγανέλαιο υψηλής περιεκτικότητας σε θυμόλη (60%) εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές TBA σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 4 °C. Τέλος, οι Paravergou et al. (1994) αναφέρουν ότι η προσθήκη αποξηραμένης ρίγανης σε σάρκα ωμού ψαριού είχε ως αποτέλεσμα την διατήρηση των τιμών TBA σε πολύ χαμηλά επίπεδα (<2.5 mg MDA/Kg για διάστημα 15 ημερών, ενώ ο μάρτυρας επέδειξε τιμές TBA της τάξης των 25 mg MDA/Kg στο ίδιο χρονικό διάστημα).

Οι τιμές TBARS στα δείγματα A-X-Θ εμφάνισαν υψηλή διακύμανση κατά την διάρκεια συντήρησης του προϊόντος. Όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των δειγμάτων A-Θ, οι τιμές TBARS μειώθηκαν από την αρχική τους τιμή την 2^η ημέρα συντήρησης, και στη συνέχεια παρέμειναν σε χαμηλά επίπεδα έως την 12^η ημέρα συντήρησης (περίπου 1.5 mg/Kg). Τα δείγματα A-X-Θ είχαν κατά 1.0 mg MDA/Kg χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τον μάρτυρα ($p<0.05$), υποδεικνύοντας καλύτερη αντιοξειδωτική δράση των δυο φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων όταν χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό. Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έρχονται σε συμφωνία με τους Georgantelis et al. (2007), οι οποίοι αναφέρουν ότι μπιφτέκια στα οποία είχε προστεθεί χιτοζάνη σε συνδυασμό με δενδρολίβανο, παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές TBA από ότι τα αντίστοιχα που περιείχαν χιτοζάνη ή δενδρολίβανο ξεχωριστά. Επίσης, οι Ojagh et al. (2010) αναφέρουν ότι δείγματα πέστροφας που εμφύσηστηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης 2.0% w/v εμπλουτισμένο με έλαιο κανέλας 1.5% v/v, επέδειξαν χαμηλότερες τιμές TBA από τα αντίστοιχα που εμφύσηστηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης χωρίς το αιθέριο έλαιο.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.2.1(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή των τιμών TBARS στα δείγματα από σουβλάκι κοτόπουλο που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με ή χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.1(β)**, όλα τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα παρουσίασαν μείωση των τιμών TBARS κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Patsias et al. (2006) οι οποίοι αναφέρουν ότι οι τιμές TBARS σε προμαγειρεμένο φιλέτο από κοτόπουλο που συσκευάστηκε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, επέδειξαν πτωτική τάση κατά την συντήρηση στους 4 °C για 20 ημέρες. Η παρατηρούμενη μείωση πιθανόν να οφείλεται στους λόγους που προαναφέρθηκαν και για την περίπτωση των δειγμάτων Α-Θ, τα οποία παρουσίασαν ανάλογη συμπεριφορά (παράγραφος-γράφημα **3.2.1.α**).



Γράφημα 3.2.1(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή των τιμών TBARS στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C): A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Τα δείγματα M έως την 4^η ημέρα συντήρησης είχαν χαμηλότερες τιμές από τα δείγματα του μάρτυρα, ενώ την ίδια ημέρα δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές

μεταξύ των τιμών TBARS των δειγμάτων M, M-X, M-Θ και M-X-Θ ($p>0.05$). Οι μειωμένες τιμές TBARS στα δείγματα M σε σχέση με τον μάρτυρα πιθανόν να οφείλεται στο ότι η παρουσία ατμοσφαιρικού οξυγόνου στα δείγματα A ευνοεί την οξείδωση του λίπους (Berruga et al. 2005). Ωστόσο, την 6^η ημέρα συντήρησης οι τιμές TBARS των δειγμάτων M αυξήθηκαν, και κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα με τα δείγματα και A ($p<0.05$). Η παρατηρούμενη αύξηση των τιμών TBARS στα δείγματα M, ίσως να οφείλεται στην παρουσία χαμηλών επιπέδων οξυγόνου στην συσκευασία, μια και έχει αναφερθεί ότι κατά την συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα συχνά παραμένει εντός μικρή ποσότητα ατμοσφαιρικού οξυγόνου συγκέντρωσης 0-2% v/v, που είναι αρκετή να προκαλέσει οξείδωση του λίπους σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης (Smiddy et al., 2002; Berruga et al., 2005). Μετά την 6^η ημέρα συντήρησης ακολούθησε εκ νέου μείωση των τιμών TBARS στα δείγματα M, η οποία πιθανόν να οφείλεται σε αποικοδόμηση της MDA από μικροοργανισμούς όπως τα εντεροβακτηριοειδή και οι ψευδομονάδες (χρησιμοποιούν τον οργανικό άνθρακα της TBARS ένωσης MDA για τον μεταβολισμό τους) ή σε περαιτέρω αναγωγή ή οξείδωση της MDA σε άλλες οργανικές ενώσεις (π.χ. αλκοόλες, οργανικά οξέα, αλδεϋδες) που δεν μπορούν να ανιχνευθούν από το τεστ TBA (Georgantelis et al. 2007).

Τα δείγματα M-Θ και M-X είχαν στατιστικά χαμηλότερες τιμές TBARS από τα δείγματα του μάρτυρα κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p<0.05$). Συνολικά, η μείωση των τιμών TBARS στα δείγματα M-Θ κυμάνθηκε στα 0.6-1.6 mg MDA/Kg κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, και ήταν υψηλότερης τάξης από την αντίστοιχη των δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε αερόβια συσκευασία A-Θ, υποδεικνύοντας συνεργιστική αντιοξειδωτική δράση μεταξύ MAP και θυμαρέλαιου. Η συνεργιστική δράση μεταξύ MAP και αιθέριων ελαίων για την μείωση της οξείδωσης του λίπους έχει παρατηρηθεί και από τους Kykkidou et al. (2009), με τους οποίους, οι τιμές TBA κατά την συσκευασία φιλέτων ξιφία σε MAP με την προσθήκη θυμαρέλαιου ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε αερόβια συσκευασία με θυμαρέλαιο, στο τέλος της περιόδου συντήρησης (4 °C). Παρομοίως, η MAP σε συνδυασμό με χιτοζάνη, μείωσε τις τιμές TBARS κατά 0.8-1.5 mg MDA/Kg σε σχέση με τον μάρτυρα ($p<0.05$). Επίσης, οι τιμές TBARS στα δείγματα M-X ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των δειγμάτων A-X ($p<0.05$) κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Οι Jo et al. (2001) αναφέρουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ολιγομερούς της χιτοζάνης 0.2% σε λουκάνικα που συσκευάστηκαν αερόβια ή σε VP. Επίσης, σύμφωνα με τους Yinyuad et al. (2006), η

συνδυαστική χρήση VP και χιτοζάνης 2.5% για την συντήρηση ψητού χοιρινού επέδειξε καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από την χρήση συσκευασίας κενού χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης. Τέλος, οι Duan et al. αναφέρουν ότι ο συνδυασμός χιτοζάνης και συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας/κενού για την συντήρηση φιλέτων ψαριού οδήγησε σε χαμηλότερες τιμές TBA κατά 4.5 mg MDA/Kg, σε σχέση με τον μάρτυρα κατά την συντήρηση μαγειρεμένων φιλέτων ψαριού για 14 ημέρες.

Τα δείγματα M-X-Θ παρουσίασαν ανάλογες τιμές TBARS με τα δείγματα M-X και M-Θ, έως την 6^η ημέρα συντήρησης ($p>0.05$). Ωστόσο από την 6^η ημέρα και έπειτα, παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές TBARS σε σχέση με δείγματα M-Θ και M-X ($p<0.05$). Συνολικά, τα δείγματα M-X-Θ μείωσαν τις τιμές TBA κατά 1.0-2.0 mg MDA/Kg σε σχέση με τον μάρτυρα και τα δείγματα M. Σύμφωνα με τους Kanatt et al. (2008) η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και μέντας για την συντήρηση προϊόντος από χοιρινό κρέας (cocktail salami) διατήρησε τις τιμές TBA στα αρχικά επίπεδα. Επίσης, οι Georgantelis et al. (2007) αναφέρουν ότι η χιτοζάνη έδρασε συνεργιστικά με το δενδρολίβανο για την παρεμπόδιση της οξειδωσης του λίπους όταν προστέθηκαν σε λουκάνικα από χοιρινό κρέας (για 20 ημέρες στους 4 °C).

3.2.2. Μεταβολή του χρώματος

Η μεταβολή του χρώματος κατά την συντήρηση προϊόντων κρέατος αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για την αποδοχή τους από τους καταναλωτές, εφόσον το κριτήριο του χρώματος χρησιμοποιείται συχνά ως ένδειξη φρεσκότητας ενός προϊόντος (Mancini & Hunt, 2005). Κατά την μελέτη της μεταβολής του χρώματος του προϊόντος προσδιορίστηκαν οι χρωματικοί παράμετροι της φωτεινότητας (L^*), της ερυθρότητας (a^*) και της κίτρινης απόχρωσης (b^*). Επίσης υπολογίστηκε η συνολική μεταβολή του χρώματος (DE^*), η μεταβολή της έντασης του χρώματος (παράγοντας *Chroma*).

3.2.2.1. Μεταβολή της φωτεινότητας (L^*), ερυθρότητας (a^*), κίτρινης απόχρωσης (b^*), έντασης του χρώματος (*Chroma*).

Η μεταβολή των τιμών L^* , a^* , b^* και *Chroma* παρουσιάζεται στους Πίνακες 1(α) και 1(β).

Πίνακας 1(α): Μεταβολή των παραμέτρων του χρώματος L^* (φωτεινότητα), a^* (ερυθρότητα), b^* (κίτρινη απόχρωση), *Chroma* (μεταβολή έντασης χρώματος) κατά την συντήρηση του προϊόντος (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X= δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ= δείγμα με τον συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Μεταχείριση	Ημέρες Συντήρησης														
	0	SD	2	SD	4	SD	6	SD	8	SD	10	SD	12	SD	
A	L^*	48,71	0,25	46,33	0,21	46,66	0,96	46,29	1,06	44,52	0,98	40,23	1,13	40,09	1,18
	a^*	7,76	1,13	7	0,59	7,78	0,5	8,51	0,34	8,81	0,52	7,72	1,12	6,78	0,19
	b^*	8,54	1,08	9,4	0,59	9,76	0,36	7,16	0,19	8,5	1,12	8,12	1,15	7,49	0,9
	<i>Chroma</i>	11,5		11,7		12,5		11,13		12,2		11,2		10,1	
A-Θ	L^*			44,73	0,67	46,42	0,75	47,55	1,5	43,37	0,69	44,6	0,70	41,3	1,43
	a^*			9,7	1,19	8,56	0,94	8,71	1,75	8,85	1,09	8,86	1,02	8,85	1,11
	b^*			9,13	0,73	8,46	0,44	6,44	1,57	9,12	0,54	9,13	0,68	9,23	0,48
	<i>Chroma</i>			14		12,73		13,4		13,3		13,21		13,16	
A-X	L^*			45,98	0,40	43,15	0,38	44,42	1,1	44,47	0,8	44,6	0,62	44,9	1,12
	a^*			7,94	0,27	9,09	0,65	8,17	0,76	8,88	1,35	8,89	0,46	8,9	1,24
	b^*			8,24	0,42	8,48	0,25	9,23	0,24	8,7	0,22	8,5	0,42	8,6	0,65
	<i>Chroma</i>			11,4		12,4		12,3		12,4		12,3		12,4	
A-X-Θ	L^*			47,99		47,52		48,56		47,4		46,8		44,18	1,15
	a^*			8,01		6,72		7,44		7,2		7,23		7,25	0,8
	b^*			10,37		10,34		9,5		8,44		8,76		8,8	0,64

Πίνακας 1(β): Μεταβολή των παραμέτρων του χρώματος L^* (φωτεινότητα), a^* (ερυθρότητα), b^* (κίτρινη απόχρωση), *Chroma* (μεταβολή έντασης χρώματος) κατά την συντήρηση του προϊόντος (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C). A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Μεταχείριση	Ημέρες Συντήρησης																
	0	2	4	6	8	10	12	14	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	
A	L*	48,71	46,33	46,66	0,96	46,29	1,06	44,52	0,98	40,23	1,13	40,09	1,18	40,2	1,22		
	a*	7,76	1,13	7,0	0,59	7,78	0,5	8,51	0,34	8,81	0,52	7,72	1,12	6,78	0,19	6,55	0,55
	b*	8,54	1,08	9,4	0,59	9,76	0,36	7,16	0,19	8,5	1,12	8,12	1,15	7,49	0,9	7,15	0,88
M	<i>Chroma</i>	11,5	11,7	12,5		11,13		12,2		11,2		10,1		9,70			
	L*		43,31	45,3	0,35	40,87	1,8	44,10	0,49	40,25	0,59	40,1	1,13	38,5	1,24		
	a*		9,2	1,28	7,53	0,84	8,65	1,55	9,95	1,17	7,89	1,12	6,63	1,17	6,52	0,75	
M-Θ	b*		9,13	0,43	8,46	0,34	6,44	1,67	9,12	0,3	9,13	0,4	9,23	0,58	9,2	0,66	
	<i>Chroma</i>		13,0	11,3		10,8		13,5		12,1		11,3		11,3			
	L*		47,53	0,42	47,21	0,38	47,91	1,1	47,33	0,8	40,64	0,62	42,3	1,12	42,08	1,18	
M-X	a*		8,1	0,37	7,11	0,75	6,88	0,76	7,7	1,35	10,25	0,46	10,36	1,24	9,97	0,55	
	b*		9,11	0,14	9,71	0,35	10,04	0,43	8,34	0,19	9,58	0,2	10,25	0,55	10,2	0,42	
	<i>Chroma</i>		12,2	12,0		12,2		11,3		14,2		14,3		14,3		14,3	14,3
M-X-Θ	L*		48,88	0,21	48,22	0,21	48,04	1,09	47,82	0,19	43,16	0,59	43,10	0,62	43,11	1,08	
	a*		8,22	0,36	7,16	0,52	8,21	0,4	8,19	0,42	9,88	0,37	10,26	0,41	9,82	0,13	
	b*		9,17	0,12	9,26	0,2	8,18	0,24	9,97	0,21	8,17	0,21	8,65	0,25	8,88	0,26	
M-X-Θ	<i>Chroma</i>		12,3	11,7		11,6		12,9		12,8		13,4		13,2			
	L*		47,13	0,59	43,36	0,02	46,97	0,33	45,64	0,37	45,51	0,41	44,95	0,16	45,12	0,65	
	a*		7,83	0,57	8,41	0,37	7,93	0,34	8,63	0,79	8,5	0,76	8,12	0,71	8,34	0,37	
M-X-Θ	b*		9,33	0,12	7,89	0,1	8,81	0,23	7,9	0,26	8,9	0,55	9,87	0,1	10,2	0,45	
	<i>Chroma</i>		12,2	11,5		11,9		11,7		12,3		12,8		13,4			

Στον **Πίνακα 1(α)** παρουσιάζεται η μεταβολή των τιμών L^* , a^* , b^* και *Chroma* (μεταβολή έντασης χρώματος) στα δείγματα του προϊόντος που συσκευάστηκαν αερόβια, με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου ή/και χιτοζάνης, κατά την διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη. Η μεταβολή της χρωματικής παραμέτρου L^* , εκφράζει κατά πόσο αυξάνεται ή μειώνεται η φωτεινότητα της επιφάνειας του προϊόντος κατά την συντήρηση. Οι τιμές της φωτεινότητας L^* στα δείγματα του μάρτυρα (A) ξεκινώντας από την τιμή 48.7 μειώθηκαν προοδευτικά κατά την διάρκεια συντήρησης, φτάνοντας την τιμή 40.2 και 40.1, την 10^η και 12^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα ($p < 0.05$). Το γεγονός ότι η τιμή της χρωματικής παραμέτρου L^* μειώθηκε κατά περισσότερο από 5 μονάδες, είναι σημαντικό, εφόσον σύμφωνα με τους Seydim et al. (2006), αύξηση αυτού του μεγέθους οδηγεί σε χρωματική διαφορά του προϊόντος που γίνεται αντιληπτή από τον καταναλωτή. Επιπλέον, σύμφωνα με τους McDougall et al. (1982) οι μεταβολές στις τιμές L^* αποδίδονται σε αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στην δομή του κρέατος κατά την συντήρηση, και ιδιαίτερα στην μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Chouliara et al. (2007) οι οποίοι αναφέρουν μείωση των τιμών της φωτεινότητας σε φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκε αερόβια στους 4 °C (από 49.5 σε 45.9 την 12^η ημέρα συντήρησης). Επιπρόσθετα, τα δείγματα A-Θ παρουσίασαν ανάλογες τιμές L^* με τα δείγματα του μάρτυρα ($p > 0.05$), υποδεικνύοντας ότι το θυμαρέλαιο δεν άσκησε σημαντική επίδραση (θετική ή αρνητική) στην φωτεινότητα του προϊόντος. Από την 2^η και έως την 10^η ημέρα της περιόδου συντήρησης, τα δείγματα A-X-Θ παρουσίασαν τις μεγαλύτερες τιμές L^* σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα (7 μονάδες διαφορά την 10^η ημέρα συντήρησης σε σχέση με τον μάρτυρα), υποδεικνύοντας ότι η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης ήταν η πιο αποτελεσματική για την διατήρηση της φωτεινότητας του προϊόντος. Ωστόσο, την 12^η ημέρα τα δείγματα A-X και A-X-Θ είχαν παρόμοιες τιμές L^* ($p > 0.05$).

Όπως επίσης παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1(α)**, η αρχική τιμή της ερυθρότητας στα δείγματα του μάρτυρα ήταν 7.8 και αυξήθηκε στην τιμή 8.8 την 8^η ημέρα συντήρησης (μέγιστη τιμή). Στην συνέχεια και έως την 12^η ημέρα συντήρησης, η ερυθρότητα μειώθηκε στην τιμή 7.0. Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και από τους Chouliara et al. (2007), σύμφωνα με τους οποίους, οι τιμές a^* σε φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκε αερόβια παρουσίασαν αύξηση έως την 12^η ημέρα συντήρησης (από 3.30 σε 6.05), ενώ στην συνέχεια μειώθηκαν στην τιμή 3.62 την 25^η ημέρα συντήρησης. Επίσης, οι Keokamnerd et

al. (2008) αναφέρουν ότι η ερυθρότητα προϊόντος από μπούτι κοτόπουλο, αυξήθηκε ελαφρώς από την αρχική τιμή 10.6 σε 11.1, αλλά στην συνέχεια της περιόδου συντήρησης μειώθηκε σημαντικά στην τιμή 5.3 (12^η ημέρα συντήρησης). Η αύξηση των τιμών της ερυθρότητας στα δείγματα του μάρτυρα μεταξύ 4^{ης}-8^{ης} ημέρας οφείλεται στο ότι κατά την συσκευασία προϊόντων κρέατος σε συσκευασία με υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (αερόβια συσκευασία), η μυοσφαιρίνη (πρωτεΐνη του μυός) στην οποία οφείλεται το επιθυμητό ερυθρωπό χρώμα της επιφάνειας του κοτόπουλου) οξυγονώνεται σε οξυμυοσφαιρίνη η οποία αποδίδει έντονο ερυθρωπό χρωματισμό στην επιφάνεια των πουλερικών (Seydim et al., 2006). Ωστόσο, με την πάροδο των ημερών συντήρησης η συνεχής κατανάλωση του οξυγόνου από την μικροβιακή χλωρίδα οδηγεί σε μείωση της σχετικής πίεσης και διείσδυση του οξυγόνου στο εσωτερικό του μυϊκού ιστού. Οι συνθήκες αυτές (σχετική πίεση 4 mm Hg) ευνοούν τον σχηματισμό της καφέ μεταμυοσφαιρίνης με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυσχρωμίας στην επιφάνεια του προϊόντος και την μείωση της ερυθρότητας (Berruga et al., 2005, Seydim et al., 2006), κάτι το οποίο παρατηρήθηκε μετά την 8^η ημέρα συντήρησης στα δείγματα του μάρτυρα (a^* = 8.8 και 7.7 την 8^η και 10^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα). Τα δείγματα A-X και A-Θ εμφάνισαν αυξημένες τιμές ερυθρότητας κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος, οι οποίες ωστόσο δεν διέφεραν σημαντικά σε σχέση με τις αντίστοιχες του μάρτυρα, έως την 8^η ημέρα συντήρησης ($p>0.05$). Ωστόσο, από την 8^η ημέρα και μετά οι τιμές a^* στα δείγματα A-X και A-Θ διατηρήθηκαν σε σταθερά επίπεδα, χωρίς να παρουσιάζουν μείωση όπως παρατηρήθηκε στα δείγματα A. Στα δείγματα A-X-Θ οι τιμές a^* δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου υποδεικνύοντας ότι η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και θυμαρέλαιου δεν αύξησε την τιμή της ερυθρότητας όπως παρατηρήθηκε στα δείγματα A-X και A-Θ, αλλά την διατήρησε κοντά στα αρχικά της επίπεδα ($p>0.05$).

Όσον αφορά την μεταβολή των τιμών b^* , η αρχική τιμή της κίτρινης απόχρωσης ήταν 8.54, και κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης παρουσίασε διακυμάνσεις στα δείγματα του μάρτυρα. Συγκεκριμένα, στα δείγματα A οι τιμές b^* παρουσίασαν μικρή αύξηση τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης, ενώ στην συνέχεια ακολούθησαν πτωτική τάση. Αντιστοίχως, οι Seydim et al. (2006) αναφέρουν μείωση της τιμής της κίτρινης απόχρωσης κατά την συντήρηση προϊόντος πουλερικών (στρουθοκάμηλο) σε αερόβια συσκευασία ή σε συσκευασία υψηλή περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Τα δείγματα A-X παρουσίασαν την μεγαλύτερη συνολικά αύξηση των τιμών της κίτρινης απόχρωσης κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, ενώ στα δείγματα A-X-Θ η αύξηση των τιμών b^* ήταν πιο

εμφανής τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης καθώς στη συνέχεια κυμάνθηκε σε τιμές ανάλογες με εκείνες των πρώτων ημερών συντήρησης. Τα δείγματα A-X διατήρησαν την κίτρινη απόχρωση στα αρχικά της επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια συντήρησης του προϊόντος.

Τέλος, η μεταβολή της έντασης του χρώματος (*Chroma*) παρουσίασε μεγάλη διακύμανση στην περίπτωση των δειγμάτων του μάρτυρα. Ωστόσο, σε μια δεδομένη ημέρα συντήρησης (π.χ. 8^η ημέρα) τα δείγματα A, A-X και A-X-Θ επέδειξαν τις χαμηλότερες τιμές του παράγοντα *Chroma*, ενώ τα δείγματα A-Θ τις μεγαλύτερες. Μάλιστα, τα δείγματα A-Θ διατήρησαν τις μεγαλύτερες τιμές του παράγοντα *Chroma* καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη του θυμαρέλαιου είχε θετική επίδραση στην διατήρηση της έντασης του χρώματος του προϊόντος. Αντίθετα, η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης δεν είχε τόσο έντονη επίδραση στην διατήρηση του παράγοντα *Chroma*, εφόσον παρουσίασε χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τα δείγματα A-X και A-Θ.

Στον **Πίνακα 1(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή των τιμών L^* , a^* , b^* και *Chroma* (μεταβολή έντασης χρώματος) στα δείγματα του προϊόντος που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου ή/και χιτοζάνης, κατά την διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη. Όπως και στην περίπτωση των δειγμάτων που συσκευάστηκαν αερόβια, η φωτεινότητα των δειγμάτων M παρουσίασε πτωτική τάση, κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Τα δείγματα που συσκευάστηκαν με την προσθήκη χιτοζάνης (M-X και M-X-Θ) επέδειξαν υψηλότερες τιμές L^* , σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, κατά τη διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p < 0.05$), υποδεικνύοντας ότι η παρουσία της χιτοζάνης διατήρησε την φωτεινότητα του προϊόντος σε υψηλά επίπεδα κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος στη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Ωστόσο, στην βιβλιογραφία αναφέρονται αντιφατικά αποτελέσματα σε σχέση με την επίδραση της χιτοζάνης στην διατήρηση της φωτεινότητας σε προϊόντα κρέατος. Συγκεκριμένα, οι Jo et al. (2001) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης σε λουκάνικα οδήγησε σε αύξηση της φωτεινότητας σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα, ενώ οι Darmadji & Izumimoto (1994) και Georgantelis et al. (2007) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης κατά την συντήρηση προϊόντων κρέατος μείωσε την φωτεινότητα σε σχέση με τον μάρτυρα.

Στον ίδιο **Πίνακα 1(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή των τιμών της ερυθρότητας a^* στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με ή χωρίς την προσθήκη

αντιμικροβιακών παραγόντων. Σύμφωνα με τις τιμές a^* , όλα τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα παρουσίασαν ανάλογη συμπεριφορά με τα δείγματα του μάρτυρα (A), όσον αφορά την μεταβολή της ερυθρότητας κατά την διάρκεια των πρώτων 8 ημερών συντήρησης του προϊόντος ($p>0.05$), συνεπώς η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας δεν είχε σημαντική επίπτωση στην μεταβολή του χρώματος του προϊόντος, έως τη δεδομένη χρονική στιγμή (πλην την 2^η ημέρα συντήρησης όπου τα δείγματα M παρουσίασαν σημαντική αύξηση της ερυθρότητας σε τιμή 9.2, για άγνωστο λόγο). Ωστόσο, τα δείγματα M-X και M-Θ από την 8^η και έως την 14^η ημέρα παρουσίασαν σημαντική αύξηση των τιμών της ερυθρότητας σε σχέση με τον μάρτυρα ($p<0.05$), παρουσιάζοντας τελικές τιμές a^* ίσες με 9.97-9.82 (αρχική τιμή 7.8). Επίσης, οι τιμές ερυθρότητας των δειγμάτων M-X-Θ ήταν υψηλότερες από τις αντίστοιχες του μάρτυρα και των δειγμάτων M από την 8-14^η ημέρα συντήρησης, αλλά χαμηλότερες από τις αντίστοιχες των M-X και M-Θ ($p<0.05$). Ωστόσο, στα δείγματα M-X-Θ η μεταβολή των τιμών a^* παρουσίασε την χαμηλότερη διακύμανση, εφόσον η ερυθρότητα διατηρήθηκε σε επίπεδα λίγο πιο υψηλά από αυτά της 0η ημέρας συντήρησης (αύξηση από 7.8 σε 8.34). Σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία, τα αιθέρια έλαια είναι δυνατό να διατηρήσουν την ερυθρότητα των προϊόντων κρέατος σε επιθυμητά επίπεδα, εφόσον είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις οι οποίες ενεργούν ως ενεργά αντιοξειδωτικά στα τρόφιμα, παρεμποδίζοντας την οξείδωση της μυοσφαιρίνης σε μεταμυοσφαιρίνη (Kroll et al., 2001). Επίσης, η χιτοζάνη μπορεί να έχει την ίδια αντιοξειδωτική δράση, εφόσον διαθέτει την ικανότητα, μέσω της δημιουργίας χηλικών συμπλόκων, να δεσμεύει τα ελεύθερα μεταλλικά ιόντα (π.χ. Fe^{2+} Cu^{2+}) του μυϊκού ιστού τα οποία καταλύουν τις διάφορες οξειδωτικές αντιδράσεις στα τρόφιμα. Σύμφωνα με τους Darmadji & Izumimoto (1994), Jo et al. (2001) και Youn et al. (1999), η προσθήκη χιτοζάνης σε προϊόντα κρέατος αύξησε τις τιμές ερυθρότητας κατά την συντήρησή τους υπό ψύξη, ενώ οι Georgantelis et al. (2007) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και δενδρολίβανου για την συντήρηση μπιφτεκιών (υπό κατάψυξη) αύξησε σημαντικά την ερυθρότητά τους, επιδεικνύοντας συνεργιστική δράση.

Τέλος, η κίτρινη απόχρωση παρουσίασε μεγάλη διακύμανση στα δείγματα που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, συνεπώς δεν μπόρεσαν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την συμπεριφορά των τιμών b^* κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Ωστόσο, μπορεί να σημειωθεί ότι παρατηρείται παρόμοια μεταβολή των τιμών b^* μεταξύ των δειγμάτων M και A ($p>0.05$).

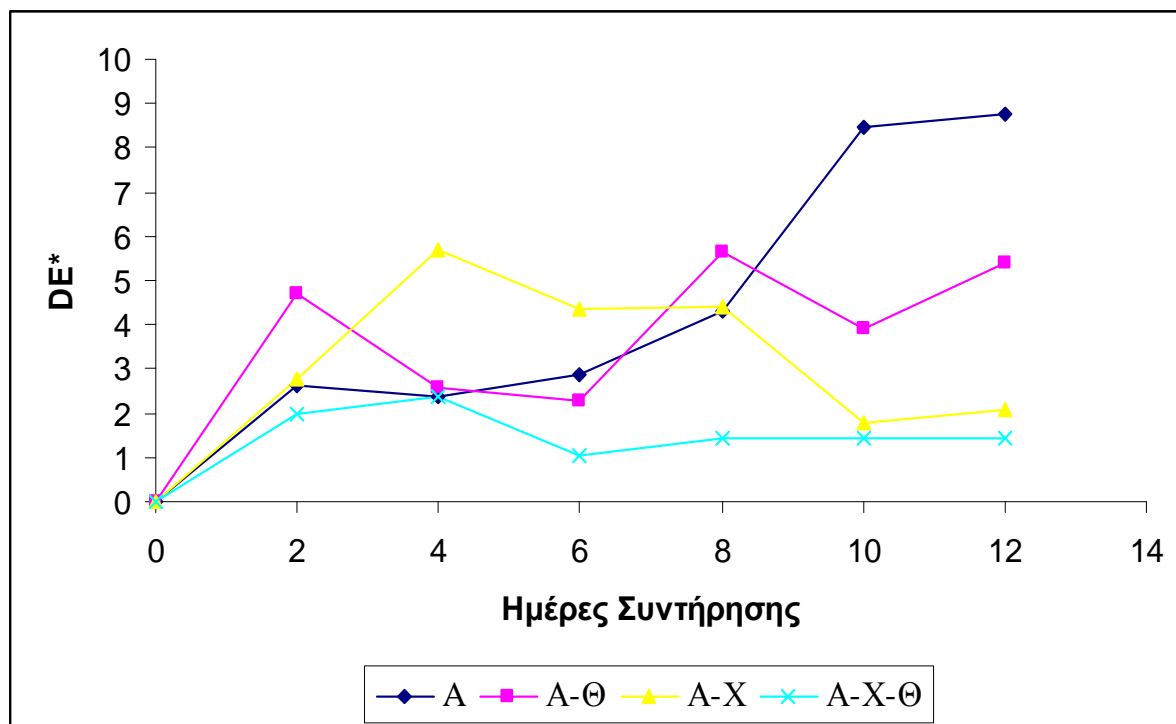
Τις πρώτες 8 ημέρες συντήρησης η μεταβολή της έντασης του χρώματος, που εκφράζει ο παράγοντας *Chroma*, παρουσίασε μεγάλη διακύμανση σε όλα τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Ωστόσο, από την 8η ημέρα και ύστερα, οι διαφορές των τιμών του παράγοντα *Chroma* μεταξύ των μεταχειρίσεων άρχισαν να γίνονται πιο ξεκάθαρες. Συγκεκριμένα, την 12^η ημέρα συντήρησης, τα δείγματα M-Θ είχαν την υψηλότερη μεταβολή της έντασης του χρώματος, με ακόλουθα τα δείγματα M-X και M-X-Θ. Όπως φαίνεται, η θετική επίδραση του θυμαρέλαιου στην διατήρηση της έντασης του χρώματος ήταν εμφανής όχι μόνο στα δείγματα της αερόβιας συσκευασίας αλλά και στα δείγματα της τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Επίσης, αξίζει να τονιστεί ότι τα δείγματα M-X-Θ παρουσίασαν μεγαλύτερες τιμές έντασης χρώματος από τα αντίστοιχα που συσκευάστηκαν αερόβια (A-X-Θ), υποδεικνύοντας ότι η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και θυμαρέλαιου είχε καλύτερο αποτέλεσμα στην διατήρηση της έντασης του χρώματος του προϊόντος, όταν εφαρμόστηκε στην συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

3.2.2.2 Συνολική χρωματική μεταβολή (DE^*)

Η παράμετρος DE^* εκφράζει την συνολική χρωματική αλλαγή του χρώματος μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, εφόσον ουσιαστικά συνδέει την μεταβολή που παρατηρήθηκε στις τρεις μεταβλητές του χρώματος των δειγμάτων (L^* , a^* , b^*) κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης.

α) Αερόβια συσκευασία

Στο **Γράφημα 3.2.2(α)** παρουσιάζεται η συνολική χρωματική μεταβολή (DE^*) κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης των δειγμάτων σε αερόβια συσκευασία με ή χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων.

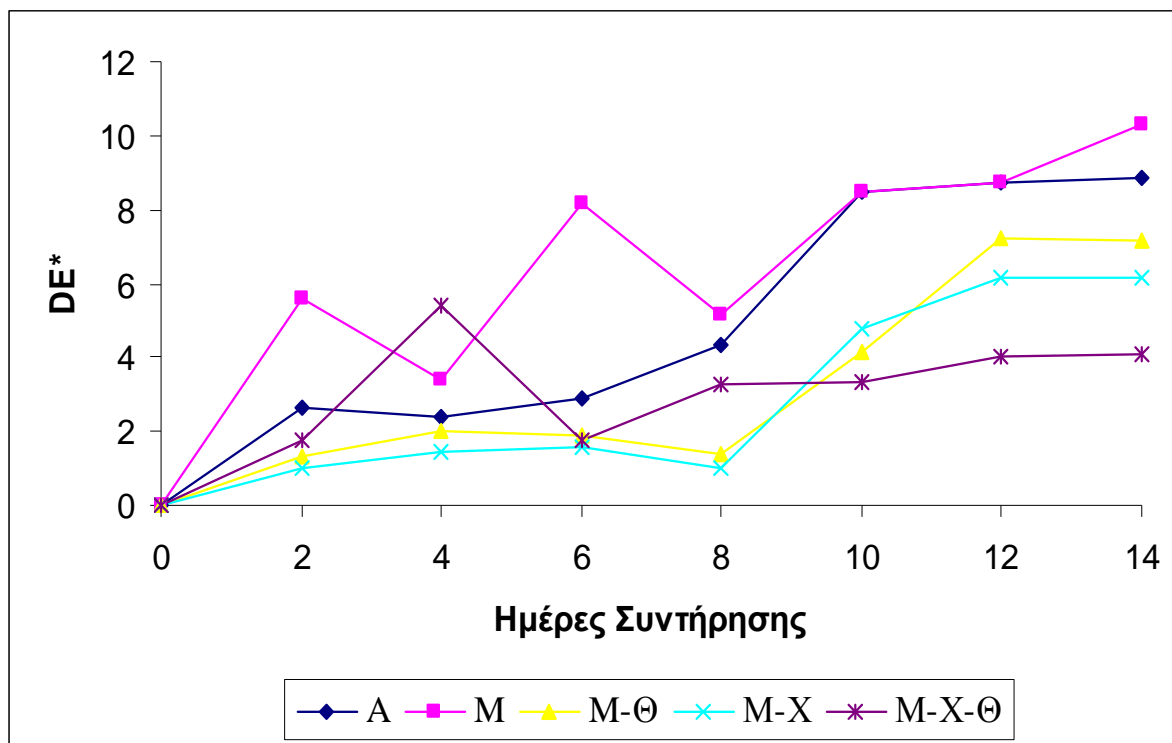


Γράφημα 3.2.2(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην συνολική χρωματική μεταβολή (DE^*) των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X= δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ= δείγμα με το συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.2.2(α)**, από την 0η έως την 6^η ημέρα συντήρησης, τα δείγματα A και A-Θ παρουσίασαν παρόμοιες τιμές DE^* , υποδεικνύοντας ότι έως την δεδομένη στιγμή η προσθήκη θυμαρέλαιου δεν άσκησε επιρροή στην συνολική χρωματική μεταβολή του χρώματος του προϊόντος. Αντίθετα, τα δείγματα A-X είχαν τις υψηλότερες τιμές DE^* σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα κατά την διάρκεια της ίδιας περιόδου. Ωστόσο, από την 9η ημέρα συντήρησης και μετά, τα δείγματα A-X, A-Θ είχαν στατιστικά χαμηλότερες τιμές από τα δείγματα A ($p < 0.05$). Είναι αξιοσημείωτο, ότι τα δείγματα A-X-Θ επέδειξαν τις χαμηλότερες τιμές DE^* σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα που συντηρήθηκαν σε αερόβια συσκευασία ($p < 0.05$), γεγονός που τονίζει ότι ο συνδυασμός θυμαρέλαιου και χιτοζάνης άσκησε την μικρότερη επίπτωση στην μεταβολή των χρωματικών παραμέτρων του προϊόντος κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.2.2(β)** παρουσιάζεται η συνολική χρωματική μεταβολή (DE^*) κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης των δειγμάτων σε αερόβια συσκευασία με ή χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων.



Γράφημα 3.2.2(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην συνολική χρωματική μεταβολή (DE^*) των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C): A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/θυμαρέλαιου.

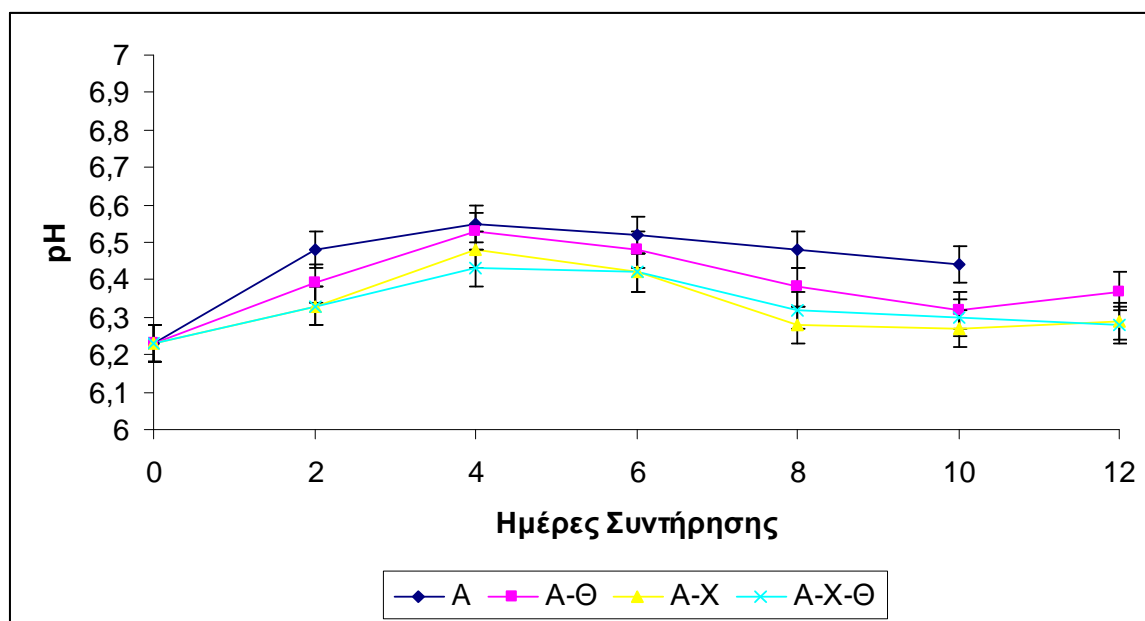
Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.2(β)**, τα δείγματα M και A παρουσίασαν την μεγαλύτερη συνολική χρωματική μεταβολή DE^* σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα ($p > 0.05$). Τα δείγματα M-X και M-Θ είχαν στατιστικά χαμηλότερες τιμές DE^* σε σχέση με τα δείγματα A και M καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι διαφορά τιμών DE^* μεταξύ των δειγμάτων M-X, M-Θ και A, M ήταν πιο εμφανής τις πρώτες 8 ημέρες συντήρησης, εφόσον από εκείνη τη μέρα και μετά, η συνολική χρωματική μεταβολή των πρώτων ακολούθησε γρηγορότερο ρυθμό αύξησης.

Από την άλλη πλευρά, η συνολική χρωματική μεταβολή DE^* ακολούθησε πιο ήπια διακύμανση, καταλήγοντας σε χαμηλότερες τιμές την 14^η ημέρα συντήρησης, σε σχέση με τα δείγματα M-X και M-Θ. Συνολικά, η χρήση θυμαρέλαιου ή χιτοζάνης σε συνδυασμό με MAP διατήρησαν την συνολική χρωματική μεταβολή σε πολύ χαμηλά επίπεδα έως την 8^η ημέρα συντήρησης, ενώ όταν συνδυάστηκαν (M-X-Θ) η δράση αυτή διατηρήθηκε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη οι Duan et al. (2010) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση διαλύματος χιτοζάνης (3% w/v), krill-oil (20% w/w χιτοζάνης), έλαιο κανέλλας (0.1 μL/mL) και MAP/VP για την συσκευασία φρέσκου φιλέτου ψαριού (lingcod), διατήρησε το χρώμα των φιλέτων κατά την συντήρηση στους 2 °C για 21 ημέρες.

3.2.3 Μεταβολή του pH.

Στα Γραφήματα 3.2.3(α) και 3.2.3(β) παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά την συντήρηση του προϊόντος σε α) αερόβια συσκευασία ή β) MAP με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου/χιτοζάνης.

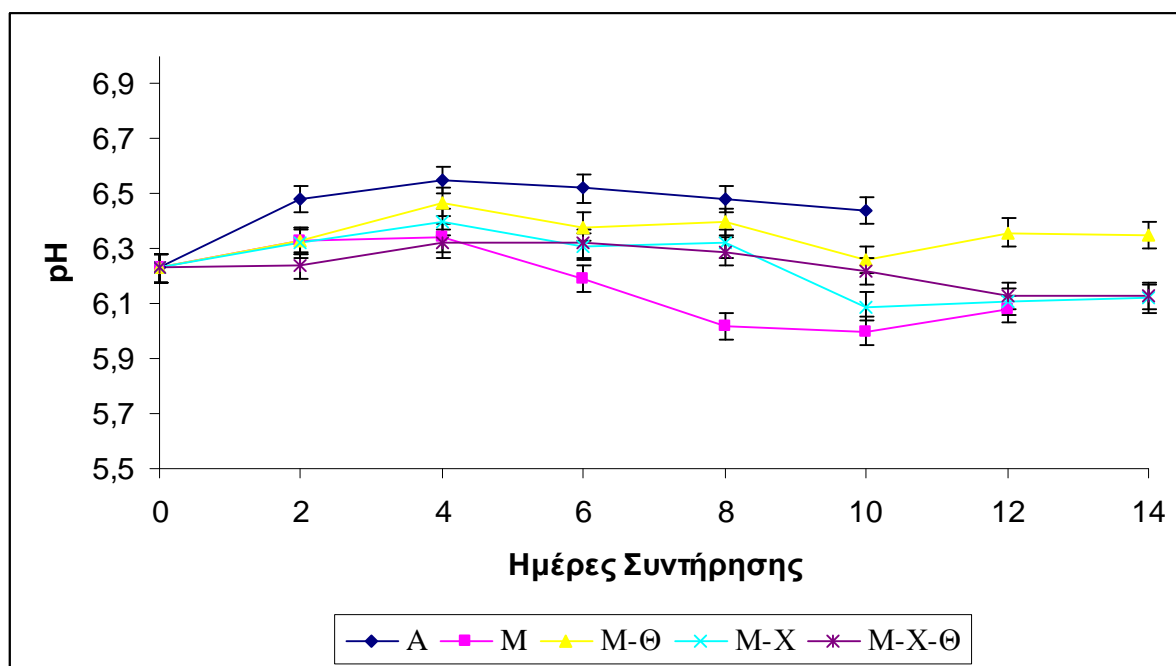
β) Αερόβια συσκευασία



Γράφημα 3.2.3(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή του pH των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X = δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ = δείγμα με τον συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.2.3(α)**, η αρχική τιμή pH του προϊόντος ήταν 6.2, σε συμφωνία με τους Kayisoglou et al. (2003) οι οποίοι αναφέρουν ανάλογη τιμή pH για νωπό σουβλάκι από κοτόπουλο (pH=6.1). Η τιμή του pH αυξήθηκε κατά την διάρκεια των πρώτων 4 ημερών συντήρησης των δειγμάτων, φτάνοντας τα 6.55, 6.53, 6.48 και 6.43 για τα δείγματα A, A-Θ, A-X και A-X-Θ, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολούθησε μείωση των τιμών του pH, με αποτέλεσμα να φτάσουν τα 6.44, 6.32, 6.27 και 6.30, στα δείγματα A, A-Θ, A-X και A-X-Θ, αντίστοιχα την 10^η ημέρα συντήρησης. Γενικά, τα δείγματα A-X και A-X-Θ είχαν χαμηλότερες τιμές pH από τα αντίστοιχα του μάρτυρα ($p < 0.05$), πιθανόν λόγω της παρουσίας της χιτοζάνης η οποία είχε προηγουμένως διαλυθεί σε οξικό οξύ. Οι Georgantelis et al. (2007) αναφέρουν ότι οι τιμές του pH σε λουκάνικα που συντηρήθηκαν στους 4 °C με την προσθήκη χιτοζάνης και θυμαρέλαιου κυμάνθηκαν από 6.2 έως 6.4. Επίσης, σύμφωνα με τους Lin & Chao (2001), η τιμή του pH σε λουκάνικα χαμηλών λιπαρών που περιείχαν χιτοζάνη ήταν 6.35 την 9^η ημέρα συντήρησης και κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα των δειγμάτων του μάρτυρα (pH=6.44).

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας



Γράφημα 3.2.3(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή του pH των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C): A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.2.3(β)**, τα δείγματα Μ επέδειξαν την μεγαλύτερη πτώση του pH σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα ($p < 0.05$) εφόσον έφτασε την τιμή 6.0 την 10^η ημέρα συντήρησης. Η πτώση του pH που παρατηρήθηκε στα δείγματα Μ πιθανόν να οφείλεται στον υψηλό πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων στην μικροχλωρίδα του προϊόντος, όταν αυτό συσκευάστηκε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, τα οποία κατά τον μεταβολισμό τους παράγουν οργανικά οξέα όπως π.χ. γαλακτικό, οξικό και φορμικό οξύ (Pexara et al. 2002), αν και η παραγωγή τους δεν μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Επιπρόσθετα, η πτώση του pH σε προϊόντα κρέατος εξαρτάται και από την διαθεσιμότητα σε μεταβολίσιμα υποστρώματα σακχάρων, όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση σε σάκχαρα, τόσο μεγαλύτερη είναι η αναμενόμενη πτώση του pH (Pexara et al. 2002). Οι τιμές του pH στα δείγματα Μ-Χ και Μ-Χ-Θ κυμάνθηκαν στα χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p < 0.05$), και κυμάνθηκαν μεταξύ 6.1 και 6.3. Οι χαμηλότερες τιμές pH των δειγμάτων Μ-Χ και Μ-Χ-Θ οφείλονται στην παρουσία της χιτοζάνης, όπως προαναφέρθηκε και στην περίπτωση των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε αερόβια συσκευασία.

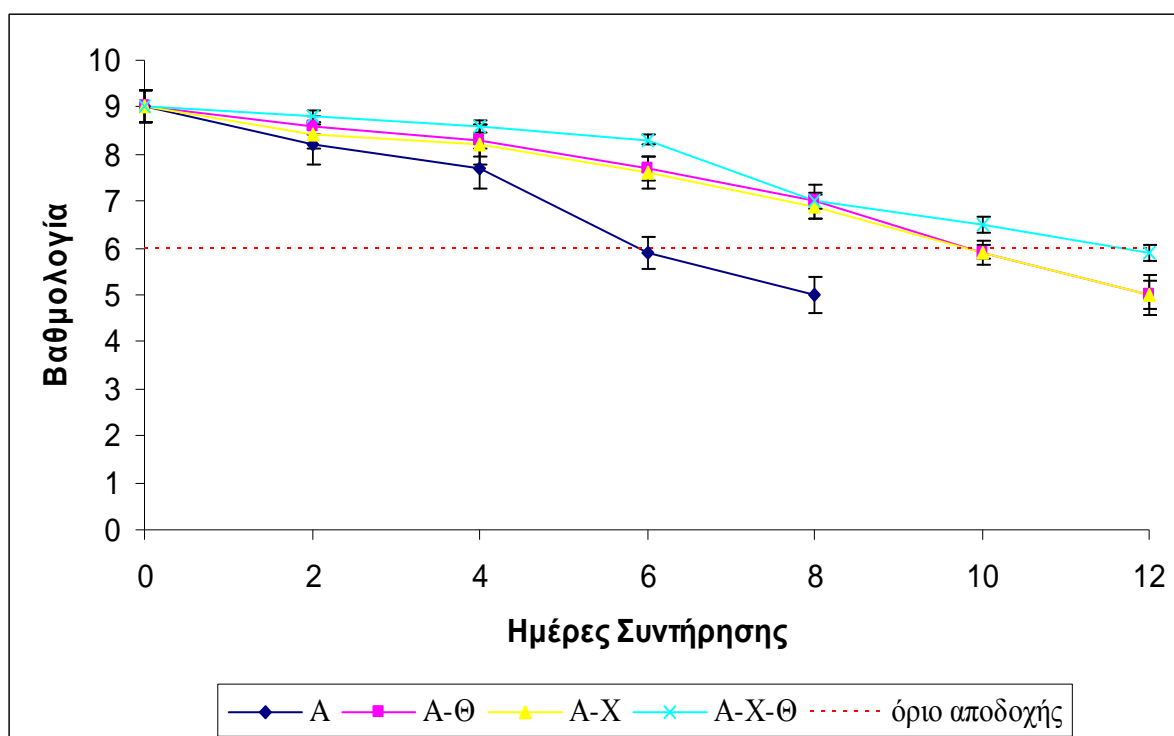
3.2.4 Οργανοληπτική ανάλυση

Παράλληλα με την μικροβιολογική αξιολόγηση των δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε αερόβια συσκευασία ή σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, με ή χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου και χιτοζάνης, πραγματοποιήθηκε και αξιολόγηση της μεταβολής των οργανοληπτικών παραγόντων της οσμής και γεύσης του προϊόντος.

3.2.4.1 Μεταβολή της Γεύσης

α) Αερόβια συσκευασία

Στο **Γράφημα 3.2.4.1(α)** παρουσιάζεται η μεταβολή της γεύσης του προϊόντος σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης σε αερόβια συσκευασία με ή χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου. Γενικά, η γεύση αποτέλεσε πιο ευαίσθητη οργανοληπτική παράμετρο από την οσμή, για αυτό και χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης του οργανοληπτικού χρόνου συντήρησης των δειγμάτων.



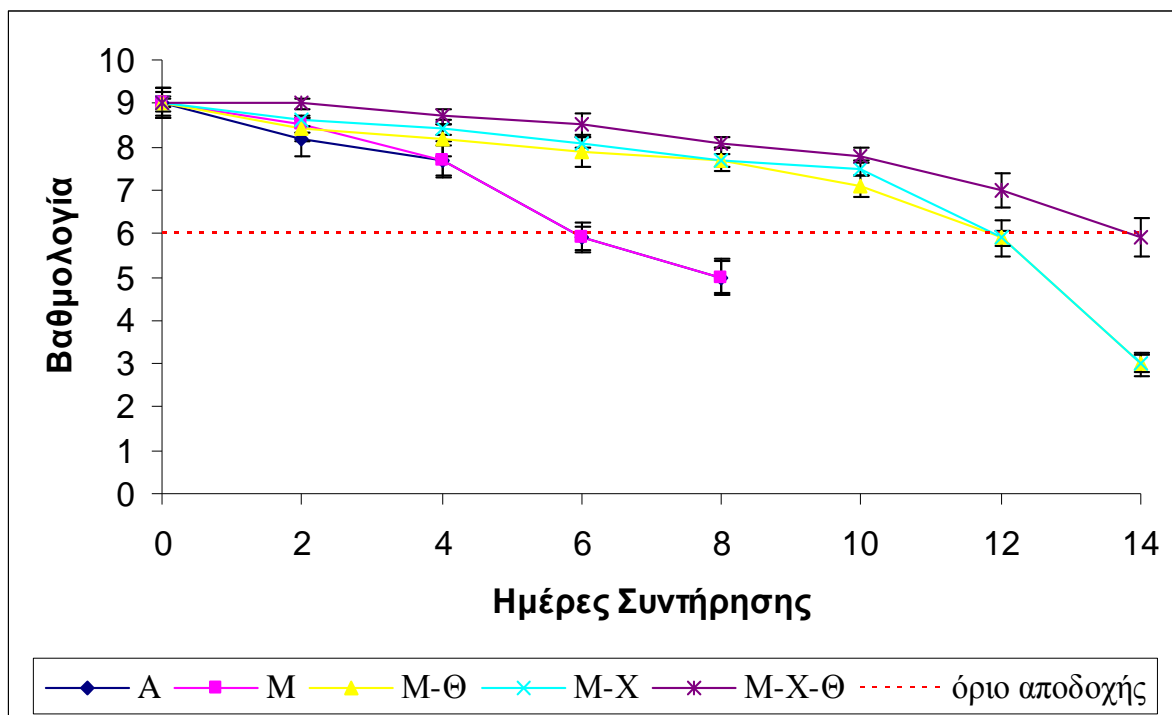
Γράφημα 3.2.4.1(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή της γεύσης των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X = δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ= δείγμα με τον συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.2.4.1(α)**, την 0η ημέρα συντήρησης τα δείγματα από Σουβλάκι κοτόπουλο/πιπεριά είχαν ευχάριστη γεύση, η οποία όμως μεταβλήθηκε σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα, τα δείγματα του μάρτυρα ξεπέρασαν το κατώφλι της γεύσης (όριο απόρριψης του προϊόντος) την 6^η ημέρα συντήρησης, ενώ την ίδια ημέρα τα αντίστοιχα δείγματα A-Θ, A-X και A-X-Θ έλαβαν υψηλή βαθμολογία όσον αφορά την μεταβολή του ίδιου οργανοληπτικού παράγοντα (7.7, 7.6 και 8.3). Είναι αξιοσημείωτο ότι το θυμαρέλαιο, στην συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (0.2% v/w), προσέδωσε μια πικάντικη (επιθυμητή) γεύση στα δείγματα A-Θ και A-X-Θ. Ως αποτέλεσμα, τα δείγματα A-Θ ξεπέρασαν το κατώφλι της γεύσης 4 ημέρες μετά τον

μάρτυρα (10^η ημέρα συντήρησης). Σύμφωνα με τους Viuda-Martos et al. (2010) η συντήρηση μορταδέλας με την προσθήκη θυμαρέλαιου ή ελαίου από δενδρολίβανο 0.02% και ίνες πορτοκαλιού οδήγησε σε βελτίωση της γεύσης του προϊόντος σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα κατά την συντήρηση υπό ψύξη σε συσκευασία MAP ή αερόβια. Επίσης, οι Chouliara & Kontominas (2006) αναφέρουν ότι η προσθήκη θυμαρέλαιου 0.5% σε φιλέτο κοτόπουλου που συντηρήθηκε αερόβια στους 4 °C, ξεπέρασε το κατώφλι της γεύσης την 11^η ημέρα συντήρησης, δηλαδή 5 ημέρες μετά από τον μάρτυρα. Η παρουσία της χιτοζάνης στα δείγματα A-X και A-X-Θ ήταν ιδιαίτερα ευχάριστη, από οργανοληπτική απόψη, αναδεικνύοντας ιδιαίτερα την χαρακτηριστική γεύση της πιπεριάς. Τα δείγματα A-X διατήρησαν ευχάριστη γεύση έως την 10^η ημέρα συντήρησης, μετά την οποία η παραγωγή δύσοσμων ενώσεων (off-odors) ήταν έντονη και οδήγησε στην απόρριψη του προϊόντος από οργανοληπτικής πλευράς. Τέλος, ο συνδυασμός θυμαρέλαιου και χιτοζάνης στα δείγματα A-X-Θ οδήγησε σε σημαντική διατήρηση αποδεκτής οσμής και γεύσης του προϊόντος, εφόσον ξεπέρασαν το κατώφλι της γεύσης την 12^η ημέρα συντήρησης. Σύμφωνα με τους Soutos et al. (2008), Roller et al. (2002) και Lin & Chao et al. (2001), η προσθήκη χιτοζάνης σε λουκάνικα διατήρησε την οσμή και την γεύση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τον μάρτυρα.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.2.4.1(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή της γεύσης του προϊόντος σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας με ή χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης και θυμαρέλαιου.



Γράφημα 3.2.4.1(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή της γεύσης των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C): A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.4.1(β)**, η γεύση μεταβλήθηκε αντιστρόφως ανάλογα με τον χρόνο συντήρησης των δειγμάτων. Τα δείγματα M ακολούθησαν την ίδια πορεία μεταβολής της γεύσης με τα δείγματα A ($p > 0.05$). Παρόλο που η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας στα δείγματα M παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος κατά 2 ημέρες (O.M.X.=7.0 log CFU/g την 6^η ημέρα συντήρησης), δεν κατάφερε να ασκήσει την ίδια θετική επίδραση και στον οργανοληπτικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος, εφόσον τα δείγματα M και A ξεπέρασαν το κατώφλι οσμής την ίδια ημέρα συντήρησης (6^η ημέρα). Ωστόσο, ο συνδυασμός τροποποιημένης ατμόσφαιρας με θυμαρέλαιο ή χιτοζάνη οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα, εφόσον τα δείγματα M-Θ και M-X ξεπέρασαν το όριο αποδοχής της γεύσης την 12^η ημέρα συντήρησης, ενώ η μεταβολή της ακολούθησε την ίδια πορεία ($p > 0.05$). Ανάλογα αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Yingyuad et al. (2006), σύμφωνα με τους

οποίους δείγματα ψητού χοιρινού που συντηρήθηκαν αερόβια ή σε συσκευασία κενού απορρίφθηκαν την 7 και 14^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα, ενώ η εμφάνιση σε διάλυμα χιτοζάνης 2.0% διατήρησε επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για 28 ημέρες συντήρησης (2 °C). Επίσης, σύμφωνα με τους Chouliara & Kontominas (2006) η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε συνδυασμό με θυμαρέλαιο 0.5% παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης φιλέτου κοτόπουλου κατά 6 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα. Τέλος, τα δείγματα M-X-Θ διατήρησαν επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έως το τέλος της περιόδου συντήρησης (14^η ημέρα) ενώ η βαθμολογία της γεύσης κατά την διάρκεια συντήρησης του προϊόντος ξεπέρασε την αντίστοιχη των υπόλοιπων δειγμάτων. Ειδικότερα, ενώ την 12^η ημέρα συντήρησης τα δείγματα M-X και M-Θ είχαν βαθμολογία γεύσης κάτω από το όριο αποδοχής (5.9) η αντίστοιχη των δειγμάτων ήταν αρκετά υψηλότερη (7.0). Όπως προαναφέρθηκε και στην περίπτωση των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε αερόβια συσκευασία τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής ανάλυσης δεν συμβάδισαν με τα αντίστοιχα της μικροβιολογικής αξιολόγησης, πλην των δειγμάτων M όπου ο συσχετισμός ήταν απόλυτος. Οι λόγοι στους οποίους πιθανόν να οφείλεται η έλλειψη αντιστοιχίας γεύσης-μικροβιολογικής απόρριψης είναι οι ίδιοι που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη **παράγραφο 3.2.4.1(α)**.

Είναι αξιοσημείωτο ότι τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής ανάλυσης (γεύση) δεν συμβαδίζουν με τα αντίστοιχα της μικροβιολογικής ανάλυσης, εφόσον η υπέρβαση του μικροβιολογικού ορίου αλλοίωσης ($O.M.X=7.0 \log \text{ CFU/g}$) στις περισσότερες μεταχειρίσεις (αερόβια συσκευασία και MAP), προηγήθηκε της οργανοληπτικής αλλοίωσης. Πιθανές εξηγήσεις για το γεγονός αυτό μπορεί να είναι οι εξής:

I) Η οργανοληπτική αλλοίωση δεν αποδίδεται σε όλους τους μικροοργανισμούς (μ/ο) που αναπτύσσονται στα τρόφιμα, αλλά στον πληθυσμό συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών, που καλούνται ειδικοί μ/ο αλλοίωσης (Specific Spoilage Organisms, SSO; Jay, 1986). Υπό συνθήκες αερόβιας συσκευασίας, η οργανοληπτική απόρριψη των δειγμάτων (με βάση τη βαθμολογία της παραμέτρου της γεύσης, <6) σημειώθηκε όταν οι πληθυσμοί των ψευδομονάδων κυμάνθηκε σε πληθυσμούς μεταξύ 7.6-8.0 $\log \text{ CFU/g}$. Σύμφωνα με τους Lin et al. (2004) κατά τη συντήρηση προϊόντων πουλερικών σε αερόβια συσκευασία, οι κύριοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης είναι οι ψευδομονάδες (κυρίως *Ps. lundensis*, *Ps. fluorescens* και *Ps. fragi*), η ανάπτυξη των οποίων μπορεί να οδηγήσει στην αποδόμηση (π.χ. πρωτεόλυση, ενζυματική υδρόλυση/οξείδωση λιπιδίων) δομικών συστατικών των τροφίμων και στη δημιουργία γλοιώδους επικάλυψης στην επιφάνεια του

αλλοιωμένου προϊόντος. Τα παραπάνω συντελούν στην υποβάθμιση της εμφάνισης (υφή, χρώμα) καθώς και στην παραγωγή ανεπιθύμητων οσμηρών ενώσεων (off-odors). Τα κύρια προϊόντα μεταβολισμού των ψευδομονάδων σε αερόβια συσκευασία, είναι διάφορες ενώσεις π.χ. υδρόθειο, μερκαπτάνες, μέθυλ-σουλφίδια, κετόνες, αμίνες, αμμωνία κ.α. (Pittard et al, 1982). Η παραγωγή πτητικών θειούχων ενώσεων από τα βακτήρια αυτά (μέσω κυρίως πρωτεολυτικής δράση) οδηγεί στην οργανοληπτική αλλοίωση προϊόντων πουλερικών (Pittard et al, 1982; Doyle, 2007). Το γεγονός ότι τα δείγματα της αερόβιας συσκευασίας (A, A-X, A-Θ, A-X-Θ) ανέπτυξαν δυσάρεστη οσμή, θα μπορούσε πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία ουρίας, θειούχων ενώσεων και αμμωνίας, ο προσδιορισμός των οποίων δεν έγινε στην παρούσα εργασία. Κατά την οργανοληπτική εξέταση των δειγμάτων με βάση το κριτήριο της γεύσης διαπιστώθηκε ότι τα δείγματα είχαν πικρή γεύση, όταν ο πληθυσμός των ψευδομονάδων προσέγγισε τους 7.5-8.0 log CFU/g. Σύμφωνα με τον Blakistone (1998), όταν ο πληθυσμός των ψευδομονάδων φτάσει το όριο των 10^8 CFU/cm², η παραγωγή δύσοσμων ενώσεων (off-odors) γίνεται άμεσα αντιληπτή κατά τον έλεγχο της οργανοληπτικής αξιολόγησης.

Τα δείγματα (M, M-X, M-Θ) που συντηρήθηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, απορρίφθηκαν (με βάση τη γεύση) όταν ο πληθυσμός των προαιρετικά αναερόβιων (ή μικροαερόφιλων) οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *Br. thermosphacta*, προσέγγισαν πληθυσμούς της τάξης των 7.0 log CFU/g. Στην παρούσα περίπτωση, τη στιγμή της απόρριψης, παρατηρήθηκε οξίνιση (souring) των δειγμάτων, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της αερόβιας συσκευασίας, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο μεταβολισμό σακχάρων (π.χ., γλυκόζη, ριβόζη, φρουκτόζη) και γλουταμινικού οξέος, παράγοντας οργανικά οξέα (π.χ. μυρμηκικό, οξικό, γαλακτικό, βαλερικό) που οδηγούν στην ανάπτυξη τυροειδούς (cheesy), όξινης (acidic), μεταλλικής (liver-like) ή βουτυρικής (buttery) γεύσης και οσμής (Doyle, 2007).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το είδος των δευτερογενών προϊόντων μεταβολισμού των γαλακτικών βακτηρίων εξαρτάται από τις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες συντήρησης και τα διαθέσιμα θρεπτικά υποστρώματα, επηρεάζοντας θετικά η αρνητικά την οργανοληπτική ποιότητα των τροφίμων. Για παράδειγμα, το οξικό οξύ έχει διαφορετική γεύση και οσμή από το γαλακτικό οξύ. Με άλλα λόγια, η συντήρηση σε MAP ή VP όχι μόνο επηρεάζει την επικράτηση ενός συγκεκριμένου πληθυσμού βακτηρίων, αλλά επιδρά και στις μεταβολικές δραστηριότητες του μικροβιακού φορτίου (Nychas et al., 1999).

Επιπρόσθετα, το διοξειδίο του άνθρακα στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (30%) ίσως να επέδρασε αρνητικά στη γεύση του προϊόντος (οξίνιση) με την πάροδο του χρόνου συντήρησης.

II) Η παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων με έντονο άρωμα και γεύση όπως το θυμαρέλαιο ή η χιτοζάνη, μπορεί να υπερκαλύψει την παραγωγή ανεπιθύμητων οσμικών ενώσεων (off-odors) και κατά συνέπεια να “καμουφλάρουν” την οργανοληπτική αλλοίωση, όπως παρατηρήθηκε από τους Mexis et al. (2009), σύμφωνα με τους οποίους ενώ το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης φιλέτων πέστροφας που συντηρήθηκαν παρουσία ριγανέλαιου ξεπεράστηκε την 12^η ημέρα, ο οργανοληπτικός χρόνος συντήρησης ήταν μεγαλύτερος κατά 5 ημέρες.

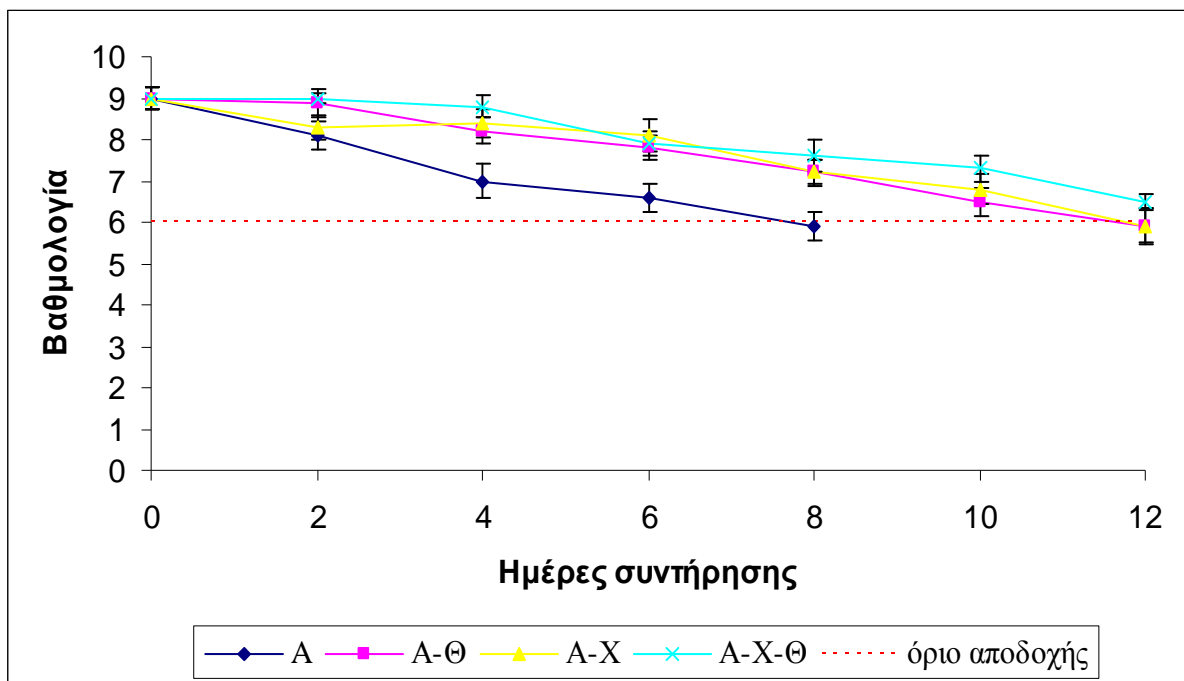
III) Η παρουσία διαφόρων αρωματικών ενώσεων (2-ισοβουτυλ-3-μέθοξυ-πυραζίνη, λιναλόλη, βενζαλδεΐδη, φουρανόνες, βανιλίνη, ευγενόλη; Wu & Liou, 1986; Zimmermann & Schieberle, 2000) στην πιπεριά μπορεί να έχει πιθανώς υπερκαλύψει την ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών και γεύσεων στα δείγματα που εξετάστηκαν. Σημειώνεται ότι η παρουσία των παραπάνω ενώσεων δεν εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη.

Στη βιβλιογραφία αναφέρθηκε ότι διάφορες ενώσεις (οξικό, γαλακτικό και προπιονικό οξύ), προϊόντα μεταβολισμού μικροοργανισμών αλλοίωσης τεμαχισμένων πιπεριών, είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη όξινης γεύσης/οσμής, όπως διαπιστώθηκε από τους Jacxsens et al. (2003).

3.2.4.2 Μεταβολή της Οσμής

α) Αερόβια συσκευασία

Στο **Γράφημα 3.2.4.2(α)** παρουσιάζεται η μεταβολή της οσμής του προϊόντος σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης σε αερόβια συσκευασία με ή χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου.

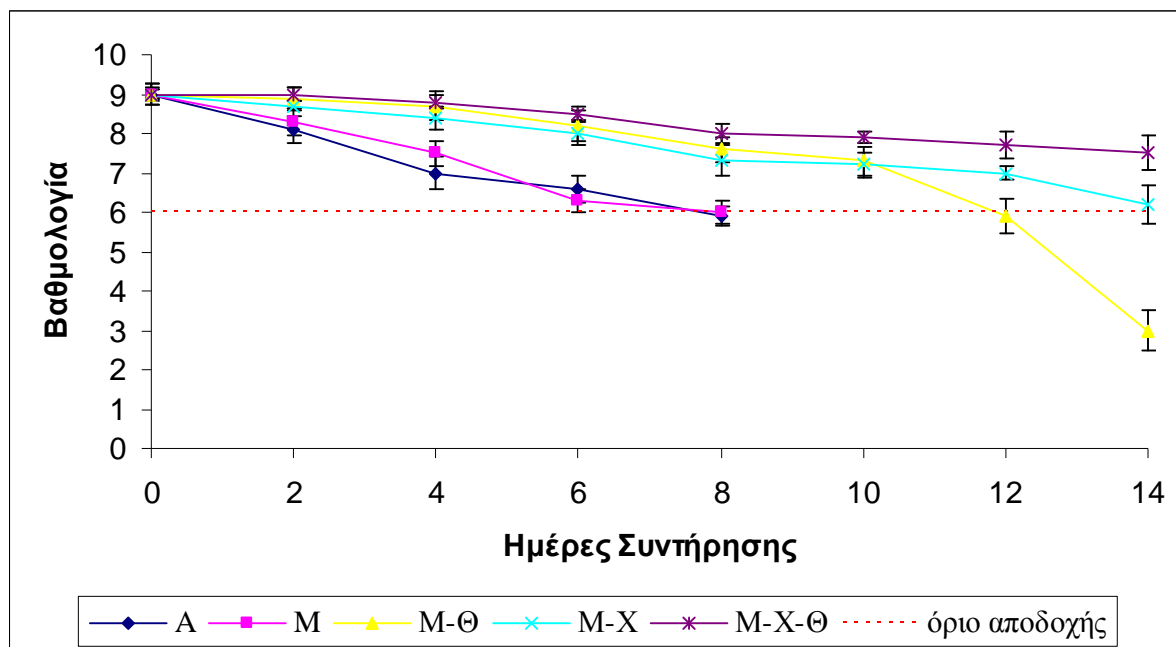


Γράφημα 3.2.4.2(α): Επίδραση αερόβιας συσκευασίας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή της οσμής των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C) σε: A = δείγμα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας), A-Θ = δείγμα με θυμαρέλαιο 0.2% v/w, A-X = δείγμα με χιτοζάνη 1.5% v/w (=0.03% w/w), A-X-Θ = δείγμα με το συνδυασμό χιτοζάνης / θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.2.4.2(α)**, την 0η ημέρα συντήρησης τα δείγματα από σουβλάκι κοτόπουλο/πιπεριά είχαν ευχάριστη γεύση, η οποία όμως μεταβλήθηκε σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Συγκεκριμένα, τα δείγματα του μάρτυρα ξεπέρασαν το κατώφλι της οσμής την 8^η ημέρα συντήρησης, ενώ τα δείγματα A-Θ και A-X την 12^η ημέρα συντήρησης. Η μεταβολή της οσμής στα δείγματα A-X-Θ ακολούθησε πιο αργό ρυθμό σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, εφόσον διατήρησαν αποδεκτή οσμή έως την 12^η ημέρα συντήρησης (6.5 την 12^η ημέρα συντήρησης). Γενικά, τα αποτελέσματα της μεταβολής της οσμής στα δείγματα που συντηρήθηκαν σε αερόβια συσκευασία με ή χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης και θυμαρέλαιου δεν έδειξαν να συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της γεύσης.

β) Συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Στο **Γράφημα 3.2.4.2(β)** παρουσιάζεται η μεταβολή της οσμής του προϊόντος σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας με ή χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης και θυμαρέλαιου.



Γράφημα 3.2.4.2(β): Επίδραση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας/φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στην μεταβολή της οσμής των δειγμάτων από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 ± 0.5 °C): A= δείγμα σε αερόβια συσκευασία (μάρτυρας), M = δείγμα σε συσκευασία MAP, M-Θ = δείγμα σε MAP + θυμαρέλαιο 0.2% v/w, M-X= δείγμα σε MAP + χιτοζάνη 1.5% v/w (= 0.03% w/w), M-X-Θ = δείγμα σε MAP + συνδυασμός χιτοζάνης/ θυμαρέλαιου.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.2.4.2(β)** η οσμή των δειγμάτων A και M ακολούθησε τον ίδιο ρυθμό μεταβολής και διατηρήθηκε σε αποδεκτά επίπεδα έως την 8^η ημέρα συντήρησης. Τα δείγματα M-X και M-Θ είχαν ανάλογο ρυθμό μεταβολής γεύσης έως την 10^η ημέρα συντήρησης ($p > 0.05$), αλλά από 10^η ημέρα και μετά τα M-X είχαν υψηλότερη βαθμολογία γεύσης από την αντίστοιχη των M-Θ (5.9 και 7.0, αντίστοιχα την 12^η ημέρα συντήρησης), υποδεικνύοντας ότι ο συνδυασμός χιτοζάνης με MAP βελτίωσε την οσμή του προϊόντος σε μεγαλύτερο βαθμό από το θυμαρέλαιο. Τέλος, το θυμαρέλαιο και η χιτοζάνη έδρασαν συνεργιστικά για την διατήρηση της οσμής στα δείγματα M-X-Θ, εφόσον η συγκεκριμένη οργανοληπτική παράμετρος δεν ξεπέρασε το όριο αποδοχής καθ' όλη την διάρκεια της συντήρησης.

4.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Το εξεταζόμενο προϊόν (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) ξεπέρασε το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης (O.M.X. = 7.0 log CFU/g) την 4^η ημέρα συντήρησης (μάρτυρας A), ενώ η προσθήκη χιτοζάνης (A-X, 1.5% v/w= 0.03% w/w), θυμαρέλαιου (A-Θ, 0.2% v/w) και του συνδυασμού χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (A-X-Θ) οδήγησε σε παράταση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησης κατά 2, 2 και 3 ημέρες, αντίστοιχα (4 °C).
- Η συσκευασία MAP (30% CO₂/70% N₂) παρέτεινε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος κατά 2 ημέρες στους 4 °C (μεταχείριση M), ενώ ο συνδυασμός MAP με θυμαρέλαιο (M-Θ) ή χιτοζάνη (M-X) οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα οδηγώντας σε παράταση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησης του προϊόντος κατά 5 ημέρες. Τέλος, τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε MAP με τον συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) ξεπέρασαν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης την 13^η ημέρα συντήρησης, σημειώνοντας παράταση του μικροβιολογικού χρόνου συντήρησης κατά 9 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα και κατά 7 ημέρες σε σχέση με τα δείγματα MAP.
- Την στιγμή της οργανοληπτικής αλλοίωσης του προϊόντος (A, 6^η ημέρα συντήρησης) τα βακτήρια με τον υψηλότερο πληθυσμό ήταν οι ψευδομονάδες (8.03 log CFU/g), ακολουθούμενες από τον μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta* (7.34 log CFU/g). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα εντεροβακτηριοειδή αποτέλεσαν επίσης σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας του προϊόντος (6.37 log CFU/g και 6.53 log CFU/g, αντίστοιχα). Οι ζύμες-μύκητες κυμάνθηκαν στα χαμηλότερα επίπεδα από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς κατά την συντήρηση σε αερόβια συσκευασία (5.01 log CFU/g).
- Την στιγμή της μικροβιολογικής-οργανοληπτικής αλλοίωσης του προϊόντος στη συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (M, 6^η ημέρα συντήρησης) τα βακτήρια με τον υψηλότερο πληθυσμό ήταν τα οξυγαλακτικά βακτήρια μαζί με τον μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta* (6.60 και 6.72 log CFU/g, αντίστοιχα), με ακόλουθες τις ψευδομονάδες (6.16 log CFU/g) και τα εντεροβακτηριοειδή (6.15 log CFU/g). Τέλος, οι ζύμες-μύκητες κυμάνθηκαν στα χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς (4.03 CFU/g).

- Κατά την συντήρηση σε αερόβια συσκευασία, οι ψευδομονάδες αποτέλεσαν την πιο ανθεκτική ομάδα μικροοργανισμών στην δράση του θυμαρέλαιου ή/και της χιτοζάνης εφόσον μειώθηκαν κατά 0.6 και 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα στα δείγματα A-Θ και A-X, αντίστοιχα. Τα δείγματα A-X-Θ μείωσαν τις ψευδομονάδες κατά 1.6 log CFU/g έως και την 6^η ημέρα συντήρησης, αλλά στην συνέχεια επέδειξαν παρόμοιους πληθυσμούς με τα δείγματα A-Θ.
- Η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης (A-X-Θ) επέδειξε (πιθανή) συνεργιστική δράση για την μείωση των γαλακτικών βακτηρίων (-2.0 log CFU/g) και των εντεροβακτηριοειδών (-3.0 log CFU/g) αλλά στην περίπτωση του *Brochothrix thermosphacta* η συνεργιστική δράση δεν ήταν εμφανής μετά την 8^η ημέρα συντήρησης (μείωση κατά 3.0 log CFU/g). Η ανάπτυξη των ζυμών-μυκήτων αναστάλθηκε σημαντικά με την συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης εφόσον δεν ξεπέρασαν τους 4.0 log CFU/g κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης (βακτηριοστατική επίδραση).
- Ο συνδυασμός MAP χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) αποδείχτηκε ο πιο αποτελεσματικός για την καθυστέρηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατά την συσκευασία δειγμάτων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα: παρατηρήθηκε καθυστέρηση της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των ψευδομονάδων έως την 8^η και 12^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα (βακτηριοστατική δράση) ενώ οι πληθυσμοί τους δεν ξεπέρασαν τους 6.1 log CFU/g (μείωση κατά 3.0 log CFU/g). Επίσης, ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* (-4.5 log CFU/g) και τα εντεροβακτηριοειδή καθιλώθηκαν σε πληθυσμό ≤ 5.0 log CFU/g ενώ οι ζύμες-μύκητες δεν ξεπέρασαν τους 3.0 log CFU/g (μείωση κατά 3.0-4.0 log CFU/g).
- Η (πιθανή) συνεργιστική δράση της χιτοζάνης και του θυμαρέλαιου στην αναχαίτιση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, στα δείγματα M-X-Θ, ήταν εμφανής από την αρχή της περιόδου συντήρησης στην περίπτωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, του *Brochothrix thermosphacta* και των ζυμών - μυκήτων, ενώ στην περίπτωση των εντεροβακτηριοειδών και των ψευδομονάδων εκδηλώθηκε μετά την 6 και 8^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα.
- Η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης-θυμαρέλαιου διατήρησε τις τιμές TBARS στα χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα τόσο στην αερόβια (A-X-

Θ, μείωση κατά 1.0 mg MDA/Kg) όσο και στην MAP (M-X-Θ, μείωση κατά 2.0 mg MDA/Kg).

- Τα δείγματα M-X-Θ και A-X-Θ διατήρησαν το χρώμα σε καλύτερο βαθμό σε σχέση με τους μάρτυρες όπως παρατηρήθηκε από τον προσδιορισμό της συνολικής χρωματικής μεταβολής ΔΕ*.
- Τα δείγματα A-X-Θ και M-X-Θ διατήρησαν την ερυθρότητα του προϊόντος στα αρχικά επίπεδα, καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Επιπλέον, παρουσίασαν υψηλότερη τιμή φωτεινότητας σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα, προς το τέλος της περιόδου συντήρησης.
- Τα δείγματα A-Θ και M-Θ παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές έντασης του χρώματος σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα προς το τέλος της περιόδου συντήρησης.
- Κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων, η γεύση αποτέλεσε πιο ευαίσθητο παράμετρο από την οσμή. Με βάση το κριτήριο της γεύσης, τα δείγματα του μάρτυρα απορρίφθηκαν την 6^η ημέρα συντήρησης, ενώ τα δείγματα που A-Θ, A-X και A-X-Θ την 10^η και 12^η ημέρα συντήρησης, αντίστοιχα.
- Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, τα δείγματα M απορρίφθηκαν την 6^η ημέρα συντήρησης, ενώ τα δείγματα M-X και M-Θ την 12^η ημέρα συντήρησης. Τέλος, τα δείγματα M-X-Θ έλαβαν την υψηλότερη βαθμολογία σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα κατά την διάρκεια της συντήρησης και διατήρησαν ευχάριστη οσμή και γεύση μέχρι το τέλος της περιόδου συντήρησης.
- Γενικά, τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης δεν είχαν καλή συμφωνία με τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης, εφόσον η μικροβιολογική αλλοίωση (O.M.X.= 7.0 log CFU/g) προηγήθηκε της οργανοληπτικής.

Κεφάλαιο 3: «*Επίδραση Χιτοζάνης/Θυμαρέλαιου στην πορεία ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica ser. Montevideo* και *Bacillus cereus* κατά την συντήρησή του προϊόντος “Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά” στους 4 °C και 8 °C (συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας). Συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων με θεωρητικά μοντέλα*»

1.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

Ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο ήταν η μελέτη της επίδρασης των φυσικών συντηρητικών χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στη πορεία ανάπτυξης τριών παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus*) κατά την συντήρηση του προϊόντος στους 4 °C και 8 °C (συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας). Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε θεωρητική πρόβλεψη της συμπεριφοράς των τριών παθογόνων μικροοργανισμών με την χρήση δυο μοντέλων πρόβλεψης για την διαπίστωση τυχόν αποκλίσεων μεταξύ θεωρητικών/πειραματικών τιμών.

2.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία του προϊόντος

Η προετοιμασία του προϊόντος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 1**, (Παράγραφος 2.1)

2.2 Καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών-προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος-ενοφθαλμισμός των παθογόνων βακτηρίων επί του προϊόντος

Οι καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών και η προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 1 (Παράγραφος 2.2)**. Μετά την επώαση των καλλιεργειών σε BHI broth για 24 h, διατηρήθηκαν στους 4 °C για περίπου 36-48 h, προκειμένου να προσαρμοστούν τα κύτταρα των μικροοργανισμών σε θερμοκρασία ψύξης.

Στην περίπτωση του *B. cereus* ως αρχικό ενοφθάλμισμα χρησιμοποιήθηκε μικτή καλλιέργεια τεσσάρων διαφορετικών στελεχών (*Bacillus cereus* PAL 22; *Bacillus cereus*

PAL 25, *Bacillus cereus* ATCC 14579; *Bacillus cereus* ATCC 10987). Το αρχικό ενοφθάλμισμα της *L. monocytogenes* (Scott A) ή της *Salmonella enterica* (serovar Montevideo) ή του *B. cereus* (αρχική συγκέντρωση κυττάρων περίπου 10^8 - 10^9 CFU/ml) αραιώθηκε δεκαδικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 ml πεπτονόχου διαλύματος 0.1% wt/vol (pH=7.0) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση των βακτηρίων να είναι περίπου 10^{5-6} CFU/ml (τελικό ενοφθάλμισμα). Στη συνέχεια, ποσότητα 1 ml από το τελικό μόλυσμα ενοφθαλμίστηκε σε ποσότητα 100 gr του προϊόντος. Ο τελικός βακτηριακός πληθυσμός στο προϊόν ήταν περίπου σε 10^{3-4} CFU/gr. Σημειώνεται ότι κάθε μικροοργανισμός ενοφθαλμίστηκε χωριστά από τους υπόλοιπους σε κάθε μεταχείριση, εφόσον δεν ήταν αντικείμενο της παρούσης έρευνας η ταυτόχρονη πορεία ανάπτυξη τους στα δείγματα. Επομένως, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε ξεχωριστό μικροοργανισμό που ενοφθαλμίστηκε. Στη συνέχεια, οι τρεις ομάδες δειγμάτων, με τα ενοφθαλμισμένα στελέχη, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων του μολύσματος στην επιφάνεια των μεταχειρίσεων. Με το πέρας των 15 λεπτών, τα δείγματα διατηρήθηκαν εντός ψυγείου (4 ± 0.5 °C ή 8 ± 1.0 °C).

2.3 Συσκευασία των δειγμάτων

Μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων με τα τρία παθογόνα βακτήρια, προέκυψαν τέσσερις κατηγορίες μεταχειρίσεων, με βάση την προσθήκη θυμαρέλαιου ή/και χιτοζάνης και την συσκευασία:

1. Ενοφθαλμισμένα με παθογόνα βακτήρια δείγματα που συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂/70% N₂) χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου/χιτοζάνης (M, μάρτυρας)
2. Ενοφθαλμισμένα με παθογόνα βακτήρια δείγματα που συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂/70% N₂) με την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος 1.5% v/w (0.03% w/w) → Μεταχείριση M-X
3. Ενοφθαλμισμένα με παθογόνα βακτήρια δείγματα που συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂/70% N₂) με την προσθήκη θυμαρέλαιου 0.2% v/w → Μεταχείριση M-Θ
4. Ενοφθαλμισμένα με παθογόνα βακτήρια δείγματα που συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂/70% N₂) με την προσθήκη του συνδυασμού θυμαρέλαιου/χιτοζάνης → Μεταχείριση M-X-Θ

Η προετοιμασία των διαλυμάτων της χιτοζάνης, του θυμαρέλαιου και η προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στα δείγματα καθώς και η συσκευασία τους, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 2 (Παράγραφοι 2.2/2.3/2.4/2.5, σελ. 136-138)**.

Μετά την συσκευασία τους, οι τέσσερις διαφορετικές ομάδες μεταχειρίσεων συντηρήθηκαν σε δυο θερμοκρασίες συντήρησης: (4 ± 0.5 °C ή 8 ± 1.0 °C).

2.4 Μικροβιολογική εξέταση και προσδιορισμός του pH

Εξετάστηκαν τα ακόλουθα είδη μικροοργανισμών (εκτός των ενοφθαλμισμένων στελεχών): Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), Ψευδομονάδες, Οξυγαλακτικά βακτήρια και ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* με τον τρόπο που περιγράφεται στο Κεφάλαιο 1 (Παράγραφος 2.4) και Κεφάλαιο 2 (Παράγραφος 3.1). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν ανά ημέρα για τους παθογόνους μικροοργανισμούς/μεταβολή της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, και 8^η) και κάθε δύο ημέρες για τους αλλοιωγόνους μη παθογόνους μικροοργανισμούς (0, 2, 4, 6, και 8^η). Στη περίπτωση των δειγμάτων που περιείχαν τον συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου πραγματοποιήθηκαν δυο επιπλέον δειγματοληψίες πέρα της 8^η ημέρα συντήρησης (την 10^η και 12^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C). Το pH προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 1 (Παράγραφος 2.5)** και η μέτρησή του έγινε την 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 και 8^η ημέρα συντήρησης.

2.5 Εφαρμογή θεωρητικών μοντέλων για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών κατά τις συνθήκες συντήρησης του προϊόντος

Η θεωρητική πρόβλεψη της συμπεριφοράς των τριών παθογόνων μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας δυο μαθηματικά μοντέλα:

1. Το θεωρητικό μοντέλο **Combase® model** (διαθέσιμο στον δικτυακό χώρο http://ifrsynwwwdev.ifrn.bbsrc.ac.uk/CombasePMP/GP/ComBase_Predictor.aspx) με βάση την θερμοκρασία συντήρησης (4 ή 8 °C), την τιμή του pH του υπό εξέταση προϊόντος, την σύσταση των αερίων στην συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂), την ενεργότητα ύδατος ($a_w = 0.99$) ή την % περιεκτικότητα σε NaCl (0.5 %) καθώς και την αρχική συγκέντρωση των κυττάρων του ενοφθαλμισμένου παθογόνου μικροοργανισμού στο προϊόν (3.0 log CFU/g). Επίσης, ελήφθη υπόψη ο χρόνος συντήρησης του προϊόντος

(μάρτυρα, 6 ημέρες) συν ένα ποσοστό 30% πλέον του χρόνου διατήρησης (8 ημέρες), δηλαδή σύνολο $t = 192$ h.

Ο τύπος που περιγράφει το μοντέλο Combase® είναι ο εξής (Baranyi & Roberts, 1994):

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} F(t) - \ln \left(1 + \frac{e^{\mu_{\max} F(t)} - 1}{e^{(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (1)$$

Όπου:

$$F(t) = t + \frac{1}{v} \ln (e^{-vt} + e^{-h_0} - e^{(-vt-h_0)}). \quad (2)$$

$y(t)$ = ο βακτηριακός πληθυσμός σε χρόνο t (log CFU/g)

y_0 = ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός του μικροοργανισμού σε χρόνο $t=t_0=0$

μ_{\max} = ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ανά ημέρα (maximum specific growth rate, log CFU/g/day)

$F(t)$ = όπως ορίζεται από τον τύπο (2) όπου: $h_0 = \mu_{\max} * \lambda$ (λ = διάρκεια της λανθάνουσας φάσης) και $v \approx \mu_{\max}$

Η **σχέση (1)** μπορεί να αποδοθεί με απλούστερο τρόπο από την σχέση (Sosa Mejia et al., 2010):

$$\mathbf{Ln}(y) = \mathbf{Ln}(y_0) + \mu t \quad \text{ή} \quad \mathbf{Log}(y) = \mathbf{Log}(y_0) + \mu x \quad (3)$$

Όπου:

y = ο βακτηριακός πληθυσμός σε χρόνο t (CFU/g)

y_0 = ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός του μικροοργανισμού σε χρόνο $t=t_0=0$ ή $\text{day}=\text{day}_0=0$ (CFU/g)

μ = ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης ανά ώρα/ ή ανά ημέρα (specific growth rate, h^{-1} ή day^{-1})

2. Το θεωρητικό μοντέλο **Gamma®** (Zwietering et al., 1996) με βάση την θερμοκρασία συντήρησης (4 ή 8 °C), την τιμή του pH που μετρήθηκε στο εξεταζόμενο προϊόν, την ενεργότητα ύδατος ($a_w = 0.99$) ή την % περιεκτικότητα σε NaCl (0.5 %) και την αρχική συγκέντρωση των κυττάρων του ενοφθαλμισμένου παθογόνου μικροοργανισμού στο προϊόν (3.0 log CFU/g). Επίσης, ελήφθη υπόψη ο χρόνος συντήρησης του προϊόντος

(μάρτυρα, 6 ημέρες) συν ένα ποσοστό 30% πλέον του χρόνου διατήρησης (8 ημέρες), δηλαδή σύνολο $t = 192$ h.

$$\log(N) = \log(N_o) + \frac{1}{\ln(10)} \sum_i b^2 (T_i - T_{\min})^2 t_i \quad (4)$$

Όπου:

N = ο βακτηριακός πληθυσμός σε χρόνο t (CFU/g)

N_o= ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός του μικροοργανισμού σε χρόνο $t=t_o=0$ ή $\text{day}=\text{day}_o$ (CFU/g)

T_i = θερμοκρασία συντήρησης

T_{min}= Η ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός (°C) π.χ. για την *Listeria monocytogenes* $T_{\min} = -0.4$ °C, για την *Salmonella* spp. $T_{\min} = 5$ °C και για τον *B. cereus* $T_{\min} = 3.4$ °C (σύμφωνα με τις παραδοχές του συγκεκριμένου μοντέλου)

t_i = ο χρόνος συντήρησης (h ή day)

b= σταθερά η οποία υπολογίζεται από τον τύπο:

$$b = \sqrt{\gamma(\text{pH})\gamma(a_w) \frac{\mu_{opt}}{(T_{opt} - T_{\min})^2}}$$

Όπου: **pH**= το pH του προϊόντος, **a_w**= ενεργότητα ύδατος του προϊόντος, **T_{opt}** = η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού π.χ. για την *Listeria monocytogenes* $T_{opt} = 33.8$ °C, για την *Salmonella* spp. $T_{opt} = 37.7$ °C και για τον *B. cereus* $T_{opt} = 33.2$ °C (σύμφωνα με τις παραδοχές του συγκεκριμένου μοντέλου), **T_{min}**= η ελάχιστη θερμοκρασία στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός και **μ_{opt}**= ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε συνθήκες βέλτιστες για την ανάπτυξή του (T_{opt} , pH_{opt}).

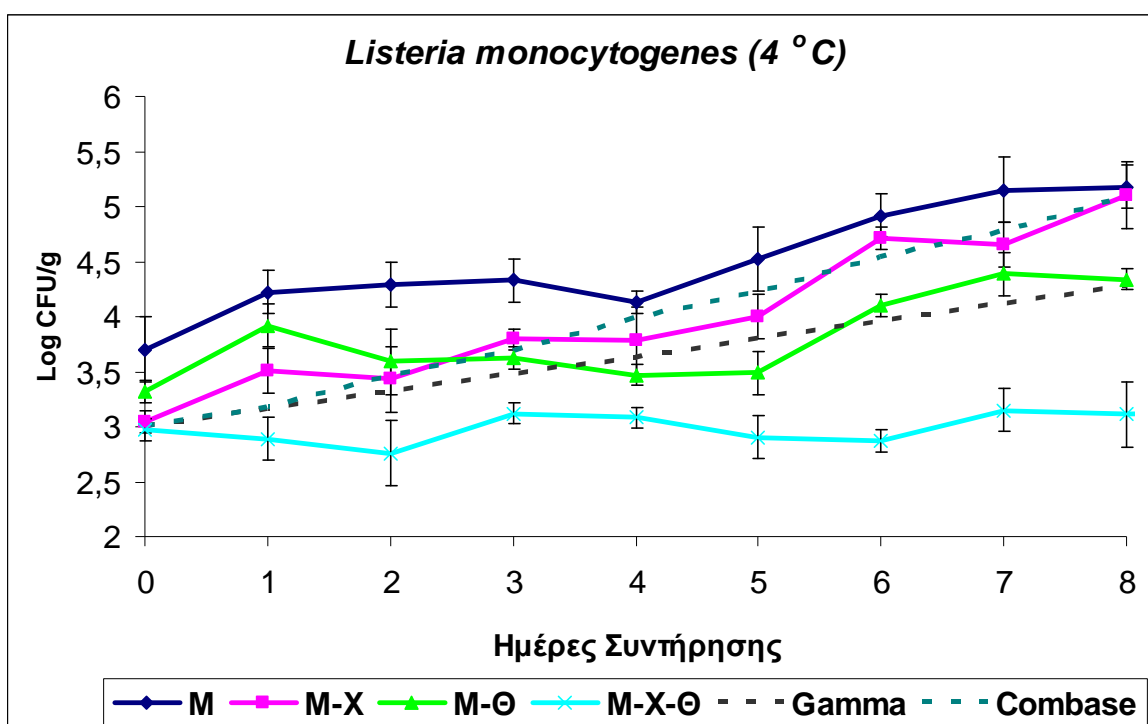
3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόν Κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C και 8 °C- Συγκριτική μελέτη με θεωρητικά μοντέλα Combase® και Gamma®

Τα τρόφιμα ζωϊκής/φυτικής προέλευσης που συντηρούνται σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας/κενού συχνά παρουσιάζουν αυξημένο χρόνο συντήρησης λόγω της αναχαίτισης των αερόβιων μικροοργανισμών στο μικροαερόφιλο ή αναερόβιο περιβάλλον συσκευασίας. Ωστόσο, η ανάπτυξη ορισμένων ψυχρότροφων και προαιρετικά αναερόβιων παθογόνων βακτηρίων δεν αναστέλλεται υπό την συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας MAP/κενού VP (Farber 1991, <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>). Σύμφωνα με έρευνες που έγιναν στο παρελθόν, η *Listeria monocytogenes* αποτελεί έναν από τους προαιρετικά αναερόβιους παθογόνους μικροοργανισμούς που μπορούν να αναπτυχθούν σε νωπά ή μαγειρεμένα προϊόντα κοτόπουλου τα οποία διατηρούνται σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή κενού (Marshall et al., 1992). Μάλιστα, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* μπορεί να γίνει εις βάρος άλλων μικροοργανισμών αλλοίωσης της αυτόχθονης μικροχλωρίδας των τροφίμων που συσκευάστηκαν σε MAP (Wimpfheimer et al., 1990; Ingham et al., 1990; Marshall et al., 1992). Το κύριο πρόβλημα που προκύπτει από την χρήση συσκευασίας για την παράταση του χρόνου συντήρησης ενός φρέσκου προϊόντος, είναι ότι πολλές φορές το συσκευασμένο προϊόν διατηρεί τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά για μεγάλο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα ο καταναλωτής να τα κρίνει αποδεκτά για κατανάλωση, ακόμη και αν έχει προηγηθεί ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών σε αυτά (Farber 1991). Επίσης, η παρουσία λαχανικών στο προϊόν (π.χ. τεμαχισμένης πιπεριάς) μπορεί να αυξήσει περαιτέρω τον κίνδυνο της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση σε MAP, εφόσον πολλές έρευνες αναφέρουν ότι η συσκευασία MAP μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη προαιρετικά αναερόβιων ψυχρότροφων μικροοργανισμών σε λαχανικά που έχουν υποστεί ελάχιστη επεξεργασία (minimally processed, Francis & O' Beirne, 1998).

3.1.1 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόν Κοτόπουλο (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Η πορεία ανάπτυξης της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes* στο προϊόν που συντηρήθηκε σε MAP χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες και με την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης (διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος) ή/και θυμαρέλαιου (4 °C), απεικονίζεται στο **Γράφημα 3.1.1**.



Γράφημα 3.1.1: Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόν Κοτόπουλο (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w= 0.03% w/w, M-X), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, M-Θ) και με το συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) στους 4 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης Gamma® και Combase®.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.1**, ο αρχικός πληθυσμός του ενοφθαλμισμένου παθογόνου μικροοργανισμού στα δείγματα του μάρτυρα (M), ήταν 3.7 log CFU/g και έφτασε τους 5.2 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C. Συνολικά, στα δείγματα M, σημειώθηκε αύξηση του μικροοργανισμού κατά 1.5 log CFU/g από τον αρχικό του πληθυσμό ($p < 0.05$).

Είναι αξιοσημείωτο ότι κατά την συσκευασία του προϊόντος υπό αερόβιες συνθήκες (**Κεφάλαιο 1, Παράγραφος 3.1**) η αύξηση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* στο προϊόν ακολούθησε πιο αργό ρυθμό σε σχέση με τα δείγματα τροποποιημένης ατμόσφαιρας (M). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την άποψη ότι η χρήση συσκευασίας MAP αύξησε τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος κατά 2 ημέρες (μειώνοντας τον πληθυσμό των αερόβιων μικροοργανισμών), αλλά παράλληλα συνέβαλε στην ανάπτυξη του μικροαερόφιλου βακτηρίου *L. monocytogenes*.

Αρκετές έρευνες στο παρελθόν έχουν διαπιστώσει ότι η χρήση MAP για την συντήρηση τροφίμων έχει ευνοήσει την ανάπτυξη και επιβίωση προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών όπως είναι η *L. monocytogenes* (Hintlian & Hotchkiss 1986; Brackett 1994; Francis and O'Beirne 1997). Επιπλέον, η *L. monocytogenes* έχει αναφερθεί να παρουσιάζει βέλτιστη ανάπτυξη σε μικροαερόφιλο περιβάλλον (FSAI, 2007; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>)

Σημειώνεται ότι ο τρόπος μεταβολισμού της *L. monocytogenes* ενδέχεται να τροποποιείται ανάλογα με το διαθέσιμο οξυγόνο (αερόβιο, αναερόβιο, μικροαερόφιλο περιβάλλον) και χρειάζονται περαιτέρω έρευνες προκειμένου να διαπιστωθεί πως το βακτήριο επιβιώνει και κατορθώνει να προσβάλλει συγκεκριμένα κέντρα-στόχους των μικροοργανισμών (Lungu et al. 2009). Για παράδειγμα, οι Buchanan & Klawitter (1990) και Buchanan & Phillips (1990) αναφέρουν ότι ο περιορισμός του διαθέσιμου οξυγόνου κατά την μελέτη της ανάπτυξης του σε θρεπτικό ζωμό, οδήγησε σε βελτίωση της ικανότητας του μικροοργανισμού να προσαρμόζεται σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. χαμηλό pH) και κατά συνέπεια σε αύξηση της ικανότητας ανάπτυξής του, σε σχέση με τις αερόβιες συνθήκες. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι κάτω υπό συνθήκες αυξημένης συγκέντρωσης CO₂ και απουσία οξυγόνου (αναεροβίωση) παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που αποκωδικοποιούν το ένζυμο της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (glutamate decarboxylase, GDA) που βοηθά τον μικροοργανισμό να επιβιώνει σε αντίξοες και μικροαερόφιλες συνθήκες (Jydegaard-Axelsen et al., 2004). Επίσης, η αυξημένη ποσότητα λιπαρών οξέων (anteiso) στην κυτταρική της μεμβράνη (Lungu et al. 2009) την προστατεύουν από την επίδραση εξωγενών (δυσμενών) περιβαλλοντικών συνθηκών (π.χ. επίδραση συσκευασίας/αντιμικροβιακών παραγόντων). Γενικά, η *L. monocytogenes* έχει αποδειχτεί αρκετά ανθεκτική σε συγκέντρωση 50-80% CO₂ (Ingham et al., 1990).

Σύμφωνα με τους Gounadaki et al. (2007) η χρήση συσκευασίας κενού για την συντήρηση προϊόντος κρέατος (sliced salami) αύξησε την ικανότητα επιβίωσης της *L. monocytogenes* σε σχέση με την αερόβια συσκευασία, ειδικότερα σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης. Σε ανάλογες έρευνες που μελέτησαν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε προϊόντα ζωϊκής προέλευσης που συσκευάστηκαν σε MAP, οι Zeitoun & Debevere et al. (1991) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού αυξήθηκε κατά 1.7 log CFU/g κατά την συντήρηση προϊόντος κοτόπουλου (μπουτάκια) σε MAP (90% CO₂/10% O₂) για 8 ημέρες (6 °C). Επίσης, οι Wimpfheimer et al. (1990) αναφέρουν ότι κατά την συντήρηση νωπού προϊόντος κοτόπουλου σε MAP (72.5% CO₂/22.5 % N₂/5% O₂) ο πληθυσμός της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes*, αυξήθηκε κατά 3.3 log CFU/g από την αρχική της τιμή (2.45 log CFU/g) σε διάστημα 10 ημερών (4 °C). Τέλος, οι Claire et al. (2004) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση αυγών συσκευασμένων σε MAP (40% CO₂/60% N₂) αυξήθηκε κατά περίπου 2.5 log CFU/g από την αρχική της τιμή (2.5 log CFU/g) σε διάστημα 7 ημερών (4 °C), ενώ ανάλογη αύξηση αναφέρεται και από τους Lyver et al. (1998) κατά την συντήρηση νωπού προϊόντος θαλασσινών (raw surimi nuggets) σε συσκευασία με την χρήση απορροφητή οξυγόνου (4 °C). Μάλιστα, στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού ήταν υψηλότερος στα δείγματα συσκευασίας με απορροφητή οξυγόνου από τα αντίστοιχα της συμβατικής αερόβιας συσκευασίας, την 7^η και 28^η ημέρα συντήρησης.

Όσον αφορά ανάλογες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε προϊόντα λαχανικών, οι Francis & O' Beirne (1997) αναφέρουν ότι η συσκευασία λάχανου σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (96% N₂) οδήγησε σε αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση στους 8 °C (από 4.5 log CFU/g σε περίπου 7.0 log CFU/g), ενώ η χρήση αερόβιας συσκευασίας μείωσε τον πληθυσμό της κατά 1.0 log CFU/g στο ίδιο χρονικό διάστημα. Επίσης, οι Ringle et al. (1991) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* παρέμεινε αμετάβλητος κατά την συντήρηση σαλάτας λαχανικών (shredded chicory salad) στους 4 ή στους 8 °C σε αερόβιες συνθήκες, ενώ η χρήση συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας ευνόησε την ανάπτυξή της. Τέλος, οι Bennik et al. (1996) αναφέρουν ότι η χρήση MAP 20% CO₂/80% N₂ για την συντήρηση σαλάτας αντιδιού, ευνόησε την ανάπτυξη της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes*, εφόσον η αύξηση της στην συσκευασία MAP έφτασε τους 2.5 log CFU/g, ενώ στην περίπτωση της

αερόβιας συσκευασίας (21% O₂) δεν ξεπέρασε τους 1.0 log CFU/g (μετά από 8 ημέρες στους 8 °C).

Στο παρόν πείραμα, για την πρόβλεψη της πορείας ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στα δείγματα M εφαρμόστηκαν δυο θεωρητικά μοντέλα, το Combase® Predictor και Gamma® (4 °C). Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο Combase® προβλέπεται αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 2.0 log CFU/g από την 0^η έως την 8^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C ακολουθώντας την εξίσωση:

$$y = 0.2635x + 2.936 \quad (1)$$

Σύμφωνα με το μοντέλο Gamma η αύξηση του πληθυσμού του μικροοργανισμού ακολουθεί βραδύτερο ρυθμό, φτάνοντας τα 1.3 log CFU/g στο τέλος της περιόδου συντήρησης, ακολουθώντας την εξίσωση :

$$y = 0.1583x + 3.001 \quad (2)$$

Με βάση το **Γράφημα 3.1.1** η πειραματική πορεία ανάπτυξης του μικροοργανισμού στα δείγματα M (από την 0^η έως και την 8^η ημέρα) περιγράφεται από την εξίσωση:

$$y = 0.1693x + 3.816 \quad (3)$$

Με δεδομένο ότι η κλίση των παραπάνω εξισώσεων (slope) αντιπροσωπεύει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (μ) κατά την συντήρηση στους 4 °C (Baranyi & Roberts, 1994; Nalbantsoy et al., 2007), δηλαδή $\mu_{\text{πειρ}} = 0.1693 \log \text{CFUg}^{-1}\text{day}^{-1}$, τα πειραματικά αποτελέσματα προσομοιάζονται καλύτερα από το μοντέλο Gamma ($\mu_{\text{G}} = 0.1583 \log \text{CFUg}^{-1}\text{day}^{-1}$, εξίσωση 2) παρά με το μοντέλο Combase που προβλέπει μεγαλύτερο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης $\mu_{\text{Com}} = 0.2635 \log \text{CFUg}^{-1}\text{day}^{-1}$ (εξίσωση 1).

Ο προσδιοριζόμενος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού με βάση τα πειραματικά δεδομένα ($0.1693 \log \text{CFU g}^{-1}\text{day}^{-1}$, εξίσωση 3) βρίσκεται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Pal et al. (2008a), οι οποίοι αναφέρουν ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) 3 διαφορετικών στελεχών της *L. monocytogenes* κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0.15-0.21 log CFU g⁻¹day⁻¹, κατά την διάρκεια της συντήρησης ψητού φιλέτου γαλοπούλας σε συσκευασία κενού (4 °C). Επίσης, οι Pal et al. (2008b) αναφέρουν ότι ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης 19 διαφορετικών στελεχών της *L. monocytogenes* μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε γαλάκτωμα (slurries) γαλοπούλας κυμάνθηκε από 1.5 έως 2.0 log CFU g⁻¹day⁻¹ (4 °C).

Η προσθήκη χιτοζάνης στα δείγματα M-X μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 0.7 log CFU/g, μόλις από την 1^η ημέρα συντήρησης ($p < 0.05$). Η διαφορά πληθυσμών της *L. monocytogenes* μεταξύ των δειγμάτων του μάρτυρα και των δειγμάτων

M-X κυμάνθηκε από 0.7 έως 0.9 τις πρώτες δύο ημέρες συντήρησης των δειγμάτων, υποδεικνύοντας ότι η χρήση χιτοζάνης εμφάνισε ελαφρά δράση στην αναχαίτιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού ($p < 0.05$). Ωστόσο, από την 3^η ημέρα συντήρησης και μετά, η αντιλισταεριακή δράση της χιτοζάνης μειώθηκε ($p > 0.05$), και τα δείγματα M-X κατέληξαν σε παρόμοιους πληθυσμούς *L. monocytogenes* με τον μάρτυρα M, την 8^η ημέρα συντήρησης ($p > 0.05$). Η σταδιακή μείωση της αντιλισταεριακής δράσης της χιτοζάνης κατά την διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος παρατηρήθηκε και από τους Coma et al. (2002) οι οποίοι αναφέρουν περιορισμό της δράσης της χιτοζάνης ενάντια στον συγκεκριμένο μικροοργανισμό με την πάροδο του χρόνου. Η μείωση της αντιλισταεριακής δράσης της χιτοζάνης σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησης πιθανόν να οφείλεται στο ότι οι ήδη υπάρχουσες ελεύθερες αμινομάδες της χιτοζάνης δεσμεύονται στην επιφάνεια (κυτταρικό τοίχωμα/κυτταρική μεμβράνη) των βακτηριακών κυττάρων, με αποτέλεσμα να μην είναι πια διαθέσιμες για την αναστολή της ανάπτυξης νέων κυττάρων που αναπτύσσονται με την πάροδο του χρόνου συντήρησης (Coma et al. 2002) ή στην σταδιακή ανάπτυξη ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes* απέναντι στην αντιμικροβιακή δράση του συντηρητικού (προσαρμογή του παθογόνου μικροοργανισμού στις νέες συνθήκες ανάπτυξης). Ωστόσο, προσθήκη χιτοζάνης σε μεγαλύτερη συγκέντρωση από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, πιθανόν να οδηγούσε σε καλύτερη αντιλισταεριακή δράση.

Η αντιλισταεριακή δράση της χιτοζάνης έχει αναφερθεί από αρκετούς ερευνητές, αλλά τα συμπεράσματα ποικίλουν ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος/μέγεθος εμβολίου, την θερμοκρασία συντήρησης, το εξεταζόμενο υπόστρωμα (τρόφιμο, μοντέλο τροφίμου), την συγκέντρωση/διαλύτη/μοριακό βάρος/είδος της χρησιμοποιούμενης χιτοζάνης, το pH κ.α. Σύμφωνα με τους Beverly et al. (2008) η εμφάπτιση ψητού χοιρινού σε διάλυμα χιτοζάνης (χαμηλού μοριακού βάρους)/γαλακτικού οξέος (1%), μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 1.4-1.6 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 4 °C για διάστημα 14 ημερών. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι η χρήση διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα μειώνοντας τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 2-2.5 log CFU/g στο ίδιο χρονικό διάστημα. Επίσης, οι Fernandez-Saiz et al. (2010) αναφέρουν ότι η προσθήκη 10 mg φιλμ από chitosonium acetate σε ψαρόσουπα οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 2.0 log CFU/, μετά από συντήρηση στους 4 °C για διάστημα 25 ημερών. Τέλος, οι Inatsu et al. (2005) αναφέρουν ότι η προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης 0.1% σε λάχανο ζυμωμένης

μορφής (τουρσί) μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 0.9 log CFU/g και 1-2 log CFU/g την 1^η και 4^η ημέρα συντήρησης στους 10 °C, αντιστοίχως, ενώ οι Ponce et al. (2008) αναφέρουν ότι η εμβάπτιση κολοκύθας σε διάλυμα χιτοζάνης 1% w/v δεν κατάφερε να μειώσει τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes* (αρχικός πληθυσμός μολύσματος 6 log CFU/g).

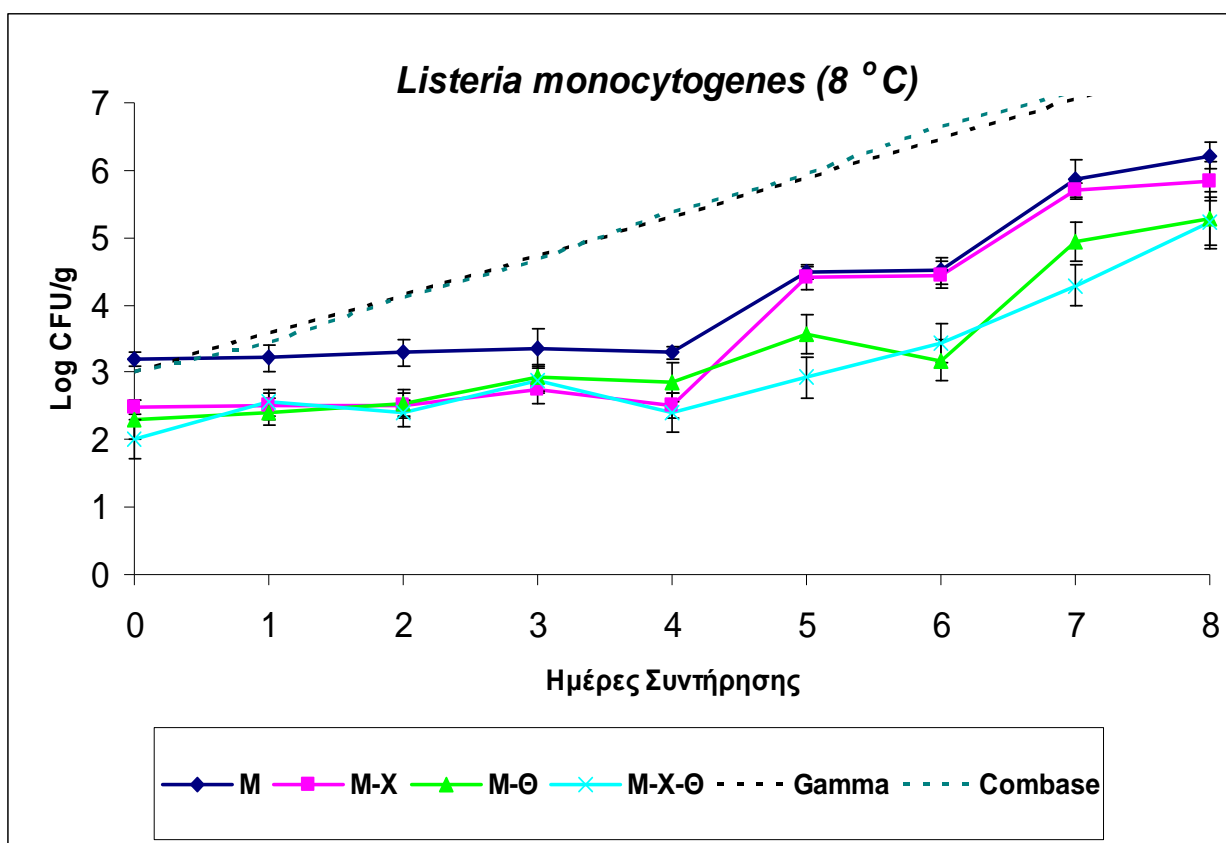
Τα δείγματα Μ-Θ μείωσαν σημαντικά τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p < 0.05$). Συγκεκριμένα, από την 2η ημέρα συντήρησης και μετά, η διαφορά των πληθυσμών του μικροοργανισμού μεταξύ των δειγμάτων Μ-Θ και Μ κυμάνθηκε στα 0.7-1.0 log CFU/g, και διατηρήθηκε στο ίδιο εύρος καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, υποδεικνύοντας ότι η χρήση του θυμαρέλαιου αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική από την χιτοζάνη, εφόσον διατήρησε την αντιλειτουργική του δράση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η αντιλειτουργική δράση της χιτοζάνης μειώθηκε σημαντικά με τον χρόνο συντήρησης (4-8^η ημέρα), στην περίπτωση του θυμαρέλαιου παρατηρήθηκε αντίθετο φαινόμενο, αφού η δράση του φάνηκε να αυξάνει με την πάροδο του χρόνου (2^η-8^η ημέρα συντήρησης). Στο τέλος της περιόδου συντήρησης, τα δείγματα Μ-Θ είχαν κατά 1.0 log CFU/g χαμηλότερο πληθυσμό της *L. monocytogenes*, σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$).

Η επίδραση του θυμαρέλαιου στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* έχει μελετηθεί από πολλούς ερευνητές. Σύμφωνα με ορισμένες από αυτές, οι Aureli et al. (1992) αναφέρουν ότι η προσθήκη θυμαρέλαιου (0.02 mL/25 gr) μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 2 log CFU/g κατά την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 4 °C, ενώ σύμφωνα με τους Hao et al. (1998) η προσθήκη θυμαρέλαιου (0.1 mL/25 gr), σε μαγειρεμένο στήθος κοτόπουλου δεν ανέστειλε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε σχέση με τον μάρτυρα (4 °C). Αντιθέτως, οι Solomakos et al. (2008) αναφέρουν μεγάλη μείωση της *L. monocytogenes*, κατά την συντήρηση μοσχαρίσιου κιμά στους 4 °C (μείωση κατά 3 log CFU/g). Ωστόσο, στην συγκεκριμένη έρευνα η συγκέντρωση του θυμαρέλαιου ήταν τρεις φορές μεγαλύτερη από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (0.6% v/w). Σύμφωνα με in vitro έρευνα των Rota et al. (2004) το θυμαρέλαιο αποδείχτηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αναχαίτιση της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* με ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση ≤ 1 $\mu\text{L/mL}$. Ωστόσο, η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς μειώνεται όταν χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα ανάπτυξης πραγματικά τρόφιμα αντί μοντέλων αυτών, λόγω της ύπαρξης υψηλών συγκεντρώσεων λίπους και πρωτεϊνών σε αυτά, τα οποία προστατεύουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Burt, 2004). Συγκεκριμένα, διαλυτοποίηση των Α.Ε. στην λιπιδική φάση των τροφίμων ή/και αλληλεπίδραση των φαινολικών τους συστατικών με τις πρωτεΐνες των τροφίμων περιορίζει την αντιβακτηριακή τους δράση (Juven et al., 1994). Επιπλέον, η μικρότερη ενεργότητα ύδατος των τροφίμων σε σχέση με τα μοντέλα αυτών, παρακωλύει την διείσδυση των αιθέριων ελαίων στα ενεργά κέντρα-στόχους των βακτηριακών κυττάρων (Smith-Palmer et al., 2001). Τέλος, η επιφάνεια των τροφίμων παρουσιάζει πόρους, στο εσωτερικό των οποίων καταφεύγουν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί βρίσκοντας καταφύγιο, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος και η επιφάνεια επαφής τους με τα αιθέρια έλαια και κατά συνέπεια να προστατεύονται από την αντιμικροβιακή τους δράση (Hao et al., 1998). Η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης (μεταχείριση Μ-Χ-Θ), αποδείχτηκε η πιο αποτελεσματική μέθοδος για την καθυστέρηση της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης. Συγκεκριμένα, στα δείγματα Μ-Χ-Θ, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* δεν μεταβλήθηκε από την αρχική του τιμή ($p > 0.05$), σημειώνοντας μείωση κατά 2.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 8^η ημέρα συντήρησης ($p < 0.05$). Επιπλέον, ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού δεν ξεπέρασε τους 3.2 log CFU/g κατά την

συντήρηση των δειγμάτων, ως και την 12^η ημέρα (τα αποτελέσματα μετά την 8^η ημέρα δεν δείχνονται). Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η χιτοζάνη και το θυμαρέλαιο έδρασαν (πιθανόν) συνεργιστικά για την αναχαίτιση της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την διάρκεια συντήρησης του προϊόντος (βακτηριοστατική δράση). Οι Zivanovic et al. (2005) αναφέρουν ότι η χρήση φιλμ από χιτοζάνη (10 mg/cm²) για την συντήρηση τεμαχισμένου προϊόντος κρέατος (bologna slices) μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 1-2 log CFU/g, αλλά μετά τον εμπλουτισμό του φιλμ με ριγανέλαιο 1% και 2% επήλθε μεγαλύτερη μείωση των βακτηριακών κυττάρων (μείωση κατά 3.6-4.0 log CFU/g την 5^η ημέρα συντήρησης στους 10 °C). Επιπρόσθετα, οι Ponce et al. (2008) αναφέρουν ότι η εμφάνιση κολοκύθας σε διάλυμα χιτοζάνης 2% w/v δεν κατάφερε να μειώσει τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes* ενώ η προσθήκη δενδρολίβανου (1%) στη συνέχεια στο διάλυμα βελτίωσε την αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης. Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και από τους Pranoto et al. (2005) οι οποίοι μελέτησαν την συνδυαστική χρήση αιθέριου ελαίου σκόρδου και χιτοζάνης ενάντια στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* (in vitro). Επίσης, οι Inatsu et al. (2005) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης 0.1% και AIT-hop 0.2% (αντιμικροβιακή ουσία που περιέχει Allyl isothiocyanate και λυκίσκο) έδρασε συνεργιστικά έναντι της ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, ενοφθαλμισμένης σε λάχανο, μειώνοντας τον πληθυσμό της κατά περίπου 3.0 log CFU/g κατά την συντήρηση στους 10 °C, για 4 ημέρες. Τέλος, οι Kim et al. (2008) αναφέρουν μικρότερη αντιλειτουργική δράση διαλύματος χιτοζάνης/λυσοζύμης όταν χρησιμοποιήθηκε για την εμφάνιση βρασμένων αυγών (χωρίς κέλυφος), εφόσον μείωσε τον πληθυσμό της κατά 0.8-1.4 log CFU/g κατά την συντήρηση στους 10 °C, για 7 ημέρες.

3.1.2 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόν Κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 8 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Στο **Γράφημα 3.1.2** απεικονίζεται η πορεία ανάπτυξης της ενοφθαλμισμένης *Listeria monocytogenes* στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 8 °C, σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας απουσία ή παρουσία θυμαρέλαιου/χιτοζάνης



Γράφημα 3.1.2: Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε προϊόν Κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w = 0.03% w/w, M-X), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, M-Θ) και με τον συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) στους 8 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης Gamma και Combase®.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.2**, ο αρχικός πληθυσμός της *L. monocytogenes* στα δείγματα M ήταν 3.2 log CFU/g (0η ημέρα συντήρησης). Κατά την διάρκεια των πρώτων

ημερών συντήρησης στους 8 °C, τα κύτταρα της *L. monocytogenes* δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά από τον αρχικό τους πληθυσμό, υποδεικνύοντας την μεσολάβηση φάσης προσαρμογής (lag phase) η οποία διήρκησε περίπου 4 ημέρες ($p < 0.05$). Η αργή ανάπτυξη του μικροοργανισμού τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης, πιθανόν να οφείλεται σε φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ της *L. monocytogenes* και της αυτόχθονης μικροχλωρίδας του προϊόντος, η οποία να παρεμπόδιζε την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού ή στο γεγονός ότι η θερμοκρασία στην οποία είχε γίνει η προσαρμογή (cold adaptation) του αρχικού ενοφθαλμίσματος (πριν τον ενοφθαλμισμό στο προϊόν) ήταν χαμηλότερη (4 °C), συνεπώς ο μικροοργανισμός πιθανόν να χρειάστηκε περισσότερο χρόνο να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες (8 °C). Ωστόσο, από την 4^η ημέρα και έπειτα, η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* ακολούθησε πιο ταχύ ρυθμό, φτάνοντας τους 6.2 log CFU/g, την 8^η ημέρα συντήρησης. Συνολικά, αυξήθηκε κατά 3.0 log CFU/g από τον αρχικό πληθυσμό ($p > 0.05$).

Το γεγονός ότι η *L. monocytogenes* κατάφερε να αναπτυχθεί με πιο γρήγορο ρυθμό μετά την 4^η ημέρα συντήρησης, πιθανόν να οφείλεται σε ένα από τους παρακάτω λόγους:

α) το παθογόνο βακτήριο ανέπτυξε ανθεκτικότητα μετά τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης, πιθανόν μέσω αύξησης των πρωτεϊνών ψυχρής επίπληξης, αύξησης της συγκέντρωσης σε ακόρεστα λιπαρά οξέα (anteiso) που διατηρούν την ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε βέλτιστη τιμή, αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου GAD, με αποτέλεσμα την θωράκιση από την επίδραση εξωγενών (δυσμενών) περιβαλλοντικών συνθηκών

β) με την πάροδο του χρόνου οι μικροοργανισμοί αλλοίωσης ενδεχομένως να είχαν μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα και κυτταρική ανανέωση (μετάβαση στην φάση στασιμότητας), συνεπώς να μειώθηκαν τα φαινόμενα ανταγωνισμού με την *L. monocytogenes* και η δεύτερη να αναπτύχθηκε ευκολότερα

γ) να πραγματοποιήθηκε λύση ορισμένων βακτηριακών κυττάρων των μικροοργανισμών αλλοίωσης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών τα οποία μεταβολίστηκαν από την *L. monocytogenes* προωθώντας την ανάπτυξή της, όπως παρατηρήθηκε και από τους Mellefont et al. (2008) κατά την συν-καλλιέργεια του παθογόνου με τον μικροοργανισμό *Lactobacillus plantarum*.

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, οι Wimpfheimer et al. (1990) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* που ενοφθαλμίστηκε σε κιμά κοτόπουλου συσκευασμένο σε MAP (72.5% CO₂/22.5% N₂/5% O₂), αυξήθηκε κατά 4.0 log CFU/g μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 10 °C, ύστερα από τη μεσολάβηση

φάσης προσαρμογής, η οποία διήρκησε περίπου 2 ημέρες. Επίσης, οι Barakat & Harris (1999) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* σε μαγειρεμένο κοτόπουλο που συσκευάστηκε σε MAP (44% CO₂/56% N₂) αυξήθηκε κατά 1-1.5 log CFU/g μετά από 10 ημέρες συντήρησης στους 3.5 °C, ενώ κατά την συντήρηση σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (6.5, 10 °C) η αντίστοιχη αύξηση ξεπέρασε τους 4.0 log CFU/g στο ίδιο χρονικό διάστημα. Επίσης, σύμφωνα με τους Barmpalia et al. (2005), η αύξηση της *L. monocytogenes* από τον αρχικό πληθυσμό, ξεπέρασε τους 4.0 log CFU/g κατά την συντήρηση τεμαχισμένου προϊόντος κρέατος (bologna slices) σε συσκευασία κενού, για 10 ημέρες (10 °C). Τέλος, οι Lyver et al. (1998) αναφέρουν ότι κατά την συντήρηση νωπού προϊόντος θαλασσινών (surimi nuggets) που συσκευάστηκε σε MAP (100% CO₂), αυξήθηκε κατά 3.0 log CFU/g μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 12 °C, ενώ σύμφωνα με τους Claire et al. (2004) ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού αυξήθηκε κατά 4.0 log CFU/g κατά την συντήρηση βρασμένων αυγών στους 8 °C, για 7 ημέρες, ενώ σύμφωνα με τους Bennik et al. (1996) κατά την συντήρηση σαλάτας αντιδιού σε MAP (20% CO₂/80% N₂) για 8 ημέρες στους 8 °C, ο πληθυσμός της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes* αυξήθηκε κατά 2.5 log CFU/g.

Για την πρόβλεψη της πορείας ανάπτυξης της *L. monocytogenes* στα δείγματα Μ εφαρμόστηκαν δυο θεωρητικά μοντέλα, το Combase® Predictor και Gamma® (8 °C). Σύμφωνα με τα δυο θεωρητικά μοντέλα, το Combase® προβλέπει αύξηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 4.8 log CFU/g από την 0η έως την 8 ημέρα συντήρησης στους 8 °C ακολουθώντας την εξίσωση:

$$y = 0.6103x + 2.912 \quad (1),$$

ενώ σύμφωνα με το μοντέλο Gamma η αύξηση του πληθυσμού του μικροοργανισμού ακολουθεί ανάλογο ρυθμό, φτάνοντας τους 7.62 log CFU/g στο τέλος της περιόδου συντήρησης (αύξηση κατά 4.6 log CFU/g), ακολουθώντας την εξίσωση :

$$y = 0.5773x + 3.000 \quad (2)$$

Με βάση το **Γράφημα 3.1.2** η πειραματική πορεία ανάπτυξης του μικροοργανισμού στα δείγματα Μ, περιγράφεται από την εξίσωση:

$$y = 0.3933x + 2.586 \quad (3)$$

Με δεδομένο ότι η κλίση των παραπάνω εξισώσεων (slope) αντιπροσωπεύει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (μ) κατά την συντήρηση στους 8 °C (Baranyi & Roberts, 1994; Nalbantsoy et al., 2007), Baranyi & Roberts, 1994), δηλαδή $\mu_{\text{πειρ}} = 0.3933$

$\log \text{CFUg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ (εξίσωση 3) τα πειραματικά αποτελέσματα είναι χαμηλότερα σε σχέση με αυτά που προβλέπονται από το μοντέλο Gamma ($\mu_G = 0.5773 \log \text{CFU g}^{-1} \text{day}^{-1}$, εξίσωση 2) ή από το μοντέλο Combase ($\mu_{\text{Com}} = 0.6103 \log \text{CFU g}^{-1} \text{day}^{-1}$, εξίσωση 1), ιδιαίτερα κατά την διάρκεια των πρώτων 4 ημερών της συντήρησης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι συχνά τα θεωρητικά μοντέλα πολλές φορές υπερεκτιμούν την μικροβιακή ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα διάφορα τρόφιμα, επειδή κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των μοντέλων σημαντικοί παράγοντες όπως η αλληλεπίδραση με την αυτόχθονη μικροχλωρίδα, η δομή και η σύσταση των προϊόντων δεν λαμβάνονται υπόψη (Mataragas et al., 2006).

Ο προσδιοριζόμενος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού με βάση τα πειραματικά δεδομένα ($0.3933 \log \text{CFU g}^{-1} \text{day}^{-1}$, εξίσωση 3) είναι αρκετά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο που αναφέρεται από τους Pal et al. (2008), οι οποίοι αναφέρουν ότι ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης 3 διαφορετικών στελεχών της *L. monocytogenes* κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών $0.97\text{-}1.76 \log \text{CFU g}^{-1} \text{day}^{-1}$, κατά την διάρκεια της συντήρησης ψητού φιλέτου γαλοπούλας σε συσκευασία κενού (7°C). Επίσης, οι Lianou et al. (2007) και αναφέρουν υψηλότερο ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση στους τεμαχισμένου προϊόντος κρέατος (sliced cured ham) στους 7°C ($0.9 \log \text{CFU g}^{-1} \text{day}^{-1}$).

Η προσθήκη χιτοζάνης, οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά $0.6\text{-}0.8 \log \text{CFU/g}$ σε σχέση με τον μάρτυρα, τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης του προϊόντος (M-X). Ωστόσο, από την 5^η ημέρα και ως το τέλος της περιόδου συντήρησης (8^η ημέρα συντήρησης) η διαφορά αυτή μειώθηκε σημαντικά στους $0.1\text{-}0.4 \log \text{CFU/g}$ ($p > 0.05$). Όπως ήδη αναφέρθηκε (Παράγραφος 3.1.1), η μείωση της αντιλειτουργικής ικανότητας της χιτοζάνης με την πάροδο του χρόνου πιθανόν να οφείλεται στην μείωση των διαθέσιμων ελευθέρων αμινομάδων των αμινοξέων, λόγω της δέσμευσης τους σε βακτηριακά κύτταρα (Coma et al., 2002), ή στην ανάπτυξη μηχανισμών άμυνας (αύξηση ανθεκτικότητας) από την *L. monocytogenes* απέναντι στην δράση του συντηρητικού. Επίσης, σύμφωνα με τους Fernandez-Saiz et al. (2010) η κυτταρική επιφάνεια της *L. monocytogenes* εμφανίζει μικρότερη ηλεκτραρνητικότητα σε θερμοκρασία ίση με 8°C (λόγω της σύνθεσης πρωτεϊνών cold-shock με προσαρμοστική δράση και περιορισμένων ελεύθερων καρβοξυλικών ομάδων στο κυτταρικό τοίχωμα), με αποτέλεσμα να μειώνεται η πιθανότητα αλληλεπίδρασης με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες τις χιτοζάνης.

Τα δείγματα M-Θ, την 0-1η ημέρα συντήρησης είχαν κατά 0.8-0.9 log CFU/g χαμηλότερο πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού, σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$). Κατά την διάρκεια των πρώτων 4 ημερών συντήρησης, τα δείγματα M-Θ και M-X επέδειξαν την ίδια περίπου αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *L. monocytogenes*, εφόσον οι πληθυσμοί τους κυμάνθηκαν στα ίδια επίπεδα ($p > 0.05$). Ωστόσο, το θυμαρέλαιο κατάφερε να διατηρήσει την αντιμικροβιακή του δράση ενάντια στο παθογόνο βακτήριο καθ' όλη την διάρκεια της περιόδου συντήρησης, σε αντίθεση με την χιτοζάνη που την έχασε μετά την 4^η ημέρα συντήρησης, καταλήγοντας σε τελικό πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 1.0 log CFU/g χαμηλότερο σε σχέση με τον μάρτυρα (8^η ημέρα συντήρησης), όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και στους 4 °C.

Τα δείγματα M-X-Θ μείωσαν τον αρχικό πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 1.2 log CFU/g, την 0η ημέρα συντήρησης. Στη συνέχεια και έως την 4^η ημέρα συντήρησης, τα δείγματα M-X-Θ και M-X, M-Θ επέδειξαν παρόμοιους πληθυσμούς του παθογόνου ($p > 0.05$) υποδεικνύοντας ότι εντός αυτού του χρονικού διαστήματος δεν έλαβε χώρα έντονη (πιθανή) συνεργιστική δράση μεταξύ χιτοζάνης και θυμαρέλαιου για την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Την 5^η ημέρα συντήρησης στους 8 °C, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* στα δείγματα M-X-Θ έφτασε τους 2.9 log CFU/g, σημειώνοντας μείωση κατά 1.6 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα και κατά 0.7, 1.5 log CFU/g σε σχέση με τα δείγματα M-Θ και M-X, αντίστοιχα (πιθανή συνεργιστική δράση). Ωστόσο, μεταξύ 6-8^{ης} ημέρας τα δείγματα M-X-Θ και M-Θ επέδειξαν παρόμοιους πληθυσμούς, υποδεικνύοντας ότι η συνεργιστική δράση χιτοζάνης/θυμαρέλαιου που παρατηρήθηκε την 5^η ημέρα, δεν ήταν πλέον το ίδιο εμφανής. Συνολικά, η συνδυαστική χρήση χιτοζάνης και θυμαρέλαιου, ενώ στους 4 °C μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 2.0 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης, στους 8 °C η διαφορά μειώθηκε στον 1.0 log CFU/g, υποδεικνύοντας καλύτερη (πιθανή) συνεργιστική δράση της χιτοζάνης και του θυμαρέλαιου σε χαμηλή θερμοκρασία (4 °C). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων της *L. monocytogenes* είναι μεγαλύτερος στους 8 °C από ότι στους 4 °C, όπως άλλωστε φαίνεται και από τις προβλέψεις των δυο θεωρητικών μοντέλων για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε αυτές τις θερμοκρασίες ($\mu_{4\text{ }^{\circ}\text{C}} < \mu_{8\text{ }^{\circ}\text{C}}$). Η αύξηση της ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes* στην επίδραση των αντιμικροβιακών παραγόντων συμβαδίζει με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης, και αυτό έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές. Οι Barmpalia et al. (2005) αναφέρουν ότι η αντιμικροβιακή δράση διάφορων χημικών συντηρητικών ενάντια στην

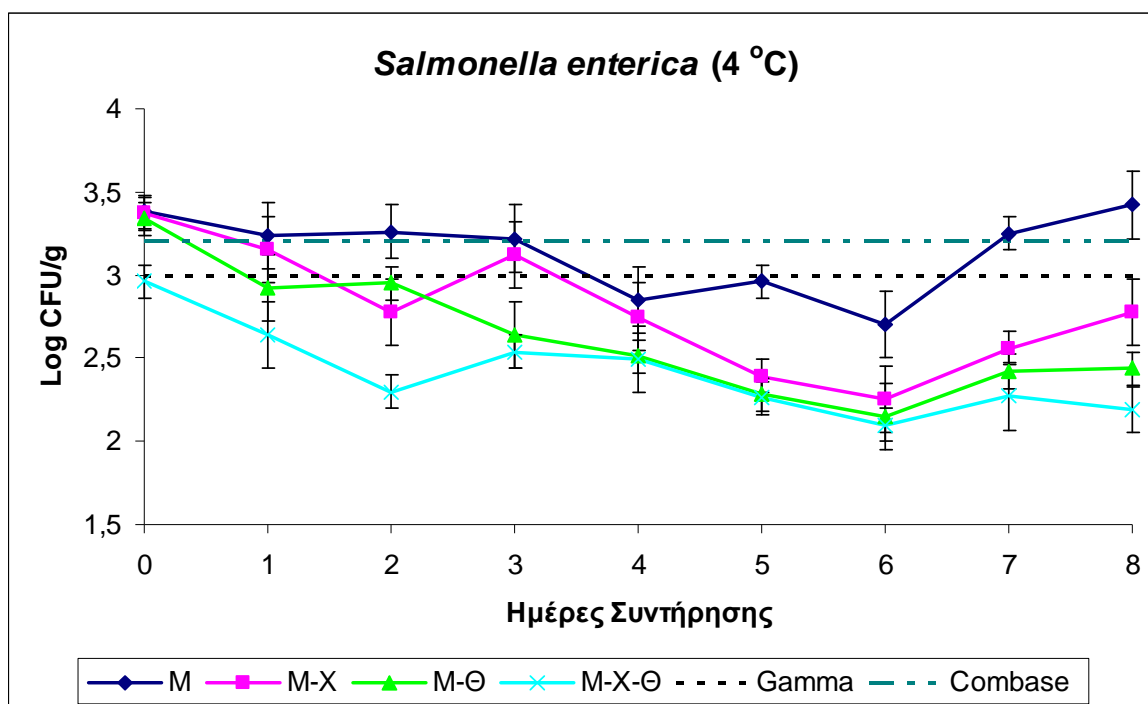
ανάπτυξη της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση προϊόντος από χοιρινό κρέας (pork bologna), μειώθηκε όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 4 °C στους 10 °C. Επίσης, οι Fernandez-Saiz et al. (2010) αναφέρουν ότι η *L. monocytogenes* παρουσίασε αυξημένη ανθεκτικότητα απέναντι στην αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης κατά την συντήρηση ψαρόσουπας στους 12 °C, ενώ κατά την συντήρηση στους 4 °C ή στους 37 °C η ανθεκτικότητά της εμφανίστηκε μειωμένη. Επιπρόσθετα, οι Aureli et al. (1992) αναφέρουν ότι η προσθήκη θυμαρέλαιου σε κιμά από χοιρινό κρέας μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 2.0 log CFU/g κατά την συντήρηση στους 4 °C, αλλά στους 8 °C η διαφορά μειώθηκε στους 1.0 log CFU/g.

3.2 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* ser. Montevideo σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C και 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Τα βακτήρια του είδους *Salmonella* spp. σε γενικές γραμμές δεν θεωρείται ότι αναπτύσσονται σε θερμοκρασία < 5 °C αλλά η επιβίωσή των ή/και η ανάπτυξή των εξαρτάται και από άλλους παράγοντες (εκτός της θερμοκρασίας) όπως το pH, η ατμόσφαιρα της συσκευασίας που χρησιμοποιείται κάθε φορά και η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα που επικρατεί στο υπο εξέταση τρόφιμο (Garcia de Fernando et al., 1995). Σε πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν σε κοτόπουλο (φιλέτο στήθος ή μπούτι) εμβολιασμένο με τον μικροοργανισμό *Salmonella enteritidis*, το συγκεκριμένο βακτήριο κατάφερε να επιβιώσει αλλά δεν αναπτύχθηκε κατά την συντήρηση στους 3 °C σε συσκευασία κενού, 100% CO₂, 100% N₂ ή 20% CO₂ (Nychas 1994). Σύμφωνα με τους Jay et al. (1997) και <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-typhoid-salmonellae.pdf> ο μικροοργανισμός *Salmonella enterica* μπορεί να αναπτυχθεί τόσο υπό αερόβιες ή αναερόβιες συνθήκες και για την αναχαίτιση της ανάπτυξής της σε θερμοκρασίες ψύξης απαιτείται συγκέντρωση CO₂ ≥ 80%. Ωστόσο η ανασταλτική επίδραση του CO₂ ενάντια στην ανάπτυξη της *Salmonella* μειώνεται όσο αυξάνει η θερμοκρασία συντήρησης (Langston et al., 1993). Γενικά, η αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης κατά την παραγωγή ή την συντήρηση των τροφίμων αποτελεί τον μεγαλύτερο κίνδυνο για την πρόκληση Σαλμονέλωσης από την κατανάλωσή τους (Juneja et al., 2007).

3.2.1 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* ser. Montevideo σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Η πορεία ανάπτυξης της ενοφθαλμισμένης *Salmonella enterica* στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά που συντηρήθηκαν στους 4 °C, σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα (δείγματα M, μάρτυρας), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w= 0.03% w/w, δείγματα M-X), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, δείγματα M-Θ) ή με συνδυαστική χρήση χιτοζάνης (1.5% v/w= 0.03% w/w) και θυμαρέλαιου (0.2% v/w) (δείγματα M-X-Θ), απεικονίζεται στο **Γράφημα 3.2.1**.



Γράφημα 3.2.1: Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε προϊόν Κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w = 0.03% w/w, M-X), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, M-Θ) και με τον συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) στους 4 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης Gamma® και Combase®.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.1**, το βακτήριο της *S. enterica* κατάφερε να επιβιώσει κατά την συντήρηση σε συσκευασία MAP απουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, χωρίς ωστόσο να παρατηρείται αύξηση από τον αρχικά ενοφθαλμισμένο πληθυσμό ($p>0.05$). Το γεγονός αυτό ήταν αναμενόμενο, εφόσον το βακτήριο της *Salmonella* έχει αναφερθεί ότι επιβιώνει αλλά δεν αναπτύσσεται εύκολα σε θερμοκρασίες μικρότερες των 5-7 °C (Gill & DeLacy 1991; Szcawinska et al., 1991; Cox et al., 1999, Juneja et al., 2007; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/non-typhoid-salmonellae.pdf>), λόγω χαμηλής μεταβολικής της δραστηριότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες και μειωμένης κυτταρικής ανανέωσης (Koutsoumanis et al., 1999; Beal et al. 2002; Hayouni et al., 2008). Ωστόσο, οι Baker et al. (1986) αναφέρουν αύξηση του πληθυσμού των *S. typhimurium* και *S. enteritidis* σε κρέας κοτόπουλου κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 2 °C για 2-6 ημέρες. Η μη ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά την συντήρηση του παρόντος εξεταζόμενου προϊόντος σε MAP παρατηρήθηκε επίσης υπό αερόβιες συνθήκες (Κεφάλαιο 1, Παράγραφος 3.2). Σύμφωνα με τους Ellis et al. (2006) ο πληθυσμός της ενοφθαλμισμένης *Salmonella typhimurium* σε φιλέτα από κοτόπουλο που συσκευάστηκαν σε MAP (25% CO₂/ 75% N₂) δεν παρουσίασε αύξηση από την αρχική του τιμή (4.0 log CFU/g) κατά την συντήρηση στους 3 °C για 15 ημέρες. Επίσης, οι Govaris et al. (2010) και Skandamis et al., (2002) αναφέρουν ανάλογη συμπεριφορά της *S. enteritidis* και *S. typhimurium* κατά την συντήρηση πρόβειου κιμά (αερόβια συσκευασία, 4 °C) ή μοσχαρίσιου κρέατος (MAP, αερόβια, ή συσκευασία κενού, 5 °C για διάστημα 8 και 12 ημερών, αντίστοιχα). Επιπρόσθετα, οι Dykes et al. (2001) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των κυττάρων της *Salmonella typhimurium* και *Salmonella brandenburg* παρέμεινε αμετάβλητος από την αρχική του τιμή (3 και 5 log CFU/g, αντίστοιχα) κατά την συντήρηση τεμαχισμένου μοσχαρίσιου κρέατος σε συσκευασία κενού στους 4 °C. Επιπλέον, στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι η χρήση συσκευασίας διοξειδίου του άνθρακα (100% CO₂) δεν μείωσε την συγκέντρωση των κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού, εφόσον ο πληθυσμός τους κυμάνθηκε στα ίδια επίπεδα με την συσκευασία κενού (Dykes et al. 2001). Τέλος, οι Kakiomenou et al. (1998) αναφέρουν επιβίωση αλλά όχι ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού κατά την συντήρηση σαλάτας λαχανικών στους 4 °C για 15 ημέρες.

Στο **Γράφημα 3.2.1** παρουσιάζεται η θεωρητική πρόβλεψη της συμπεριφοράς της *S. enterica* με την χρήση των μοντέλων Gamma® και Combase®. Το μοντέλο Gamma προέβλεψε επιβίωση αλλά όχι ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά την συντήρηση στους

4 °C. Σημειώνεται ότι το μοντέλο Combase δεν προβλέπει ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου σε θερμοκρασίες < 5 °C, αλλά θεωρεί ότι επιβιώνει.

Σύμφωνα με τα μοντέλα Gamma® και Combase® ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού παραμένει σταθερός, ακολουθώντας την σχέση $y = 3$ (εξίσωση 1), ενώ με βάση τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης η εξίσωση που περιγράφει την ανάπτυξη/επιβίωση της *S. enterica* (έως και την 8^η ημέρα συντήρησης) είναι η εξής:

$$y = -0.0198x + 3.2216 \text{ (εξίσωση 2)}$$

Ως αποτέλεσμα, δεν διαπιστώνονται σημαντικές διαφορές μεταξύ της πρόβλεψης του μοντέλου ($\mu_{\text{Gamma}} = \mu_{\text{com}} = 0$) και των πειραματικών αποτελεσμάτων ($\mu_{\text{πειρ}} = -0.0198 \log \text{CFUg}^{-1}\text{day}^{-1}$).

Τα δείγματα M-X παρουσίασαν περίπου τον ίδιο πληθυσμό κυττάρων της *S. enterica* με τα δείγματα του μάρτυρα (M) τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης στους 4 °C ($p > 0.05$). Ωστόσο, από την 4^η ημέρα συντήρησης και μετά, η διαφορά πληθυσμών της *S. enterica* μεταξύ των δειγμάτων του μάρτυρα και των δειγμάτων M-X αυξήθηκε. Συνολικά, η χρήση της χιτοζάνης μείωσε ελαφρά τον πληθυσμό της *S. enterica* κατά 0.6 log CFU/g, την 8^η ημέρα συντήρησης ($p < 0.05$). Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Inatsu et al. (2005) οι οποίοι αναφέρουν ότι η προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης σε λάχανο (0.1%) μείωσε τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *S. enteritidis* κατά 0.7 log CFU/g κατά την συντήρηση για 4 ημέρες στους 10 °C. Επίσης, οι Roller & Covill (2000) αναφέρουν ότι η προσθήκη διαλύματος (3.0 g/L) γλουταμινικής χιτοζάνης σε μαγιονέζα που περιείχε χυμό λεμονιού, μείωσε τον πληθυσμό της *S. enteritidis* κατά 0.5-1.0 log CFU/g κατά την συντήρηση στους 5 °C για διάστημα 8 ημερών, ενώ οι Chhabra et al. (2006) αναφέρουν ότι η εμβάπτιση μυδιών σε διάλυμα χιτοζάνης (2% w/v) δεν μείωσε τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *S. typhimurium* σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 4 °C. Σημειώνεται ότι οι Marques et al. (2008) αναφέρουν την τιμή 0.03-0.05% v/v ως την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της χιτοζάνης ενάντια στην ανάπτυξη της *Salmonella enterica* (10 °C).

Η προσθήκη θυμαρέλαιου στο προϊόν δεν άσκησε αντιβακτηριακή επίδραση στον μικροοργανισμό της *S. enterica* κατά την διάρκεια των πρώτων δυο ημερών συντήρησης στους 4 °C, εφόσον οι πληθυσμοί του μικροοργανισμού στα δείγματα M-Θ δεν διέφεραν στατιστικά από τους αντίστοιχους των δειγμάτων M ($p > 0.05$). Ωστόσο, την 3^η ημέρα συντήρησης η επίδραση του θυμαρέλαιου στην μείωση του μικροοργανισμού άρχισε να γίνεται αισθητή, εφόσον η διαφορά πληθυσμών μεταξύ M και M-Θ έφτασε τους 0.6 log

CFU/g. Μάλιστα, την 8^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C, τα δείγματα M-Θ μείωσαν τον πληθυσμό της *S. enterica* κατά 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$). Η επίδραση του θυμαρέλαιου στην αναχαίτιση της ανάπτυξης της *Salmonella* έχει αποδειχτεί σε έρευνες “in vitro”, αλλά δεν έχει μελετηθεί μέχρι τώρα σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία. Σύμφωνα με την in vitro έρευνα των Rota et al. (2004) η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) που απαιτήθηκε για την παρεμπόδιση την ανάπτυξης των *S. typhimurium* και *S. enteritidis* ήταν 0.4-0.8 μL/mL, ενώ σύμφωνα με τους Burt (2004) η MIC του θυμαρέλαιου ενάντια στην ανάπτυξη της *S. typhimurium* κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 0.45-20 μL/mL. Επίσης, οι Juven et al. (1994) αναφέρουν ότι η προσθήκη θυμόλης σε θρεπτικό άγαρ, μείωσε τον πληθυσμό της *S. typhimurium* κατά περισσότερο από 7 log CFU/g, όταν η συγκέντρωση της αντιμικροβιακής ουσίας ξεπέρασε τα 140 μg/L (αναερόβιες συνθήκες). Ωστόσο, η απαιτούμενη MIC και η αντιβακτηριακή δράση των αιθέριων ελαίων ενάντια στην ανάπτυξη της *Salmonella* spp. μπορεί να διαφοροποιείται όταν ως υποστρώματα ανάπτυξης χρησιμοποιούνται πραγματικά τρόφιμα αντί για μοντέλα αυτών (Shelef et al., 1984; Juven et al., 1994).

Η ευαισθησία των βακτηρίων στην δράση των αιθέριων ελαίων αυξάνει όσο μειώνεται το pH, η θερμοκρασία συντήρησης και το περιεχόμενο οξυγόνο στην συσκευασία των τροφίμων (Burt 2004). Επίσης, είναι γενικά αποδεκτό ότι η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος των τροφίμων θωρακίζει τα βακτήρια από την αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων εφόσον είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί διαλυτοποίηση των υδρόφοβων μορίων των ελαίων στην λιπιδική φάση του υποστρώματος, περιορίζοντας την διάχυση τους στα βακτήρια (Burt 2004). Επίσης, οι πρωτεΐνες των τροφίμων είναι δυνατό να αλληλεπιδράσουν με τα αιθέρια έλαια περιορίζοντας την αντιμικροβιακή τους δράση ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως η *S. typhimurium* και ο *Bacillus cereus* (Juven et al., 2004; Pol et al., 2001).

Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας φαίνονται να συμφωνούν με τα αντίστοιχα των Kim et al. (1995) οι οποίοι αναφέρουν ότι η προσθήκη καρβακρόλης (αντιμικροβιακού συστατικού του θυμαρέλαιου) συγκέντρωσης 0.5% w/v, σε φιλέτα ψαριού κομμένα σε κύβους (red grouper fish cubes) μείωσε τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *S. typhimurium* κατά 0.7-1.2 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 4 °C για διάστημα 4 ημερών, αλλά αύξηση της συγκέντρωσης της αντιμικροβιακής ουσίας οδήγησε σε πολύ καλύτερα αποτελέσματα. Παρομοίως, οι Skandamis et al. (2002) αναφέρουν ότι η προσθήκη ριγανέλαιου συγκέντρωσης 0.8% v/w σε μοσχαρίσια φιλέτα

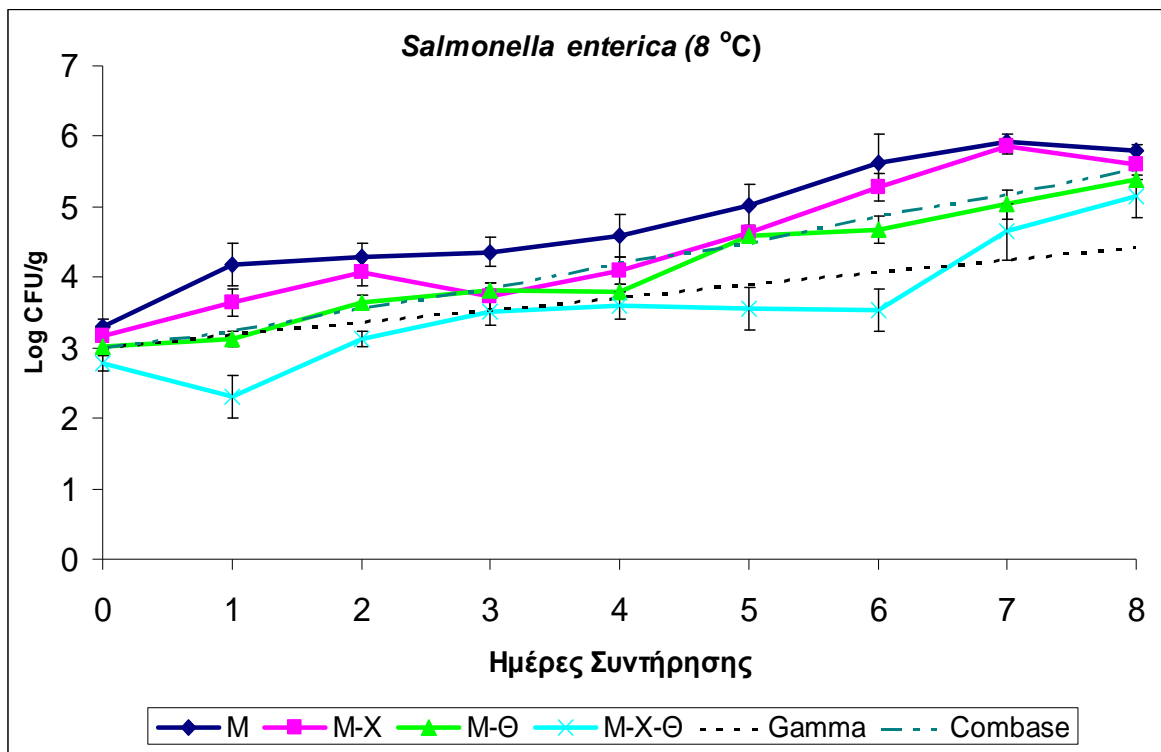
που συσκευάστηκαν σε MAP, μείωσε τον πληθυσμό της *S. typhimurium* κατά 2.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα την πρώτη ημέρα συντήρησης, ενώ περαιτέρω συντήρηση 8 ημερών στους 4 °C οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση (>3.7 log CFU/g). Τέλος, οι Turgis et al. (2008) αναφέρουν μείωση του πληθυσμού της *Salmonella* κατά 2.0 log CFU/g (σε σχέση με τον μάρτυρα) κατά την συντήρηση μοσχαρίσιου κιμά σε αερόβια συσκευασία παρουσία ριγανέλαιου 0.025% w/w (4 °C) ενώ οι Tassou et al. (1999) αναφέρουν ότι η συνδυαστική χρήση ελαιόλαδου, λεμονιού (10%) και ριγανέλαιου (0.4 %) για την συντήρηση φιλέτων μπακαλιάρου, μείωσε τον πληθυσμό της *S. enteritidis* κατά 1.0 log CFU/g τόσο σε αερόβιες όσο και σε αναερόβιες συνθήκες (1 °C). Τέλος, οι Gunduz et al. (2010) αναφέρουν ότι η κατεργασία ντομάτας με ριγανέλαιο 25, 75 και 100 ppm, μείωσε τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *S. Typhimurium* κατά 1.28, 2.16 και 2.78 log CFU/g, αντιστοίχως.

Η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης (M-X-Θ) μείωσε τον πληθυσμό της *S. enterica* κατά 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 2^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C ($p < 0.05$). Τα δείγματα M-X-Θ διατήρησαν την αντιμικροβιακή τους δράση ενάντια στον παθογόνο μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια της συντήρησης, εφόσον την 8^η ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των κυττάρων της *S. enterica* ήταν κατά 1.2 log CFU/g χαμηλότερος σε σχέση με τον μάρτυρα. Παρόλο που τα δείγματα M-X-Θ είχαν χαμηλότερους πληθυσμούς της *S. enterica* σε σχέση με τα δείγματα M-X και M-Θ ($p < 0.05$) την 2^η ημέρα συντήρησης, στη συνέχεια της περιόδου συντήρησης, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα δείγματα M-Θ (0.2 log CFU/g διαφορά με τα δείγματα M-Θ την 8^η ημέρα συντήρησης, $p > 0.05$). Συνεπώς, η συνεργιστική δράση μεταξύ θυμαρέλαιου και χιτοζάνης για την αναστολή της ανάπτυξης της *S. enterica* δεν ήταν εμφανής από την 2^η ημέρα συντήρησης και μετά, σε αντίθεση με την περίπτωση της *L. monocytogenes* όπου παρατηρήθηκε συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ των δυο αντιμικροβιακών παραγόντων, στους 4 °C. Ο λόγος που δεν παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση μεταξύ θυμαρέλαιου και χιτοζάνης στην περίπτωση της *S. enterica* κατά την συντήρηση στους 4 °C δεν είναι εξακριβωμένος, και απαιτεί περαιτέρω έρευνα στο μέλλον. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Inatsu et al. (2005), σύμφωνα με τους οποίους δεν παρατηρήθηκε συνεργιστική δράση μεταξύ της χιτοζάνης (0.1%) και AIT-hop 0.2% (αντιμικροβιακή ουσία που περιέχει Allyl isothiocyanate και λυκίσκο) κατά την συνδυαστική τους χρήση ενάντια στην ανάπτυξη της *S. enteritidis* σε λάχανο (τουρσί) που συντηρήθηκε στους 10 °C (μείωση πληθυσμού κατά 0.7 log CFU/g

σε σχέση με τον μάρτυρα). Ωστόσο, στην περίπτωση της συνδυαστικής χρήσης χιτοζάνης (0.1%) και ΑΙΤ (0.2%) για την μείωση της *L. monocytogenes*, οι δυο αντιμικροβιακοί απαράγοντες επέδειξαν συνεργιστική δράση, κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη. Από την άλλη πλευρά, οι Pranoto et al. (2005) αναφέρουν ότι εδώδιμα φιλμ χιτοζάνης δεν επέδειξαν αντιμικροβιακή δράση ενάντια στην *S. typhimurium* αλλά ο εμπλουτισμός τους με έλαιο σκόρδου (100 μL/g) βελτίωσε την δράση τους (agar-diffusion method).

3.2.2 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Στο **Γράφημα 3.2.2** παρουσιάζεται η πορεία ανάπτυξης της ενοφθαλμισμένης *Salmonella enterica* στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά που συντηρήθηκαν στους 8 °C, σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας απουσία ή παρουσία χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου. Στο ίδιο γράφημα παρουσιάζεται και η θεωρητική πρόβλεψη της συμπεριφοράς του παθογόνου βακτηρίου στην ίδια θερμοκρασία, με την χρήση των μοντέλων Gamma® και Combase®.



Γράφημα 3.2.2: Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w =0.03 w/w, M-X), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, M-Θ) και με τον συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) στους 8 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης Gamma® και Combase®.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.2**, τα δείγματα M επέδειξαν γρήγορη ανάπτυξη της *Salmonella enterica* κατά την συντήρηση στους 8 °C. Συγκεκριμένα, ο αρχικός πληθυσμός ήταν 3.3 log CFU/g (0η ημέρα συντήρησης) και κατέληξε στους 5.8 log CFU/g (8^η ημέρα συντήρησης), σημειώνοντας συνολική αύξηση κατά 2.5 log CFU/g ($p < 0.05$). Είναι αξιοσημείωτο ότι η ανάπτυξη της *S. enterica* στα δείγματα M, ήταν ταχύτερη κατά τις πρώτες 6 ημέρες συντήρησης στους 8 °C, εφόσον αυξήθηκε κατά 2.3 log CFU/g από την αρχική τιμή μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα. Ωστόσο, από την 6^η και ως την 8^η ημέρα συντήρησης η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ακολούθησε βραδύτερο ρυθμό, εφόσον ο πληθυσμός του μικροοργανισμού αυξήθηκε μόλις κατά 0.2 log CFU/g ($p > 0.05$).

Η ικανότητα ανάπτυξης της *S. enterica* σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 7 °C έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές. Είναι αξιοσημείωτο ότι έρευνες αναφέρουν ότι το βακτήριο της *Salmonella* μπορεί να αναπτυχθεί εις βάρος της αυτόχθονης μικροχλωρίδας

των τροφίμων σε υψηλές θερμοκρασίες ψύξης (Mackey & Kerridge 1988; Nissen et al., 2000; Nissen et al., 2001). Συγκεκριμένα, οι Nissen et al. (2000) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός της ενοφθαλμισμένης *S. enteritidis* αυξήθηκε κατά περίπου 4.0 log CFU/g από την αρχική της τιμή, κατά την συντήρηση τεμαχισμένου μοσχαρίσιου κρέατος στους 10 °C σε αναερόβια συσκευασία MAP, για διάστημα 7 ημερών. Μάλιστα, στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι ο συγκεκριμένος παθογόνος μικροοργανισμός ακολούθησε ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης κατά την συντήρηση του προϊόντος στη συσκευασία MAP (60% CO₂/40% N₂/0.4% CO) από ότι παρατηρήθηκε όταν συσκευάστηκε στην συμβατική αερόβια συσκευασία (μάρτυρα). Επίσης, στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι η ενοφθαλμισμένης *S. enteritidis* επιβίωσε αλλά δεν αναπτύχθηκε όταν το τεμαχισμένο κρέας συντηρήθηκε σε συσκευασία υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (70% O₂/30% CO₂) και οι ερευνητές απέδωσαν το φαινόμενο αυτό σε ενδεχόμενο οξειδωτικό στρες του παθογόνου (oxidative stress reactions). Επίσης, οι Nissen et al. (2001) αναφέρουν ότι ο αρχικά ενοφθαλμισμένος πληθυσμός της *S. enteritidis* (3.5 log CFU/g) σε κοτόπουλο (αερόβια συσκευασία) αυξήθηκε κατά περίπου 3.5 log CFU/g μετά από συντήρηση 4 ημερών στους 10 °C. Τέλος, οι Gill & DeLacy (1991) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός της *S. typhimurium* αυξήθηκε κατά 1-2 log CFU/g κατά την συντήρηση μοσχαρίσιου κρέατος σε συσκευασία κενού, για διάστημα 5-6 ημερών (8, 10 °C).

Για την πρόβλεψη της πορείας ανάπτυξης της *S. enterica* στα δείγματα M, εφαρμόστηκαν δυο θεωρητικά μοντέλα, το Combase® Predictor και Gamma® (8 °C). Σύμφωνα με τα θεωρητικά μοντέλα, το Combase® προβλέπει αύξηση του πληθυσμού της *S. enterica* κατά 2.5 log CFU/g από την 0η έως την 8^η ημέρα συντήρησης στους 8 °C ακολουθώντας την εξίσωση:

$$y = 0.321x + 2.9238 \text{ (εξίσωση 1)}$$

ενώ σύμφωνα με το μοντέλο Gamma® η αύξηση του πληθυσμού του μικροοργανισμού ακολουθεί βραδύτερο ρυθμό, φτάνοντας τους 4.4 log CFU/g στο τέλος της περιόδου συντήρησης (αύξηση κατά 1.4 log CFU/g), ακολουθώντας την εξίσωση :

$$y = 0.1778x + 3.0009 \text{ (εξίσωση 2)}$$

Με βάση το **Γράφημα 3.2.2** η πειραματική πορεία ανάπτυξης του μικροοργανισμού στα δείγματα M, περιγράφεται από την εξίσωση:

$$y = 0.3095x + 3.5442 \text{ (εξίσωση 3)}$$

Με δεδομένο ότι η κλίση των παραπάνω εξισώσεων (slope) αντιπροσωπεύει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (μ) κατά την συντήρηση στους 8 °C (Baranyi &

Roberts, 1994; Nalbantsoy et al., 2007), τα πειραματικά αποτελέσματα περιγράφονται καλύτερα από το θεωρητικό μοντέλο Combase®, εφόσον $\mu_{\text{πειρ}} = 0.3095 \log \text{CFU}^{-1}\text{day}^{-1}$ (εξίσωση 3) και σύμφωνα με την εξίσωση (1) $\mu_{\text{com}} = 0.3210 \log \text{CFU}^{-1}\text{day}^{-1}$. Το μοντέλο πρόβλεψης Gamma® προσδιορίζει πολύ μικρότερη τιμή του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης του βακτηρίου, στους 8 °C ($\mu_G = 0.1778 \log \text{CFU}^{-1}\text{day}^{-1}$, εξίσωση 2).

Ο αρχικός πληθυσμός της *S. enterica* στα δείγματα M-X ήταν 3.2 log CFU/g και έφτασε τους 4.1 log CFU/g την 4^η ημέρα συντήρησης στους 8 °C (αύξηση κατά 0.9 log CFU/g από την αρχική τιμή). Τα δείγματα M-X είχαν κατά 0.6-0.7 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τον μάρτυρα μεταξύ της 3-4^{ης} ημέρας συντήρησης, αλλά στην συνέχεια της περιόδου συντήρησης η διαφορά άρχισε να μειώνεται σε τιμές μικρότερες των 0.4 log CFU/g, υποδεικνύοντας ότι η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης ενάντια στην ανάπτυξη της *S. enterica* ήταν πολύ περιορισμένη έως και μηδαμινή κατά την συντήρηση στους 8 °C ($p > 0.05$). Η αιτία αυτού του φαινομένου δεν είναι εξακριβωμένη, αλλά πιθανολογείται ότι μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη διαθεσιμότητα των ελεύθερων αμινομάδων της χιτοζάνης λόγω της δέσμευσής της από άλλους μικροοργανισμούς (π.χ. μικροοργανισμούς αλλοίωσης) ή σε φυσικοχημικές μεταβολές του προϊόντος (π.χ. μεταβολή του pH του προϊόντος) κατά την συντήρηση στους 8 °C, που είναι δυνατόν να έχουν αρνητική επίπτωση στην αντιμικροβιακή της δραστηριότητα. Για παράδειγμα, κατά την συντήρηση του προϊόντος στους 4 °C, ενώ το pH των δειγμάτων M-X κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 5.8-6.3 στην περίπτωση της συντήρησης στους 8 °C αυξήθηκε σε τιμές pH= 6.6-6.75 τις πρώτες 5 ημέρες συντήρησης, τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης φαίνεται να επηρεάζεται από την μεταβολή του pH του προϊόντος, εφόσον σύμφωνα με τους Devlieghere et al. (2004), αν η τιμή του είναι χαμηλότερη από το ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών, τότε η χιτοζάνη διατηρεί τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες, αλλά αν το pH αυξηθεί, η δράση της παρεμποδίζεται. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι σε υψηλές τιμές pH οι πρωτεΐνες του τροφίμου εμφανίζονται αρνητικά φορτισμένες με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με τις θετικά φορτισμένες ομάδες της χιτοζάνης, εξουδετερώνοντας το ηλεκτρικό της φορτίο και κατά συνέπεια να παρεμποδίζεται η δέσμευση της δεύτερης στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των μικροοργανισμών (Devlieghere et al., 2004). Ωστόσο, οι Tsai et al. (2006) αναφέρουν ότι η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης χαμηλού MB (που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη) δεν φάνηκε να επηρεάζεται από μεταβολή

του pH από τιμή 6.0 σε 7.0. Συνεπώς η περιορισμένη δράση της χιτοζάνης στην μείωση της *S. enterica* στην παρούσα μελέτη (8 °C) μπορεί να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες όπως π.χ. στην ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε έρευνα “in vitro” (Marques et al., 2008) η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της χιτοζάνης (μεσαίου MB) ενάντια στην *S. enterica* προσδιορίστηκε ως 0.03-0.05% v/v (10 °C).

Όσον αφορά άλλες έρευνες που μελέτησαν την επίδραση της χιτοζάνης στην μείωση της ανάπτυξης της *Salmonella* spp. σε άλλα τρόφιμα που συντηρήθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες, οι Fernandez-Saiz et al. (2010) αναφέρουν ότι η προσθήκη φιλμ από chitosonium acetate σε ψαρόσουπα (10-20 mg), μείωσε τον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού κατά $>2 \log \text{CFU/g}$ τις πρώτες 10 ημέρες συντήρησης στους 12 °C και μείωσαν τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού από $0.141 \log \text{CFUg}^{-1}\text{h}^{-1}$ σε $0.049-0.026 \log \text{CFUg}^{-1}\text{h}^{-1}$, αλλά στην συνέχεια της περιόδου συντήρησης τα κύτταρα του μικροοργανισμού ανέπτυξαν ανθεκτικότητα απέναντι στον αντιμικροβιακό παράγοντα. Ωστόσο, αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης ($>40 \text{ mg}$) οδήγησε σε πολύ καλύτερα αποτελέσματα.

Ο αρχικός πληθυσμός της *S. enterica* στα δείγματα M-Θ ήταν $3.0 \log \text{CFU/g}$ και ακολούθησε βραδύτερη αύξηση σε σχέση με δείγματα M, η οποία έφτασε τους $0.8 \log \text{CFU/g}$ την 4^η ημέρα συντήρησης ($p>0.08$). Η μέγιστη μείωση των κυττάρων της *S. enterica* από το θυμαρέλαιο παρατηρήθηκε μεταξύ 6^{ης} και 7^{ης} ημέρας συντήρησης, κατά περίπου $1.0 \log \text{CFU/g}$ πληθυσμός σε σχέση με τον μάρτυρα ($p<0.05$).

Από την σύγκριση των πειραματικών δεδομένων που ελήφθησαν για τα δείγματα M-Θ κατά την μελέτη της πορείας ανάπτυξης της *S. enterica* στους 4 και 8 °C, προκύπτει ότι το θυμαρέλαιο κατάφερε να διατηρήσει την ίδια αντιμικροβιακή δράση ενάντια στον μικροοργανισμό, εφόσον η μείωση των κυττάρων του παθογόνου, ήταν της ίδια αριθμητικής τάξης και στις δυο θερμοκρασίες ($1.0 \log \text{CFU/g}$), πάντα σε σχέση με τον μάρτυρα ($p<0.05$). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι την 8^η ημέρα συντήρησης η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου σημείωσε εξασθένηση, εφόσον την συγκεκριμένη ημέρα η διαφορά των πληθυσμών του παθογόνου μεταξύ των δειγμάτων M-Θ και M, μειώθηκε στους $0.4 \log \text{CFU/g}$ ($p> 0.05$). Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της συντήρησης στους 4 °C, εφόσον το θυμαρέλαιο διατήρησε τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες καθ' όλη την περίοδο της συντήρησης. Η εξασθένηση της αντιμικροβιακής δράσης του θυμαρέλαιου την 8^η ημέρα συντήρησης στους 8 °C, πιθανόν

να οφείλεται στο ότι με την πάροδο του χρόνου οι μικροοργανισμοί-στόχοι μπορεί να αναπτύξουν ανθεκτικότητα στην επίδραση των αιθέριων ελαίων, όπως προτάθηκε και από τους Hao et al. (1998). Επιπρόσθετα, οι Beuchat et al. (1994) αναφέρουν ότι η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων παρουσιάζεται πιο αυξημένη σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Hayouni et al. (2008), οι οποίοι μελέτησαν την πορεία ανάπτυξης της *S. enteritidis* ενοφθαλμισμένης σε μοσχαρίσιο κιμά, που συντηρήθηκε παρουσία του αιθέριου ελαίου του φασκόμηλου (*Salvia officinalis*) στους 4-7 °C. Η συγκεκριμένη έρευνα αναφέρει ότι παρουσία του ελαίου σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.02-1.0 % v/w) ο πληθυσμός της *S. enteritidis* μειώθηκε από 1.0 έως 1.6 log CFU/g, αλλά αύξηση της συγκέντρωσης του αιθέριου ελαίου (1-3 % v/w) οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα (μείωση κατά 2.1-2.8 log CFU/g). Οι Govaris et al. (2010) αναφέρουν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε πρόβειο κιμά (0.6% v/w) μείωσε τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *S. enteritidis* κατά 1.6 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 4 °C για 12 ημέρες, αλλά σε μεγαλύτερη θερμοκρασία συντήρησης (10 °C) η μείωση έφτασε τους 2.5 log CFU/g.

Ο αρχικός πληθυσμός της ενοφθαλμισμένης *S. enterica* στα δείγματα M-X-Θ ήταν 2.8 log CFU/g, επιδεικνύοντας μείωση κατά 0.5 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα ($p>0.05$), εντός μικρού χρονικού διαστήματος μετά τον εμβολιασμό του παθογόνου. Επίσης, μετά από περαιτέρω συντήρηση για 24 ώρες (1^η ημέρα) παρατηρήθηκε μείωση κατά 1.8 log CFU/g ($p<0.05$). Στη συνέχεια της περιόδου συντήρησης, η μείωση του πληθυσμού του μικροοργανισμού από την συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου και χιτοζάνης ήταν πιο έντονη, φτάνοντας τους 2.1 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, την 6^η ημέρα συντήρησης στους 8 °C. Μάλιστα, μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} ημέρας συντήρησης, ο συνδυασμός θυμαρέλαιου και χιτοζάνης είχε βακτηριοστατική επίδραση στον παθογόνο μικροοργανισμό, εφόσον δεν έλαβε χώρα σημαντική μεταβολή του πληθυσμού των κυττάρων του, σε αυτό το χρονικό διάστημα (3.12-3.54 log CFU/g μεταξύ 2^{ης} και 6^{ης} ημέρας, $p>0.05$). Ωστόσο, μεταξύ 7^{ης} και 8^{ης} ημέρα συντήρησης τα δείγματα M-X-Θ είχαν κατά 1.3 log CFU/g και 0.7 log CFU/g χαμηλότερο πληθυσμό της *S. enterica* σε σχέση με τον μάρτυρα αντίστοιχα ($p<0.05$), υποδεικνύοντας ότι η αντιμικροβιακή δράση του συνδυασμού χιτοζάνης-θυμαρέλαιου ενάντι της ανάπτυξης της *S. enterica* άρχισε να εξασθενεί με την πάροδο του χρόνου, κάτι που παρατηρήθηκε προηγουμένως και στην

περίπτωση των δειγμάτων M-X και M-Θ. Γενικά, τα δείγματα M-X-Θ είχαν χαμηλότερους πληθυσμούς της *S. enterica* σε σχέση με τα δείγματα M-X και M-Θ κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης ($p < 0.05$), μάλλον λόγω εμφάνισης (πιθανού) συνεργιστικού φαινομένου μεταξύ των δυο αντιμικροβιακών παραγόντων, στην αναχαίτιση της ανάπτυξης της *S. enterica* κατά την συντήρηση στους 8 °C. Είναι αξιοσημείωτο ότι το συγκεκριμένο (πιθανό) συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ των δυο αντιμικροβιακών παραγόντων ήταν πολύ ασθενέστερο στην περίπτωση της μελέτης της ανάπτυξης της *S. enterica* στα δείγματα M-X-Θ κατά την συντήρηση στους 4 °C.

Οι Pranoto et al. (2005) και Hasseini et al. (2008) αναφέρουν ότι φιλμ από χιτοζάνη δεν επέδειξαν αντιμικροβιακό φαινόμενο ενάντια στον μικροοργανισμό *S. typhimurium* και *S. enteritidis* (in vitro έρευνες) αλλά ο εμπλουτισμός του με έλαιο σκόρδου (100-400 μL/g) ή θυμαρέλαιο (0.5%) βελτίωσε την αντιμικροβιακή της δράση.

3.3 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C και 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Τα σπορογόνα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Bacillus cereus* απομονώνονται συχνά από τρόφιμα που διατηρούνται υπό ψύξη, όπως το γάλα, τα διάφορα προϊόντα κρέατος, και αυτά μπορούν να αποτελέσουν ενδεχόμενο κίνδυνο για την δημόσια υγεία, λόγω της ικανότητάς τους να αναπτύσσουν σπορογόνες μορφές (σπόρους) που αναπτύσσονται σε θερμοκρασία ψύξης 4-7 °C (Thorsen et al., 2009). Μάλιστα, σύμφωνα με τους Carlin et al. (2000), τα γεύματα που περιέχουν λαχανικά παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης του βακτηρίου, ιδιαίτερα εφόσον προηγουμένως έχουν υποστεί θερμική επεξεργασία (cook-chill), λόγω της ικανότητας των σπόρων του μικροοργανισμού να επιβιώνουν στις συνήθεις θερμοκρασίες μαγειρέματος.

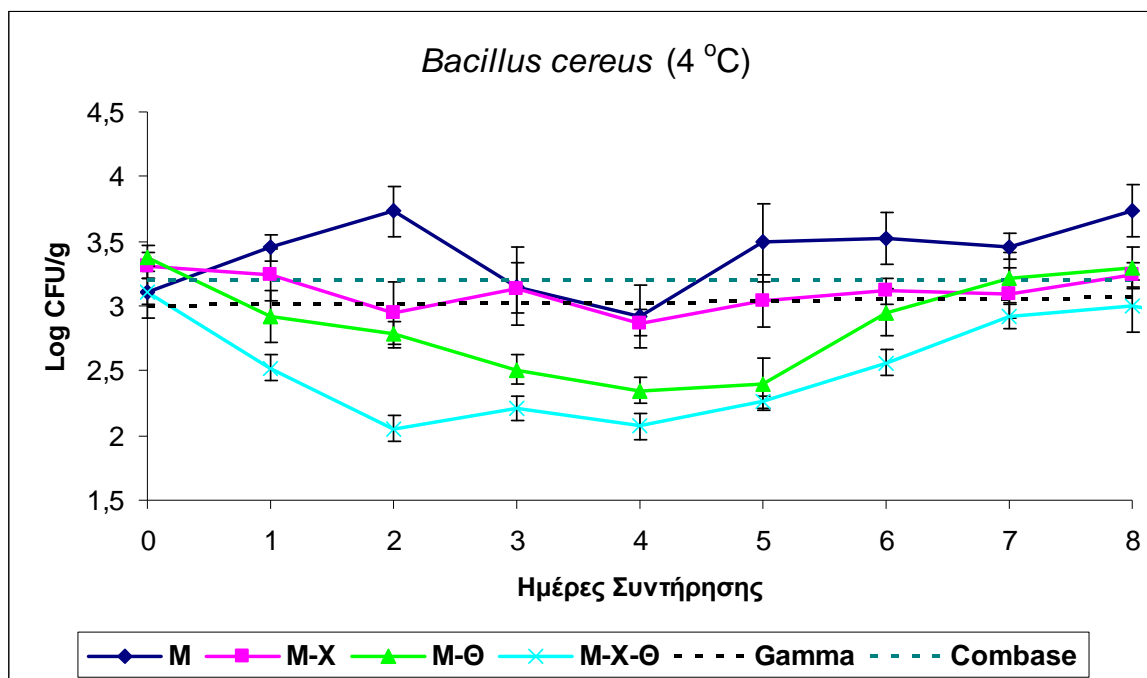
Το παθογόνο βακτήριο *B. cereus* παρουσιάζει βέλτιστη (άριστη) ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες, αλλά διαθέτει την ικανότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται απουσία οξυγόνου, δηλαδή υπό αναερόβιες συνθήκες (Whyte & Wong, 2004). Ωστόσο, ο ρυθμός ανάπτυξης και η παραγωγή τοξίνης από το βακτήριο του *B. cereus* είναι μικρότερη σε αναερόβιο περιβάλλον (Whyte & Wong, 2004; <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/bacillus-cereus.pdf>). Η ανάπτυξη του *B. cereus* σε προϊόντα που είναι

συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, εξαρτάται από την συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα (%) που χρησιμοποιείται κάθε φορά, από τις ιδιότητες του στελέχους του *B. cereus* (ψυχρότροφο ή μεσόφιλο στέλεχος), από την φάση ανάπτυξης (κύτταρα στην βλαστική φάση ή σπόροι), καθώς και από την θερμοκρασία συντήρησης. Η βλαστική (vegetative) ανάπτυξη των κυττάρων του *B. cereus* (αναπαραγωγή των κυττάρων του *B. cereus* χωρίς την παραγωγή σπόρων) μπορεί να παρεμποδιστεί από το διοξείδιο του άνθρακα, μέσω διεύθυνσής του στο εσωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την μείωση του ενδοκυτταρικού pH και την αλληλεπίδραση με τα μεταβολικά και ενζυμικά συστήματα του κυττάρου (Thorsen et al. 2009). Ωστόσο, περιορισμένος αριθμός ερευνών έχει επικεντρωθεί στην επίδραση του διοξειδίου του άνθρακα στο βακτήριο *B. cereus*, και το σημαντικότερο είναι ότι ακόμα λιγότερες διευκρινίζουν αν τα στελέχη που χρησιμοποίησαν ήταν ψυχρότροφα ή μεσόφιλα. Σε ορισμένες από αυτές, η ανάπτυξη του *B. cereus* δεν επηρεάστηκε από συγκέντρωση CO₂ μικρότερη του 5%, αλλά σε συγκέντρωση ≥ 50 % ορισμένα στελέχη δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν. Επίσης, συγκέντρωση CO₂ ίση με 20%, φάνηκε να καθυστερεί αλλά όχι να αναστέλλει την ανάπτυξη του *B. cereus*, in vitro (Bennik et al., 1995).

Τέλος, ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τον κίνδυνο ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε κρίσιμη συγκέντρωση για την παραγωγή τοξίνης σε τρόφιμα συσκευασμένα σε MAP, είναι η αύξηση της θερμοκρασίας (> 5 °C) κατά την μεταφορά ή την συντήρησή τους (Nauta et al., 2003). Συνεπώς η μελέτη της ανάπτυξης του *B. cereus* σε συνθήκες MAP κατά την συντήρηση σε θερμοκρασία ψύξης, εκτός των προτεινόμενων ορίων (> 5 °C) είναι απαραίτητη, όπως προτάθηκε και από τους Thorsen et al. (2009).

3.3.1 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 4 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Στο **Γράφημα 3.3.1(i)** παρουσιάζεται η πορεία ανάπτυξης του ενοφθαλμισμένου μίγματος στελεχών του *B. cereus* στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά που συντηρήθηκαν στους 4 °C σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας απουσία ή παρουσία θυμαρέλαιου ή/και χιτοζάνης



Γράφημα 3.3.1: Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w= 0.03% w/w, M-X), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, M-Θ) και με το συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) στους 4 °C - Συγκριτική μελέτη με τα μοντέλα πρόβλεψης Gamma® and Combase®

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.3.1**, ο αρχικός πληθυσμός του ενοφθαλισμένου παθογόνου μικροοργανισμού στα δείγματα M ήταν 3.0 log CFU/g και έφτασε τους 3.75 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C. Συνολικά, στα δείγματα M σημειώθηκε αύξηση του μικροοργανισμού κατά 0.75 log CFU/g από τον αρχικό του πληθυσμό ($p < 0.05$). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταβολή του πληθυσμού στα δείγματα M δεν παρουσίασε σταθερή πορεία κατά την συντήρηση των δειγμάτων, αλλά παρουσίασε διακυμάνσεις, ιδιαίτερα μεταξύ 3^{ης} και 5^{ης} ημέρας. Η αιτία εμφάνισης της συγκεκριμένης συμπεριφοράς παραμένει άγνωστος. Γενικά, η συνδυαστική χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας και χαμηλής θερμοκρασίας ψύξης συντέλεσε στην βραδεία ανάπτυξη του μικροοργανισμού στα δείγματα M, πιθανότατα παρατείνοντας την φάση προσαρμογής του βακτηρίου. Επίσης, σύμφωνα με τους Carlin et al., (2000), συγκέντρωση CO₂ ίση με 20%, μείωσε τον ρυθμό ανάπτυξης του *B. cereus* σε σχέση με τον μάρτυρα (0% CO₂), παρατείνοντας

την φάση προσαρμογής των κυττάρων του κατά την μελέτη της ανάπτυξής του σε αμυλούχο υπόστρωμα (potato medium, 10 °C). Ωστόσο στη ίδια έρευνα αναφέρεται ότι από την 5^η ημέρα συντήρησης και μετά, η δράση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας 20% CO₂ ενάντια στην ανάπτυξη του *B. cereus* εξασθένησε σημαντικά. Σημειώνεται ότι η πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του *B. cereus* σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης που συντηρήθηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα στους 4 °C, δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς μέχρι σήμερα. Ωστόσο, οι Aires et al. (2009) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του *B. cereus* σε παστεριωμένο γάλα που συντηρήθηκε στους 4 °C αυξήθηκε κατά 1.5 και 5.0 log CFU/g από την αρχική του τιμή (1.0 log CFU/g) μετά από 7 και 14 ημέρες, αντίστοιχα. Επιπλέον, οι Dufrenne et al. (1994) απομόνωσαν διάφορα στελέχη του βακτηρίου *B. cereus* από διάφορα τρόφιμα και παρατήρησαν ότι η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης πολλών από αυτών ήταν ≤ 5 °C.

Στο παρόν πείραμα, για την πρόβλεψη της πορείας ανάπτυξης του *B. cereus* στα δείγματα Μ εφαρμόστηκαν τα θεωρητικά μοντέλα Gamma® και Combase® (4 °C), και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο γράφημα **3.3.1**. Σημειώνεται ότι το θεωρητικό μοντέλο Combase® δεν προβλέπει ανάπτυξης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε θερμοκρασίες <5 °C, αλλά θεωρεί ότι επιβιώνει ($y=3.0$, εξίσωση 1). Σύμφωνα με το μοντέλο Gamma, προβλέπεται αύξηση του πληθυσμού του *B. cereus* μόνο κατά 0.1 log CFU/g, από την 0^η έως την 8^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C ακολουθώντας την εξίσωση:

$$y = 0.0083x + 3.0 \text{ (εξίσωση 2)}$$

Με βάση το **Γράφημα 3.3.1** η πειραματική πορεία ανάπτυξης του μικροοργανισμού στα δείγματα Μ περιγράφεται από την εξίσωση:

$$y = 0.0421x + 2.232 \text{ (εξίσωση 3)}$$

Με δεδομένο ότι η κλίση των παραπάνω εξισώσεων (slope) αντιπροσωπεύει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (μ) κατά την συντήρηση στους 4 °C (Baranyi & Roberts, 1994; Nalbantsoy et al., 2007), δηλαδή $\mu_{\text{πειρ}} = 0.0421 \text{ log CFUg}^{-1}\text{day}^{-1}$ (εξίσωση 2), τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν μεγαλύτερη αύξηση του μικροοργανισμού από αυτή που προβλέπεται από το μοντέλο Gamma ($\mu_G = 0.0083 \text{ log CFUg}^{-1}\text{day}^{-1}$, εξίσωση 1). Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στους παρακάτω λόγους: α) στην

χρησιμοποίηση 4 διαφορετικών στελεχών του *B. cereus* για την παρασκευή της μικτής καλλιέργειας ως εμβόλιο στο προϊόν. Γενικά, τα θεωρητικά μοντέλα πρόβλεψης, όπως το combase, είναι σχεδιασμένα για να προβλέπουν την συμπεριφορά μεσόφιλων στελεχών του *B. cereus* (Zwietering et al., 1996). Ωστόσο, το 1 από τα 4 στελέχη (PAL 22) έχει χαρακτηριστεί ως ψυχρότροφο (ανάπτυξη σε θερμοκρασία $<7\text{ }^{\circ}\text{C}$, Wijnants et al., 2005; 2007) ενώ τα στελέχη PAL 25, ATCC 10987 και ATCC 14579 έχουν χαρακτηριστεί ως μεσόφιλα (ανάπτυξη σε θερμοκρασία $\geq 7.0\text{ }^{\circ}\text{C}$, Wijnants et al., 2005; 2007, Den Besten et al., 2010), αλλά είναι δυνατή η εμφάνιση ψυχρόφιλου χαρακτήρα σε θερμοκρασίες ψύξης μέσω δημιουργίας πρωτεϊνών cold-shock και αύξησης της ποσότητας των ακόρεστων λιπαρών οξέων (ιδιαίτερα των anteiso) στην κυτταρική μεμβράνη (Brussole et al., 2010). β) τα θεωρητικά μοντέλα πρόβλεψης, είναι σχεδιασμένα να προβλέπουν την ανάπτυξη μόνο των βλαστικών κυττάρων του *B. cereus* (Little & Knochel, 1994), ωστόσο στην παρούσα έρευνα τα κύτταρα των χρησιμοποιούμενων στελεχών έχουν μεγάλη ικανότητα σπορογένεσης (σε ποσοστό $>80\%$) άρα δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την παραγωγή σπορίων, η συμπεριφορά των οποίων δεν συμπεριλαμβάνεται στα μοντέλα. Αξίζει να σημειωθεί ότι σχετικά πρόσφατα οι Nauta et al., (2003) ανέπτυξαν μοντέλο πρόβλεψης της συμπεριφοράς του *B. cereus* λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη ψυχρόφιλων και μεσόφιλων στελεχών του παθογόνου καθώς και σπορογόνες μορφές αυτού, και το συγκεκριμένο μοντέλο προβλέπει ανάπτυξη του *B. cereus* στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, ακόμη και σε κρίσιμες συγκεντρώσεις για την υγεία ($>10^5\text{ CFU/g}$). Επίσης, οι Zwietering et al. (1996) αναφέρουν ότι ο ρυθμός ανάπτυξης ψυχρότροφων στελεχών του *B. cereus* σε γάλα κατά την συντήρηση στους $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ μπορεί να φτάσει την τιμή 0.0112 h^{-1} .

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.3.1**, η προσθήκη χιτοζάνης στα δείγματα M-X παρουσίασε το μέγιστο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα στην μείωση του πληθυσμού του *B. cereus* την 2^η ημέρα συντήρησης (1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, $p<0.05$), αλλά στην συνέχεια η δράση της παρουσίασε εξασθένηση. Συγκεκριμένα, την 8^η ημέρα συντήρησης τα δείγματα M-X είχαν κατά περίπου 0.5 CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς του μικροοργανισμού σε σχέση με τον μάρτυρα ($p>0.05$). Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η χιτοζάνη παρουσίασε ελαφρά μείωση του μικροοργανισμού σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την διάρκεια της περιόδου συντήρησης στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Σύμφωνα με την έρευνα των Fernandes et al., (2009) η εμφάνιση αντιμικροβιακής δράσης από την πλευρά χιτοζάνης ενάντια στο βακτήριο *B. cereus* (στέλεχος ATCC 14579) εξαρτάται από το μοριακό της βάρος (χαμηλό, μεσαίο, υψηλό), την μορφή στην

οποία χρησιμοποιείται (ολιγομερές/συμβατική μορφή) καθώς και από την φάση ανάπτυξης των κυττάρων του μικροοργανισμού (βλαστική μορφή κυττάρων, σπόροι). Πιο συγκεκριμένα, οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν ότι κατά την “in vitro” χρήση χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (100 kDa) ενάντια στην ανάπτυξη των βλαστικών μορφών του *B. cereus*, η μείωση των κυττάρων κυμάνθηκε από 1 έως 2.5 log CFU/g, ενώ η χρήση χιτοζάνης με μεγαλύτερο MB (628 kDa) οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα (σταθερή μείωση κατά 3.0 log CFU/g). Ωστόσο, όταν μελετήθηκε η επίδραση της χιτοζάνης χαμηλού η υψηλού MB στους σπόρους του μικροοργανισμού, δεν παρατηρήθηκε καμία μείωση του πληθυσμού τους σε σχέση με τον μάρτυρα. Εντούτοις, η χρήση ολιγομερούς της χιτοζάνης οδήγησε σε μείωση κατά 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα (MB ≤ 5 kDa). Στην ίδια έρευνα πραγματοποιήθηκε βακτηριακή απεικόνιση των βλαστικών κυττάρων του *B. cereus* με την χρήση ατομικής μικροσκοπίας (atomic microscopy) και νανο-ταυτοποίησης, πριν και μετά την προσβολή τους από τη χιτοζάνη, και παρατήρησαν ότι η αντιμικροβιακή ουσία δεν μπόρεσε να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη του μικροοργανισμού, αλλά η δράση της περιορίστηκε στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από το περιβάλλον, μειώνοντας την μεταβολική του δραστηριότητα. Αντιθέτως, τα ολιγομερή της χιτοζάνης μπόρεσαν να διεισδύσουν στο εσωτερικό των βλαστικών κυττάρων *B. cereus*, λόγω του μικρότερου μήκους της ανθρακικής τους αλυσίδας (Fernandes et al., 2009). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι κάτω από συνθήκες μειωμένης διάθεσης των θρεπτικών συστατικών, τα κύτταρα του *B. cereus* αρχίζουν να χάνουν την βλαστική τους μορφή και ξεκινά η διαδικασία της σπορογονίας, με αποτέλεσμα την δημιουργία πολύ ανθεκτικών μορφών του μικροοργανισμού που αντέχουν στην επίδραση χημικών συντηρητικών (Μπεζιρτζόγλου, 2005).

Με δεδομένο ότι στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη χαμηλού MB (50-190 kDa) η οποία δεν μπορεί να διαπεράσει εύκολα την κυτταρική μεμβράνη των βλαστικών κυττάρων του *B. cereus*, όπως παρατηρήθηκε από τους Fernandes et al. (2009), η περιορισμένη επίδραση της χιτοζάνης στο βακτηριακό μίγμα στελεχών του παθογόνου είναι εν μέρη δικαιολογημένη. Επίσης, είναι δυνατό τα βλαστικά κύτταρα του *B. cereus* να προέβηκαν στην διαδικασία σπορογονίας με την πάροδο του χρόνου (π.χ. λόγω μείωσης των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών από την χιτοζάνη ή την μεταβολική δραστηριότητα των υπόλοιπων μικροοργανισμών αλλοίωσης), με αποτέλεσμα την δημιουργία πολύ ανθεκτικών σπόρων του μικροοργανισμού. Οι σπόροι του *B. cereus* παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε αντίξοες συνθήκες όπως η θέρμανση, ψύξη, η

ακτινοβόληση και η επίδραση χημικών συντηρητικών (Μπεζιρτζόγλου, 2005), ενώ μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες απόλυτης έλλειψης θρεπτικών συστατικών για πολλές δεκαετίες (Fernandes et al., 2009).

Επίσης, Οι Tsai et al. (2006) και Tsai & Su (1999) αναφέρουν ότι η φάση ανάπτυξης των κυττάρων του *B. cereus* ή του *E. coli* επηρεάζει δραστικά την αποτελεσματικότητα της χιτοζάνης ενάντι στην ανάπτυξή τους. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα των παθογόνων βακτηρίων που βρίσκονται στο στάδιο της εκθετικής ανάπτυξης είναι πιο ευαίσθητα στην αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης σε σχέση με εκείνα που βρίσκονται στην στάσιμη κατάσταση, πιθανόν λόγω της διαφορετικής ηλεκτραρνητικότητας που παρουσιάζει η κυτταρική τους επιφάνεια.

Τα δείγματα Μ-Θ επέδειξαν χαμηλότερους πληθυσμούς του *B. cereus* σε σχέση με τον μάρτυρα κατά την διάρκεια των πρώτων 5 ημερών συντήρησης στους 4 °C ($p < 0.05$), και η παρατηρούμενη μείωση έφτασε τον 1.0 log CFU/g (5^η ημέρα συντήρησης). Ωστόσο, μεταξύ 6^{ης}-8^{ης} ημέρας συντήρησης, η διαφορά μεταξύ των δειγμάτων Μ και Μ-Θ, όσον αφορά τον πληθυσμό του *B. cereus*, μειώθηκε στους 0.5 log CFU/g ($p > 0.05$). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η αντιμικροβιακή δράση του θυμαρέλαιου ενάντια στην ανάπτυξη του *B. cereus* μειώθηκε σημαντικά μετά την 5^η ημέρα συντήρησης, πιθανόν λόγω αύξησης της ανθεκτικότητας των κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού σε αυτόν. Επίσης, τα δείγματα Μ-Θ επέδειξαν χαμηλότερο πληθυσμό του *B. cereus* σε σχέση με τα δείγματα Μ-Χ κατά την διάρκεια των 5 πρώτων ημερών συντήρησης στους 4 °C ($p < 0.05$), αλλά στη συνέχεια οι μεταξύ των πληθυσμοί δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$). Κατά συνέπεια, ενώ το θυμαρέλαιο είχε καλύτερη επίδραση στην αναχαίτιση της ανάπτυξης τους *B. cereus* σε σχέση με την χιτοζάνη στα πρώτα στάδια και ως το μέσον της περιόδου συντήρησης (5^η ημέρα) με την πάροδο του χρόνου κατέληξαν στο ίδιο ασθενές αντιμικροβιακό αποτέλεσμα.

Οι Periago et al. (2001) αναφέρουν ότι η θυμόλη και η καρβακρόλη επέδειξαν από μικρή έως μηδενική αντιμικροβιακή επίδραση ενάντια στα κύτταρα του *B. cereus* όταν χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 0.3 mmol/L, αλλά όταν χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την νισίνη παρατηρήθηκε σημαντικό αντιμικροβιακό αποτέλεσμα (συνεργιστική δράση). Επίσης, οι Rajkovic et al. (2005) αναφέρουν ότι σε έρευνα “in vitro” η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) της καρβακρόλης ενάντια σε διαφορετικά στελέχη του *B. cereus* ήταν περίπου 150 µg/mL (7 °C). Ωστόσο, σύμφωνα με τους Ultee & Smid (2001) απαιτείται τουλάχιστον πενταπλάσια συγκέντρωση καρβακρόλης από την

αντίστοιχη που ορίστηκε ως MIC στις “in vitro” μελέτες, προκειμένου να επιτευχθεί ανάλογο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα σε ένα πραγματικό τρόφιμο.

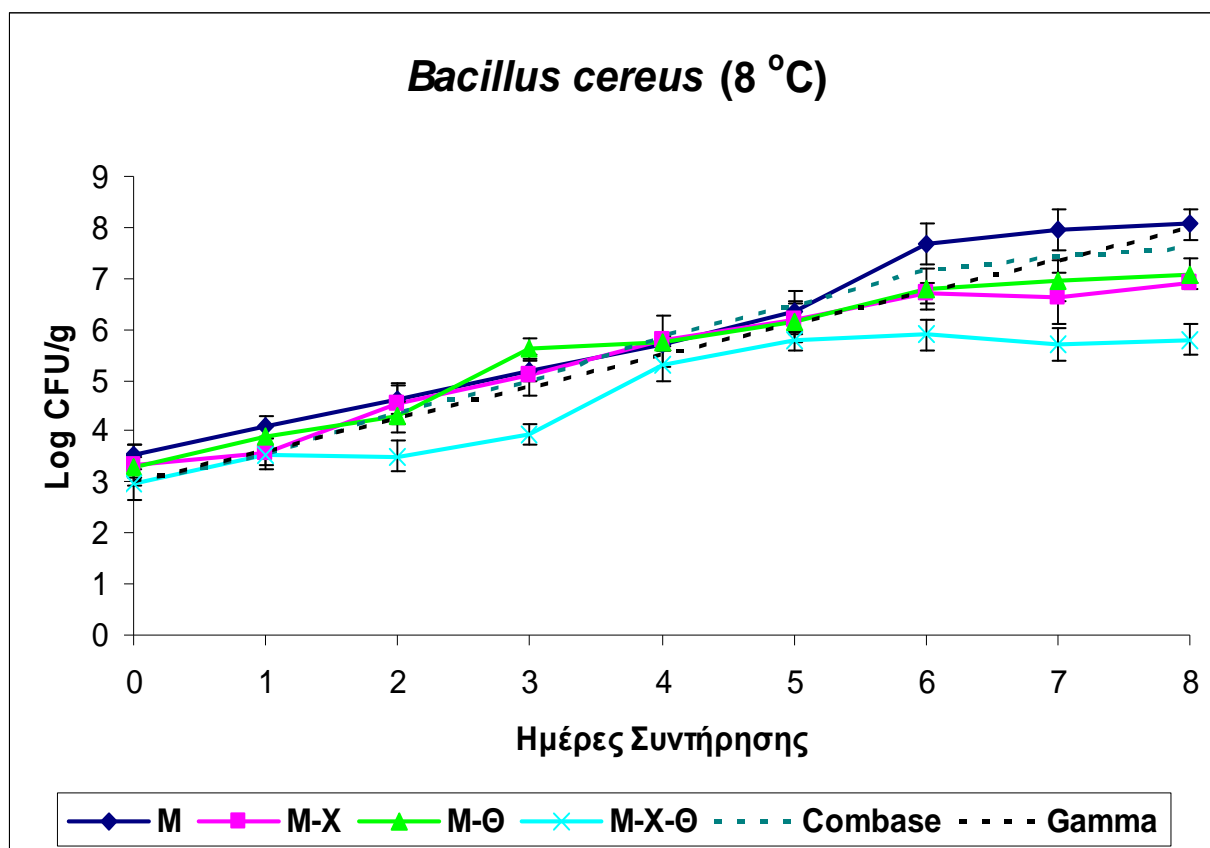
Τα δείγματα Μ-Χ-Θ μείωσαν τον πληθυσμό του *B. cereus* κατά 1.0-2.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, τις πρώτες 2 ημέρες συντήρησης στους 4 °C ($p < 0.05$) αλλά στη συνέχεια, και ως την 6^η ημέρα συντήρησης, η διαφορά βακτηριακών πληθυσμών του *B. cereus* μεταξύ των μεταχειρίσεων Μ και Μ-Χ-Θ διατηρήθηκε σταθερή στον 1.0 log CFU/g. Ωστόσο, στο τέλος της περιόδου συντήρησης (8^η ημέρα) η συγκεκριμένη διαφορά μειώθηκε στους 0.75 log CFU/g ($p < 0.05$). Τα δείγματα Μ-Χ-Θ επέδειξαν πιθανή συνεργιστική δράση μεταξύ θυμαρέλαιου και χιτοζάνης ενάντια στην ανάπτυξη του παθογόνου, η οποία ωστόσο φάνηκε να εξασθενίζει μεταξύ 7-8^{ης} ημέρας συντήρησης ($p > 0.05$).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας από την πλευρά των κυττάρων του *B. cereus* απέναντι των στη δράση της χιτοζάνης ή του θυμαρέλαιου (κυρίως μετά την 6^η ημέρα συντήρησης) καθώς και του συνδυασμού αυτών (κυρίως μετά την 7^η ημέρα συντήρησης) μπορεί να οφείλεται α) στην ύπαρξη μεσόφιλων στελεχών στο εμβόλιο, τα οποία μέσω της προσπάθειάς τους να προσαρμοστούν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (< 7 °C) αναπτύσσουν μηχανισμούς άμυνας (π.χ. πρωτεΐνες ψυχρής επίπληξης), που ταυτόχρονα τους παρέχουν προστασία και από άλλους παράγοντες που δυσχεραίνουν την ανάπτυξή τους (stresses) όπως έχει προταθεί και από τους Mahakarnchanakul et al. (1999) και Brussole et al., 2010), ή β) στην δημιουργία πολύ ανθεκτικών σπόρων του μικροοργανισμού από τα βλαστικά κύτταρα, αν και δεν μελετήθηκε ο σχηματισμός στους στην παρούσα εργασία.

Σύμφωνα με τους Kannat et al. (2008) η συνδυαστική χρήση διαλύματος χιτοζάνης-αιθέριου ελαίου μέντας (0.1%) οδήγησε σε αξιοσημείωτη μείωση κατά 2.0-3.0 log CFU/g των κυττάρων του *B. cereus* και του *Staphylococcus aureus*, μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε πρόβειο κρέας που συντηρήθηκε στους 0-3 °C. Η μείωση που αναφέρεται στην εργασία των Kannat et al. (2008), είναι αρκετά υψηλότερη σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης και μπορεί να οφείλεται στην χρήση διαφορετικού στελέχους του *B. cereus*, χιτοζάνης διαφορετικού ΜΒ (δεν αναφέρεται στην έρευνα των Kannat et al., 2008), στη χαμηλότερη θερμοκρασία συντήρησης (0-3 °C), τη συγκέντρωση της χιτοζάνης κ.α.

3.3.2 Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου στους 8 °C- Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης

Στο Γράφημα 3.3.2 παρουσιάζεται η πορεία ανάπτυξης του ενοφθαλμισμένου *Bacillus cereus* στα δείγματα από Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά που συντηρήθηκαν στους 8 °C, σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας απουσία ή παρουσία χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου. Στο ίδιο Γράφημα παρουσιάζεται και η θεωρητική πρόβλεψη της συμπεριφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού στην ίδια θερμοκρασία, με την χρήση των μοντέλων Gamma® και Combase®.



Γράφημα 3.3.2: Πορεία ανάπτυξης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) κατά την συντήρηση υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M), με την προσθήκη χιτοζάνης (1.5% v/w= 0.03% w/w, M-X), με την προσθήκη θυμαρέλαιου (0.2% v/w, M-Θ) και με το συνδυασμό χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ) στους 8 °C - Συγκριτική μελέτη με μοντέλα πρόβλεψης Gamma® and Combase®.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.3.2**, αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης στους 8 °C, ευνόησε σημαντικά την ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού, εφόσον ο πληθυσμός του αυξήθηκε με γρήγορο ρυθμό από την αρχική τιμή των 3.52 log CFU/g, σε τελική τιμή ίση με 8.06 log CFU/g (δείγματα M). Συνολικά, η αύξηση του πληθυσμού του *B. cereus* στα δείγματα M, μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 8 °C ήταν 4.54 log CFU/g. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι ο πληθυσμός του *B. cereus* ξεπέρασε την τιμή των 6.0 log CFU/g την 5^η ημέρα συντήρησης, γεγονός ιδιαίτερα ανησυχητικό για την ασφάλεια του τροφίμου, εφόσον οι van Netten et al., (1990), Grant et al. (1993), Mahakarnchanakul et al. (1999) και Finlay et al. (2002) αναφέρουν ότι σε τέτοια συγκέντρωση είναι πιθανή η παραγωγή διαρροϊκής τοξίνης (εντεροτοξίνης) από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Το γεγονός αυτό τονίζει την ανάγκη διατήρηση του συγκεκριμένου προϊόντος σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (<5 °C) σε συνδυασμό με συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, όπου καθυστερεί σημαντικά η ανάπτυξη του *B. cereus* (**Γράφημα 3.3.1, προηγούμενη παράγραφος**) καθώς επίσης και την εφαρμογή καταλλήλων μέτρων υγιεινής (π.χ. καλή εφαρμογή του συστήματος HACCP, καλή ποιότητα πρώτων υλών) για την εξασφάλιση της απουσίας του μικροοργανισμού ή τουλάχιστον την ύπαρξη του σε χαμηλή αρχική συγκέντρωση.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, βρίσκονται σε συμφωνία με τα αντίστοιχα των Bennik et al. (1995) οι οποίοι αναφέρουν ότι κατά την μελέτη ανάπτυξης του παθογόνου μικροοργανισμού *B. cereus* σε μοντέλο τροφίμου (solid surface model system) που διατηρήθηκε στους 8 °C σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (20% CO₂) με χαμηλή διαθεσιμότητα σε οξυγόνο ($\leq 1.5\%$), παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού του κατά 3.2 log CFU/g. Επίσης, οι Rajkovic et al. (2005) αναφέρουν ότι πληθυσμός του *B. cereus*, μετά τον εμβολιασμό του σε πουρέ πατάτας που συσκευάστηκε υπό κενό (VP), αυξήθηκε κατά περίπου 4.5 log CFU/g μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 7 °C. Επιπρόσθετα, οι Jaquette & Beuchat (1998) απέδειξαν ότι μίγμα στελεχών του *B. cereus* μπόρεσαν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία ίση με 8 °C, ενώ η παραγωγή διαρροϊκής τοξίνης παρατηρήθηκε μετά από επώαση στους 15 °C για 72 ώρες. Επίσης, οι Cronin et al. (2009) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του *B. cereus* που ενοφθαλμίστηκε σε μαγειρεμένο ρύζι, αυξήθηκε κατά 3.0 log CFU/g μετά από 6 ημέρες συντήρησης στους 10 °C, αλλά δεν παρατηρήθηκε παραγωγή σπόρων στο προϊόν (αρχική συγκέντρωση 3.0 log CFU/g). Επιπρόσθετα, οι Beuchat et al. (1997) μελέτησαν την πορεία ανάπτυξης ψυχρότροφων στελεχών του *B. cereus* σε βοδινό ζωμό (beef gravy) και παρατήρησαν αύξηση των

βλαστικών κυττάρων (vegetative cells) και των σπορίων κατά 0.6 και 2.0 log CFU/g, αντίστοιχα, από την αρχική τους τιμή (6.2-6.8 log CFU/g) μετά από 14 ημέρες συντήρησης στους 8 °C. Επίσης, οι Thorsen et al. (2009) μελέτησαν την επίδραση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας 0% O₂/20% CO₂ στην ανάπτυξη τριών διαφορετικών στελεχών του *Bacillus weihenstephanensis* (σπόροι) και παρατήρησαν ότι τα 2 από τα 3 παθογόνα στελέχη αναπτύχθηκαν κατά 1.5-2.0 log CFU/g μετά από 14 ημέρες συντήρησης στους 8 °C, ενώ αύξηση του περιεχόμενου οξυγόνου κατά μόλις 2% οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση κατά 2.0 log CFU/g μέσα σε μικρότερο χρονικό διάστημα (7 ημέρες στους 8 °C). Τέλος, οι Mahakarnchanakul et al. (1999) αναφέρουν αύξηση του πληθυσμού ενός ψυχρόφιλου και ενός μεσόφιλου στελέχους του *B. cereus* κατά 4.0 και 3.0 log CFU/g, αντίστοιχα, μετά τον ενοφθαλμισμό τους σε σάλτσα από κρέας κοτόπουλου (chicken gravy) που συντηρήθηκε στους 10 °C, για 7 ημέρες.

Όπως φαίνεται από την σύγκριση των αποτελεσμάτων των προαναφερόμενων μελετών, η πορεία ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου *B. cereus* εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η % ικανότητα σπορογονίας των χρησιμοποιούμενων στελεχών, η ικανότητά τους να αναπτύσσονται (ψυχρότροφα στελέχη) ή ακόμη και να προσαρμόζονται σε θερμοκρασίες ψύξης (μεσόφιλα στελέχη), η θερμοκρασία συντήρησης, η περιεχόμενη υγρασία, και η ικανότητα των στελεχών να αναπτύσσονται σε μικροαερόφιλλο ή αναερόβιο περιβάλλον. Με δεδομένο ότι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μίγμα στελεχών με διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ των δεν είναι εύκολη η απευθείας σύγκριση των αποτελεσμάτων με αντίστοιχες μελέτες. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι οι Wijnands et al. (2005, 2007) αναφέρουν ότι ο χρόνος διπλασιασμού της συγκέντρωσης (generation time) των κυττάρων των στελεχών PAL 22 και PAL 25 κατά την επώαση στους 10 °C (και τα δυο από αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην μικτή καλλιέργεια του μολύσματος του *B. cereus* στην παρούσα μελέτη), είναι 31.50 και 36.30 ώρες, αντιστοίχως. Επίσης, οι de Besten et al. (2010) μελέτησαν την πορεία ανάπτυξης του μεσόφιλου στελέχους ATCC 14579, που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη, και παρατήρησαν αύξηση του πληθυσμού του κατά 3.5 log CFU/g μετά από 2 ημέρες επώασης στους 12 °C (BHI broth).

Στο παρόν πείραμα, για την πρόβλεψη της πορείας ανάπτυξης του *B. cereus* στα δείγματα Μ εφαρμόστηκε το θεωρητικό μοντέλο Combase® Predictor και Gamma® (8 °C), και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 3.3.2**. Σύμφωνα με το μοντέλο Combase® προβλέπεται αύξηση του πληθυσμού του *B. cereus* κατά 4.6 log CFU/g, από την 0η έως την 8^η ημέρα συντήρησης στους 4 °C, ακολουθώντας την εξίσωση:

$$y = 0.6192x + 3.1233 \text{ (εξίσωση 1)}$$

Σύμφωνα με το μοντέλο Gamma® η συνολική αύξηση του πληθυσμού του μικροοργανισμού έως την 8^η ημέρα συντήρησης υπολογίζεται να είναι ίση με 5.0 log CFU/g και ακολουθεί την εξίσωση:

$$y = 0.6222x + 3.0 \text{ (εξίσωση 2)}$$

Με βάση το **Γράφημα 3.3.1(i)** η πειραματική πορεία ανάπτυξης του μικροοργανισμού στα δείγματα M, έως και την 8^η ημέρα συντήρησης, περιγράφεται από την εξίσωση:

$$y = 0.6155x + 3.4436 \text{ (εξίσωση 3)}$$

Με δεδομένο ότι η κλίση των παραπάνω εξισώσεων (slope) αντιπροσωπεύει τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης του μικροοργανισμού (μ) κατά την συντήρηση στους 8 °C (Baranyi & Roberts, 1994; Nalbantsoy et al., 2007), δηλαδή $\mu_{\text{πειρ}} = 0.6155 \text{ log CFU}^{-1}\text{day}^{-1}$ (εξίσωση 3), τα πειραματικά αποτελέσματα συμφωνούν και με τα δυο μοντέλα ($\mu_{\text{com}} = 0.6192$ και $\mu_G = 0.622 \text{ log CFU}^{-1}\text{day}^{-1}$, εξίσωση 1, 2 αντίστοιχα), εφόσον δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Τα δείγματα M-X και M-Θ παρουσίασαν την ίδια πορεία ανάπτυξης για το παθογόνο βακτήριο *B. cereus* στους 8 °C ($p > 0.05$). Γενικά, οι βακτηριακοί πληθυσμοί του παθογόνου στα δείγματα M-X και M-Θ, κυμάνθηκαν σε παρόμοιες τιμές με τις αντίστοιχες των δειγμάτων M, κατά την διάρκεια των πρώτων 5 ημερών συντήρησης στους 8 °C, υποδεικνύοντας ότι η χρήση χιτοζάνης ή θυμαρέλαιου δεν επέδρασε ενάντια στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού εντός του συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος ($p > 0.05$). Ωστόσο, την 8^η ημέρα συντήρησης τα δείγματα M-X και M-Θ είχαν κατά 1.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς του βακτηρίου σε σχέση με τον μάρτυρα ($p < 0.05$). Σύμφωνα με τους No et al. (2002), ο πληθυσμός των κυττάρων του *B. cereus* μειώθηκε κατά 3.80 log CFU/g, μετά από 24 ώρες έκθεσης (37 °C) σε χιτοζάνη χαμηλού MB (MB= 224) και συγκέντρωσης 0.02% w/v (διαλελυμένη σε 1% οξικό οξύ). Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης σε 0.04-0.10%, δεν οδήγησε σε βελτίωση της αντιμικροβιακής της δράσης ενάντια στο ίδιο βακτήριο.

Τέλος, τα δείγματα M-X-Θ είχαν κατά 2.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς του *B. cereus* σε σχέση με τον μάρτυρα, την 8^η ημέρα συντήρησης. Το γεγονός ότι τα δείγματα M-X-Θ δεν ξεπέρασαν το όριο των 6.0 log CFU/g (κρίσιμη τιμή για την παραγωγή εντεροτοξίνης) έως την 8^η ημέρα συντήρησης, είναι σημαντικό εφόσον έτσι

μειώνεται η πιθανότητα παραγωγής εντεροτοξίνης. Απεναντίας, τα δείγματα M, M-X και M-Θ ξεπέρασαν το αντίστοιχο όριο των 6.0 log CFU/g από την 5^η ημέρα συντήρησης. Αυτό υποδεικνύει ότι η αντιμικροβιακή επίδραση του συνδυασμού χιτοζάνης/θυμαρέλαιου ενάντια στον μικροοργανισμό *B. cereus* ήταν σημαντική κατά την συντήρηση του προϊόντος στους 8 °C. Αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση του συνδυασμού χιτοζάνης-θυμαρέλαιου είναι δυνατό να παρεμποδίσει τον σχηματισμό εντεροτοξίνης από τον *B. cereus*, αν και η παραγωγή της δεν αποτέλεσε αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Ultee & Smid (2001), κατά την συντήρηση μανιταρόσουπας παρουσία καρβακρόλης (3.0 mg/mL), αν και ο πληθυσμός των κυττάρων του *B. cereus* ήταν της τάξης των 6.0 log CFU/g, δεν παρατηρήθηκε η παραγωγή εντεροτοξίνης από τα κύτταρά του (5 ημέρες στους 17 °C) σε αντίθεση με τον μάρτυρα (παραγωγή εντεροτοξίνης 50 μg/mL σε συγκέντρωση *B. cereus* 7.30 log CFU/g).

Ο μηχανισμός κατά τον οποίο τα συστατικά των αιθέριων ελαίων (π.χ. θυμόλη, καρβακρόλη κ.α.) μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή τοξίνης από τα κύτταρα του *B. cereus* δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος, αλλά έχουν διατυπωθεί κάποιες πιθανές θεωρίες (Ultee & Smid 2001; Ultee et al. 1999): α) η έκκριση εντεροτοξίνης πραγματοποιείται στο εσωτερικό του κυττάρου και είναι μια διαδικασία η οποία απαιτεί την κατανάλωση μεταβολικής ενέργειας. Παρουσία καρβακρόλης/θυμόλης η κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου γίνεται πιο διαπερατή (δημιουργία πόρων) με αποτέλεσμα να προκαλείται εκροή κατιόντων καλίου (K⁺) και υδρογόνου (H⁺) και να παρεμποδίζεται η σύνθεση του ATP (μείωση κινητηρίου δύναμης πρωτονίων). Ελάττωση της διαθέσιμης μεταβολικής ενέργειας κατά αυτό τον τρόπο οδηγεί σε συσσώρευση της τοξίνης ενδοκυτταρικά με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η αύξησή της (αναχαίτιση μέσω ανάδρασης, feedback inhibition) και β) παρουσία καρβακρόλης ή θυμόλης, το βακτηριακό κύτταρο χρησιμοποιεί το σύνολο της μεταβολικής τους ενέργειας για να επιβιώσει και όχι για να παράγει εντεροτοξίνη.

3.4 Μεταβολή της μικροχλωρίδας του προϊόντος που ενοφθαλμίστηκε με τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes* ή *Salmonella enterica* ser. Montevideo ή *Bacillus cereus* και συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης ή/και θυμαρέλαιου στους 4 °C και 8 °C

Στους Πίνακες 1 (α) και (β) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τελικών πληθυσμών των μικροοργανισμών της μικροχλωρίδας αλλοίωσης των δειγμάτων M (μάρτυρες) ενοφθαλμισμένων με τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ή *Bacillus cereus* και που συντηρήθηκαν στους α) 4 °C και β) 8 °C για διάστημα 8 ημερών.

Πίνακας 1: Μεταβολή της μικροχλωρίδας αλλοίωσης των δειγμάτων M (μάρτυρες) ενοφθαλμισμένων με τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ή *Bacillus cereus* και κατά την συντήρηση στους α) 4 °C και β) 8 °C, για διάστημα 8 ημερών.

α) 4 °C	OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
<i>L. monocytogenes</i>	6.1±0.2	8.3±0.8	5.0±0.5	8.1±0.6	5.0±0.3	5.8±0.3	4.0±0.1	7.0±0.2
<i>S. enterica</i>	5.6±0.5	7.9±0.4	4.3±0.3	7.4±0.5	5.0±0.1	6.6±0.2	4.2±0.2	7.0±0.4
<i>B. cereus</i>	5.8±0.3	7.5±0.4	4.0±0.4	7.2±0.2	5.6±0.2	6.5±0.3	4.0±0.1	5.8±0.3

β) 8 °C	OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
<i>L. monocytogenes</i>	6.2±0.1	9.4±0.6	4.7±0.4	8.6±0.2	6.1±0.3	5.6±0.3	4.0±0.1	7.8±0.4
<i>S. enterica</i>	5.7±0.2	9.2±0.5	4.8±0.3	8.2±0.4	5.2±0.1	5.5±0.2	4.0±0.2	7.1±0.4
<i>B. cereus</i>	5.8±0.3	9.0±0.4	4.8±0.3	8.2±0.5	5.4±0.2	7.6 ±0.1	4.1±0.2	6.4±0.3

*O.M.X.= Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, LAB= Οξυγαλακτικά βακτήρια, Ps= Ψευδομονάδες, Br th= *Brochothrix thermosphacta*

Σύμφωνα με τον Πίνακα 1α, η Ο.Μ.Χ. αυξήθηκε από την αρχική τιμή 5.6-6.1 log CFU/g σε υψηλούς τελικούς πληθυσμούς της τάξεως των 7.5-8.3 log CFU/g, μετά από 8 ημέρες συντήρησης των δειγμάτων Μ στους 4 °C (παρουσία των ενοφθαλισμένων παθογόνων). Εκ των τριών μικροοργανισμών της μικροχλωρίδας αλλοίωσης που προσδιορίστηκαν, κυριάρχησαν τα προαιρετικά ανερόβια οξυγαλακτικά βακτήρια, με τελικούς πληθυσμούς της τάξης των 7.2-8.1 log CFU/g και ο *B. thermosphacta* (τελικοί πληθυσμοί 7.0 log CFU/g), με την εξαίρεση των δειγμάτων που είχαν ενοφθαλιστεί με το παθογόνο *B. cereus* (τελικός πληθυσμός 5.8 log CFU/g), πιθανόν λόγω εμφάνισης φαινομένων ανταγωνισμού του συγκεκριμένου μικροοργανισμού αλλοίωσης με το παθογόνο βακτήριο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε πληθυσμούς μεγαλύτερους των 7.0 log CFU/g (6^η-8^η ημέρα συντήρησης) συνοδεύτηκε από μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, υποδεικνύοντας ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν περισσότερο αποτελεσματικά έναντι της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (πιθανόν μέσω παραγωγής βακτηριοσινών). Σε παρόμοιες έρευνες, οι Devlieghere et al. (2001) και Bredholt et al., (1999) αναφέρουν ότι πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων της τάξης των 7.0-8.0 log CFU/g απαιτούνται για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε προϊόντα κρέατος που συντηρούνται υπό συνθήκες MAP. Χαμηλότεροι πληθυσμοί σημειώθηκαν για τις ψευδομονάδες και ειδικότερα στην περίπτωση των δειγμάτων που ενοφθαλμίστηκαν με *L. monocytogenes* (τελικός πληθυσμός 5.8 log CFU/g), όπως έχει διαπιστωθεί και σε παρόμοια μελέτη προϊόντων κοτόπουλου (nuggets) από τους Marshall et al. (1992). Συγκεκριμένα, οι Marshall et al. (1992) μελέτησαν την πορεία ανάπτυξης των βακτηρίων *Pseudomonas fluorescens* και *L. monocytogenes*, κατά την συν-καλλιέργεια τους σε προμαγειρεμένο προϊόν κοτόπουλου που συντηρήθηκε αερόβια, σε ατμόσφαιρα MAP₁ (76% CO₂/13.3% N₂/10.7% O₂) ή σε MAP₂ (80% CO₂/20% N₂). Παρατήρησαν ότι στους 11 °C και στην αερόβια ή MAP₂ ατμόσφαιρα, τα δύο βακτήρια επέδειξαν φαινόμενα ανταγωνισμού για διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, με αποτέλεσμα την αναχαίτιση ή καθυστέρηση της ανάπτυξης της *Ps. fluorescens*. Επιπρόσθετα, οι Buchanan & Bagi (1999) αναφέρουν ότι η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας για την καθυστέρηση της μικροβιολογικής αλλοίωσης σε προϊόντα κρέατος, μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλοίωσης (κυρίως των αερόβιων ψευδομονάδων) παρέχοντας προβάδισμα στην *L. monocytogenes* για την ανάπτυξή της.

Κατά την συντήρηση των δειγμάτων Μ στους 8 °C (Πίνακας 1β), σημειώθηκαν υψηλότεροι τελικοί πληθυσμοί της Ο.Μ.Χ., σε σχέση με τους 4 °C (Πίνακας 1α). Συγκεκριμένα, μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 8 °C, οι πληθυσμοί της Ο.Μ.Χ. ήταν της τάξης των 9-9.4 log CFU/g. Και σε αυτή την περίπτωση, επικράτησαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια με τελικούς πληθυσμούς ≥ 8.0 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης, σε όλες τις περιπτώσεις. Ο μικροοργανισμός *B. thermosphacta* κυμάνθηκε σε επίσης υψηλούς τελικούς πληθυσμούς για τα δείγματα που συντηρήθηκαν παρουσία *L.monocytogenes* ή *S. enterica* (7.8 και 7.1 log CFU/g, αντίστοιχα), ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων που ενοφθαλμίστηκαν με *B. cereus*, κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα (6.4 log CFU/g την 8^η ημέρα συντήρησης), όπως παρατηρήθηκε και στους 4 °C (πιθανός ανταγωνισμός με παθογόνο βακτήριο). Τέλος, οι ψευδομονάδες κυμάνθηκαν σε χαμηλότερες τιμές σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς αλλοίωσης που προσδιορίστηκαν, στα δείγματα που ενοφθαλμίστηκαν με *L.monocytogenes* ή *S. enterica*. Συγκεκριμένα, ενώ την 6^η ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των ψευδομονάδων στα συγκεκριμένα δείγματα ήταν περίπου 6.5 log CFU/g (αποτελέσματα δεν δείχνονται), την 8^η ημέρα μειώθηκαν στους 5.5-5.6 log CFU/g. Η παρατηρούμενη μείωση των ψευδομονάδων πιθανόν να οφείλεται σε φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ αυτών και της *L.monocytogenes* και *S. enterica*, που την ίδια ημέρα συντήρησης (8^η) είχαν φτάσει σε υψηλούς πληθυσμούς (περίπου 6.0 log CFU/g). Φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ διαφόρων στελεχών του βακτηρίου *Salmonella* spp. και των ψευδομονάδων έχουν παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές στο παρελθόν (Thomas & Wimpenny, 1996; Oblinger & Kraft, 1970). Συγκεκριμένα, οι Thomas & Wimpenny (1996) μελέτησαν την ανάπτυξη-επιβίωση τριών διαφορετικών στελεχών της *Salmonella* (*Salmonella virchow*, *Salmonella enteritidis* και *Salmonella typhimurium*) κατά την καλλιέργεια τους παρουσία ή απουσία δυο διαφορετικών στελεχών του μικροοργανισμού *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas putida* και *Pseudomonas fluorescens*). Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις τους, η συν-καλλιέργεια της *S. virchow*, *S. enteritidis* και *S. typhimurium* με τον μικροοργανισμό *P. fluorescens* κάτω από σχεδόν αναερόβιες συνθήκες (pH= 6.4-6.5), οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού της ψευδομονάδας κατά 2.7, 3.2 και 2.5 log CFU/g, αντίστοιχα. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και κατά την συν-καλλιέργεια των τριών στελεχών της *Salmonella* με τον μικροοργανισμό *P. putida*, οδηγώντας σε μείωση του δεύτερου κατά 1.9-2.6 log CFU/g. Ωστόσο, κάτω από αερόβιες συνθήκες η *P. putida* εμφάνισε αυξημένη ανθεκτικότητα και κατάφερε εκείνη με την σειρά της να μειώσει τον πληθυσμό της *S.*

typhimurium και *S. enteritidis* κατά 1.0 log CFU/g και 0.7 log CFU/g, αντιστοίχως. Επομένως, η εμφάνιση φαινομένων ανταγωνισμού μεταξύ των ψευδομονάδων και της *Salmonella* συσχετίζεται με την διαθεσιμότητα του υποστρώματος σε οξυγόνο, κάτι που προαναφέρθηκε και στην περίπτωση της *L. monocytogenes*.

Στους Πίνακες 2α και 2β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των τελικών πληθυσμών της μικροχλωρίδας αλλπίωσης των δειγμάτων M-X (προσθήκη χιτοζάνης 1.5% v/w=0.03% w/w) ενοφθαλισμένων με τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ή *Bacillus cereus* και κατά την συντήρηση στους α) 4 °C και β) 8 °C, για διάστημα 8 ημερών

Πίνακας 2: Μεταβολή της μικροχλωρίδας αλλοίωσης των δειγμάτων M-X (προσθήκη χιτοζάνης 1.5% v/w= 0.03% w/w) ενοφθαλισμένων με τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ή *Bacillus cereus* και κατά την συντήρηση στους α) 4 °C και β) 8 °C για διάστημα 8 ημερών.

α) 4 °C		OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
Παθογόνο	Ημέρα	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
		<i>L. monocytogenes</i>	5.6±0.2	7.5±0.2	4.7±0.4	6.5±0.6	4.8±0.3	4.3±0.3	3.6±0.1
<i>S. enterica</i>	5.8±0.5	6.6±0.2	4.1±0.3	5.2±0.4	4.7±0.1	5.1±0.2	3.6±0.2	5.2±0.1	
<i>B. cereus</i>	5.7±0.3	6.7±0.3	4.0 ±0.2	5.6±0.2	5.3±0.3	5.8±0.6	3.6±0.1	4.0±0.3	

β) 8 °C		OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
Παθογόνο	Ημέρα	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
		<i>L. monocytogenes</i>	5.5±0.2	9.4±0.6	4.7±0.5	8.4±0.6	5.5±0.5	5.4±0.3	3.8±0.1
<i>S. enterica</i>	5.5±0.3	8.8±0.3	3.8±0.3	7.7±0.5	4.4±0.1	5.9±0.2	3.2±0.4	5.7±0.4	
<i>B. cereus</i>	5.4±0.3	8.1±0.5	3.8±0.4	7.9±0.2	4.7±0.3	6.9±0.3	3.3±0.3	5.5±0.3	

*O.M.X.= Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, LAB= Οξυγαλακτικά βακτήρια, Ps= Ψευδομονάδες, Br th= *Brochothrix thermosphacta*

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 2α**, οι τελικοί πληθυσμοί της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ-Χ που ενοφθαλμίστηκαν με τα τρία παθογόνα βακτήρια *L. monocytogenes*, *S. enterica* ή *B. cereus* ήταν 7.5, 6.6 και 6.7 log CFU/g, αντίστοιχα (8^η ημέρα στους 4 °C). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έφτασαν τους 6.5 log CFU/g στην περίπτωση των δειγμάτων που ενοφθαλμίστηκαν με *L. monocytogenes*, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα (με *S. enterica* ή *B. cereus*) είχαν χαμηλότερους πληθυσμούς (5.2-5.6 log CFU/g). Τέλος, οι τελικοί πληθυσμοί των ψευδομονάδων για τα δείγματα με και *S. enterica* ή *B. cereus* ήταν 5.2-5.8 log CFU/g ενώ στα δείγματα με *L. monocytogenes* οι ψευδομονάδες παρέμειναν καθηλωμένες στην αρχική τους τιμή, πιθανόν λόγω ανταγωνισμού με το παθογόνο βακτήριο, το οποίο επέδειξε υψηλό τελικό πληθυσμό στα συγκεκριμένα δείγματα (5.1 log CFU/g). Τέλος, ο μικροοργανισμός *B. thermosphacta* κυμάνθηκε σε χαμηλότερους πληθυσμούς στο τέλος της περιόδου συντήρησης όλων των δειγμάτων (4.0-5.2 log CFU/g) και ιδιαίτερα στη περίπτωση των δειγμάτων με *B. cereus*.

Κατά την συντήρηση στους 8 °C η Ο.Μ.Χ. αυξήθηκε σε τελικούς πληθυσμούς 9.4, 8.8 και 8.1 log CFU/g για τα δείγματα Μ-Χ με *L. monocytogenes*, *S. enterica* και *B. cereus*, αντίστοιχα (8^η ημέρα συντήρησης, **Πίνακας 2β**). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κυριάρχησαν στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης όλων των δειγμάτων Μ-Χ με τελικές τιμές 7.7-8.4 log CFU/g (υψηλότεροι πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων στην περίπτωση των δειγμάτων με *L. monocytogenes*). Ο μικροοργανισμός *B. thermosphacta* αυξήθηκε από αρχικές τιμές 3.3-3.8 log CFU/g σε τελική τιμή 6.6 log CFU/g για τα δείγματα με *L. monocytogenes*, ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων με *S. enterica* ή *B. cereus* παρουσίασε μικρότερη μεταβολή, πιθανόν λόγω εκδήλωσης φαινομένων ανταγωνισμού με τα συγκεκριμένα παθογόνα βακτήρια (τελικές τιμές 5.5-5.7 log CFU/g). Στην περίπτωση των ψευδομονάδων παρατηρήθηκαν τελικοί πληθυσμοί περίπου 7.0 log CFU/g στα δείγματα με *B. cereus* αλλά παρουσία *L. monocytogenes* ή *S. enterica* σημειώθηκαν χαμηλότερες τιμές (5.4 και 5.9 log CFU/g, αντίστοιχα), πιθανόν λόγω ενδεχόμενου ανταγωνισμού όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των δειγμάτων Μ.

Πίνακας 3: Μεταβολή της μικροχλωρίδας αλλοίωσης των δειγμάτων Μ-Θ (προσθήκη θυμαρέλαιου 0.2% v/w) ενοφθαλμισμένων με τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ή *Bacillus cereus* και κατά την συντήρηση στους α) 4 °C και β) 8 °C για διάστημα 8 ημερών.

α) 4 °C	OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
<i>L. monocytogenes</i>	5.2±0.3	7.2±0.5	4.9±0.4	6.4±0.6	3.9±0.3	5.5±0.4	3.6±0.1	5.1± 0.2
<i>S. enterica</i>	5.6±0.5	6.1±0.5	4.0±0.3	5.3±0.5	4.5±0.1	5.0±0.2	3.7±0.2	4.9± 0.1
<i>B. cereus</i>	5.6±0.4	6.8±0.3	4.0 ±0.3	5.6±0.2	5.0±0.2	5.2±0.4	3.2±0.1	4.8± 0.4

β) 8 °C	OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
<i>L. monocytogenes</i>	5.5±0.2	8.4±0.4	3.6±0.2	7.4±0.5	4.8±0.3	5.3±0.3	3.6±0.1	6.3± 0.3
<i>S. enterica</i>	5.4±0.2	8.8±0.3	4.0±0.3	7.5±0.5	4.9±0.1	5.8±0.2	3.4±0.3	6.2± 0.4
<i>B. cereus</i>	5.5±0.1	8.1±0.5	4.1±0.4	7.7±0.2	4.5±0.2	6.9±0.3	3.5±0.3	5.8± 0.1

*Ο.Μ.Χ.= Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, LAB= Οξυγαλακτικά βακτήρια, Ps= Ψευδομονάδες, Br th= *Brochothrix thermosphacta*

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3α, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ-Θ μετά τον ενοφθαλμισμό τους με *L. monocytogenes*, *S. enterica* ή *B. cereus* και ύστερα από 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C αυξήθηκε στους 7.2, 6.1 και 6.8 log CFU/g, αντίστοιχα (αρχική τιμή 5.2-5.6 log CFU/g). Στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης δεν φάνηκε να επικρατεί κάποιος μικροοργανισμός αλλοίωσης έναντι των άλλων που προσδιορίστηκαν. Συγκεκριμένα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια από αρχική τιμή 4-4.9 log CFU/g αυξήθηκαν στους 5.3-6.4 log CFU/g, ενώ, οι ψευδομονάδες σε τιμές 5.0-5.5 log CFU/g. Τέλος, ο *Brochothrix thermosphacta* από αρχική τιμή 3.2-3.7 log CFU/g παρουσίασε μικρή μεταβολή σε όλα τα δείγματα (τελικός πληθυσμός 4.8-5.1 log CFU/g).

Στους 8 °C, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ-Θ αυξήθηκε σε υψηλές τιμές >8 log CFU/g, μετά από 8 ημέρες συντήρησης, παρουσία των ενοφθαλμισμένων παθογόνων (Πίνακας 3β). Εκ των τριών μικροοργανισμών αλλοίωσης που προσδιορίστηκαν, τα οξυγαλακτικά βακτήρια

κυμάνθηκαν στα υψηλότερα επίπεδα σε όλα τα δείγματα με τα τρία παθογόνα βακτήρια (τελικοί πληθυσμοί 7.4-7.7 log CFU/g), με ακόλουθο τον *B. thermosphacta* πλην των δειγμάτων με *B. cereus* (πιθανός ανταγωνισμός *B. thermosphacta* με *B. cereus*). Οι ψευδομονάδες κυμάνθηκαν στα χαμηλότερα επίπεδα στην περίπτωση των δειγμάτων με με *L. monocytogenes* ή *S. enterica* (5.3-5.8 log CFU/g) πιθανόν λόγω εκδήλωσης φαινομένων ανταγωνισμού. Ωστόσο, τα δείγματα με *B. cereus* επέδειξαν τελικούς πληθυσμούς των ψευδομονάδων περίπου 7.0 log CFU/g

Πίνακας 4: Μεταβολή της μικροχλωρίδας αλλοίωσης των δειγμάτων M-X-Θ (προσθήκη χιτοζάνης 1.5% v/w= 0.03 w/w και θυμαρέλαιου 0.2% v/w) ενοφθαλμισμένων με τα παθογόνα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ή *Bacillus cereus* και κατά την συντήρηση στους α) 4 °C και β) 8 °C για διάστημα 8 ημερών.

α) 4 °C	OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
<i>L. monocytogenes</i>	4.6±0.4	6.5±0.5	4.0±0.4	5.5±0.6	4.1±0.1	5.2±0.2	2.3±0.1	3.3± 0.2
<i>S. enterica</i>	5.0±0.4	5.6±0.2	4.0±0.3	4.4±0.5	3.6±0.3	4.8±0.2	3.6±0.4	3.9±0.1
<i>B. cereus</i>	5.0±0.5	5.9±0.5	3.9 ±0.3	5.0±0.4	4.2±0.2	5.1±0.1	2.5±0.1	4.1± 0.2

β) 8 °C	OMX (Log CFU/g)		LAB (Log CFU/g)		Ps (Log CFU/g)		Br th (Log CFU/g)	
	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η	0η	8 ^η
<i>L. monocytogenes</i>	4.8±0.2	8.2±1.1	3.9±0.2	7.0±0.2	4.6±0.2	5.1±0.4	3.0±0.1	6.0± 0.3
<i>S. enterica</i>	5.1±0.6	7.3±0.9	3.2±0.1	7.0±0.2	4.1±0.1	4.7±0.2	3.1±0.3	4.2± 0.4
<i>B. cereus</i>	4.8±0.3	7.2±0.2	3.6±0.1	7.2±0.1	4.2±0.2	7.0±0.5	3.0±0.3	4.2± 0.1

*O.M.X.= Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, LAB= Οξυγαλακτικά βακτήρια, Ps= Ψευδομονάδες, Br th= *Brochothrix thermosphacta*

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 4α**, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ-Χ-Θ που συντηρήθηκαν στους 4 °C παρουσία των παθογόνων *L. monocytogenes*, *S. enterica* ή *B. cereus* αυξήθηκε στους 6.5, 5.6 και 5.9 log CFU/g, αντίστοιχα. Στη μικροχλωρίδα των δειγμάτων φάνηκαν να επικρατούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι ψευδομονάδες, χωρίς ωστόσο οι τελικοί τους πληθυσμοί να είναι υψηλοί (4.4-5.5 και 4.8-5.2 log CFU/g, αντίστοιχα). Ο μικροοργανισμός *B. thermosphacta* κυμάνθηκε στα χαμηλότερα επίπεδα εκ των 3 μικροοργανισμών που προσδιορίστηκαν (3.3-4.1 log CFU/g).

Κατά την συντήρηση στους 8 °C, παρουσία *L. monocytogenes*, *S. enterica* ή *B. cereus* (**Πίνακας 4β**) η Ο.Μ.Χ. αυξήθηκε σε τελικούς πληθυσμούς 8.2, 7.3 και 7.2 log CFU/g, αντίστοιχα. Εκ των τριών μικροοργανισμών της μικροχλωρίδας αλλοίωσης που προσδιορίστηκαν, τα οξυγαλακτικά βακτήρια εμφάνισαν τους υψηλότερους τελικούς πληθυσμούς (7.0-7.2 log CFU/g) σε όλα τα δείγματα. Ο μικροοργανισμός *B. thermosphacta* έφτασε τους 6.0 log CFU/g στα δείγματα με *L. monocytogenes*, αλλά στα δείγματα με *S. enterica* ή *B. cereus* κυμάνθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα (πιθανός ανταγωνισμός με τα παθογόνα βακτήρια). Τέλος, οι ψευδομονάδες έφτασαν τους 7.0 log CFU/g στα δείγματα με *B. cereus*, αλλά στα δείγματα με *L. monocytogenes* ή *S. enterica* δεν ξεπέρασαν τους 5.1 log CFU/g, πιθανόν λόγω εκδήλωσης ανταγωνιστικών φαινομένων με τα συγκεκριμένα παθογόνα.

Σημειώνεται ότι τα φαινόμενα ανταγωνισμού μεταξύ μικροχλωρίδας αλλοίωσης και παθογόνων βακτηρίων είναι υποθετικά. Ωστόσο, στο μέλλον θα ήταν ενδιαφέρον να πραγματοποιηθούν πειράματα με στείρα (χωρίς αυτόχθονη μικροχλωρίδα) δείγματα για την καλύτερη μελέτη της ανάπτυξης/επιβίωσης των παθογόνων βακτηρίων στα δείγματα.

4.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Εκ των τριών παθογόνων βακτηρίων, η *Listeria monocytogenes* ήταν εκείνη που επέδειξε την μεγαλύτερη αύξηση από τον αρχικά ενοφθαλμισμένο πληθυσμό, κατά την συντήρηση των δειγμάτων Μ στους 4 °C (κατά 1.5 log CFU/g ή 40% από την αρχική τιμή), ενώ στους 8 °C, το παθογόνο βακτήριο που επέδειξε την μεγαλύτερη αύξηση από την αρχική του τιμή ήταν ο *Bacillus cereus* (αύξηση κατά 4.5 log CFU/g ή 128%).
- ✓ Το μοντέλο Gamma® προέβλεψε με επιτυχία τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση στους 4 °C, αλλά στους 8 °C η πειραματική ανάπτυξη του βακτηρίου ήταν χαμηλότερη από την προβλεπόμενη (και από τα δύο μοντέλα), ιδίως τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης. Η πειραματική ανάπτυξη της *S. enterica* είχε προβλεφθεί με επιτυχία από τα μοντέλα Gamma® και Combase® στους 4 °C, αλλά στους 8 °C συμφώνησε καλύτερα με το μοντέλο Combase®. Τέλος, η πειραματική ανάπτυξη του *B. cereus* ήταν ελαφρώς υψηλότερη από την αντίστοιχη που προέβλεψαν τα δυο μοντέλα στους 4 °C, αλλά στους 8 °C υπήρξε πλήρης συμφωνία και με τα δύο μοντέλα.
- ✓ Η χιτοζάνη (M-X) επέδειξε περιορισμένη αντιμικροβιακή δράση στην μείωση του πληθυσμού των τριών παθογόνων βακτηρίων στους 4 °C και 8 °C, αλλά στην περίπτωση του *B. cereus* μείωσε τον τελικό πληθυσμό του κατά 1.0 log CFU/g (σε σχέση με Μ) κατά την συντήρηση στους 8 °C.
- ✓ Το θυμαρέλαιο (M-Θ) ήταν αποτελεσματικό ενάντι της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* τόσο στους 4 °C όσο και στους 8 °C (μείωση κατά 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα). Ανάλογη ήταν και η επίδραση του θυμαρέλαιου στην περίπτωση της *S. enterica* στους 4 °C και 8 °C (μείωση κατά 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα) με εξαίρεση την 8^η ημέρα συντήρησης στους 8 °C όπου η αποτελεσματικότητά του μειώθηκε σημαντικά. Στην περίπτωση του *B. cereus*, επέδειξε περιορισμένη αντιμικροβιακή δράση μεταξύ 6^{ης}-8^{ης} ημέρας στους 4 °C, αλλά στους 8 °C μείωσε τον τελικό πληθυσμό κατά 1.0 log CFU/g, μετά από 5 ημέρες συντήρησης (αναλογία με δείγματα M-X).
- ✓ Η συνδυαστική χρήση θυμαρέλαιου-χιτοζάνης (M-X-Θ) άσκησε βακτηριοστατική δράση στον πληθυσμό της *L. monocytogenes* και του *B. cereus* κατά την

- συντήρηση στους 4 °C, υποδεικνύοντας πιθανό συνεργιστικό φαινόμενο μεταξύ τους (μείωση κατά 2.0 και 0.75 log CFU/g, αντίστοιχα σε σχέση με τον μάρτυρα)
- ✓ Κατά την συντήρηση της μεταχείρισης M-X-Θ στους 8 °C, το βακτήριο *L. monocytogenes* χρειάστηκε 5-6 ημέρες συντήρησης για να προσεγγίσει τον αρχικό ενοφθαλμισμένο πληθυσμό αλλά στην συνέχεια επέδειξε ταχύτερη ανάπτυξη (μείωση κατά 1.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα) ενώ παράλληλα μειώθηκε σημαντικά η (πιθανή) συνεργιστική δράση μεταξύ θυμαρέλαιου και χιτοζάνης.
 - ✓ Στην μεταχείριση M-X-Θ, ο πληθυσμός της *S. enterica* μειώθηκε κατά 1.2 log CFU/g από την αρχική του τιμή κατά την συντήρηση στους 4 °C, αλλά στους 8 °C, ενώ τα δείγματα M-X-Θ επέδειξαν βακτηριοστατική δράση στο βακτήριο τις πρώτες 6 ημέρες (μείωση κατά 2.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα), στην συνέχεια σημειώθηκε ανάπτυξη (μείωση κατά 0.7-1.3 log CFU/g σε σχέση με M). Η (πιθανή) συνεργιστική δράση μεταξύ θυμαρέλαιου και χιτοζάνης στην περίπτωση της *S. enterica* ήταν περισσότερο εμφανής κατά την συντήρηση στους 8 °C, παρά σε χαμηλότερη θερμοκρασία.
 - ✓ Κατά την συντήρηση των δειγμάτων M, M-X και M-Θ στους 8 °C, ο πληθυσμός του (ενοφθαλμισμένου) *B. cereus* ξεπέρασε το όριο των 6.0 log CFU/g (κρίσιμο για την παραγωγή εντεροτοξίνης) την 5^η ημέρα συντήρησης.
 - ✓ Τα δείγματα M-X-Θ είχαν κατά 2.0 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς του *B. cereus* σε σχέση με τον μάρτυρα, την 8^η ημέρα συντήρησης. Το γεγονός ότι στα δείγματα M-X-Θ ο πληθυσμός του *B. cereus* δεν ξεπέρασε το όριο των 6.0 log CFU/g καθ' όλη την διάρκεια της συντήρησης είναι σημαντικό εφόσον έτσι μειώνεται η πιθανότητα παραγωγής εντεροτοξίνης σε σχέση με τον μάρτυρα.
 - ✓ Η *L. monocytogenes* επέδειξε (πιθανά) φαινόμενα ανταγωνισμού με τις ψευδομονάδες, περιορίζοντας την ανάπτυξή τους τόσο στους 4 °C όσο και στους 8 °C.
 - ✓ Η *Salmonella enterica* επέδειξε (πιθανά) φαινόμενα ανταγωνισμού με τις ψευδομονάδες και (σε μικρότερο βαθμό) με τον μικροοργανισμό *Br. thermosphacta*, περιορίζοντας την ανάπτυξή τους στους 8 °C.
 - ✓ Ο *B. cereus* επέδειξε (πιθανά) φαινόμενα ανταγωνισμού με τον μικροοργανισμό *Br. thermosphacta*, περιορίζοντας την ανάπτυξή του (κυρίως) στους 8 °C.

Κεφάλαιο 4: «Επίδραση θερμικής επεξεργασίας (μικροκυμάτων) στην επιβίωση/θανάτωση των παθογόνων βακτηρίων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica ser. Montevideo*, *Bacillus cereus* κατά την συντήρηση του προϊόντος «Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά» στους 4 °C και 8 °C, σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου»

1.0 ΣΚΟΠΟΣ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ:

Ο σκοπός των πειραμάτων που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο ήταν η μελέτη της επίδρασης μικροκυμάτων (MW) στην επιβίωση/θανάτωση τριών παθογόνων βακτηρίων που ενοφθαλμίστηκαν σε Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά. Επίσης, έγινε συσχέτιση μεταξύ του χρόνου θερμικής επεξεργασίας και της θερμοκρασίας ψησίματος του προϊόντος μετά από δυο λεπτά εφόσον το κύριο πρόβλημα που προκύπτει από την χρήση συσκευών MW είναι η ανομοιογενής διάχυση της παραγόμενης θερμότητας στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα την δημιουργία ψυχρών περιοχών στην μάζα του. Τέλος, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού του κατάλληλου συνδυασμού χρόνου ψησίματος/θερμοκρασίας του προϊόντος για την διασφάλιση της υγιεινής του.

2.0 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία του προϊόντος

Η παραγωγή του προϊόντος πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 1 (Παράγραφος 2.1)**.

2.2 Ενοφθαλμισμός των παθογόνων βακτηρίων επί του προϊόντος

Η καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών και η προετοιμασία του ενοφθαλμίσματος πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 1 (Παράγραφος 2.2)**. Μετά την επώαση των υγρών καλλιιεργειών σε BHI Broth, τα στελέχη διατηρήθηκαν στους 4 °C για περίπου 36-48 h, προκειμένου να προσαρμοστούν τα κύτταρα των βακτηρίων σε θερμοκρασία ψύξης.

Το αρχικό ενοφθάλμισμα των *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica ser. Montevideo* και *Bacillus cereus* (μίγμα τεσσάρων στελεχών) αραιώθηκε δεκαδικά (μία φορά) σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 mL πεπτονούχου διαλύματος 0.1% (w/v) έτσι ώστε

η τελική συγκέντρωση των βακτηρίων στο εναιώρημα να είναι περίπου 10^8 CFU/mL. Στη συνέχεια, 1 mL από το αραιωμένο βακτηριακό εναιώρημα ενοφθαλμίστηκε σε 100 gr του προϊόντος έτσι ώστε ο τελικός βακτηριακός πληθυσμός στο προϊόν να είναι περίπου $10^{6-6.5}$ CFU/g. Σημειώνεται ότι ο κάθε μικροοργανισμός ενοφθαλμίστηκε χωριστά από τους υπόλοιπους, συνεπώς, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές για κάθε βακτήριο. Στην συνέχεια, οι τρεις ομάδες δειγμάτων, με τα ενοφθαλμισμένα στελέχη, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη προσκόλληση των παθογόνων βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια των δειγμάτων.

2.3 Συσκευασία των δειγμάτων-Μεταχειρίσεις

Μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων με τα τρία παθογόνα βακτήρια προέκυψαν δύο κατηγορίες μεταχειρίσεων με βάση την προσθήκη θυμαρέλαιου/χιτοζάνης και της συσκευασίας.

Πειραματικές μεταχειρίσεις:

- 1) Δείγματα που συσκευάστηκαν σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (30% CO₂/70% N₂) χωρίς την προσθήκη θυμαρέλαιου/χιτοζάνης (M, μάρτυρας),
- 2) Δείγματα που συσκευάστηκαν σε MAP (30% CO₂/70% N₂) με την συνδυαστική χρήση διαλύματος χιτοζάνης/οξικού οξέος 1.5% v/w (=0.03% w/w) και θυμαρέλαιου (0.2% v/w).

Σημειώνεται ότι η μεταχείριση M-X-Θ επιλέχθηκε εκ των υπολοίπων (M-X και M-Θ) λόγω του γεγονότος ότι ο συνδυασμός χιτοζάνης-θυμαρέλαιου αποδείχτηκε ως ο πιο αποτελεσματικός στην επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του προϊόντος (αποτελέσματα **Κεφαλαίου 2**) καθώς και στην καθυστέρηση της ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων στους 4 και 8 °C (αποτελέσματα **Κεφαλαίου 3**)

Η παρασκευή των διαλυμάτων της χιτοζάνης, προσθήκη του αιθέριου ελαίου θυμαριού-διαλύματος χιτοζάνης και η συσκευασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 2 (Παράγραφοι 2.2/2.3/2.4)**. Μετά την συσκευασία των δειγμάτων οι δυο διαφορετικές μεταχειρίσεις συντηρήθηκαν σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες: 4 και 8 °C.

2.4 Θερμική επεξεργασία του προϊόντος-Μικροβιολογική ανάλυση

Η θερμική επεξεργασία των μεταχειρίσεων πραγματοποιήθηκε σε δυο διαφορετικές χρονικές στιγμές: Την ημέρα που ακολούθησε της συσκευασίας των δειγμάτων (**Ημέρα 1**) καθώς και μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 4 ή 8 °C (**Ημέρα 8**). Η θερμική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με ψήσιμο των δειγμάτων σε φούρνο μικροκυμάτων

(Izzy, Model 820ARQ, Greece) για 1, 2, 3, 4, 5 λεπτά στη μέγιστη ισχύ (800 W). Μετά την θερμική επεξεργασία τα δείγματα διατηρήθηκαν για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να επιτευχθεί ομογενής διάχυση της θερμοκρασίας στην μάζα του προϊόντος. Κατόπιν μετρήθηκε η θερμοκρασία των δειγμάτων με την βοήθεια ψηφιακού θερμομέτρου που φέρει μεταλλική ακίδα (Model HI 145, Hanna Instruments), στα κομμάτια κοτόπουλου και πιπεριάς (εσωτερικά), έτσι ώστε να υπολογιστεί η μέση θερμοκρασία του προϊόντος. Μετά την μέτρηση της θερμοκρασίας πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία του προϊόντος όπως περιγράφεται στο **Κεφάλαιο 3**. Στα πλαίσια της μικροβιολογικής ανάλυσης προσδιορίστηκε η μεταβολή των παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. Montevideo, *Bacillus cereus*), καθώς επίσης και της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας

3.0 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

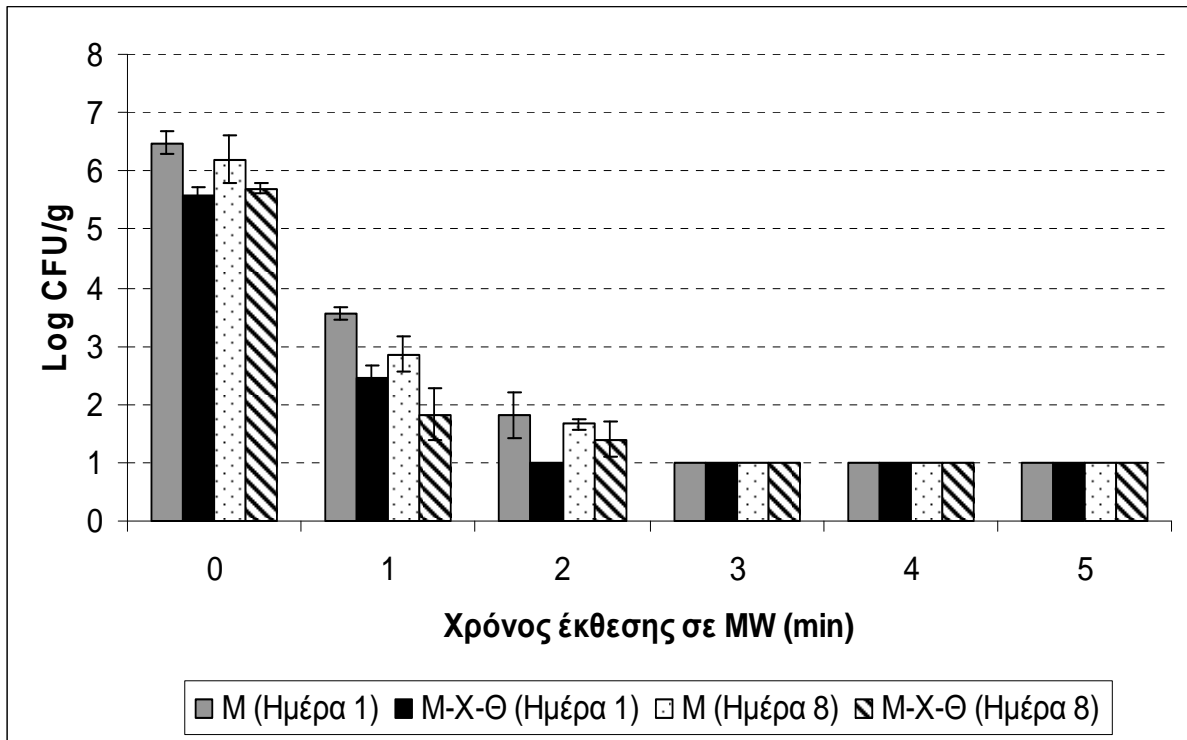
Η διαδικασία της θερμικής επεξεργασίας αποτελεί το τελευταίο στάδιο πριν την κατανάλωση των νωπών προϊόντων πουλερικών και μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους (φούρνο μικροκυμάτων, συμβατικό φούρνο, σχάρα, ψήσιμο στα κάρβουνα κ.λ.π.). Ωστόσο οι συσκευές μικροκυμάτων (MW) αποτελούν την πιο σύγχρονη τάση θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων λόγω του γρήγορου και εύκολου τρόπου λειτουργίας τους. Ωστόσο το κύριο πρόβλημα που προκύπτει από την χρήση τέτοιου είδους συσκευών είναι η ανομοιογενής διάχυση της παραγόμενης θερμότητας στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα την δημιουργία ψυχρών περιοχών στην μάζα τους (Suga et al., 2007). Μάλιστα, έρευνες έχουν αναφέρει ότι οι αριθμητικές αποκλίσεις μεταξύ των θερμοκρασιών που αναπτύσσονται σε διάφορες περιοχές ενός τροφίμου, μετά το ψήσιμο σε φούρνο MW, μπορεί να φτάσουν τους 60 °C (Rodriguez-Marval et al., 2009). Ως αποτέλεσμα, επικρατεί έντονα η ανησυχία της πιθανότητας επιβίωσης παθογόνων μικροοργανισμών σε επιμολυσμένα τρόφιμα, μετά την θερμική τους επεξεργασία σε φούρνο MW. Σύμφωνα με τους Rodriguez-Marval et al. (2009), οι όψιμοι μικροβιολογικοί κίνδυνοι που συνδέονται με την κατανάλωση τροφίμων που έχουν προηγουμένως ψηθεί σε φούρνο μικροκυμάτων, μπορούν να ελαχιστοποιηθούν αν τηρηθούν οι κατάλληλες οδηγίες χρόνου θερμικής επεξεργασίας/ισχύος μικροκυμάτων/τελικής θερμοκρασίας στο προϊόν.

3.1 Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* στο προϊόν κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου, για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C

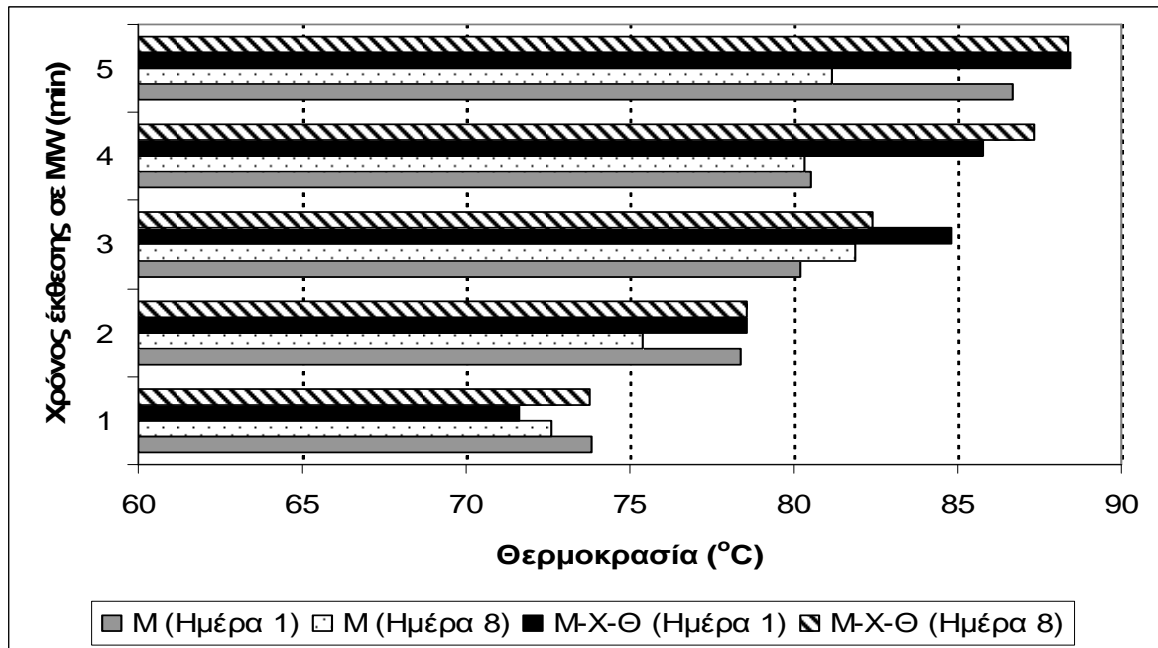
Το βακτήριο της *L. monocytogenes* θεωρείται το πιο θερμοανθεκτικό ανάμεσα στα τα υπόλοιπα μη-σπορογόνα παθογόνα βακτήρια (Huang & Sites, 2007). Τα μικροκύματα είναι μια μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί για τη μεταφορά θερμικής ενέργειας σε προϊόντα κρέατος έτοιμων προς κατανάλωση (Ready-To-Eat) με σκοπό την πλήρη θανάτωση της *L. monocytogenes*. Τα μικροκύματα μετατρέπουν την ηλεκτρομαγνητική ενέργεια που παράγεται σε συχνότητες 915-2450 MHz σε θερμότητα η οποία μεταφέρεται στα τρόφιμα (μεταφορά ενέργειας + αγωγή). Η παραγόμενη ηλεκτρομαγνητική ενέργεια (συχνότητες 915-2450 MHz) αυξάνει την κινητική ενέργεια των μορίων ύδατος των τροφίμων με αποτέλεσμα να αυξάνονται οι συγκρούσεις μεταξύ των και να παράγεται θερμότητα (δυνάμεις τριβής) που με την σειρά της αυξάνει σημαντικά την εσωτερική

θερμοκρασία του προϊόντος. Κατά συνέπεια, η διαδικασία αυτή μπορεί να επιταχύνει την θανάτωση των βακτηρίων που απαντούν στο προϊόν.

Στο **Γράφημα 3.1.1.α** παρουσιάζεται η επιβίωση της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes* στο προϊόν μετά από την επίδραση μικροκυμάτων για 1, 2, 3, 4 και 5 λεπτά. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ που συντηρήθηκαν στους 4 °C για 1 και 8 ημέρες. Επιπρόσθετα, στο **Γράφημα 3.1.1.β** (κάτω από **Γράφημα 3.1.1.α**) παρουσιάζεται το προφίλ της εσωτερικής θερμοκρασίας που μετρήθηκε στα δείγματα (μετά από διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δύο λεπτά) συναρτήσει του διαφορετικού χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.



Γράφημα 3.1.1α. Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w = 0.03% w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 4 °C, για 1 και 8 ημέρες (πληθυσμοί κάτω από το όριο ανίχνευσης έλαβαν την τιμή 1.0 log CFU/g).

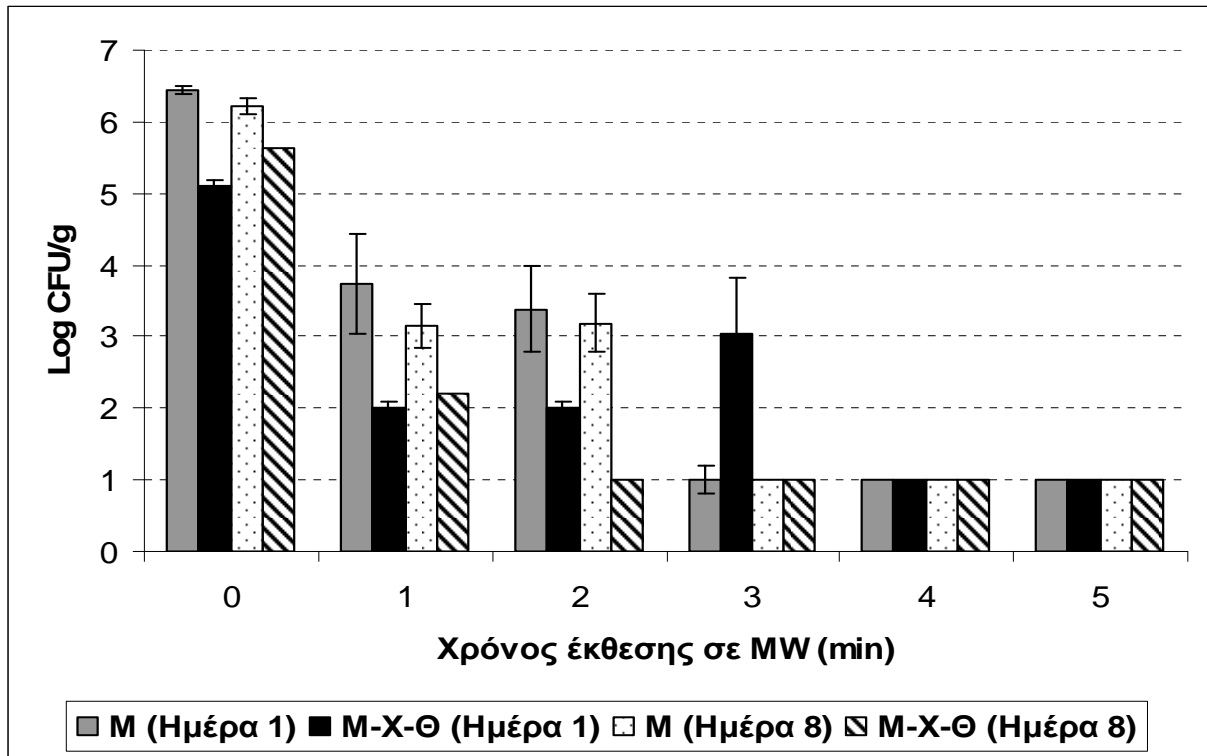


Γράφημα 3.1.1β. Μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.

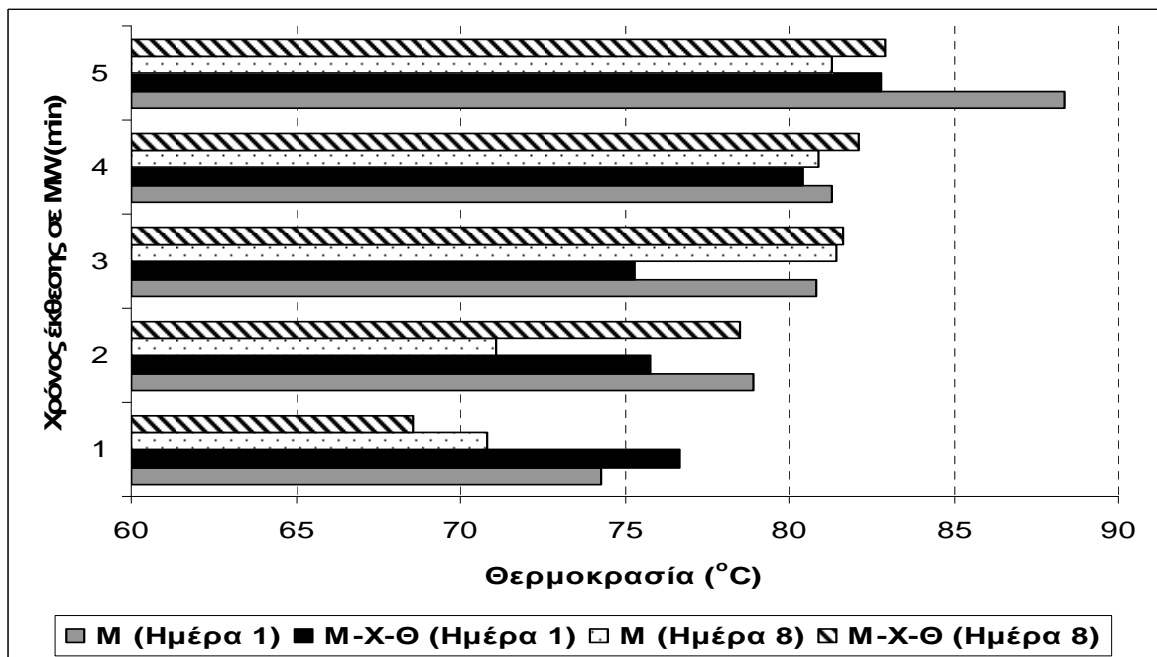
Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.1α**, ο αρχικός πληθυσμός του ενοφθαλμισμένου παθογόνου μικροοργανισμού στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ σε χρόνο $t=0$ (προ ψησίματος, νωπό προϊόν) ήταν 6.5 και 5.6 log CFU/g, αντίστοιχα (ημέρα 1). Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ-Χ-Θ και Μ για χρόνο ενός λεπτού ($t=1$ min) οδήγησε σε μείωση του αρχικού πληθυσμού του παθογόνου κατά 3.0 log CFU/g (εσωτερική θερμοκρασία 71.6 °C και 73.8 °C, αντίστοιχα, **Γράφημα 3.1.1.β**). Μετά από χρόνο έκθεσης των δειγμάτων Μ-Χ-Θ στα μικροκύματα $t=2$ min (εσωτερική θερμοκρασία 78.6 °C) ο πληθυσμός του παθογόνου ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ενώ ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε για τα δείγματα Μ σε χρόνο $t=3$ min (εσωτερική θερμοκρασία 80.2 °C).

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για τα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C, και οδήγησε στα εξής αποτελέσματα: Ο πληθυσμός του ενοφθαλμισμένου παθογόνου στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ σε $t=0$ ήταν 6.2 και 5.7 log CFU/g, αντίστοιχα. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για $t=1$ min οδήγησε σε ελάττωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 3.3 (72.6 °C) και 3.9 log CFU/g (73.8 °C) αντίστοιχα. Μετά από χρόνο $t=2$ min η μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ ήταν ίση με 4.4 και 4.3 log CFU/g, αντίστοιχα (εσωτερική θερμοκρασία 75.4 και 78.6 °C, αντίστοιχα). Τέλος, ο πληθυσμός του παθογόνου έπεσε κάτω από το όριο ανίχνευσης (δηλ. <1.0 log CFU/g) μετά από $t=3$ min και στις δυο μεταχειρίσεις, υποδεικνύοντας μείωση ≥ 6 log CFU/g (-6D). Η εσωτερική θερμοκρασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 3 λεπτά θερμικής επεξεργασία ήταν 81.9 και 82.4 °C, αντίστοιχα.

Στο **Γράφημα 3.1.2α** παρουσιάζεται η επιβίωση της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes* στο προϊόν μετά από την επίδραση μικροκυμάτων για 1, 2, 3, 4 και 5 λεπτά. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ που συντηρήθηκαν στους 8 °C για 1 και 8 ημέρες. Επιπρόσθετα, στο **Γράφημα 3.1.2β** παρουσιάζεται το προφίλ της εσωτερικής θερμοκρασίας που μετρήθηκε στα δείγματα (μετά από διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δύο λεπτά) συναρτήσει του διαφορετικού χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα



Γράφημα 3.1.2α. Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *Listeria monocytogenes* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP απουσία χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w= 0.03% w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 8 °C, για 1 και 8 ημέρες (πληθυσμοί κάτω από το όριο ανίχνευσης έλαβαν την τιμή 1.0 log CFU/g)



Γράφημα 3.1.2β. Μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.2α** ο αρχικός πληθυσμός της ενοφθαλμισμένης *Listeria monocytogenes* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 1 ημέρα συντήρηση στους 8 °C ήταν 6.4 και 5.1 log CFU/g, αντίστοιχα (t=0 min). Ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου μειώθηκε κατά ≥ 6 log CFU/g ($\geq 6D$) μετά από έκθεση των δειγμάτων Μ στα μικροκύματα για t= 3 min (78.9 °C) ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων Μ-Χ-Θ ολοκληρωτική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε σε χρόνο t=4 min, πιθανόν λόγω του μικρότερου ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας στα συγκεκριμένα δείγματα (θερμοκρασία 75.3 και 80.8 °C μετά από t=3 και t=4 min, αντίστοιχα, **Γράφημα 3.1.2β**).

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε μετά από 8 ημέρες συντήρησης των δειγμάτων στους 8 °C. Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.1.2α**, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 8 ημέρες συντήρησης (t=0 min) ήταν 6.2 και 5.6 log CFU/g, αντίστοιχα. Η *L. monocytogenes* δεν εντοπίστηκε στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ μετά από χρόνο έκθεσης στα μικροκύματα t=3 min και t=2 min, αντίστοιχα. Η εσωτερική θερμοκρασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ την χρονική στιγμή που ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης, ήταν 79-81 °C (**Γράφημα 3.1.2β**).

Γενικά, ο χρόνος έκθεσης στα μικροκύματα που απαιτήθηκε για την μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* σε επίπεδα κάτω από το όριο ανίχνευσης, κυμάνθηκε από 2-4 λεπτά στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ. Όπως παρατηρήθηκε, η ολοκληρωτική μείωση της *L. monocytogenes* εξαρτήθηκε από την θερμοκρασία που μετρήθηκε στο εσωτερικό του προϊόντος μετά την θερμική επεξεργασία. Συγκεκριμένα, μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* $\geq 6D$ (θανάτωση) επιτεύχθηκε σε όλα τα δείγματα σε θερμοκρασία κοντά στους 80 °C (± 2 °C). Τα περισσότερα δείγματα απέκτησαν εσωτερική θερμοκρασία $\theta \geq 80$ °C μετά από χρόνο έκθεσης στα μικροκύματα t= 3-4 min, συνεπώς ο συγκεκριμένος χρόνος θα μπορούσε να αποτελέσει και την προτεινόμενη διάρκεια ψησίματος (MW) του προϊόντος από τον καταναλωτή προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλειά του από το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο. Επιπλέον, σε χρόνο $t \geq 4$ min το προϊόν είχε ικανοποιητική εμφάνιση (καλοψημένο), ενώ σε λιγότερο χρόνο έκθεσης φαινόταν από ωμό έως ανομοιόμορφα ψημένο.

Σύμφωνα με τους Schnepf & Barbeau (1989) η θανάτωση των βακτηρίων υπό την επίδραση της θερμικής επεξεργασίας, καθορίζεται από μία σχέση θερμοκρασίας-χρόνου ψησίματος (temperature-time relationship). Σε κάποιες περιπτώσεις, έχει διαπιστωθεί ότι ψήσιμο των τροφίμων σε φούρνο μικροκυμάτων, για μικρά χρονικά διαστήματα (π.χ. 1 ή 2 λεπτά) δεν εξασφαλίζει την διατήρηση της θερμοκρασίας θανάτωσης των παθογόνων

βακτηρίων για αρκετό χρονικό διάστημα, ώστε να εξασφαλιστεί ο μηδενισμός του πληθυσμού τους (Schnepf & Barbeau, 1989).

Οι Soyutemiz & Cetinkaya (2005) τόνισαν επίσης την ανάγκη θερμικής επεξεργασίας ωμού προϊόντος κρέατος (κεφτέδες) για τουλάχιστον 4 λεπτά (800 W) έτσι ώστε η εσωτερική θερμοκρασία να φτάσει τους 85 °C και να επιτευχθεί μείωση της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes* κατά 4D. Επιπλέον, οι Harisson & Carpenter (1989) αναφέρουν ότι μετά την θερμική επεξεργασία στήθους από κοτόπουλο σε φούρνο μικροκυμάτων (700 W) καταγράφηκε μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 3.8 log CFU/g σε περιοχή εσωτερικής θερμοκρασίας του προϊόντος 76.7-82.2 °C. Ωστόσο, σε χαμηλότερη εσωτερική θερμοκρασία (71.1-73.9 °C) η μείωση του παθογόνου δεν ξεπέρασε τους 2.5 log CFU/g. Παρομοίως, τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας έδειξαν ότι όταν η μέση εσωτερική θερμοκρασία του προϊόντος (σουβλάκι κοτόπουλο /πιπεριά) ήταν μικρότερη των 74 °C (συνήθως μετά από 1-2 min θερμικής επεξεργασίας) η μείωση του συγκεκριμένου παθογόνου δεν ξεπέρασε τους 3.0 log CFU/g, στην πλειοψηφία των δειγμάτων.

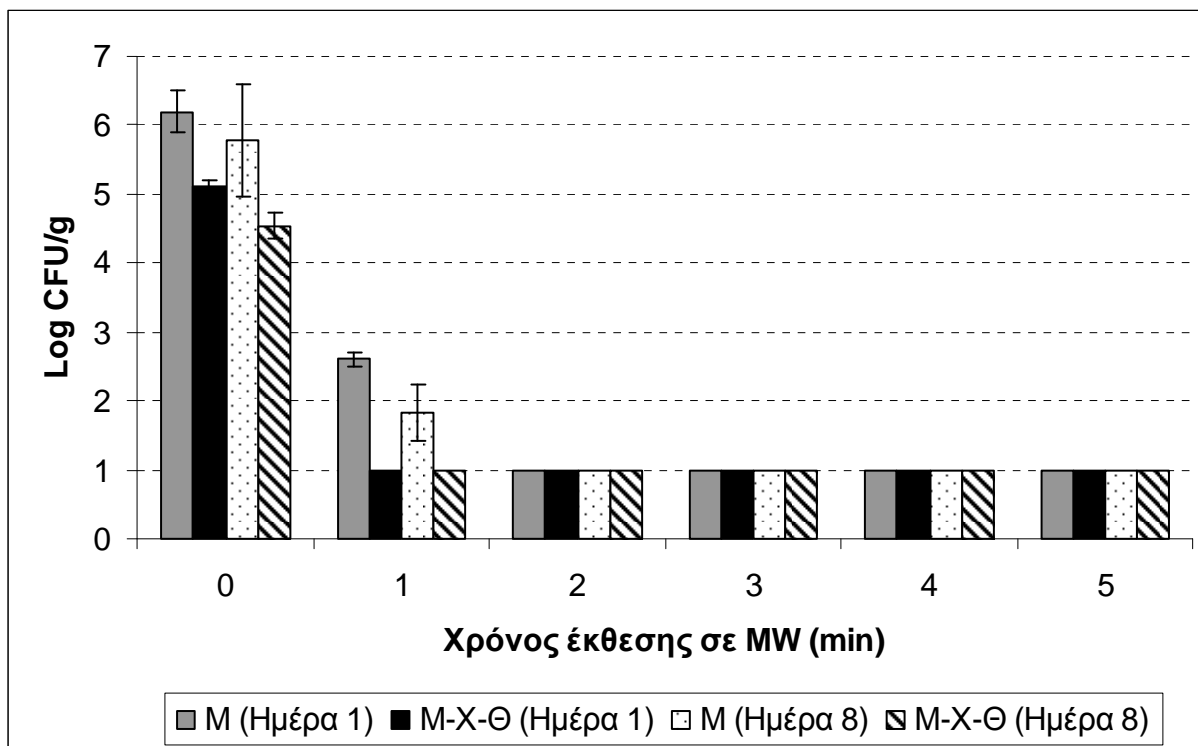
Επίσης, οι Rodriguez-Marval (2009) μελέτησαν την επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *L. monocytogenes* που ενοφθαλμίστηκε σε λουκάνικα Φρανκφούρτης, παρουσία ή απουσία συντηρητικών. Οι συγκεκριμένοι ερευνητές παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός του παθογόνου στα δείγματα του μάρτυρα (απουσία συντηρητικών) μειώθηκε κατά 5.9 log CFU/cm² από την αρχική του τιμή (7.2 log CFU/cm²) μετά από έκθεση των δειγμάτων σε μικροκύματα για 75 δευτερόλεπτα (1100 W, θερμοκρασία 60-78 °C). Επίσης στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι ο τελικός πληθυσμός του παθογόνου (μετά την επίδραση των μικροκυμάτων) στα δείγματα του μάρτυρα πολλές φορές δεν διέφερε αριθμητικά από τα αντίστοιχα των δειγμάτων που είχαν αντιμικροβιακούς παράγοντες. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι ενώ ο αρχικός πληθυσμός της *L. monocytogenes* (προ επίδρασης μικροκυμάτων) ήταν χαμηλότερος στα δείγματα M-X-Θ από ότι στα δείγματα M ($p < 0.05$) οι τελικοί πληθυσμοί τους μετά από 3-4 min θερμικής επεξεργασίας δεν διέφεραν σημαντικά ($p > 0.05$). Συνεπώς η παρουσία της χιτοζάνης και του θυμαρέλαιου στα δείγματα M-X-Θ δεν φάνηκε να επηρεάζει δραστικά το προφίλ επιβίωσης της *L. monocytogenes*, εφόσον δεν εντοπίστηκαν κύτταρα του μικροοργανισμού μετά από 3-4 min σε κανένα από τα δείγματα (M και M-X-Θ). Τέλος, οι Huang & Sites (2007) αναφέρουν ότι κατά την έκθεση λουκάνικων τύπου Φρανκφούρτης σε

μικροκύματα ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* παρουσίασε μείωση κατά 6D, μετά από χρόνο $t=6$ min (εξωτερική θερμοκρασία δειγμάτων 85 °C).

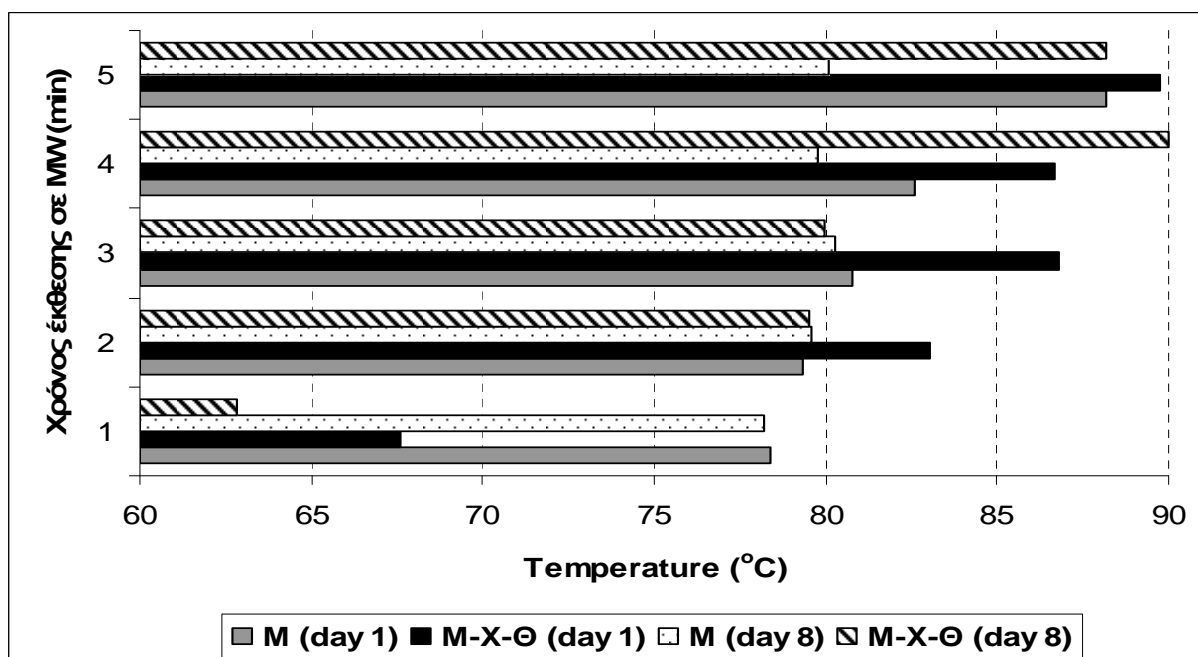
3.2 Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *Salmonella enterica* ser. Montevideo στο προϊόν, κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C

Η θερμοανθεκτικότητα της *Salmonella* spp. επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως π.χ. η θερμοκρασία ανάπτυξης των βακτηριακών καλλιιεργειών (μολύσματος), ο αρχικός πληθυσμός των κυττάρων του εμβολίου ή φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, οι Heddlesson et al. (1994) αναφέρουν ότι η μέγιστη θερμοανθεκτικότητα της *Salmonella* spp. παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα του μικροοργανισμού είχαν φτάσει στην στάσιμη φάση ανάπτυξής τους, δηλαδή μετά από 24 ώρες επώασης σε tryptic soy broth (TSB). Επίσης, οι Burns et al. (2001) αναφέρουν ότι προϊόντα κρέατος με χαμηλή ενεργότητα ύδατος παρείχαν μεγαλύτερη προστασία των κυττάρων της *Salmonella* spp. από την επίδραση θερμικής επεξεργασίας. Επιπλέον, οι Fain et al. (1991) αναφέρουν ότι η θερμοανθεκτικότητα των βακτηρίων στα τρόφιμα αυξάνεται σε συνάρτηση με την περιεκτικότητα αυτών σε λίπος.

Στο **Γράφημα 3.2.1α** παρουσιάζεται η επιβίωση της ενοφθαλμισμένης *Salmonella enterica* μετά την επίδραση μικροκυμάτων στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ που συντηρήθηκαν στους 4 °C για 1 και 8 ημέρες. Επιπρόσθετα, στο **Γράφημα 3.2.1β** παρουσιάζεται το προφίλ της εσωτερικής θερμοκρασίας που μετρήθηκε στα δείγματα (μετά από διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δύο λεπτά) συναρτήσει του διαφορετικού χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.



Γράφημα 3.2.1α. Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *Salmonella enterica* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w=0.03% w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 4 °C, για 1 και 8 ημέρες (πληθυσμοί κάτω από το όριο ανίχνευσης έλαβαν την τιμή 1.0 log CFU/g).

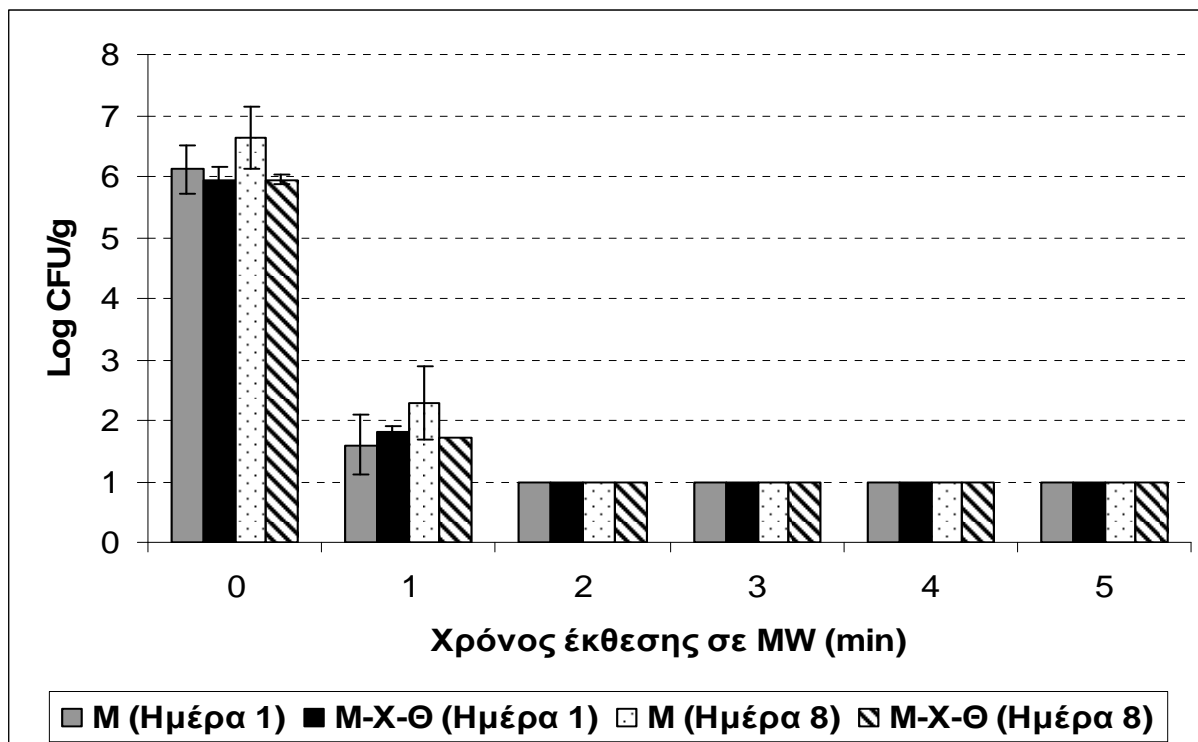


Γράφημα 3.2.1β. Μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.

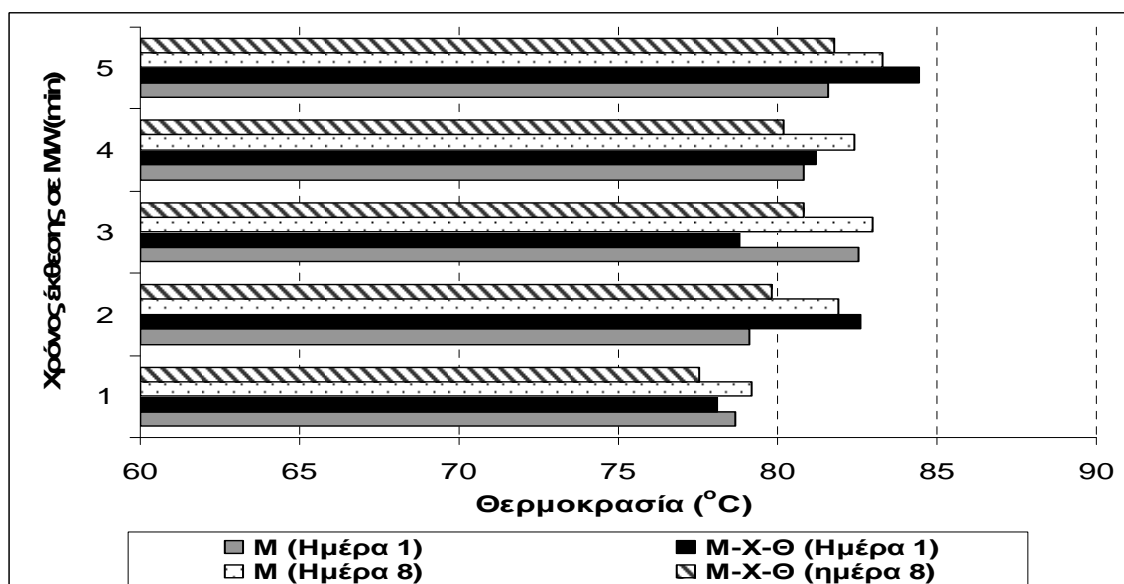
Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.1α**, ο αρχικός πληθυσμός της *S. enterica* ser. Montevideo στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ, μετά από 1 ημέρα συντήρησης στους 4 °C, και προ της θερμικής επεξεργασίας (t=0) ήταν 6.2 και 5.1 log CFU/g, αντίστοιχα. Μετά από χρόνο έκθεσης στα μικροκύματα t=1 min ο πληθυσμός της *S. enterica* στα δείγματα Μ-Χ-Θ μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης, δηλαδή μειώθηκε κατά περίπου 5D (μέση εσωτερική θερμοκρασία 67.6 °C, **Γράφημα 3.2.1β**). Την ίδια στιγμή, ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου στα δείγματα του μάρτυρα Μ, μειώθηκε κατά 3.6 log CFU/g, αλλά δεν παρατηρήθηκε θανάτωση του βακτηρίου. Ωστόσο, μετά από θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ για t=2 min η *S. enterica* δεν εντοπίστηκε, δηλαδή μειώθηκε κατά περίπου 6.0 log CFU/g (79.3 °C).

Επανάληψη της διαδικασίας μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C οδήγησε σε ανάλογα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *S. enterica* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ σε χρόνο t=0 min ήταν 5.8 και 4.5 log CFU/g, αντίστοιχα. Όπως ακριβώς έγινε και την 1^η ημέρα συντήρησης, θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ-Χ-Θ για μόλις t=1 min οδήγησε σε πλήρη θανάτωση του παθογόνου (μείωση 4.5D) ενώ η εσωτερική θερμοκρασία των δειγμάτων μετρήθηκε να είναι 62.8 °C. Στην περίπτωση των δειγμάτων Μ, παρατηρήθηκε σχεδόν ανάλογη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 4D σε χρόνο t=1 min, ενώ ολοκληρωτική θανάτωση του παρατηρήθηκε σε χρόνο t=2 min (-6D, 79.6 °C). Η καθυστέρηση της μείωσης του πληθυσμού της *S. enterica* σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης στα δείγματα Μ (ένα λεπτό αργότερα από τα δείγματα Μ-Χ-Θ) δικαιολογείται από το γεγονός τα δείγματα Μ-Χ-Θ είχαν κατά 1.3 log CFU/g χαμηλότερο αρχικό πληθυσμό του παθογόνου σε σχέση με τον μάρτυρα (λόγω της ύπαρξης αντιμικροβιακών παραγόντων).

Στο **Γράφημα 3.2.2α** παρουσιάζεται η επιβίωση της ενοφθαλμισμένης *S. enterica* στο προϊόν μετά από την επίδραση μικροκυμάτων για 1, 2, 3, 4 και 5 λεπτά. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ που συντηρήθηκαν στους 8 °C για 1 και 8 ημέρες. Επιπρόσθετα, δίπλα στο **Γράφημα 3.2.2β** παρουσιάζεται το προφίλ της εσωτερικής θερμοκρασίας που μετρήθηκε στα δείγματα (μετά από διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δύο λεπτά) συναρτήσει του διαφορετικού χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.



Γράφημα 3.2.2α. Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *Salmonella enterica* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w= 0.03% w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 8 °C, για 1 και 8 ημέρες (πληθυσμοί κάτω από το όριο ανίχνευσης έλαβαν την τιμή 1.0 log CFU/g)



Γράφημα 3.2.2β. Μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.2α**, ο αρχικός πληθυσμός της *S. enterica* μετά από 1 ημέρα συντήρησης των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ στους 8 °C, ήταν 6.1 και 5.9 log CFU/g, αντίστοιχα. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για t=1 min οδήγησε σε μείωση του αρχικού πληθυσμού της *S. enterica* κατά 4.5 και 4.1 log CFU/g, αντίστοιχα, αλλά δεν παρατηρήθηκε πλήρης θανάτωση του βακτηρίου. Ωστόσο, μετά από χρόνο t=2 min δεν εντοπίστηκαν βιώσιμα κύτταρα του μικροοργανισμού, δηλαδή παρατηρήθηκε μείωση κατά 6 log CFU/g (-6D) σε όλα τα δείγματα. Την ίδια χρονική στιγμή η εσωτερική θερμοκρασία των δειγμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 79-83 °C.

Μετά από 8 ημέρες συντήρησης των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ στους 8 °C, ο πληθυσμός της *S. enterica* προ της θερμικής επεξεργασίας (t=0 min) ήταν 6.6 και 5.9 log CFU/g, αντίστοιχα. Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.2.2β**, ο πληθυσμός του βακτηρίου μειώθηκε σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης μετά από χρόνο t=2 min, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και προηγουμένως (1^η ημέρα συντήρησης στους 8 °C. Ύστερα από θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για 2 λεπτά, η εσωτερική θερμοκρασία ήταν 81.9 °C και 79.8 °C, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της επίδρασης των μικροκυμάτων κατά την συντήρηση των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ στους 8 °C, υποδεικνύουν ότι η παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων στα δείγματα Μ-Χ-Θ δεν επηρέασε δραστικά την επίδραση των μικροκυμάτων στην μείωση του πληθυσμού του παθογόνου, εφόσον μετά το 2^ο λεπτό έκθεσης δεν εντοπίστηκαν βιώσιμα κύτταρα του μικροοργανισμού σε κανένα δείγμα. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι χρόνος θερμικής επεξεργασίας t=2 min δεν είναι επαρκής για το πλήρες ψήσιμο των δειγμάτων, εφόσον το προϊόν φαινόταν σχεδόν ωμό (undercooked).

Σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της *Salmonella* spp. σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, οι Pucciarelli & Benassi (2005) αναφέρουν ότι θερμική επεξεργασία προϊόντος κοτόπουλου (μπουτάκια) για 95-110 sec σε φούρνο ισχύος 800 W, ήταν αρκετή για να μειώσει τον πληθυσμό του παθογόνου κατά >6D (80 °C). Ωστόσο, όταν στη ίδια έρευνα τα μικροκύματα χρησιμοποιήθηκαν σε χαμηλότερη ισχύ, η μείωση του πληθυσμού της *S. enteritidis* δεν ξεπέρασε τα 5D, μετά από 140 sec. Σε ανάλογη έρευνα, οι Schnepf & Barbeau (2007) αναφέρουν ότι θερμική επεξεργασία ολόκληρου κοτόπουλου σε φούρνο μικροκυμάτων (700 W) είναι ικανή να περιορίσει σημαντικά την *S. typhimurium*, υπό την προϋπόθεση ότι η εσωτερική θερμοκρασία προσεγγίσει τους 85 °C. Από την άλλη πλευρά οι Bucher et al. (2008) μελέτησαν την θερμοανθεκτικότητα διαφόρων στελεχών της *Salmonella* spp. μετά

τον ενοφθαλμισμό τους σε προϊόν κοτόπουλου (nuggets/strips) και προτείνουν ότι εφαρμογή κατάλληλης θερμικής επεξεργασίας σε θερμοκρασία 71 °C, είναι επαρκής για τη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά >6D. Τέλος, οι Jamshidi et al. (2009) αναφέρουν ότι ο χρόνος έκθεσης στα μικροκύματα (850 W) που απαιτήθηκε για μείωση της *S. typhimurium* >6D, μετά τον ενοφθαλμισμό της σε μπουτάκια από κοτόπουλο (drumettes) ήταν μόλις 35 sec, με την τελική θερμοκρασία στην επιφάνεια του προϊόντος να είναι ≥ 72 °C. Ο προτεινόμενος χρόνος έκθεσης στα μικροκύματα από τους Jamshidi et al. (2009) προκειμένου να μηδενιστεί ο πληθυσμός της *Salmonella* spp. (-6D) είναι αρκετά χαμηλότερος από τον αντίστοιχο που προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη. Ωστόσο, στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι, παράγοντες όπως το μέγεθος και το σχήμα του προϊόντος που πρόκειται να υποβληθεί στην επίδραση μικροκυμάτων, ενδέχεται να επηρεάσουν σε σημαντικό βαθμό τον ρυθμό θανάτωσης των βακτηρίων που απαντούν σε αυτό (Jamshidi et al., 2009). Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τους Selby et al. (2006) η σύσταση του εκάστοτε προϊόντος επηρεάζει την ικανότητα επιβίωσης των διαφόρων ή/και παθογόνων βακτηρίων κατά την θερμική επεξεργασία, εφόσον όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα σε λίπος, πρωτεΐνες και άλατα τόσο αυξάνεται η θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών.

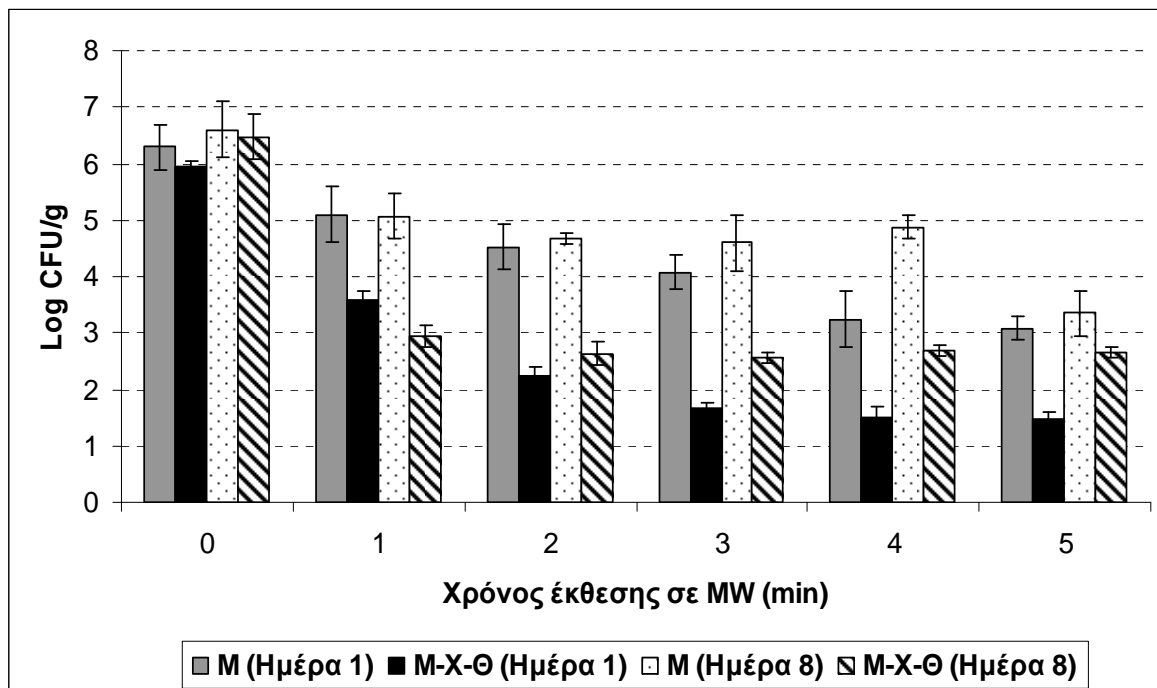
3.3 Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση του *Bacillus cereus* στο προϊόν, κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C

Η θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων του *Bacillus cereus* στην επίδραση των μικροκυμάτων, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως οι ιδιότητες των στελεχών του βακτηρίου που χρησιμοποιούνται κάθε φορά, περιβαλλοντικοί παράγοντες (θερμοκρασία ανάπτυξης, υπόστρωμα ανάπτυξης, προηγούμενη προσαρμογή στελεχών σε συνθήκες θερμικού στρες κ.λ.π.), η σύσταση του τροφίμου (περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπος κ.λ.π.), η ενεργότητα ύδατος, το pH, η παρουσία συντηρητικών (άλατα κ.λ.π.) και η εκάστοτε πειραματική μεθοδολογία (Juneja, 2000). Επίσης, οι συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιείται η θερμική επεξεργασία (ισόθερμη ή μη-ισόθερμη μεταβολή) επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την επιβίωση των κυττάρων του *B. cereus*, εφόσον τα βλαστικά κύτταρα και οι σπόροι του μικροοργανισμού παρουσιάζουν διαφορετική ανθεκτικότητα ανάλογα με το εύρος θερμοκρασιών στις οποίες υποβάλλονται.

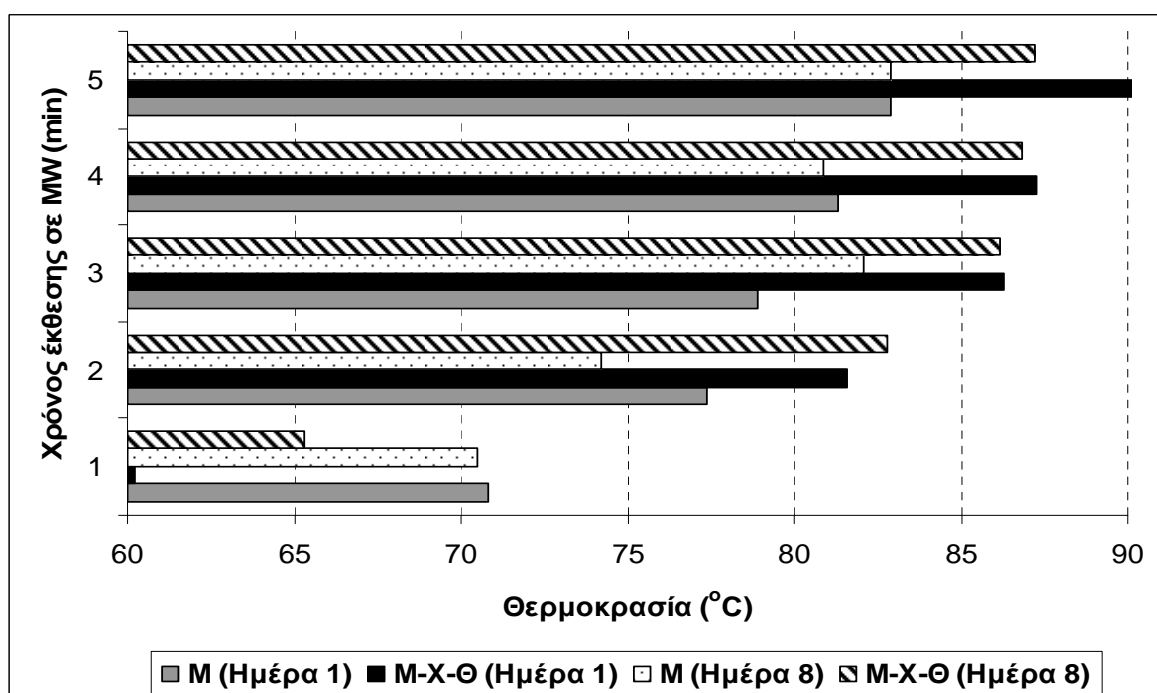
Στο **Γράφημα 3.3.1α** παρουσιάζεται η επιβίωση του *Bacillus cereus* κατά την επίδραση μικροκυμάτων στα δείγματα M και M-X-Θ που συντηρήθηκαν στους 4 °C για 1 και 8

ημέρες. Επιπρόσθετα, στο **Γράφημα 3.2.1β** παρουσιάζεται το προφίλ της εσωτερικής θερμοκρασίας που μετρήθηκε στα δείγματα (μετά από διατήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για δύο λεπτά) συναρτήσει του διαφορετικού χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.

Όπως φαίνεται στο **Γράφημα 3.3.1α**, ο αρχικός πληθυσμός του *B. cereus* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ, μετά από 1 ημέρα συντήρηση στους 4 °C, ήταν 6.3 και 5.9 log CFU/g, αντίστοιχα. Το προφίλ επιβίωσης του *B. cereus* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ ήταν τελείως διαφορετικό από το αντίστοιχο της *L. monocytogenes* και *S. enterica* κατά την επίδραση μικροκυμάτων, εφόσον σε κανένα από τα δείγματα δεν παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του σπορογόνου βακτηρίου σε επίπεδα χαμηλότερα από το όριο ανίχνευσης. Με άλλα λόγια, ο πληθυσμός του *B. cereus*, μπορεί να μειώθηκε από την αρχική του τιμή μετά από την θερμική επεξεργασία των δειγμάτων, αλλά σε όλες τις περιπτώσεις κατάφερε να επιβιώσει.



Γράφημα 3.3.1α. Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση του *Bacillus cereus* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w = 0.03% w/w/0.2% v/w, M-X-Θ) στους 4 °C, για 1 και 8 ημέρες (πληθυσμοί κάτω από το όριο ανίχνευσης έλαβαν την τιμή 1.0 log CFU/g)



Γράφημα 3.3.1β Μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας των δειγμάτων συναρτήσει του χρόνου έκθεσης σε μικροκύματα

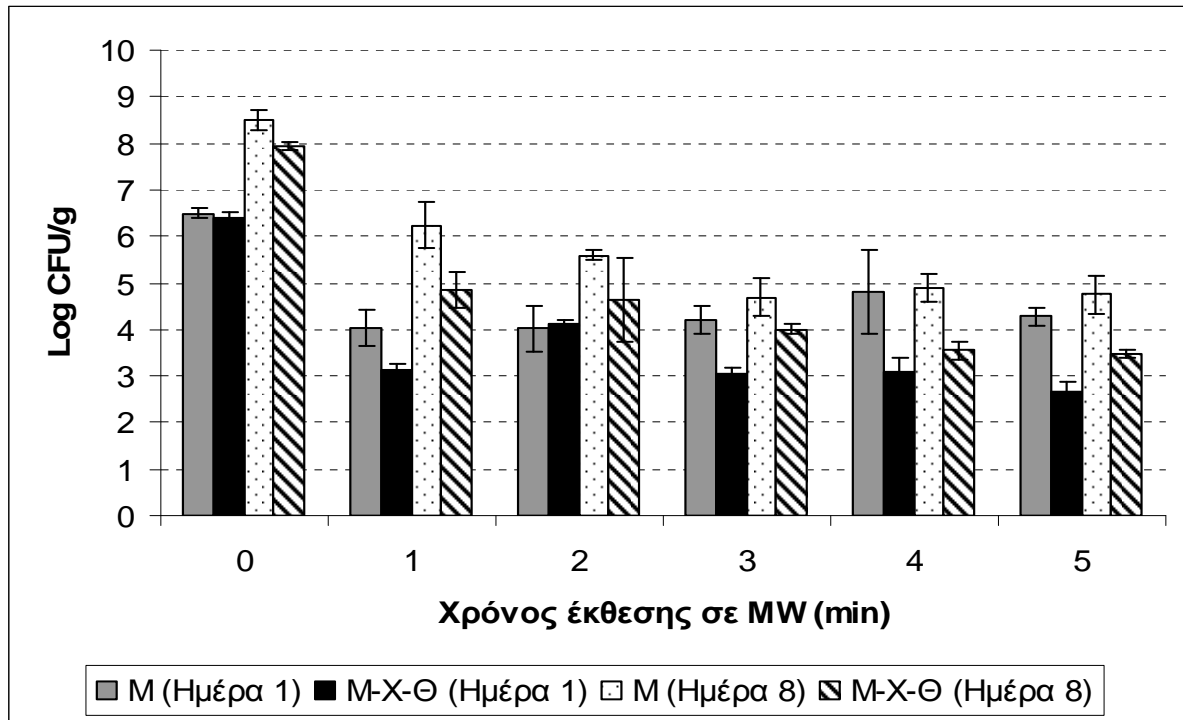
Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.3.1α**, στην περίπτωση των δειγμάτων M, το παθογόνο βακτήριο παρουσίασε μείωση από τον αρχικό του πληθυσμό (6.3 log CFU/g) κατά 2.2 log CFU/g και 3.2 log CFU/g σε χρόνο t=3 (78.9 °C) και t=5 min (83 °C), αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι θερμική επεξεργασία των δειγμάτων πλέον των 4 min, δεν οδήγησε σε περαιτέρω σημαντική μείωση του πληθυσμού του μικροοργανισμού (p>0.05). Τα δείγματα M-X-Θ παρουσίασαν μεγαλύτερη μείωση του παθογόνου βακτηρίου σε χρόνο t ≥ 3 min (-4.4D, θερμοκρασία 86.3-90 °C), και δεν παρουσιάστηκε σημαντική μεταβολή του πληθυσμού του μεταξύ 3-5 λεπτών (p>0.05). Ο τελικός πληθυσμός του *B. cereus* στα δείγματα M μετά από 5 λεπτά έκθεσης στα μικροκύματα ήταν 3.1 log CFU/g ενώ στα δείγματα M-X-Θ ήταν 0.5 log CFU/g υψηλότεροι από το όριο ανίχνευσης (1.0 log CFU/g). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα της **Ημέρας 1** υποδεικνύουν ότι οι πληθυσμοί των κυττάρων του παθογόνου βακτηρίου, που επιβίωσαν της θερμικής επεξεργασίας, ήταν χαμηλότεροι στα δείγματα M-X-Θ σε σχέση με τους αντίστοιχους των δειγμάτων M, σε χρόνο t ≥ 1 min (p<0.05). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται:

- α) στην μεγαλύτερη θερμοκρασία που μετρήθηκε για τα δείγματα M-X-Θ σε χρόνο t ≥ 3 min (διαφορά κατά 7 °C),
- β) στην μείωση της θερμοανθεκτικότητας των κυττάρων του *B. cereus* παρουσία των συντηρητικών (πιθανή διατάραξη της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων του ή/και παρεμπόδιση παραγωγής πρωτεϊνών θερμής επίπληξης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του παθογόνου, παρουσία των συντηρητικών),
- γ) σε επιβίωση διαφορετικών στελεχών του *B. cereus* παρουσία ή απουσία συντηρητικών (χρησιμοποιήθηκε μίγμα βακτηριακών στελεχών του βακτηρίου),
- δ) στην παρεμπόδιση σπορογονίας των κυττάρων του *B. cereus* παρουσία των συντηρητικών, αν και η παραγωγή θερμοανθεκτικών σπόρων δεν προσδιορίστηκε στην παρούσα μελέτη (ικανότητα σπορογονίας 4 χρησιμοποιούμενων στελεχών >80%, σύμφωνα με τον προμηθευτή).

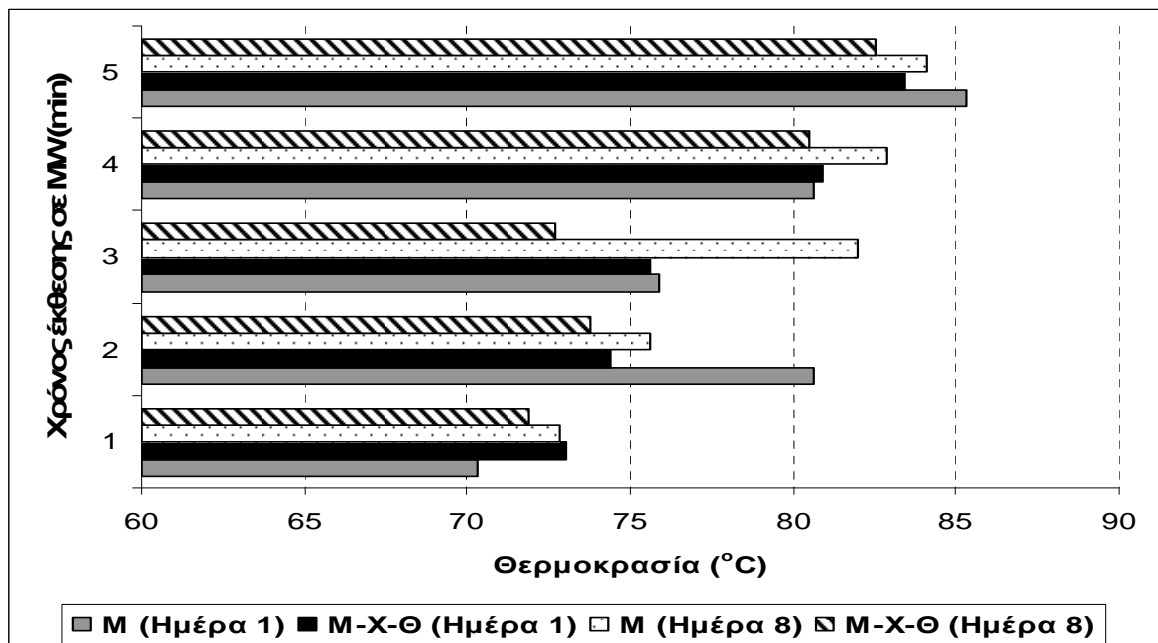
Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C. Σε χρόνο t=0 min ο πληθυσμός του *B. cereus* στα δείγματα M, M-X-Θ ήταν 6.5-6.6 log CFU/g. Ο πληθυσμός του παθογόνου στα δείγματα M, μειώθηκε κατά περίπου 2.0 log CFU/g μετά από έκθεση στα μικροκύματα για t=3 min (82.1 °C), ενώ σε χρόνο t=5 min (82.9 °C) η μείωση έφτασε τους 3.0 log CFU/g. Αντίστοιχα, θερμική επεξεργασία των δειγμάτων M-X-Θ για t=3 min, οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου κατά 4.0 log CFU/g (86.2 °C), ενώ περαιτέρω ψήσιμο των δειγμάτων για t=4 ή 5 min (86.9-87.2 °C) δεν

οδήγησε σε επιπλέον ελάττωση του πληθυσμού του ($p > 0.05$). Ο πληθυσμός του *B. cereus* που επιβίωσε της επίδρασης των μικροκυμάτων για $t = 5$ min στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ ήταν 3.5 και 2.7 log CFU/g, αντίστοιχα. Γενικά, τα δείγματα Μ-Χ-Θ είχαν στατιστικά χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα δείγματα Μ, από το 1^ο λεπτό θερμικής επεξεργασίας και μετά, όπως και την Ημέρα 1 ($p < 0.05$), πιθανόν για τους λόγους που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο.

Στο **Γράφημα 3.3.2α** παρουσιάζεται η επιβίωση του *Bacillus cereus* κατά την επίδραση μικροκυμάτων στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ που συντηρήθηκαν στους 8 °C για 1 και 8 ημέρες. Επιπρόσθετα, στο **Γράφημα 3.3.2β** παρουσιάζεται το προφίλ της εσωτερικής θερμοκρασίας που μετρήθηκε στα δείγματα συναρτήσει του διαφορετικού χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα.



Γράφημα 3.3.2α Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση του *Bacillus cereus* σε προϊόν κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w= 0.03% w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 8 °C, για 1 και 8 ημέρες (πληθυσμοί κάτω από το όριο ανίχνευσης έλαβαν την τιμή 1.0 log CFU/g)



Γράφημα 3.3.2β. Μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας των δειγμάτων συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα

Ο αρχικός πληθυσμός του *B. cereus* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 1 ημέρα συντήρησης στους 8 °C, ήταν 6.5 και 6.4 log CFU/g, αντίστοιχα (**Γράφημα 3.3.2α**). Μετά από επίδραση των μικροκυμάτων για t=1 ή t=2 min στα δείγματα Μ, ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε κατά 2.5 log CFU/g (70.3 °C) και έκτοτε παρέμεινε αμετάβλητος, ανεξαρτήτως του χρόνου θερμικής επεξεργασίας (p>0.05). Στην περίπτωση των δειγμάτων Μ-Χ-Θ ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε κατά 3.3 log CFU/g σε χρόνο t=3 min, ενώ θερμική επεξεργασία μεγαλύτερης διάρκειας (t= 4-5 min) οδήγησε σε ελαφρώς μεγαλύτερη μείωση (κατά 3.7 log CFU/g). Συνολικά, οι τελικοί πληθυσμοί του *B. cereus* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 5 λεπτά θερμικής επεξεργασίας ήταν 4.3 και 2.7 log CFU/g (p<0.05).

Μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 8 °C, ο πληθυσμός του *B. cereus* στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ αυξήθηκε σημαντικά στους 8.5 και 7.9 log CFU/g, αντίστοιχα. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για χρόνο t= 2 min οδήγησε σε ισάριθμη μείωση του πληθυσμού του μικροοργανισμού (3.0- 3.3 log CFU/g) ενώ η εσωτερική θερμοκρασία των δειγμάτων κυμάνθηκε μεταξύ 74-75.6 °C. Επίδραση των μικροκυμάτων για χρόνο t=3 min στα δείγματα Μ-Χ-Θ (82 °C), οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου (κατά 3.8 log CFU/g από την αρχική τιμή) ενώ έκθεση μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας (t ≥4 min, 83-84 °C) δεν οδήγησε σε περαιτέρω σημαντική μεταβολή του πληθυσμού (p>0.05). Στην περίπτωση των δειγμάτων Μ-Χ-Θ, σε χρόνο t=3 min (72.7 °C) και t= 4-5 min (80.5-82) παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 4.0 και 4.5 log CFU/g, αντίστοιχα. Συνολικά, μετά από 5 λεπτά θερμικής επεξεργασίας τα δείγματα Μ-Χ-Θ είχαν κατά 1.2 log CFU/g χαμηλότερους πληθυσμούς *B. cereus* σε σχέση με τα δείγματα Μ (p<0.05).

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από την θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για χρόνο t=0 και t=5 min (maximum), μετά από 1 και 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C ή 8 °C, μπορούν να συνοψιστούν στο παρακάτω **Πίνακα 1**:

Πίνακας 1: Συνολική μεταβολή του πληθυσμού του *B. cereus* που ενοφθαλμίστηκε στα δείγματα M, M-X-Θ, κατά την επίδραση MW για χρόνο t=0, t= 5 min (1^η, 8^η ημέρα συντήρησης στους 4, 8 °C).

	Nt (Log CFU/g) = Πληθυσμός του <i>B. cereus</i> μετά από χρόνο έκθεσης στα μικροκύματα t (log CFU/g)			
Ημέρα 1	M (4 °C)	M-X-Θ (4 °C)	M (8 °C)	M-X-Θ (8 °C)
t=0 (min) N ₀ (log CFU/g)	6.3	5.9	6.5	6.4
t=5 (min) N ₅ (log CFU/g)	3.1 (82.9 °C)	1.5 (90.3 °C)	4.3 (85.3 °C)	2.7 (83.4 °C)
Μείωση πληθυσμού	-3D	-4.5D	-2D	-4D
(%) μείωση πληθυσμού [(N ₀ - N _t)/N ₀] x 100%	51 %	76 %	30 %	62 %
Ημέρα 8				
t=0 (min) N ₀ (log CFU/g)	6.6	6.5	8.5	7.9
t=5 (min) N ₅ (log CFU/g)	3.4 (83.0 °C)	2.7 (87.2 °C)	4.7 (84.1 °C)	3.5 (82.5 °C)
Μείωση πληθυσμού	-3D	-4D	-4D	-4.4D
(%) μείωση του πληθυσμού [(N ₀ - N _t)/N ₀] x 100%	45%	61%	55%	56%

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 1**, ο πληθυσμός του *B. cereus* στα δείγματα M παρουσίασε μείωση κατά 2-3D μετά από επίδραση των μικροκυμάτων για χρόνο t=5 min, όταν η διαδικασία της θερμικής επεξεργασία πραγματοποιήθηκε μετά από 1 ή 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C και στους 8 °C, με εξαίρεση την 8η ημέρα συντήρησης στους 8 °C όπου η μείωση ήταν 4D. Το ποσοστό μείωσης από την αρχική τιμή κυμάνθηκε μεταξύ 30-55%. Αντίστοιχα, τα δείγματα M-X-Θ εμφάνισαν μεγαλύτερη μείωση του τελικού πληθυσμού του παθογόνου, η οποία ήταν σταθερή στην τιμή 4-4.5D. Επιπρόσθετα, το ποσοστό μείωσης για τα δείγματα M-X-Θ ήταν κατά (περίπου) 20% μεγαλύτερο σε σχέση με τα δείγματα M (56-76%).

Η επιβίωση του *B. cereus* στα δείγματα Μ-Χ-Θ και ιδιαιτέρως στην περίπτωση του μάρτυρα (Μ), πιθανόν να οφείλεται στους παρακάτω λόγους:

1. Στην παραγωγή σπόρων από τα βλαστικά κύτταρα του παθογόνου, τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη θερμοανθεκτικότητα (θανάτωση σε θερμοκρασία ≥ 95 °C, Byrne et al., 2006; Enforms 2008)
2. Στην παροχή προστασίας στα βλαστικά κύτταρα του παθογόνου από το υπόστρωμα του τροφίμου (Byrne et al., 2006)
3. Στην παραγωγή πρωτεϊνών θερμής επίπληξης από τα κύτταρα του παθογόνου οι οποίες αυξάνουν την θερμοανθεκτικότητα (heat shock proteins, Byrne et al., 2006)
4. Στη συσσωμάτωση των κυττάρων του μικροοργανισμού (clumping, aggregation) που τα προστατεύει από την επίδραση της θερμότητας (Byrne et al., 2006)
5. Στο γεγονός ότι η θερμική επεξεργασία με μικροκύματα είναι μια μη-ισόθερμη μεταβολή, η οποία μπορεί να αυξήσει την θερμοανθεκτικότητα των σπόρων και βλαστικών κυττάρων του *B. cereus* (Fernandez et al., 2001).

Στην τρέχουσα βιβλιογραφία δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα σχετικά με την επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στην μείωση του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων του *B. cereus*. Ωστόσο, οι Byrne et al. (2006) αναφέρουν ότι ο χρόνος που απαιτήθηκε για την μείωση του πληθυσμού των βλαστικών κυττάρων του παθογόνου κατά 6D, σε σταθερή θερμοκρασία 60 °C (ισόθερμη μεταβολή, χρήση υδατόλουτρου) ήταν 6 λεπτά (η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε προϊόν από χοιρινό κρέας), ενώ ο χρόνος που απαιτήθηκε για μείωση του πληθυσμού των σπόρων του ίδιου βακτηρίου κατά 1.0 log CFU/g, ήταν 2 λεπτά και 29.5 σε σταθερή θερμοκρασία 95 και 85 °C, αντίστοιχα. Η έρευνα των Byrne et al. (2006) πραγματοποιήθηκε σε ξεχωριστή καλλιέργεια των σπόρων και των βλαστικών κυττάρων του μικροοργανισμού, αλλά ο αντίστοιχος διαχωρισμός δεν έγινε στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης. Συνεπώς, δεν μπορεί να διευκρινιστεί αν η παρατηρούμενη επιβίωση του *B. cereus*, μετά την θερμική επεξεργασία, αναφέρεται σε βλαστικά κύτταρα ή σπόρους του παθογόνου, στην παρούσα μελέτη. Όσον αφορά ανάλογες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν με την χρήση σπόρων και βλαστικών κυττάρων του *B. cereus* (μικτή καλλιέργεια), οι Casadei et al. (2001) και Coroller et al. (2001) αναφέρουν ότι ο απαιτούμενος χρόνος για την μείωση του πληθυσμού κατά 1.0 log CFU/g, ήταν 1 λεπτό και 8 λεπτά, αντίστοιχα σε σταθερή θερμοκρασία 95 °C (in vitro). Τέλος, οι Mazas et al. (1995) μελέτησαν την θερμοανθεκτικότητα των σπόρων 3 διαφορετικών στελεχών του *B. cereus* (ξεχωριστές καλλιέργειες) και παρατήρησαν μεγάλες χρονικές αποκλίσεις μεταξύ

των, προκειμένου να επιτευχθεί μείωση του πληθυσμού κατά 1.0 log CFU/g, σε σταθερή θερμοκρασία ($D_{92} = 0.9-2.84$, $D_{95} = 3.58-5.76$ min, $D_{98} = 2.17-7.09$ min).

Οι Aleixo et al. (1985) χρησιμοποίησαν μικτή καλλιέργεια σπόρων (4.0 log CFU/g) και βλαστικών κυττάρων (5.8 log CFU/g) του σπορογόνου βακτηρίου *Clostridium perfringens*, ενοφθαλμισμένων σε κρέας γαλοπούλας, και αναφέρουν ότι μετά την θερμική επεξεργασία σε φούρνο μικροκυμάτων (600 W) για 30 λεπτά παρατηρήθηκε μείωση του συνολικού πληθυσμού (βλαστικά κύτταρα + σπόροι) κατά 3.9-4.6 log CFU/g (τελική θερμοκρασία 76.6 °C). Τέλος, οι Gedikli et al. (2008) μελέτησαν *in vitro* την επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση του *B. cereus* και αναφέρουν μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 4D σε χρόνο $t=1$ min (τελική θερμοκρασία 70 °C). Ωστόσο, επίδραση των μικροκυμάτων για μεγαλύτερη χρονική διάρκεια ($t= 80-140$ sec) δεν οδήγησε σε περαιτέρω ελάττωση του τελικού πληθυσμού του *B. cereus*, υποδεικνύοντας ότι η μέγιστη δυνατή μείωση του παθογόνου έγινε εντός μικρού χρονικού διαστήματος. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι σε πολλές περιπτώσεις ο πληθυσμός του *B. cereus* μειώθηκε κατά το μέγιστο μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα, αλλά στην συνέχεια δεν παρατηρήθηκε επιπλέον ελάττωση.

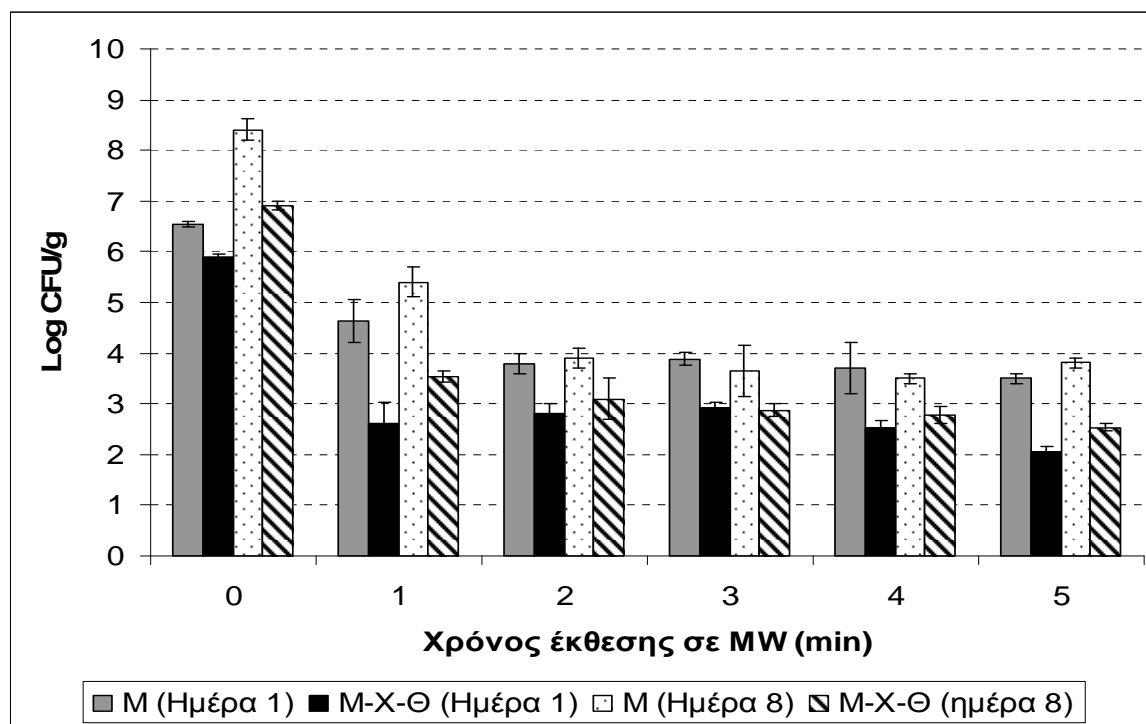
Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η επιβίωση του *B. cereus* κατά την θερμική επεξεργασία των τροφίμων, εξαρτάται από τους ακόλουθους παράγοντες (Byrne et al., 2006; Casadei et al., 2001):

1. Την θερμοανθεκτικότητα και τις διαφορετικές ιδιότητες των στελεχών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του ενοφθαλμίσματος. Για παράδειγμα, αν κάποιο από τα στελέχη έχει ιστορικό προηγούμενης έκθεσης σε θερμική επεξεργασία (π.χ. το στέλεχος PAL 22 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη έχει απομονωθεί από προ-μαγειρεμένα γεύματα)
2. Την πειραματική μεθοδολογία που εφαρμόζεται κάθε φορά
3. Το βαθμό προσκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων-σπόρων στην επιφάνεια του εκάστοτε τροφίμου
4. Τη σύσταση του τροφίμου που εξετάζεται κάθε φορά, καθώς αύξηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, λίπος και υδατάνθρακες αυξάνει την θερμοανθεκτικότητα των βακτηριακών κυττάρων
5. Την ενεργότητα ύδατος του τροφίμου (αύξηση της a_w μειώνει την θερμοανθεκτικότητα)
6. Το pH του τροφίμου (μείωση του pH αυξάνει την θερμοανθεκτικότητα)

3.4 Επίδραση μικροκυμάτων στην επιβίωση της μικροχλωρίδας αλλοίωσης στο προϊόν μετά τον ενοφθαλμισμό του με παθογόνα βακτήρια (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*) και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C

3.4.1 Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης στο προϊόν μετά τον ενοφθαλμισμό του με το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C.

Στο **Γράφημα 3.4.1α** παρουσιάζεται η επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης των δειγμάτων M και M-X-Θ μετά τον ενοφθαλμισμό τους με το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* και κατά την συντήρησή υπό συσκευασία MAP, απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 °C. Η μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας των δειγμάτων M και M-X-Θ συναρτήσει του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα έχει ήδη παρουσιαστεί στο **Γράφημα 3.1.1β**.



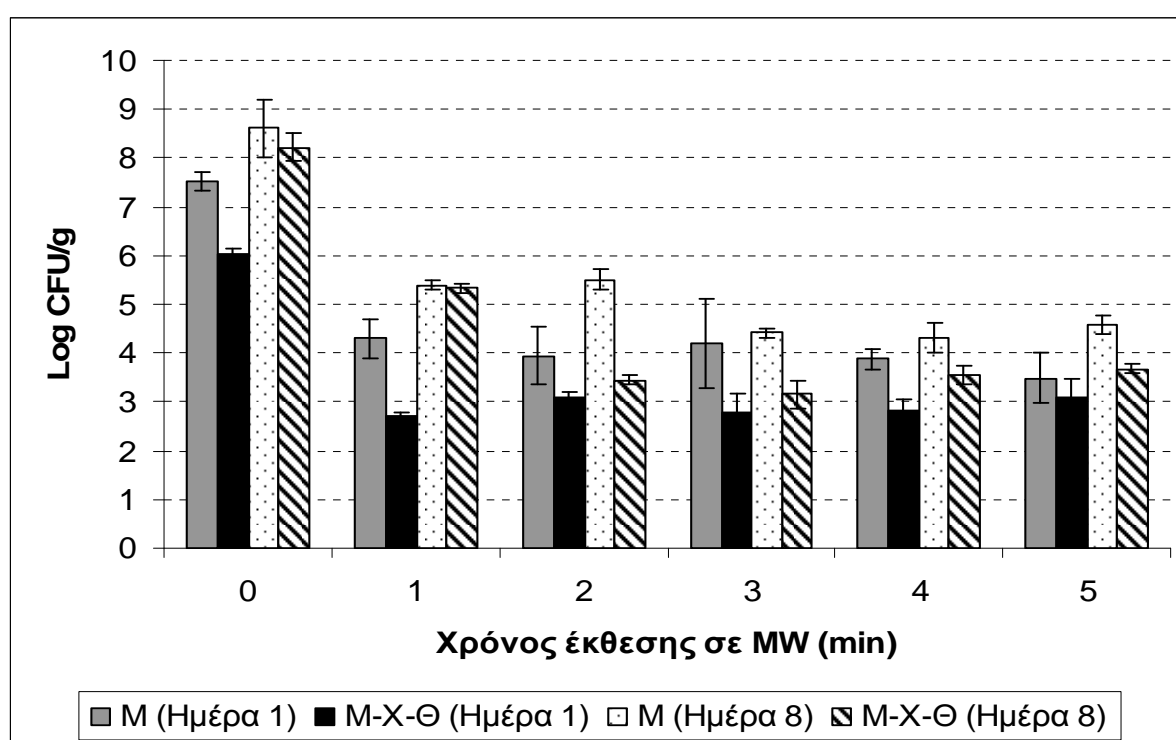
Γράφημα 3.4.1α. Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w=0.03% w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 4 °C, για 1 και 8 ημέρες (ενοφθαλμισμός με *L. monocytogenes*)

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.1α** ο αρχικός πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με το βακτήριο της *L. monocytogenes* και μετά από 1 ημέρα συντήρησης στους 4 °C, ήταν 6.55 και 5.9 log CFU/g, αντίστοιχα (t=0, προ θερμικής επεξεργασίας). Η υψηλή αρχική Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων σε t=0 οφείλεται στο γεγονός ότι και οι δυο μεταχειρίσεις είχαν εμβολιαστεί με μεγάλη συγκέντρωση του παθογόνου (περίπου 6.0 log CFU/g). Μετά από διάρκεια έκθεσης στα μικροκύματα t=1 min, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ, μειώθηκε κατά 1.9 log CFU/g και 3.3 log CFU/g, αντίστοιχα. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ για μεγαλύτερο χρόνο t=2 min οδήγησε και σε μεγαλύτερη μείωση της Ο.Μ.Χ., η οποία ήταν 2.75 log CFU/g από την αρχική τιμή. Περαιτέρω ψήσιμο των δειγμάτων Μ για t>2 min δεν οδήγησε σε σημαντική επιπλέον μείωση της Ο.Μ.Χ., εφόσον φάνηκε να επιβιώνει ανεξαρτήτως του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα. Τελικά, μετά από χρόνο t=4 και t=5 min η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ ήταν 3.70 και 3.50 log CFU/g, αντίστοιχα. Στην περίπτωση των δειγμάτων Μ-Χ-Θ, σε χρόνο t=2-4 min, η μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ. ήταν σταθερή στην τιμή 3-3.4 log CFU/g, δηλαδή μεταξύ 2 με 4 λεπτών δεν παρατηρήθηκε σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς την μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ., όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των δειγμάτων Μ. Ωστόσο, για χρόνο θερμικής επεξεργασίας t=5 min η μείωση αυξήθηκε στους 3.8 log CFU/g για τα δείγματα Μ-Χ-Θ, ενώ ο τελικός πληθυσμός Ο.Μ.Χ. ήταν 2.0 log CFU/g. Γενικά, τα δείγματα Μ-Χ-Θ είχαν πάντοτε χαμηλότερους πληθυσμούς από τα δείγματα Μ, ανεξαρτήτως χρόνου θερμικής επεξεργασίας, και η διαφορά πληθυσμών μεταξύ των σε χρόνο t=5 min ήταν 1.5 log CFU/g, υποδεικνύοντας ότι η προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων πιθανόν να οδήγησε σε καλύτερη μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ.

Μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται επίσης στο **Γράφημα 3.4.1α**. Σύμφωνα με το Γράφημα, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 4 °C, αυξήθηκε στους 8.4 και 6.9 log CFU/g, αντίστοιχα (t=0 min). Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για t=2 min οδήγησε σε μείωση της Ο.Μ.Χ. κατά 4.5 log CFU/g και 3.8 log CFU/g, αντίστοιχα. Μεγαλύτερη διάρκεια έκθεσης των δειγμάτων Μ στα μικροκύματα (t>2 min) δεν είχε ως αποτέλεσμα περαιτέρω μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ., ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων Μ-Χ-Θ θερμική επεξεργασία για t=5 min οδήγησε σε επιπλέον μείωση κατά 0.6 log CFU/g, σε σχέση με την αντίστοιχη που παρατηρήθηκε σε t=2 min. Τελικά, η τιμή Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ μετά από

θερμική επεξεργασία 5 λεπτών, ήταν 3.8 και 2.5 log CFU/g, αντίστοιχα. Γενικά, τα δείγματα M-X-Θ είχαν πάντοτε χαμηλότερες τιμές Ο.Μ.Χ. από τα δείγματα M, όπως παρατηρήθηκε και την Ημέρα 1.

Στο **Γράφημα 3.4.1β** παρουσιάζεται επίδραση μικροκυμάτων στην Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων M και M-X-Θ μετά τον ενοφθαλμισμό τους με *L. monocytogenes* και κατά την συντήρησή τους για 1 και 8 ημέρες στους 8 °C. Η μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας των δειγμάτων M και M-X-Θ συναρτήσε του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα έχει ήδη παρουσιαστεί στο **Γράφημα 3.1.2β**.



Γράφημα 3.4.1β. Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w= 0.03% w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 8 °C, για 1 και 8 ημέρες (ενοφθαλμισμός με *L. monocytogenes*)

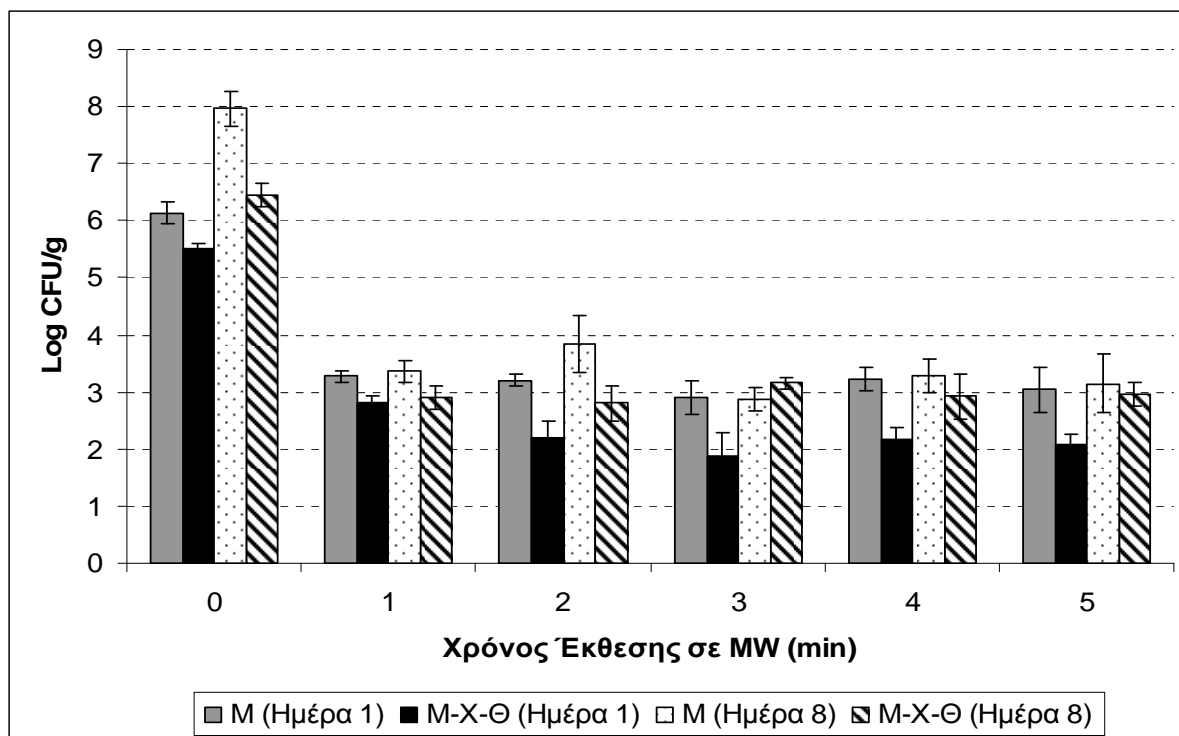
Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.1β**, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων M και M-X-Θ μετά από 1 ημέρα συντήρησης στους 8 °C, ήταν 7.5 και 6.0 log CFU/g, αντίστοιχα (δείγματα εμβολιασμένα με *L. monocytogenes*). Μετά από έκθεση στα μικροκύματα των δειγμάτων M και M-X-Θ για χρόνο t=2 min, η Ο.Μ.Χ. μειώθηκε κατά 3.6 log CFU/g και 3.0 log CFU/g, αντίστοιχα. Επιπλέον θερμική επεξεργασία των δειγμάτων M για t>2 min δεν οδήγησε σε περαιτέρω σημαντική μείωση της Ο.Μ.Χ. και σε χρόνο t=5 min η τιμή της

ήταν 3.5 log CFU/g (μείωση κατά 4.0 log CFU/g). Ανάλογο φαινόμενο παρατηρήθηκε και για τα δείγματα M-X-Θ, εφόσον, η O.M.X. δεν μεταβλήθηκε από την τιμή που απέκτησε σε χρόνο t=2 min, σε μεγαλύτερους χρόνους ψησίματος (O.M.X.= 3.1 log CFU/g σε t=5 min).

Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και μετά από 8 ημέρες συντήρησης των δειγμάτων M και M-X-Θ στους 8 °C (δείγματα επίσης ενοφθαλμισμένα με *L. monocytogenes*), και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται επίσης στο **Γράφημα 3.4.1β**. Σύμφωνα με το Γράφημα, η O.M.X. των δειγμάτων M και M-X-Θ (προ ψησίματος, t=0 min) είχε αυξηθεί στις τιμές 8.6 και 8.2 log CFU/g, αντίστοιχα. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων M και M-X-Θ για t=2 min μείωσε την O.M.X. κατά 3.1 και 4.7 log CFU/g, αντίστοιχα. Έκθεση των δειγμάτων στον φούρνο μικροκυμάτων για μεγαλύτερο χρόνο (t=3 min) οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα μόνο για τα δείγματα M, εφόσον η O.M.X. μειώθηκε κατά 4.21 log CFU/g. Ωστόσο, μεταξύ t=3-5 min δεν παρατηρήθηκε επιπλέον μεταβολή της O.M.X. των ίδιων δειγμάτων. Τελικά, ο πληθυσμός O.M.X. των δειγμάτων M και M-X-Θ μετά από επίδραση μικροκυμάτων για t=5 min, ήταν 4.6 και 3.7 log CFU/g, αντίστοιχα. Τα δείγματα M-X-Θ είχαν χαμηλότερες τιμές O.M.X. από τα δείγματα M σε κάθε χρόνο t > 1 min (διαφορά 0.9-2.0 log CFU/g). Το ποσοστό μείωσης της O.M.X. για τα δείγματα M και M-X-Θ, μετά από την επίδραση μικροκυμάτων για t=5 min, ήταν 46-55% και 48%-64%

3.4.2 Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης του προϊόντος μετά τον ενοφθαλμισμό του με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella enterica* και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C

Στο **Γράφημα 3.4.2α** παρουσιάζεται η επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης στο προϊόν μετά τον ενοφθαλμισμό του με το παθογόνο βακτήριο *Salmonella enterica* και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 °C. Η μεταβολή της εσωτερικής θερμοκρασίας των δειγμάτων M και M-X-Θ συναρτήσκει του χρόνου έκθεσης στα μικροκύματα έχει ήδη παρουσιαστεί στο **Γράφημα 3.2.1β**.



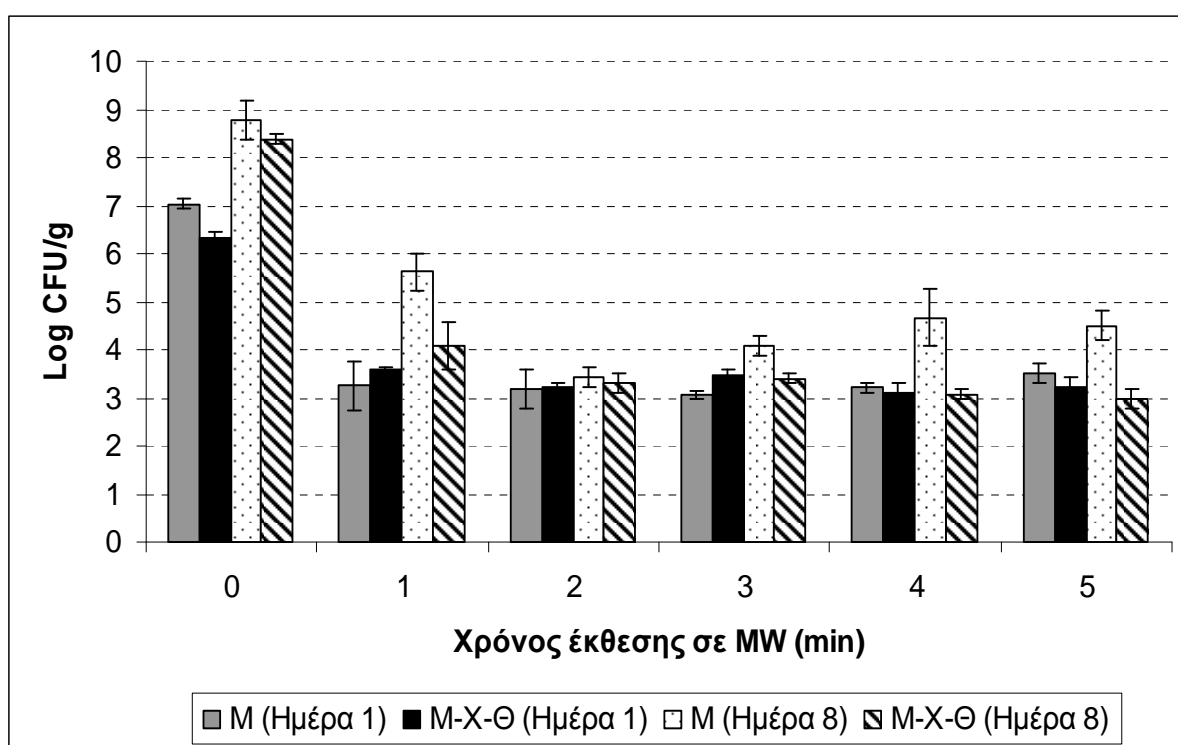
Γράφημα 3.4.2α. Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w/0.2% v/w, M-X-Θ) στους 4 °C, για 1 και 8 ημέρες (ενοφθαλμισμός με *S. enterica*)

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.2α**, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων M και M-X-Θ μετά τον ενοφθαλμισμό τους με την *S. enterica*, και ύστερα από 1 ημέρα συντήρησης στους 4 °C, ήταν 6.1 και 5.5 log CFU/g, αντίστοιχα. Σε γενικές γραμμές η επίδραση μικροκυμάτων στην Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων που είχαν ενοφθαλμιστεί με *S. enterica* δεν διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη συμπεριφορά των δειγμάτων που παρουσία *L. monocytogenes*. Σε χρόνο t=5 min η τελική Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων M και M-X-Θ ήταν 3.0 και 2.1 log CFU/g, (μείωση του αρχικού πληθυσμού κατά 3.1 και 3.4 log CFU/g, αντίστοιχα).

Μετά από 8 ημέρες συντήρησης των δειγμάτων M και M-X-θ στους 4 °C, ο πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. είχε αυξηθεί στα 8.0 και 6.5 log CFU/g, αντίστοιχα (**Γράφημα 3.4.2α**). Σε γενικές γραμμές, το προφίλ μείωσης της Ο.Μ.Χ. κάτω από την επίδραση των μικροκυμάτων δεν διέφερε σημαντικά από το αντίστοιχο που παρατηρήθηκε για τα

δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ που συντηρήθηκαν για 8 ημέρες στους 8 °C, παρουσία *L. monocytogenes* και σχολιάστηκε στην προηγούμενη παράγραφο 3.4.1. Χρόνος θερμικής επεξεργασίας t=5 min οδήγησε σε μείωση του αρχικού πληθυσμού Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ κατά 4.8 log CFU/g και 3.5 log CFU/g, αντίστοιχα, ενώ οι τελικοί τους πληθυσμοί προσδιορίστηκαν ως 3.0-3.15 log CFU/g

Στο **Γράφημα 3.4.2β** παρουσιάζεται η επίδραση μικροκυμάτων στην μείωση της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με την *S. enterica* και ύστερα από συντήρηση στους 8 °C για 1 και 8 ημέρες.



Γράφημα 3.4.2β Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (Μ, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w= 0.03 w/w /0.2% v/w, Μ-Χ-Θ) στους 8 °C, για 1 και 8 ημέρες (ενοφθαλμισμός με *S. enterica*)

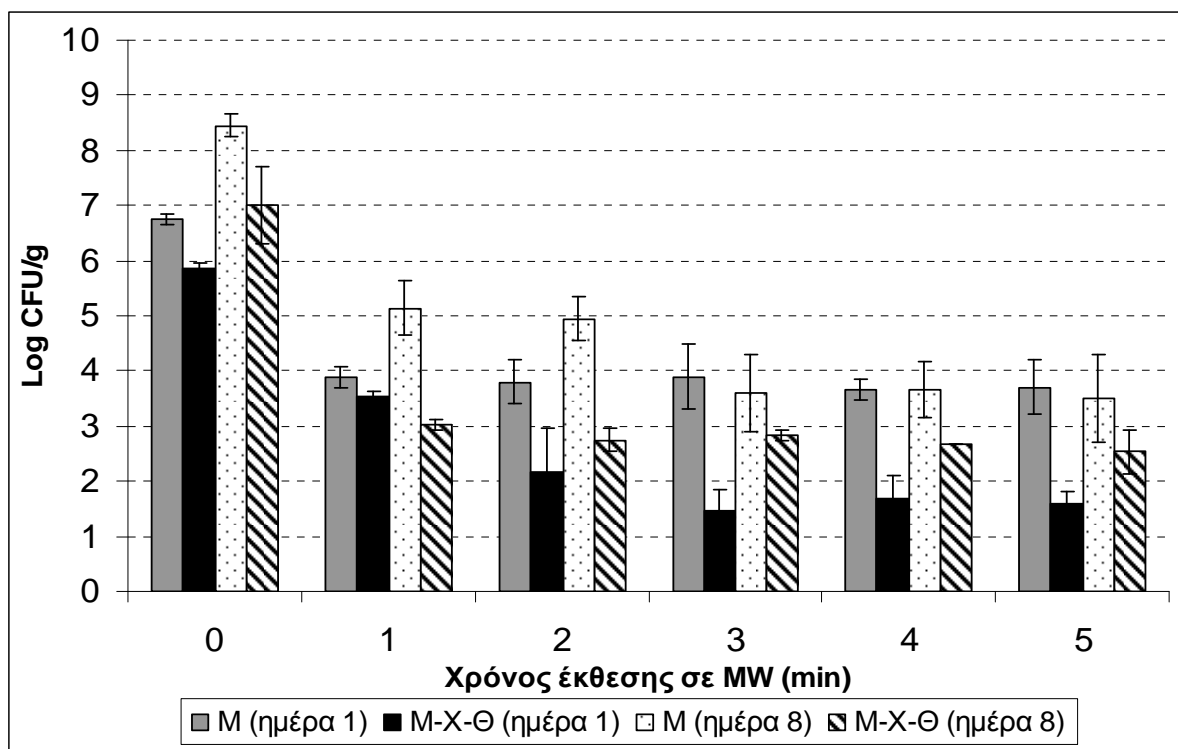
Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.2β**, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ (ενοφθαλμισμένα με *S. enterica*) σε χρόνο t=0 (προ ψησίματος, 1^η ημέρα) ήταν 7.0 και 6.3 log CFU/g, αντίστοιχα. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για χρόνο t=1 min οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ. κατά 3.75 και 2.7 log CFU/g,

αντίστοιχα. Περαιτέρω ψήσιμο των δειγμάτων για χρόνο $t > 1$ min δεν οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ, σε σχέση με αυτή που επιτεύχθηκε σε $t = 1$ min. Ο τελικός πληθυσμός Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ σε χρόνο $t = 5$ min ήταν 3.5 και 3.2 log CFU/g, αντίστοιχα.

Μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 8 °C, επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία θερμικής επεξεργασίας και τα αποτελέσματα δείχνονται επίσης στο **Γράφημα 3.4.2β**. Σε χρόνο $t = 0$ min (προ ψησίματος), ο πληθυσμός Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ ήταν 8.8 και 8.4 log CFU/g, αντιστοίχως. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για χρόνο $t = 5$ min οδήγησε σε μείωση της Ο.Μ.Χ. κατά 4.4 και 5.4 log CFU/g, αντίστοιχα, και οι τελικοί τους πληθυσμοί την δεδομένη χρονική στιγμή ήταν 4.5 και 3.0 log CFU/g. Γενικά, τα δείγματα Μ-Χ-Θ επέδειξαν χαμηλότερους πληθυσμούς της Ο.Μ.Χ. σε σχέση με τα δείγματα Μ, σε κάθε χρονική στιγμή της θερμικής επεξεργασίας (διαφορά κατά 0.7-1.5 log CFU/g).

3.4.3 Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης του προϊόντος, μετά τον ενοφθαλμισμό του με το παθογόνο βακτήριο *Bacillus cereus* και κατά την συντήρησή του υπό συσκευασία MAP απουσία ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου για 1 και 8 ημέρες στους 4 ή 8 °C

Στο **Γράφημα 3.4.3α** παρουσιάζεται η επίδραση των μικροκυμάτων στην μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ. στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με το βακτήριο *B. cereus* και ύστερα από συντήρηση για 1 και 8 ημέρες στους 4 °C.



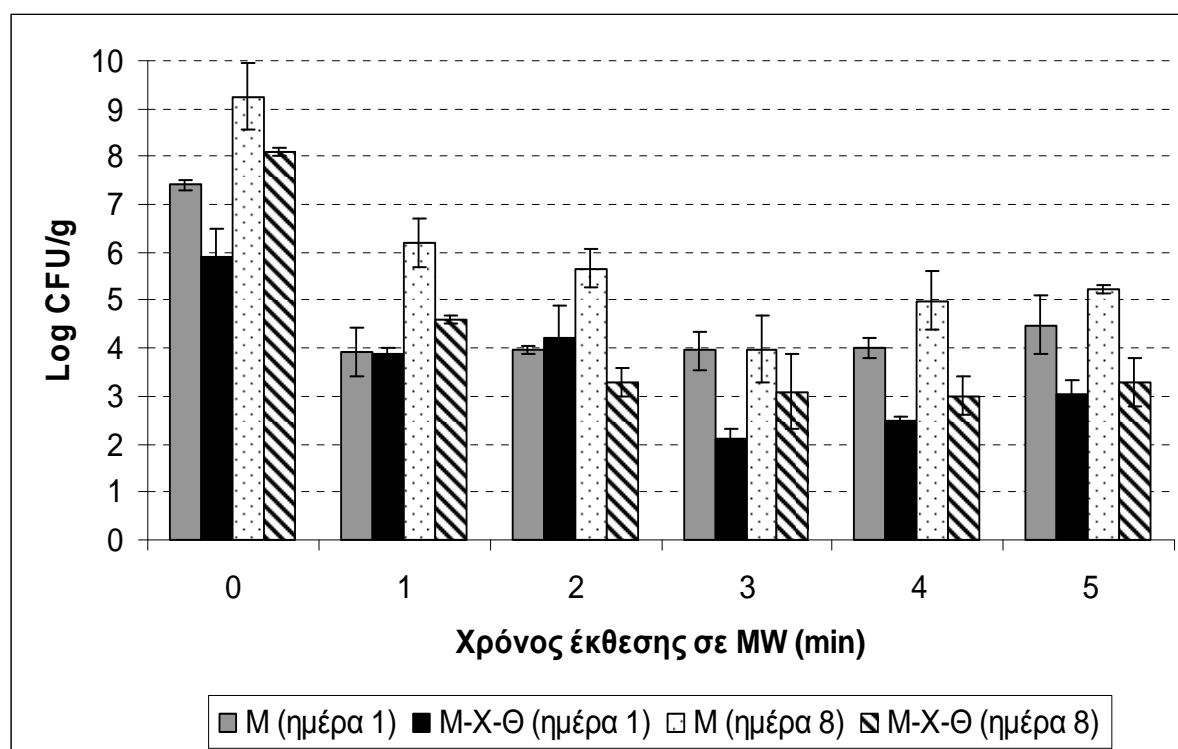
Γράφημα 3.4.3α Επίδραση μικροκυμάτων στην μικρογλωρίδα αλλοίωσης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (M, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w= 0.03 w/w /0.2% v/w, M-X-Θ) στους 4 °C, για 1 και 8 ημέρες (ενοφθαλμισμός με *B. cereus*)

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.3α**, ο αρχικός πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων M και M-X-Θ ύστερα από τον ενοφθαλμισμό τους με το βακτήριο *B. cereus* ήταν 6.7 και 5.9 log CFU/g, αντίστοιχα (t=0, Ημέρα 1). Ψήσιμο των δειγμάτων M και M-X-Θ για t=2 min μείωσε τον πληθυσμό της Ο.Μ.Χ. κατά 3.0 και 3.7 log CFU/g, αντίστοιχα, ενώ θερμική επεξεργασία πλέον των 2 λεπτών δεν οδήγησε σε περαιτέρω σημαντική μεταβολή της Ο.Μ.Χ. Τελικά, σε χρόνο t=5 min η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων M και M-X-Θ ήταν 3.7 και 1.6 log CFU/g, αντιστοίχως. Τα δείγματα M-X-Θ είχαν πάντοτε χαμηλότερες τιμές Ο.Μ.Χ. σε σχέση με τα δείγματα M μετά από t>1 min (διαφορά κατά 1.5-2.0 log CFU/g).

Στο ίδιο **Γράφημα 3.4.3α**, παρουσιάζονται επίσης τα αποτελέσματα της επίδρασης μικροκυμάτων στην μείωση της OMX μετά από 8 ημέρες συντήρησης των δειγμάτων M και M-X-Θ στους 4 °C. Σε χρόνο t=0 min (προ ψησίματος) ο πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων M και M-X-Θ ήταν 8.4 και 7.0 log CFU/g, αντιστοίχως. Μετά από θερμική επεξεργασία των δειγμάτων M και M-X-Θ για t=2 min, η OMX μειώθηκε κατά 3.45 και

4.20 log CFU/g, αντίστοιχα. Ψήσιμο των δειγμάτων για μεγαλύτερο χρόνο ($t=3$ min) οδήγησε σε επιπλέον μείωση της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ κατά 1.3 log CFU/g σε σχέση με την αντίστοιχη σε $t=2$ min, αλλά έκτοτε ($t>3$ min) δεν παρατηρήθηκε νέα μεταβολή της. Στην περίπτωση των δειγμάτων Μ-Χ-Θ, ψήσιμο των δειγμάτων για χρόνο $t>3$ min οδήγησε σε πολύ μικρή επιπλέον μείωση της Ο.Μ.Χ. μόλις κατά 0.3 log CFU/g. Σε χρόνο $t=5$ min ο πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ ήταν 3.5 και 2.5 log CFU/g, ενώ όπως παρατηρήθηκε και την Ημέρα 1, τα δείγματα Μ-Χ-Θ είχαν πάντοτε χαμηλότερους πληθυσμούς της Ο.Μ.Χ. σε σχέση με τα Μ, από το 1^ο λεπτό της θερμικής επεξεργασίας (διαφορά κατά 1-2 log CFU/g).

Στο **Γράφημα 3.4.3β** παρουσιάζεται η επίδραση των μικροκυμάτων στην μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ. στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ, μετά τον ενοφθαλμισμό τους με το βακτήριο *B. cereus* και ύστερα από συντήρηση για 1 και 8 ημέρες στους 8 °C.



Γράφημα 3.4.3β Επίδραση μικροκυμάτων στην μικροχλωρίδα αλλοίωσης προϊόντος κοτόπουλου (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) που συντηρήθηκε υπό συσκευασία MAP χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων (Μ, μάρτυρας), και με την προσθήκη χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (1.5% v/w= 0.03% w/w /0.2% v/w, Μ-Χ-Θ) στους 8 °C, για 1 και 8 ημέρες (ενοφθαλμισμός με *B. cereus*)

Σύμφωνα με το **Γράφημα 3.4.3β**, σε χρόνο $t=0$ min (προ θερμικής επεξεργασίας) ο πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ ήταν 7.4 και 5.9 log CFU/g (Ημέρα 1). Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για $t=2$ min οδήγησε σε μείωση της Ο.Μ.Χ. κατά 3.4 και 1.8 log CFU/g, αντίστοιχα. Ψήσιμο των δειγμάτων Μ για μεγαλύτερο χρόνο ($t>2$ min) δεν είχε ως αποτέλεσμα περαιτέρω μείωση της Ο.Μ.Χ., ενώ στην περίπτωση των δειγμάτων Μ-Χ-Θ παρατηρήθηκε, επιπλέον μείωση κατά περίπου 1 log CFU/g. Τελικά, σε χρόνο $t=5$ min η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ ήταν 4.5 και 3.0 log CFU/g. Η διαφορά πληθυσμών Ο.Μ.Χ. μεταξύ δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ κυμάνθηκε στους 1.5-2.0 log CFU/g για χρόνο θερμικής επεξεργασίας μεγαλύτερο ή ίσο των 3 λεπτών ($t=3-5$ min).

Επανάληψη της διαδικασίας μετά από 8 ημέρες συντήρησης των δειγμάτων στους 8 °C, οδήγησε στα αποτελέσματα που παρουσιάζονται επίσης στο **Γράφημα 3.4.3β**. Σύμφωνα με το Γράφημα, ο πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. στα δείγματα Μ και Μ-Χ-Θ μετά από 8 ημέρες συντήρησης στους 8 °C, αυξήθηκε στις τιμές 9.3 και 8.1 log CFU/g, αντίστοιχα. Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ για $t=2$ min μείωσε την τιμή Ο.Μ.Χ. κατά 3.6-4.8 log CFU/g, αντίστοιχα. Ψήσιμο των ίδιων δειγμάτων πλέον των 2 λεπτών δεν οδήγησε σε μεγαλύτερη (σημαντικά) μείωση του πληθυσμού της Ο.Μ.Χ. Τελικά, ο πληθυσμός της Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ σε χρόνο $t=5$ min, ήταν 5.2 και 3.3 log CFU/g, αντιστοίχως. Επιπρόσθετα, τα δείγματα Μ-Χ-Θ είχαν κατά 1.5-2.0 log CFU/g χαμηλότερο πληθυσμό Ο.Μ.Χ. σε σχέση με τα δείγματα Μ, μετά από χρόνο θερμικής επεξεργασίας $t \geq 1$ min.

Σε μια προσπάθεια να συνοψίσουμε τα αποτελέσματα που παρατέθηκαν στις παραπάνω παραγράφους 3.4.1, 3.4.2 και 3.4.3, παρατηρούμε ότι η επίδραση μικροκυμάτων στην περίπτωση της Ο.Μ.Χ. δεν οδήγησε σε μηδενισμό της, σε κανένα από τα δείγματα, αλλά περιορίστηκε σε μείωση του αρχικού πληθυσμού της. Μάλιστα, στην πλειοψηφία των δειγμάτων, η μέγιστη μείωση της Ο.Μ.Χ., υπό την επίδραση των μικροκυμάτων, παρατηρήθηκε σε χρόνο θερμικής επεξεργασίας $t=2-3$ min, ενώ περαιτέρω ψήσιμο για μεγαλύτερο χρόνο ($t>2$ ή $t>3$ min) δεν οδήγησε σε πλέον μείωση της Ο.Μ.Χ. Σε γενικές γραμμές, η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ, μειώθηκε κατά 3-5 log CFU/g μετά από χρόνο ψήσιματος $t=5$ min, ενώ τα δείγματα Μ-Χ-Θ είχαν χαμηλότερες τιμές Ο.Μ.Χ. σε σχέση με τα Μ (διαφορά κατά 1-2 log CFU/g), μετά από θερμική επεξεργασία $t \geq 2$ min. Συνοπτικά, οι τελικοί πληθυσμοί Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ-Χ-Θ και Μ που συντηρήθηκαν στους 4 °C (παρουσία των παθογόνων βακτηρίων *L. monocytogenes* ή *S.*

enterica ή *B. cereus*) μετά από χρόνο ψησίματος $t=5$ min , ήταν 1.6-2.5 και 3-3.8 log CFU/g, αντίστοιχα. Αναλόγως, οι τελικοί πληθυσμοί Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ-Χ-Θ και Μ που συντηρήθηκαν στους 8 °C (παρουσία των παθογόνων βακτηρίων *L. monocytogenes* ή *S. enterica* ή *B. cereus*) μετά από χρόνο ψησίματος $t=5$ min, ήταν 3.0-3.7 και 3.5-5.0 log CFU/g, αντίστοιχα.

Το γεγονός ότι η Ο.Μ.Χ. των δειγμάτων Μ και Μ-Χ-Θ, υπό την επίδραση των μικροκυμάτων, μειώθηκε αλλά δεν μηδενίστηκε, ενώ στην περίπτωση των παθογόνων βακτηρίων *L. monocytogenes* ή *S. enterica* δεν παρατηρήθηκε επιβίωση μπορεί να οφείλεται στους παρακάτω λόγους:

α) Τα παθογόνα στελέχη εμβολιάστηκαν στην επιφάνεια των δειγμάτων, με αποτέλεσμα να εκτίθενται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης (Sawyer et al., 1984), εφόσον η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία των μικροκυμάτων απορροφάται πρώτα από την επιφάνεια του τροφίμου, με αποτέλεσμα να παράγεται μεγαλύτερη θερμική ενέργεια, η ποσότητα της οποίας μειώνεται με αύξηση τους «βάθους» του τροφίμου.

β) Τα κύτταρα των μικροοργανισμών αλλοίωσης μπορεί να έχουν μεγαλύτερο βαθμό προσκόλλησης στην μάζα του τροφίμου σε σχέση με τα παθογόνα (τα οποία ενοφθαλμίστηκαν στην επιφάνεια του) με αποτέλεσμα να παρακωλύεται η θανάτωσή τους υπό την επίδραση των μικροκυμάτων (αύξηση του βαθμού προσκόλλησης των κυττάρων των μικροοργανισμών αυξάνει την θερμοανθεκτικότητά τους, Byrne et al., 2006).

γ) Στα μη εκλεκτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (όπως π.χ. το Plate Count Agar) μπορεί να αναπτυχθούν τραυματισμένα κύτταρα που είναι δυνατόν να προέρχονται και από τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Το αντίστοιχο φαινόμενο δεν παρατηρείται με την χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων (Datta & Anantheswaran, 2001).

δ) Αρκετοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης των τροφίμων, όπως enterococci, ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactobacillus* spp.) και ψευδομονάδες (π.χ. *Pseudomonas aeruginosa*) εμφανίζουν αυξημένη θερμοανθεκτικότητα στην επίδραση των μικροκυμάτων (Stolle & Schälch, 1999).

Σύμφωνα με την διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση μικροκυμάτων στην μείωση της Ο.Μ.Χ. τροφίμων ζωϊκής προέλευσης, οι Yilmaz et al. (2004) αναφέρουν ότι ψήσιμο προϊόντος κρέατος (meatballs) σε μέγιστη ισχύ (800 W) για 5 λεπτά (τελική εσωτερική θερμοκρασία 90 °C) οδήγησε σε θανάτωση των βακτηρίων *Escherichia coli*,

Staphylococcus aureus, *Clostridium perfringens* και *Salmonella* spp., ενώ ο πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας μειώθηκε κατά περίπου 2.5 log CFU/g από την αρχική του τιμή (6.37 log CFU/g σε χρόνο t=0 και 3.84 log CFU/g σε χρόνο t=5 min). Επίσης, οι Hollywood et al. (1991) αναφέρουν μείωση των μεσόφιλων μικροοργανισμών κατά 1.0 log CFU/g (αρχική τιμή O.M.X. 6.8 log CFU/g), μετά από το ψήσιμο τεμαχισμένου μοσχαρίσιου κρέατος σε φούρνο μικροκυμάτων για 9 min (650 W). Επίσης, οι Aziz et al. (2002) αναφέρουν ότι κατά την επίδραση μικροκυμάτων (600 W) σε προϊόντα από μοσχαρίσιο κρέας (μπιφτέκια κ.α) μέχρι η εσωτερική θερμοκρασία να αυξηθεί στους 85 °C, οδήγησε σε μείωση της O.M.X. κατά 2 log CFU/g (αρχική τιμή 6.6 log CFU/g). Τέλος, σύμφωνα με τους Sawyer et al. (1984), αν και ο πληθυσμός του ενοφθαλμισμένου βακτηρίου *S. aureus* μειώθηκε κατά > 6.6 log CFU/g μετά το ψήσιμο προϊόντος κοτόπουλου (drumsticks) σε φούρνο μικροκυμάτων (3 λεπτά σε 630 W, εσωτερική θερμοκρασία ≥ 74 °C), η O.M.X. μειώθηκε σε τιμή 1.78 log CFU/g (αρχική τιμή 7.7 log CFU/g, μείωση κατά 6.0 log CFU/g).

4.0 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* $\geq 6D$ (θανάτωση) επιτεύχθηκε σε όλα τα δείγματα σε $\theta \geq 80$ °C (80-82 °C). Τα περισσότερα δείγματα απέκτησαν εσωτερική θερμοκρασία ≥ 80 °C μετά από χρόνο $t = 3-4$ min, συνεπώς, ο συγκεκριμένος t θα μπορούσε να αποτελέσει και την προτεινόμενη διάρκεια ψήσιματος (MW) του προϊόντος από τον καταναλωτή προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλειά του από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό.
- Μείωση του πληθυσμού της *S. enterica* $\geq 6D$ (θανάτωση) επιτεύχθηκε σε όλα τα δείγματα μετά από $t = 2$ min. Γενικά, η *S. enterica* αποδείχθηκε πιο ευαίσθητη στην επίδραση της θερμικής επεξεργασίας (MW) από την *L. monocytogenes* και το προφίλ της θανάτωσής της ήταν το ίδιο ανεξαρτήτως θερμοκρασίας/διάρκειας συντήρησης.
- Η παρουσία χιτοζάνης και θυμαρέλαιου στα δείγματα M-X-θ μπορεί να μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* και της *S. enterica* προ της θερμικής επεξεργασίας, αλλά δεν επηρέασε δραστικά τον ρυθμό θανάτωσης αυτών.
- Ο πληθυσμός του βακτηρίου *B. cereus* μειώθηκε σημαντικά αλλά δεν μηδενίστηκε κατά το ψήσιμο των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, στα δείγματα M και M-X-Θ παρατηρήθηκε μείωση 2-3D και 4-4.5D, αντίστοιχα σε χρόνο $t = 5$ min (83-90 °C). Γενικά, το ποσοστό μείωσης από την αρχική τιμή ήταν κατά 20% μεγαλύτερο στα δείγματα M-X-Θ (56-76%) σε σχέση με τον μάρτυρα (30-55%).
- Στην πλειοψηφία των δειγμάτων, η μέγιστη μείωση της O.M.X. παρατηρήθηκε σε χρόνο θερμικής επεξεργασίας $t = 2-3$ min, ενώ περαιτέρω ψήσιμο για μεγαλύτερο χρόνο ($t > 2$ ή $t > 3$ min) δεν οδήγησε σε πλέον μείωση της O.M.X. Σε γενικές γραμμές, η O.M.X. των δειγμάτων M και M-X-Θ, μειώθηκε κατά 3-5 log CFU/g μετά από χρόνο ψήσιματος $t = 5$ min, ενώ τα δείγματα M-X-Θ είχαν χαμηλότερες τιμές O.M.X. σε σχέση με τα M (διαφορά κατά 1-2 log CFU/g), μετά από θερμική επεξεργασία $t \geq 2$ min.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ: ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗ

- ❖ Τον κύριο ενδεχόμενο μικροβιολογικό κίνδυνο κατά την συντήρηση του προϊόντος (Σουβλάκι Κοτόπουλο/Πιπεριά) σε αερόβια συσκευασία στους 4 °C, εκ των τριών παθογόνων βακτηρίων που εξετάστηκαν (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*) αποτέλεσε ο *Bacillus cereus*. Το γεγονός αυτό υπερτονίζει την αναγκαιότητα εφαρμογής καταλλήλων μέτρων υγιεινής κατά την παραγωγή του συγκεκριμένου προϊόντος από την βιομηχανία πουλερικών, και προτείνεται η διατήρηση (υπό αερόβια συσκευασία) σε θερμοκρασία ≤ 4 °C για διάστημα που δεν ξεπερνά τις 4 ημέρες. Στην περίπτωση συντήρησης του προϊόντος υπό συνθήκες MAP (30% CO₂/70% N₂) ο χρόνος διατήρησης συνιστάται να μην ξεπερνά τις 6 ημέρες, προκειμένου να εξασφαλίζεται η ασφάλεια και οργανοληπτική του ποιότητα.
- ❖ Κατά την συντήρηση του προϊόντος σε MAP στους 4 °C, τον κύριο κίνδυνο αποτελεί η *L. monocytogenes*, ωστόσο ο συνδυασμός χιτοζάνης/θυμαρέλαιου και συσκευασίας MAP (M-X-Θ) αποτρέπει την ανάπτυξη της, διατηρώντας την μικροβιολογική του ασφάλεια, για διάστημα τουλάχιστον 8 ημερών.
- ❖ Ο ίδιος συνδυασμός αποδείχτηκε ότι μπορεί να παρατείνει τον μικροβιολογικό χρόνο συντήρησης του προϊόντος από 4-6 ημέρες σε 13 ημέρες (4 °C), διατηρώντας ή/και ενισχύοντας τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Συνεπώς, ο συνδυασμός M-X-Θ θα μπορούσε να αποτελέσει καλή τεχνολογική λύση για την αύξηση του χρόνου συντήρησης του προϊόντος, με αποτέλεσμα να καθίσταται εφικτή η διάθεση του σε απομακρυσμένες περιοχές, από την εταιρία παραγωγής, χωρίς να υποβαθμίζεται ποιότητά του.
- ❖ Συντήρηση υπό συνθήκες MAP (8 °C) πρέπει να αποφεύγεται για την διατήρηση της μικροβιολογικής του ασφάλειας του προϊόντος. Ωστόσο, ο συνδυασμός M-X-Θ μπορεί να διατηρήσει την μικροβιολογική ασφάλεια του προϊόντος (από *Listeria* και *Salmonella*, *Bacillus*) για διάστημα 5-6 ημερών ακόμη και αν η θερμοκρασία συντήρησης φτάσει τους 8 °C.
- ❖ Στην περίπτωση που το προϊόν διατεθεί στο εμπόριο με την εφαρμογή του συνδυασμού M-X-Θ, είναι σημαντικό να αναγράφονται στη συσκευασία του οι κατάλληλες οδηγίες διάρκειας/θερμοκρασίας ψησίματος. Η πρόταση για το

συγκεκριμένο προϊόν είναι ψήσιμο στα μικροκύματα για $t \geq 4$ min (800 W) ή εναλλακτικά ωσότου η εσωτερική θερμοκρασία φτάσει τους 80-82 °C, για την εξασφάλιση μικροβιολογικής ασφάλειας του προϊόντος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κύριο αντικείμενο της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν η επίδραση συσκευασίας και «φυσικών» αντιμικροβιακών παραγόντων στην ποιότητα και μικροβιολογική ασφάλεια ενός νωπού Ελληνικού παραδοσιακού προϊόντος πουλερικών (Σουβλάκι: Κοτόπουλο/Πιπεριά). Η διατριβή απαρτίζεται από 4 πειραματικά κεφάλαια:

Στα πλαίσια του **Κεφαλαίου 1**, μελετήθηκε η πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της *Listeria monocytogenes*, της *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo και του σπορογόνου βακτηρίου *Bacillus cereus*, μετά τον ενοφθαλμισμό τους στο ολόκληρο προϊόν καθώς και στα επιμέρους συστατικά (κοτόπουλο/πιπεριά), συσκευασμένων υπό αερόβιες συνθήκες και διατηρημένων για διάστημα 6 ημερών, στους 4 °C. Τα βακτήρια *L. monocytogenes* και *S. enterica* δεν αναπτύχθηκαν για διάστημα 6 ημερών σε καμία από τις μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν, πιθανόν λόγω εμφάνισης φαινομένων ανταγωνισμού μεταξύ του παθογόνου/και της υψηλής μικροχλωρίδας του προϊόντος. Αντιθέτως, η ανάπτυξη του *B. cereus* (μίγμα ψυχρότροφων/μεσόφιλων στελεχών) έγινε με ταχύ ρυθμό στην περίπτωση της πιπεριάς και του ολόκληρου προϊόντος, ενώ στο κοτόπουλο ακολούθησε βραδύτερο ρυθμό, καταλήγοντας ωστόσο σε τελικό πληθυσμό κρίσιμο για την παραγωγή εντεροτοξίνης (6.0 log CFU/g) σε όλες τις μεταχειρίσεις.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Κεφαλαίου 2**, ο μικροβιολογικός χρόνος συντήρησης του προϊόντος σε αερόβια συσκευασία χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (A), με την προσθήκη χιτοζάνης 1.5% v/w= 0.03% w/w (A-X), θυμαρέλαιου 0.2% v/w (A-Θ) ή με τον συνδυασμό αυτών (1.5% v/w= 0.03% w/w/0.2% v/w, A-X-Θ) υπολογίστηκε σε 4, 6, 6, και 7 ημέρες, αντίστοιχα (4 °C). Επιπρόσθετα, ο μικροβιολογικός χρόνος συντήρησης του προϊόντος σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (M), με την προσθήκη χιτοζάνης 1.5% v/w= 0.03% w/w (M-X), θυμαρέλαιου 0.2% v/w (M-Θ) ή με τον συνδυασμό αυτών (M-X-Θ) υπολογίστηκε σε 6, 9, 9, και 13 ημέρες, αντίστοιχα (4 °C). Εκ του συνόλου των μεταχειρίσεων που εξετάστηκαν (αερόβια συσκευασία/MAP), η M-X-Θ αποδείχτηκε η πιο αποτελεσματική στην μείωση όλων των μικροοργανισμών αλλοίωσης που εξετάστηκαν. Επίσης, η M-X-Θ διατήρησε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο προϊόν για 14 ημέρες.

Με βάση τα αποτελέσματα του **Κεφαλαίου 3**, κατά την μελέτη της ανάπτυξης-επιβίωσης των παθογόνων μικροοργανισμών *L. monocytogenes*, *S. enterica* ser. Montevideo και *B. cereus* μετά τον ενοφθαλμισμό τους στο προϊόν και κατά την συντήρησή τους στους 4 °C σε MAP (δείγματα M), η *L. monocytogenes* ήταν εκείνη που

επέδειξε την μεγαλύτερη αύξηση (κατά 1.5 log CFU/g ή 40%) από τον αρχικό της πληθυσμό, ενώ στους 8 °C, το βακτήριο που επέδειξε την μεγαλύτερη αύξηση ήταν ο *Bacillus cereus* (αύξηση κατά 4.5 log CFU/g ή 128%), ενώ ο πληθυσμός του ξεπέρασε το κρίσιμο όριο (6.0 log CFU/g) την 5^η ημέρα συντήρησης. Ο συνδυασμός M-X-Θ αποδείχτηκε ο πιο αποτελεσματικός έναντι των παραπάνω βακτηρίων, ασκώντας μάλιστα βακτηριοστατική επίδραση κατά την συντήρηση στους 4 και 8 °C, για 8 και 5-6 ημέρες συντήρησης, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας (πιθανή) συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο αντιμικροβιακών παραγόντων. Στην περίπτωση του μίγματος του *B. cereus*, η μεταχείριση M-X-Θ άσκησε βακτηριοστατική δράση στους 4 °C, ενώ στους 8 °C δεν κατάφερε να αναστείλει την ανάπτυξή του. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο ότι παρουσία της M-X-Θ και κατά την συντήρηση στους 8 °C, ο πληθυσμός του *B. cereus* διατηρήθηκε <6.0 log CFU/g μειώνοντας την πιθανότητα παραγωγής εντεροτοξίνης (μείωση κατά 2.0 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα, πιθανή συνεργιστική δράση). Το μοντέλο Gamma® προέβλεψε με επιτυχία τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης της *L. monocytogenes* κατά την συντήρηση στους 4 °C, αλλά στους 8 °C η πειραματική ανάπτυξη του βακτηρίου ήταν χαμηλότερη από την προβλεπόμενη (και από τα δύο μοντέλα), ιδίως τις πρώτες 4 ημέρες συντήρησης. Η επιβίωση της *S. enterica* στους 4 °C, είχε προβλεφθεί με επιτυχία από τα δύο μοντέλα, αλλά στους 8 °C συμφώνησε καλύτερα με το μοντέλο Combase®. Τέλος, ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης του *B. cereus* ήταν ελαφρώς υψηλότερος από τον αντίστοιχο που προέβλεψαν τα δυο μοντέλα στους 4 °C, αλλά στους 8 °C υπήρξε πλήρης συμφωνία και με τα δύο μοντέλα.

Στο τελευταίο **Κεφάλαιο 4**, μελετήθηκε η επίδραση θερμικής επεξεργασίας με χρήση μικροκυμάτων (800 W) στην επιβίωση/θανάτωση των παθογόνων βακτηρίων που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή στους 4 ή/και 8 °C, σε συσκευασία MAP απουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (M) ή παρουσία χιτοζάνης/θυμαρέλαιου (M-X-Θ). Μείωση του πληθυσμού ($\geq 6D$ /θανάτωση) των *S. Montevideo* και της *L. monocytogenes* επιτεύχθηκε για τα δείγματα M, M-X-Θ όταν η εσωτερική θερμοκρασία ήταν περίπου 80 °C (± 2 °C), και μετά από $t=2$ και $t= 3-4$ min, αντίστοιχα, για τα βακτήρια αυτά. Η *S. Montevideo* αποδείχτηκε πιο ευαίσθητη στην επίδραση της θερμικής επεξεργασίας (MW) από τη *L. monocytogenes*. Ο πληθυσμός του βακτηρίου *B. cereus* μειώθηκε σημαντικά (μείωση κατά 2-4.5D) αλλά δε μηδενίστηκε κατά το ψήσιμο των δειγμάτων, υποδεικνύοντας ότι ήταν το πιο ανθεκτικό βακτήριο εκ των υπολοίπων που εξετάστηκαν στην επίδραση των μικροκυμάτων, για χρόνο $t=5$ min (83-90 °C).

ABSTRACT

The main objective of the present doctoral thesis was the combined effect of natural antimicrobial agents and packaging on the quality and microbiological safety of a fresh Greek traditional and popular poultry poroduct, made of chicken chunks and green chopped bell peppers (“Souvlaki”). The present study consists of four chapters:

Chapter 1: The fate of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo and spore former bacterium *Bacillus cereus* (cocktail of psychrotrophic/mesophilic strains) inoculated onto a fresh poultry product (“Souvlaki”), was evaluated. In order to test consistently the fate/survival of the three aforementioned pathogens, the product was also separately evaluated into its two different components (chicken chunks, chopped peppers). During the storage period of samples (6 days at 4 °C, aerobic conditions), the growth of *L. monocytogenes* and *S. enterica* was retarded, probably due to competitive phenomena with the native spoilage microflora (high initial count). On the other hand, *B. cereus* grew fast in all treatments (higher growth rate in the case of pepper-treatments), reaching final counts of 6.0 log CFU/g (threshold value for enterotoxin production by cells of the pathogen).

Chapter 2: The shelf life of product (based on microbiological analysis, Total Viable Counts data) stored under aerobic packaging with no antimicrobials added (control, A), with the addition of chitosan 1.5% v/w= 0.03% w/w (A-CH), thyme oil 0.2% v/w (A-T), or with the combined application of chitosan and thyme oil (1.5% v/w= 0.03% w/w/ 0.2% v/w, A-CH-T) was 4, 6, 6 and 7 days, respectively. Moreover, the microbiological shelf life of product stored under Modified Atmosphere Packaging (MAP) with no antimicrobials added (M), with the addition of chitosan 1.5% v/w= 0.03% w/w (M-CH), thyme oil 0.2% v/w (M-T) and with the combined application of chitosan and thyme oil (1.5% v/w= 0.03% w/w/ 0.2% v/w, M-CH-T) was 6, 9, 9 and 13 days, respectively. Of all treatments examined, irrespective of the packaging conditions, M-CH-T proved to be the most effective in inhibiting the growth of of all microorganisms tested. In addition, M-CH-T maintained acceptable sensory characteristics of the product during the storage period of 14 days.

Chapter 3: Based on the results obtained from the fate/survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo and *Bacillus cereus* (cocktail of strains) inoculated onto the poultry product at population 3-4 log CFU/g, stored under MAP and in the absence of antimicrobials, and among these bacterial

species *L. monocytogenes* grew at a higher final population (+1.5 log CFU/g) at 4 °C. At the higher temperature used (8 °C), *B. cereus* cocktail mixture exhibited the highest growth, increasing by ca. 4.5 log CFU/g, finally exceeding the critical population level of 6.0 log CFU/g, considered a threshold value for enterotoxin production, on day 5 of storage.

Of the antimicrobial treatments examined (M-CH, M-T, M-CH-T), the most effective in reducing counts of *L. monocytogenes* and *Salmonella enterica* was M-CH-T, resulting in a restricted growth (bacteriostatic effect) of these species during storage for 8 and 5-6 days, at 4 and 8 °C, respectively (possible synergistic effect between antimicrobials). In the case of *B. cereus*, the aforementioned treatment restricted its growth at 4 °C, whereas at 8 °C final population remained below 6.0 log CFU/g, thus reducing the probability of enterotoxin formation (reduction ca. 2.0 log CFU/g, possible synergistic effect). The Gamma® model was the one which best predicted the specific growth rate of *L. monocytogenes* during storage at 4 °C. However, *L. monocytogenes* growth fell under predictions of the two models (Gamma® and Combase®) at 8 °C (especially during the first 4 storage days). Survival of *S. enterica* was successfully predicted by both models at 4 °C, whereas at 8 °C experimental results seemed to correlate better with Combase®. Finally, specific growth rate of *B. cereus* based on experimental data at 4 °C, was slightly higher than the one predicted by the models, while at 8 °C, there was good agreement with the two models.

Chapter 4: The effect of microwave heating (MW) inactivation on *L. monocytogenes*, *S. enterica* ser Montevideo and *B. cereus*, inoculated onto “Souvlaki” product stored under MAP without antimicrobials (M) or with the combined application of chitosan and thyme oil (M-CH-T) at 4 and 8 °C. The effect of microwave treatment processing showed that total elimination (reduction $\geq 6D$) of the former two species was achieved when the internal cooking temperature in the samples reached approximately 80 °C (± 2 °C), after MW cooking time of $t= 2$ min and $t=3-4$ minutes, for *L. monocytogenes* and *S. Montevideo*, respectively. Finally, *B. cereus* population was significantly affected (a reduction of ca. 2-4.5D) by the use of MW, with the cells able to survive, indicating its thermotolerant capacity (not completely eliminated at internal temperature of 83-90 °C and cooking time $t=5$ min).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ)

- 1) **Abdullahi** I.O., Umoh V.J., Ameh J.B., Galadima M. (2006). Some hazards associated with the production of a popular roasted meat (tsire) in Zaria, Nigeria. *Food Control* 17, 348-352.
- 2) **Abushelaibi** A.A., Sofos J.N., Samelis J., Kendal P. (2003). Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk, or apple juice and stored at 4, 15 and 25 °C. *Food microbiology* 20, 17-25.
- 3) **Aider** M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology* 43, 837–842
- 4) **Aires** G.S.B., Walter E.H.M., Junqueira V.C.A., Roig S.M., Faria J.A.F. (2009). *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. *Journal of Food Protection* 72, 1301-1305.
- 5) **Aleixo** J.A.G., Swaminathan B., Jamesen K.S., Pratt D.E. (1985). Destruction of pathogenic bacteria in turkeys roasted in microwave ovens. *Journal of Food Science* 50, 873-880.
- 6) **American Public Health Association [APHA]** (2001). Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods. Edited by Downes F.P. and Ito K. (2001). Washington D.C. 20001-3710., ISBN 0-87553-175-x.
- 7) **Anang** D.M., Rusul G., Bakar J., Ling F.H. (2007). Effects of lactic acid bacteria and lauricin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 °C. *Food Control* 18, 961-969.
- 8) **Anaya** I., Aguirrezabal A., Ventura M., Cornellias L., Agut M. (2008). Survivability of *Salmonella* cells in popcorn after microwave oven and conventional cooking. *Microbiological Research* 163, 73-79.
- 9) **Andersen Borge** G.I., Skeie M., Sorhaug T., Langsrud T., Granum P.E. (2001). Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *International Journal of Food Microbiology* 69, 237-246.
- 10) **Annous**, B.A., Becker, L.A., Bayles, D.O., Labeda, D.P., Wilkinson, B.J., (1997). Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3887–3894.
- 11) **Apostolou** I., Papadopoulou C., Levidiotou S., Ioannides K. (2005). The effect of short-time microwave exposures on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto chicken meat portions and whole chickens. *International Journal of Food Microbiology* 101, 105-110.
- 12) **Artes** F., Gomez P.A., Arts-Hernandez F. (2007). Physical, physiological and microbiological deterioration of minimally processed fruits and vegetables. *Food Science and Technology International* 13, 177-190.

- 13) **Asslani U.**, Uran, Toska, Vilma (2003). Chemical composition of Albanian thyme oil (*Thymus vulgaris L.*). *Journal of Essential Oil Research*: http://findarticles.com/p/articles/mi_qa4091/is_200305/ai_n9300072/
- 14) **Atlas R.M.** (2006). Microbiological media for the examination of food. CRC Press, Boca Raton, FL.
- 15) **Aureli P.**, Constantini A., Zolea S. (1992). Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55, 344-348.
- 16) **Ausar S.F.**, Passalacqua N., Castagna L.F., Bianco I.D., Beiramo D.M. (2002). Growth of milk fermentative bacteria in the presence of chitosan for potential use in cheese making. *International Dairy Journal* 12, 899-906.
- 17) **Aymerich M.T.**, Jofre A., Garriga M., Hugas M. (2005). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *Journal of Food Protection* 68, 173-177.
- 18) **Aymerich T.**, Picouet P.A., Monfort J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science* 78, 114-129.
- 19) **Aziz N.H.**, Mahrous S.R., Youssef B.M. (2002). Effect of gamma-ray and microwave treatment on the shelf-life of beef products stored at 5 °C. *Food Control* 13, 437-444.
- 20) **Babic L.**, Watada A.E., Buta, J. G. (1997). Growth of *Listeria monocytogenes* restricted by native microorganisms and other properties of fresh-cut spinach. *Journal of Food Protection*, 60, 912-917.
- 21) **Bagamboula C.F.**, Uyttendaele M., Debevere J. (2002). Growth and survival of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in minimally processed vegetables packed under equilibrium modified atmosphere and stored at 7 and 12 °C. *Food Microbiology* 19, 529-536.
- 22) **Bagamboula C.F.**, Uyttendaele M., Debevere J. (2003). Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *Journal of Food Protection* 66, 668-673.
- 23) **Baker, R.C.**, Qureshi, R.A., Hotchkiss. J.H. (1986) Effect of an elevated level of carbon dioxide containing atmosphere on the growth of spoilage and pathogenic bacteria *Poultry Science* 65, 729-737.
- 24) **Balamatsia C.C.**, Rogga K., Badeka A., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2006). Effect of low-dose radiation on microbiological, chemical and sensory characteristics of chicken meat stored aerobically at 4 °C. *Journal of Food Protection* 69, 1126-1133.
- 25) **Barakat R.K.** and Harris L.J. (1999). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked Modified-Atmosphere-Packaged poultry in the presence and absence of naturally occurring microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 342-345.

- 26) **Baranyi J.** and Roberts T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- 27) **Barmpalia I.M.**, Koutsoumanis K.P., Geornaras I., Belk K.E., Scanga J.A., Kendall P.A., Smith G.C., Sofos J.N. (2005). Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10 °C. *Food Microbiology* 22, 205-211.
- 28) **Baron A.**, Bayer O., Butz P., Geisel B., Gupta B., Oltersdorf U., (1999). Consumer perception of high pressure processing: a three country survey. In: *European Conference on Emerging Food science and Technology*.
- 29) **Batt C.A.** (2004). *Bacillus cereus*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 119-124.
- 30) **Beal, J.D.**, Niven, S.J., Campbell A., Brooks P.H. (2002). The effect of temperature on the growth and persistence of *Salmonella* in fermented liquid pig feed. *International Journal of Food Microbiology* 79, 99-104.
- 31) **Beales N.** (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety* 3, 1–20.
- 32) **Bennik M.H.J.**, Peppelenbos H.W., Nguyen-the C., Carlin F.C., Smid E.J., L.G.M. (1996). Microbiology of minimally processed modified-atmosphere packaged chicory endive. *Postharvest Biology and Technology* 9, 209-221.
- 33) **Bennik M.H.J.**, Smid E.J., Rombouts F.M., Gorris L.G.M. (1995). Growth of psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of carbon dioxide and oxygen. *Food microbiology* 12, 509-519.
- 34) **Berruga M.I.**, Vergara H., Gallego L. (2005). Influence of packaging conditions on microbial and lipid oxidation in lamb meat. *Small Ruminant Research* 57, 257-264.
- 35) **Beuchat L.R.**, Rocelle M., Clavero S., Jacquette C.B. (1997). Effects of Nisin and Temperature on Survival, Growth, and Enterotoxin Production Characteristics of Psychrotrophic *Bacillus cereus* in Beef Gravy. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1953-1958.
- 36) **Beverly R.**, Janes M.E., Prinyawiwatkula W., No H.K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 25, 534-537.
- 37) **Bevilacqua A.**, Corbo M.R., Sinigaglia M. (2007). Combined effects of Modified Atmosphere Packaging and thymol for prolonging the shelf life of Caprese salad. *Journal of Food Protection* 70, 722-728.
- 38) **Bhunja A.K.** (2008). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In: Foodborne Microbial pathogens, pp. 135-148. Springer, New York.

- 39) **Blakistone** B.A. (1998). Meats and Poultry (pp. 254). In: Application of Modified Atmosphere Packaging of Foods, 2nd edition, Chapman & Hall (eds.), New York.
- 40) **Boerema** J.A., Penney N., Cummings T.L., Bell R.G. (1993). Carbon Dioxide controlled packaging of sliced ham. *International Journal of Food Science and Technology* 28, 435-442.
- 41) **Botsoglou** N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., Vassilopoulos V.N., Mantis A.J., Trakatelis A.G. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 42, 1931-1937.
- 42) **Bredholt** S., Nesbakken T., Holck A. (1999). Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *International Journal of Food Microbiology* 53, 43-52.
- 43) **Broussolle** V, Pandiani F., Haddad N., Michaud C., Carlin F., Nguyen-the C., Brillard J. (2010). Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC14579 growth at low temperature. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters* 306, 177-183.
- 44) **Buchanan** R.L. and Bagi L.K. (1999). Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 523-529.
- 45) **Buchanan** R.L. and Klawitter L.A. (1990). Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Journal of Food Science* 55, 1754-1756.
- 46) **Buchanan** R.L. and Phillips J.C. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 53, 370-376.
- 47) **Bucher** O., D' Aoust J.Y., Holley R.A. (2008). Thermal resistance of *Salmonella* serovars isolated from raw, frozen chicken nuggets/strips, nugget meat and pelleted broiler feed. *International Journal of Food Microbiology* 124, 195-198.
- 48) **Burns** T.R., Marks B.P., Harris K.L., Orta-Ramirez A., Ryser E.T. (2001). Effect of meat moisture content on thermal inactivation of bacteria. In: IFT Abstract 84-9, paper presented at the Institute of Food Technologists Annula Meeting, New Orleans , L.A.
- 49) **Burt** S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- 50) **Byrne** B., Dunne G., Bolton (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food microbiology* 23, 803-808.
- 51) **Caeraga** M., Fernandez E., Dorantes L., Mota L., Jaramillo M.E., Hernandez-Sanchez Z.H. (2003). Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and

- Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 83, 331-335.
- 52) **Campaniello** D., Bevilacqua A., Sinigaglia M., Corbo M.R. (2008). Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. *Food Microbiology* 25, 992-1000.
- 53) **Carlin** F., Fricker M., Pielat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salonen M.S., Svensson B., Nguyen-the C., Ehling-Schulz M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology* 109, 132-138.
- 54) **Carlin** F., Nguyen-The C., Morris C.E. (1996). Influence of background flora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed broad-leaved endive. *Journal of Food Protection* 59, 698-703.
- 55) **Casadei** M.A., Ingram R., Hitchings E., Archer J., Gaze J.E. (2001). Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology* 63, 125-134.
- 56) **CDC (Centers for Disease Control and Prevention)**, 2009. National Center for Zoonotic Vector-Borne and Enteric Diseases, Atlanta.
<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/>
- 57) **Celandroni** F., Longo I., Tosoratti N., Giannessi F., Ghelardi E., Salvetti S., Baggiani A., Senesi S. (2004). Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Applied Microbiology* 2004, 97, 1220–1227.
- 58) **Cervený** J., Meyer J.D., Hall P.A. (2009). Microbiological Spoilage of Meat and Poultry Products. In: *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, Food Microbiology and Food Safety, W.H. Sperber, M.P. Doyle (eds.), Springer Science+Business Media, LLC 2009.
- 59) **Chang** D.S., Cho H.R., Goo H.Y., Choe W.K. (1989). A development of food preservation with the waste of crab processing. *Bulletin of Korean Fish Society* 22, 70-78.
- 60) **Cheah**, L.H. and Page, B.B.C. (1997). Chitosan Coating for Inhibition of *Sclerotinia* Rot of Carrots. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 25, 89±92
- 61) **Chen** C., Liao W., Tsai G. (1998). Antibacterial effects of N-sulfonated and N-Sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection* 61, 1124-1128.
- 62) **Chen** C.M., Sebranek J.G., Dickson J.S., Mendonca A.E. (2004). Combining pediocin with post packaging irradiation for control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters. *Journal of Food Protection* 67, 1866-1875.

- 63) **Chhabra P.**, Huang Y.-W., Frank J.F., Chmielewski R., Gates K. (2006). Fate of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and *Vibrio vulnificus* in raw oysters treated with chitosan. *Journal of Food Protection* 69, 1600-1604.
- 64) **Chouliara E.** Karatapanis A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology* 24, 607-617.
- 65) **Chouliara I.** and Kontominas M.G. (2006). Combined effect of thyme essential oil and modified atmosphere packaging to extend shelf-life of fresh chicken meat. In: Govil J.N., Singh V.K., Almad, Khalil, Sharma, Rajeev Kr (Eds.), Recent progress in Medicinal plants: Natural product, 15. Studium Press, LLC, USA, pp. 423-442.
- 66) **Chouliara E.**, Badeka A., Savvaidis I., Kontominas M. G. (2007). Combined effect of irradiation and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of chicken breast meat: microbiological, chemical and sensory changes. *European Food Research and Technology* 226, 887-888.
- 67) **Christiansson A.**, Naidu A., Nilsson S.I., Waldstrom T., Petterson H.E. (1989). Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2595–2600.
- 68) **Chung Y.-C.** & Chen C.-Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology* 99, 2806-2814.
- 69) **Chung Y.-C.**, Wang H.-J., Chen Y.-M., Li S.-L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology* 88, 179-184.
- 70) **Chung Y.-C.**, Su Y.-P., Chen C.-C., JIA G., Wang H.-I., Wu G. J.C., Lin J.-G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica* 25, 932-936.
- 71) **Claire B.**, Smith J.P., El-Khoury W., Cayoutte B., Ngadi M., Blanchfield B., Austin J.W. (2004). Challenge studies with *Listeria monocytogenes* and proteolytic *Clostridium botulinum* in hard-boiled eggs packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology* 21, 131-141.
- 72) **Cole M.**, Jones M., Holyoak C. (1990). The effect of pH, salt concentration & temperature on the survival & growth of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Applied Microbiology*, 69, 63-72.
- 73) **Coma V.**, Martial-Gros A., Garreau S., Copinet A., Salin F., Deschamps A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science* 67, 1162-1169.

- 74) **Coroller** L., Leguerinel I., Mafart P. (2001). Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 317-322.
- 75) **Cowan**, A. E., Olivastro E.M., Koppel D.E., Loshon C. A., Setlow B., Setlow P. (2004). Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7733-7738.
- 76) **Cox**, J. (1999). *Salmonella*/Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1928-1937.
- 77) **Cronin** U.P., Wilkinson M.G. (2009). The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature. *Food Control* 20, 822-828.
- 78) **Daniel**, J. A., Krishnamurth, R., & Rizvi, S. S. H. (1985). A review of effects of CO₂ on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 48, 532-537.
- 79) **Darmadji**, P., Izumimoto, M. (1994). Effect of Chitosan in meat preservation. *Meat Science* 38, 243-254.
- 80) **Datta** E.R., Wentz B.A. (1989). Identification and enumeration of virulent *Listeria* strains. *International Journal of Food Microbiology* 8, 259-264.
- 81) **Datta** R., Anantheswaran C. (2001). Handbook of microwave technology for food applications (pp. 205). CRC press, New York.
- 82) **Datta** R.A. (2004) *Listeria monocytogenes*. In: International Handbook of Foodborne Pathogens, pp. 105. Milliotis M.D., Bier J.W. (eds.). Marcel Dekker 2003, Switzerland.
- 83) **De Almeida** J.C., Perassolo M.S., Camargo J.L., Brangolo N., Gross J.L. (2006). Fatty acid composition and cholesterol content of beef and chicken meat in southern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 42, 109-117.
- 84) **De Oliveira Mima** E. G., Pavarina A.C., Neppelenbroek K.H., Vergani C.E., Spolidorio D.M., Machado A.L. (2008). Effect of exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *Journal of Prosthodontics* 17, 312-317.
- 85) **Del Nobile** M.A., Cammariello D., Conte A., Attanasio M. (2009). A combination of chitosan, coating and modified atmosphere for prolonging Fior di Latte cheese shelf life. *Carbohydrate Polymers* 78, 151-156.
- 86) **Den Besten** H.M.W., Garcia D., Moezelaar R., Zwietering M.H., Abee T. (2010). Direct-Imaging-Based quantification of *Bacillus cereus* ATCC 14579 population heterogeneity at a low incubation temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 927-930.
- 87) **Devlieghere** F., Geeraerd A.H., Versyck K.J., Vandewaetere B., Van Impe J., Debevere J. (2001). Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology* 18, 53-66.
- 88) **Devlieghere** F., Vermeiren L., Debevere J. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* 14, 273-285

- 89) **Devlieghere** F., Vermeulen A., Debevere J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology* 21, 703-714.
- 90) **Dixon** N. M., and Kell D. B. (1989). The Inhibition by CO₂ of the Growth and Metabolism of Microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, 109-136.
- 91) **Dorman** H.J.D., and Deans S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308-316.
- 92) **Doyle** M.E. (2007). Microbial Food Spoilage-Losses and Control Strategies. Food Research Institute (FRI), University of Wisconsin-Madison, WI 53706.
- 93) **Dransfield** E., and Sosnicki A.A. (1999). Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry Science* 78, 743–746.
- 94) **Drosinos** E.H., Tassou C., Kakiomenou K., Nychas G.-J.E. (2000). Microbiological, physico-chemical and organoleptic attributes of a country tomato salad and fate of *Salmonella enteritidis* during storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions at 4°C and 10°C. *Food Control* 11, 131-135.
- 95) **Du** M., Hurand S.J., Ahn D.U. (2002). Raw meat packaging and storage affect the colour and odour of irradiated breast fillets. *Meat Science* 61, 49-54.
- 96) **Duan** J., Jiang Y., Cherian G., Zhao Y. (2010). Effect of chitosan-Krill oil coating and modified atmosphere packaging on the storability of cold stored lingcod (*Ophiodon elongates*) fillets. *Food Chemistry* 122, 1035-1042.
- 97) **Dufrenne** J., Soentoro P., Tatini S., Day T., Notermans S. (1994). Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 23, 99-109.
- 98) **Dunkley** K.D., Callaway T.R., Chalova V.I., Anderson R.C., Kunderling M.M., Dunkley C.S., Nisber D.J., Rieke S.C. (2008). Growth and genetic responses of *Salmonella typhimurium* to pH-shifts in an anaerobic conditions culture. *Food microbiology* 14, 35-42.
- 99) **Durango** A.M, Soares N.F.F, Andrade N.J (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control* 17, 336–341.
- 100) **Dutta**, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173–1182.
- 101) **Dykes** G.A., Moorhead S.M., Roberts S.L. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on chill-stored vacuum or carbon dioxide packaged primal beef cuts. *International Journal of Food Microbiology* 64, 401-405.
- 102) **Elliot** P.H, Tomlins R.I., Gray R.J.H. (1985). Control of microbial spoilage on fresh poultry using a combination potassium sorbate/carbon dioxide packaging system. *Journal of Food Science* 50, 1360-1363.

- 103) **Ellis M.**, Cooksey K., Dawson P., Han J., Vergano P. (2006). Quality of Fresh Chicken Breasts Using a Combination of Modified Atmosphere Packaging and Chlorine Dioxide Sachets. *Journal of Food Protection* 69, 1991-1996.
- 104) **Enfors S.O.** (2008). Food Microbiology. Department of Bioprocess Technology/KTH School of Biotechnology. Stockholm 2008.
- 105) **Errington, J.** (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 1, 117-126.
- 106) **Fain Jr A.R.**, Line J.E., Moran A.B., Martin L.M., Lechowich R.V., Casorella J.M., Brown W.L. (1991). Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value and z-value determinations in ground beef and turkey. *Journal of Food Protection* 54, 756-761.
- 107) **Fan W.**, sun J., Chen Y., Qiu J., Zhang Y., Chi Y. (2009). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of silver carp during frozen storage. *Food Chemistry* 115, 66-70
- 108) **Farag, R.S.**, Daw, Z.Y., Hewedi, F.M., El-Baroti, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection* 52, 665-667.
- 109) **Farber J.M.**, (1991). Microbiological aspects of modified atmosphere packaging-A review. *Journal of Food Protection* 54, 58-70.
- 110) **Farber J.M.**, and Peterkin P.I. (1991). *Microbiology Reviews* 55, 476-511
- 111) **Farkas, J.** (1998). Irradiation as a method for decontaminating food. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 189–204.
- 112) **Farrag S.A.**, Martin E.H. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* at 7 or 13 °C in skim milk. *Journal of Food Protection* 52, 825-855.
- 113) **Fasseas M.K.**, Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M., Zervas G. (2007). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* 106, 1188–1194
- 114) **FDA (Food Safety and Applied Nutrition at the U.S. Food and Drug Administration)**, 2008. Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Fresh-cut Fruits and Vegetables.
<http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/produceandplantproducts>
- 115) **Fellenberg M.A.**, and Speisky H. (2006). Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. *World's Poultry Science Journal* 62, 53-70.
- 116) **Fernandes J.C.**, Eaton P., Gomes A.M., Pintado M.E., Malcata F.X. (2009). Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy* 109, 854-860.

- 117) **Fernandes** J.C., Tavaría F.K., Soares J.C., Ramos O.S., Monteiro M.J., Pintado M.E., Malcata F.X. (2008). Antimicrobial effects of chitosan and chitooligosaccharide, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology* 25, 922-928.
- 118) **Fernandes** R. (2008). Microbiology handbook/Dairy products. Leatherhead Publishing, UK.
- 119) **Fernandez** A., Ocio M.J., Fernandez P.S., Martinez A (2001). Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 63, 257-264.
- 120) **Fernandez** J., Perez-Alvarez J., Fernandez-Lopez J.A. (1997). Thiobarbituric acid test for measuring lipid oxidation in meat. *Food Chemistry* 59, 345-353.
- 121) **Fernandez-Saiz** P., Soler C., Lagaron J.M., Ocio M.J. (2010). Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in laboratory media and in fish soup. *International Journal of Food Microbiology* 137, 287-294.
- 122) **Finlay** W.J.J., Logan N.A., Sutherland A.D. (2002). *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. *Food Microbiology* 19, 431-439.
- 123) **Fisher** K., Rowe C., Phillips C.A. (2007). The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro on food. *Letters in Applied Microbiology* 44, 495-499.
- 124) **Floristean** V., Cretu C., Carp-Carare M. (2007). Bacteriological characteristics of *Bacillus cereus* isolates from poultry. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca* 64, 425-430.
- 125) **FSAI (Food Safety Authority of Ireland)**, 2007. Resources and publications/factsheets. http://www.fsai.ie/resources_and_publications/factsheets.html.
- 126) **Francis** G.A., O' Beirne D. (1997). Effect of gas atmosphere, antimicrobial dip and temperature on the fate of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* on minimally processed lettuce. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 141-151.
- 127) **Francis** G.A., O' Beirne D. (1998). Effects of storage atmosphere on *Listeria monocytogenes* and competing microflora using a surface model system. *International Journal of Food Science and Technology* 33, 465-476.
- 128) **Francis** G.A., Thomas C., O' Beirne D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 1-22.
- 129) **Freedman**, D.J., Kondo K., Willrett D.L., 1989. Antagonism of foodborne bacteria by *Pseudomonas* spp.: a possible role for iron. *Journal of Food Protection* 52, 484-489.

- 130) **Fröder H.**, Geraldes Martins C., Oliveira de Souza K.L., Landgraf M., Franco B.D.G.M., Destro M.T. (2007). Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. *Journal of Food Protection* 70, 1277-1280.
- 131) **Galindo-Cuspinera V.**, Westhoff D.C., Rankin S.A. (2003). Antimicrobial properties of commercial annatto against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage organisms. *Journal of Food Protection* 66, 1074-1078.
- 132) **Garcia de Fernando G.D.**, Nychas G.J.E., Peck M.W., Ordonez J.A. (1995). Growth/survival of psychrotrophic pathogens under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 28, 221-231.
- 133) **Garriga M.**, Aymerich M.T., Costa S., Monfort J.M., Hugas M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology* 19, 509-518.
- 134) **Gedikli S.**, Tabak O., Tomsuk O., Cabuk A. (2008). Effect of microwave on some Gram negative and Gram positive bacteria. *Journal of Applied Biological Sciences* 2, 67-71.
- 135) **Genest P. C.**, Setlow B., Melly E., Setlow P. (2002). Killing of spores of *Bacillus subtilis* by peroxydinitrite appears to be caused by membrane damage. *Microbiology* 148, 307-314.
- 136) **Georgantelis D.**, Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science* 76, 172-181.
- 137) **Georgantelis D.**, Blekas G., Katikou P., Ambrosiadis I., Fletouris D. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science* 75, 256-264.
- 138) **Ghandi M.**, Chikindas M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, 1-15.
- 139) **Gill C.O.**, and DeLacy K.M. (1991). Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* on high-pH beef packed under vacuum or carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology* 13, 21-30.
- 140) **Gonzalez-Aguilar G.A.**, Ayala-Zavala J.F., Ruiz-Cruz S., Acedo-Felix E., Diaz-Cinco M.E. (2004). Effect of temperature and modified atmosphere packaging on overall quality of fresh-cut bell peppers. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37, 817-826
- 141) **Govaris A.**, Solomakos N., Pexara A., Chatzopoulou P.S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin, and their combinations against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 137, 175-180.
- 142) **Goy R.C.**, de Britto D., Assis O.B.G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros: Ciencia e Tecnologia* 19, 241-247.

- 143) **Grant** I.R., Nixon C.R., Patterson M.F. (1993). Effect of low-dose irradiation on growth of and toxin production by *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in roast beef and gravy. *International Journal of Food Microbiology* 18, 25-36.
- 144) **Granum** P.E. (1997). *Bacillus cereus*. In: Doyle, M.P., Beuchat L.R., Montville T.J. (eds.). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology, Washington pp. 327-336.
- 145) **Griffin** S.G., Wyllie S.G., Markham J.L., Leach D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 14, 322–332.
- 146) **Griffiths** M.W., and Phillips J.D. (1990). Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp found in raw and pasteurized milk. *Journal of the Society of Dairy Technology* 43 (3), 62-66.
- 147) **Guillen-Sans** R., and Guzmán-Chozas M. (1998). The Thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 315-330.
- 148) **Gunasekaran** N., Mallikarjunan P., Eifert J., Summer S. (2005). Effect of fat content and temperature on dielectric properties of ground beef. *Transactions of ASAE*(48/2), 673-680.
- 149) **Gündüz** G.T., Gönül A.S., Karapinar M. (2010). Efficacy of sumac and oregano in the inactivation of *Salmonella* Typhimurium on tomatoes. *International Journal of Food Microbiology* 141, 39–44.
- 150) **Gutierrez** J., Bourke P., Lonchamp J., Barry-Ryan C. (2009). Impact of plant essential oils on microbiological, organoleptic and quality markers of minimally processed vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 195-202
- 151) **Guzel-Seydim** Z.B., Greene A.K., Seydim A.C. (2004). Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37, 453-460.
- 152) **Hao** Y.Y., Brackett R.E., Doyle M.P. (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology* 15, 367-378.
- 153) **Harrison** M.A., Carpenter S.L. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* on microwave cooked poultry. *Food Microbiology* 6, 153-157.
- 154) **Hawley** L., Dunn D.J., Ruebush M. (2004). Microbiology & Immunology, Kaplan Medical Inc., USA.
- 155) **Hayouni** El Akrem, Chraief I., Abedrabba M., Bouix M., Leveau J.Y., Mohammed H., Hamdi M. (2008). Tunisian *Salvia officinalis* and *Schinus molle* essential oils: Their chemical composition and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology* 125, 242-251.

- 156) **Heddleson** R.A., Doores S., Ramaswamy R., Anantheswaran (1994). Parameters affecting destruction of *Salmonella* spp. by microwave heating. *Journal of Food Science* 59, 447-451.
- 157) **Helander** I.M., Nurmiaho-Lassila E.L., Ahvenainen R., Rhoades J., Roller S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 71, 235-244.
- 158) **Heremans**, K. (2001). The effects of pressure on biomaterials. In M. E. G.Hendrickx & D. Knorr (Eds.), *Ultra high pressure treatments of foods* (pp. 23–51). New York: Academic/Plenum Publishers.Hite, B. H.
- 159) **Ho** H.T.K., Lipman L.J.A., Gaastra W. (2006). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology* 115, 1–13.
- 160) **Holley** R.A., Patel D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food microbiology* 22, 273-292.
- 161) **Hollywood** N.W., Varabioff Y., Mitchell G.E. (1991). The effect of microwave and conventional cooking on the temperature profiles and microbial flora of minced beef. *International Journal of Food Microbiology* 14, 67-76.
- 162) **Hosseini** M.H., Razavi S.H., Mousavi S.M.A., Shahidi S.A., Hasansaraei A.G. (2008). Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences* 8, 2895-29000.
- 163) **Hotchkiss**, J.H. (1989). Microbiological Hazards of Controlled/Modified Atmosphere Food Packaging. *Journal Association of Food Drugs*, 53, 41-49.
- 164) **Huang** L., Sites J. (2007). Automatic control of a microwave heating process for in-package pasteurization of beef frankfurters. *Journal of Food Engineering* 80, 226-233.
- 165) **Hugas** M., Garriga M., Monfort J.M., Ylla (1991). Bacteriocina activa contra *Listeria monocytogenes* obtenida a partir de una cepa de *Enterococcus faecium*, Spanish Patent ES 2.068.157.
- 166) **Huhtanen** C.N., Naghski J., Custer C.S., Russel R.W.1976. Growth and toxin production by *Cl. botulinum* in mouldy tomato juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 711-715.
- 167) **ICMSF** (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1996. *Salmonella*. In *Microorganisms in Foods 5 Microbiological Specifications of Food Pathogens*, pp 217-264. Blackie Academic and professional, London.
- 168) **IFST** (Institute of Food Science and Technolog), 1999. *Development and use of microbiological criteria for foods*. London, ISBN 0 905367 16 2.
- 169) **Inatsu** Y., Bari M.L., Kawasaki S., Kawamoto S. (2005). Effectiveness of some natural antimicrobial compounds in controlling pathogen or spoilage bacteria in lightly fermented Chinese cabbage. *Journal of Food Science* 70, 393-397.

- 170) **Ingham** S.C., Escude J.M., McCown P. (1990). Comparative growth rates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked chicken loaf stored under air and two modified atmospheres. *Journal of Food Protection* 53, 289-291.
- 171) **Insausti** K., Beriain M.J., Purroy A., Alberti P., Gorraiz C., Alzueta M.J. (2001). Shelf life of beef from local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere. *Meat Science* 57, 273-281.
- 172) **Jacxsens** L., Devlieghere F., Debevere J. (2002). Temperature dependence of shelf-life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh produce. *Postharvest Biology and Technology* 26, 59-73.
- 173) **Jacxsens** L., Devlieghere F., Ragaert P., Vanneste E., Debevere J. (2003). Relation between microbiological quality, metabolite production and sensory quality of equilibrium modified atmosphere packaged fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology* 83, 263-280.
- 174) **James** S.J., and James C. (2004). Heat processing methods. *Encyclopedia of Meat Sciences* 599-606.
- 175) **Jamshidi** A., Ghasemi A., Mohammadi A. (2009). The effect of short-time microwave exposures on *Salmonella typhimurium* inoculated onto chicken drumettes. *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, 10, (No 4, Ser No 29), 378-382.
- 176) **Jaquette** C.B., Beuchat L.R. (1998). Survival and growth of psychrotrophic *Bacillus cereus* in dry and reconstituted infant rice cereal. *Journal of food protection* 61, 1629-1635.
- 177) **Jaquette**, C.B., Beuchat, L.R. (1998). Combined effects of pH, nisin, and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 61, 563-570.
- 178) **Jay** J.M. (1986). Microbial spoilage indicators and metabolites. In: Pierson M.D., Stern A. (Eds.), *Foodborne microorganisms and their toxins. Developing methodology*. Marcel Dekker Inc., Basel, pp. 213-240.
- 179) **Jay** J.M. (1997). Do background microorganisms play a role in the safety of fresh foods? *Trends in Food Science and Technology*, 8, 421-424.
- 180) **Jay** S., Grau F.H., Smith K., Lighfoot D., Murray C., Davey G.R. (1997). *Salmonella* pp 169-232 In: *Foodborne microorganisms of public health importance*, 5th edition. AIFST (NSW Branch), Sydney, Australia.
- 181) **Jay**, J. M., Loessner, M.J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). New York: Springer.
- 182) **Jeihanipour** A., Karimi K., Taherzadeh M.T. (2007). Antimicrobial properties of fungal chitosan. *Journal of Biological Sciences* 2, 239-243.

- 183) **Jimenez** S.M., Tiburzi, M.C., Salsi, M.S., Moguelevsky, M.A., Pirovani, M.E. (2009). Survival of *Salmonella* on refrigerated chicken carcasses and subsequent transfer to cutting board. *Letters in Applied Microbiology* 48(6), 687-691.
- 184) **Jo** C., Lee J.W., Lee K.H., Byun M.W. (2001). Quality properties of pork sausages prepared with water-soluble chitosan oligomer. *Meat Science* 59, 369-375.
- 185) **Juneja** V.K., Eblen B.S., Marks H.M. (2000). Thermal inactivation of microorganisms. In: Juneja V.K., Sofos J.N., (Eds). Control of food-borne Microorganisms, first ed. Marcel Dekker, New York, pp. 13-52.
- 186) **Juneja** V.K., Marmer B.S. (1999). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D- and z-value determinations in turkey, lamb and pork. *Food Research International* 32, 23-28.
- 187) **Juneja** V.K., Valenzuela Melendres M., Huang L., Gumudavelli V., Subbiah J., Thippareddi H. (2007). Modelling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiology* 24, 328-335.
- 188) **Juven** B.J., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active components. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 626-631.
- 189) **Jydegaard-Axelsen** A.-M., Høiby P.E., Holmstrøm K., Russel N., Knøchel S. (2004). CO₂- and anaerobiosis-induced changes in physiology and gene expression of different *Listeria monocytogenes* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4111–4117.
- 190) **Kakiomenou** K., Tassou C., Nychas G.-J. (1996). Microbiological, physicochemical and organoleptic changes of shredded carrots stored under modified storage. *Journal of food Science and Technology* 31, 359-366.
- 191) **Kakiomenou** K., Tassou C., Nychas G.-J.E (1998). Survival of *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on salad vegetables. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 383-387.
- 192) **Kalchayanand**, N., Sikes, T., Dunne, C. P., & Ray, B. (1998). Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. *Journal of Food Protection*, 61, 425–431.
- 193) **Kanatt** S.R., Chander R., Sharma A. (2005). Effect of radiation processing on the quality of chilled meat products. *Meat Science* 69, 269-275.
- 194) **Kanatt** S.R., Chander R., Sharma A. (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry* 107, 845-852.
- 195) **Kang**, J. S., & Lee, D. S. (1997). Susceptibility of minimally processed green pepper and cucumber to chilling injury by apparent respiration rate. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 421–426.

- 196) **Katz** M.A., Dugan L.R., Dawson L.E. (1966). Fatty acids in neutral lipids and phospholipids from chicken tissues. *Journal of Food Science* 31, 717.
- 197) **Kayisoglou**, S., Yilmaz, I., Demirci, M., Yetim, H. (2003). Chemical composition and microbiological quality of the doner kebabs sold in Terkidag market. *Food Control* 14, 469-474.
- 198) **Keokamnerd** T., Acton J. C., Han I.Y., Dawson P. L (2008). Effect of Commercial Rosemary Oleoresin Preparations on Ground Chicken Thigh Meat Quality Packaged in a High-Oxygen Atmosphere. *Poultry Science* 87, 170-179.
- 199) **Kim** C.R., Marshall D.L. (1999). Microbiological, colour and sensory changes of refrigerated chicken legs treated with selected phosphates. *Food Research International* 32, 209-215.
- 200) **Kim** H. S., Sherman D., Johnson F., Aronson A. I. (2004). Characterization of a major *Bacillus anthracis* spore coat protein and its role in spore inactivation. *Journal of Bacteriology* 186, 2413-2417.
- 201) **Kim** J., Song K.B. (2004). Effect of Vacuum Packaging on the microbiological profile of chilled chicken during storage. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 47, 35-37.
- 202) **Kim** J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston J.F., Wei C.I. (1995). Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science* 90, 1364-1368.
- 203) **Kim** K.W., Daeschel M., Zhao Y. (2008). Edible coatings for enhancing microbial safety and extending shelf life of hard-boiled eggs. *Journal of Food Science* 73, 227-235.
- 204) **Koutsoumanis** K., Lambropoulou K., Nychas G.-J.E. (1999). A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology* 49, 63-74.
- 205) **Kroll** J. and Rawel H.M. (2001). Reactions of Plant Phenols with Myoglobin: Influence of Chemical Structure of the Phenolic Compounds. *Journal of Food Science* 66, 48-58.
- 206) **Kykkidou** S., Giatrakou V., Papavergou A., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. *Food chemistry* 115, 169-175.
- 207) **Labadie** J., 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science* 52, 299-305.
- 208) **Lambert** R.J.W, Skandamis P.N., Coote P.J., Nychas G.J.E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453-462

- 209) **Lanari** M.C., Schaefer D.M., Scheller K.K. (1995). Dietary Vitamin E supplementation and discolouration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. *Meat Science* 41, 237-250.
- 210) **Langston** S.W., Altman N.S., Hotchkiss J.H. (1993). Within and between sample comparisons of Gormpetz parameters for *Salmonella enteritidis* and aerobic plate counts in chicken stored in air and modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology* 18, 43-52.
- 211) **Lee** B.H., Kermasha S., Baker B.E. (1989). Thermal, ultrasonic and ultraviolet inactivation of *Salmonella* in thin films of aqueous media and chocolate. *Food Microbiology* 6, 143-152.
- 212) **Lee** T.G., Williams S.K., Sloan D., Littell R. (1997). Development and evaluation of a chicken breakfast sausage manufactured with mechanically deboned chicken meat. *Poultry Science* 76, 415-421.
- 213) **Leistner** L., 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.
- 214) **Lianou** A., Geornaras I., Kendall P.A., Belk K.E., Scanga J.A., Smith G.C., Sofos J.N. (2007). Fate of *Listeria monocytogenes* in commercial ham, formulated with or without antimicrobials, under conditions stimulating contamination in the processing or retail environment and during home storage. *Journal of Food Protection* 70, 378-385.
- 215) **Liao** C-H. (2009). Control of foodborne pathogens and soft-rot bacteria on bell pepper by three strains of bacterial antagonists. *Journal of Food Protection* 72, 85-92.
- 216) **Liao**, C-H. and Fett W.T., 2001. Analysis of native microflora and selection of strains antagonistic to human pathogens on fresh produce. *Journal of Food Protection*, 64, 1110-1115.
- 217) **Lilyblade** A.L., and Peterson D.W. (1962). Inositol and free sugars in chicken muscle post-mortem. *Journal of Food Science* 27, 245.
- 218) **Limbo** S., Torri L., Sinelli N., Franzetti L., Casiraghi E. (2010). Evaluation and predictive modelling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science* 84, 129-136.
- 219) **Lin** K.W. and Chao J.Y. (2001). Quality characteristics of reduced-fat Chinese-style sausage as related to chitosan's molecular weight. *Meat Science* 59, 343-351.
- 220) **Lin** M., Al-Holy M., Mousavi-Hesary M., Al-Qadivi H., Cavinato A.G., Rasco B.A. (2004). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage in chicken meat by diffuse reflectance spectroscopy (60-1100 nm). *Letters in Applied Microbiology* 39, 148-155.
- 221) **Litman** S. (2000). Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project. *International Journal of Food Microbiology* 60, 117-135.

- 222) **Little C.L.**, Knochel S. (1994). Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* in Brie stored at 4, 8, and 20 °C. *International Journal of Food Microbiology* 24, 137-145.
- 223) **Liu X.F.**, Guan Y.L., Yang D.Z., Li Z., Yao K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 79, 1324-1335.
- 224) **Liu, S.**, Graham, J.E., Bigelow, L., Morse, P.D., Wilkinson, B.J., (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1697–1705.
- 225) **Lofgren P.A.** (2005). Meat poultry and meat products. *Encyclopedia of Human Nutrition*, pp. 230-237
- 226) **Lopez-Caballero M.E.**, Gomez-Guillen M.C., Perez-Mateos M., Montero P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids* 19, 303-311.
- 227) **Lund B.M.**, Baird-Parker C., Gould G.W. (2000). The microbial safety and quality of food. Aspen publishers Inc, USA.
- 228) **Lungu B.**, Ricke S.C., Johnson M.G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe (Food Microbiology)*, 15, 7-17.
- 229) **Lyver A.**, Smith J.P., Tarte I., Farber J.M., Natress F.M. (1998). Challenge studies with *Listeria monocytogenes* in a value-added seafood product stored under modified atmospheres. *Food Microbiology* 15, 379-389.
- 230) **MacDougall D. B.** (1982). Changes in the color and opacity of meat. *Food Chemistry* 9, 75-88.
- 231) **Mackey B.M.**, and Kerridge A.L., (1988). The effect of incubation temperature and inoculum size on growth of salmonellae in minced beef. *International Journal of Food Microbiology* 6, 57-65.
- 232) **Mahakarnchanakul W.**, and Beuchat L.R. (1999). Influence of temperature shifts on survival, growth, and toxin production by psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* in potatoes and chicken gravy. *International Journal of Food Microbiology* 47, 179-187.
- 233) **Mahmoud B.S.**, Yamazaki K., Miyashita K., Shin S., Suzuki T. (2006). A new technology for fish preservation by combined treatment with electrolysed NaCl solutions and essential oil compounds. *Food chemistry* 99, 656-662.
- 234) **Mancini R.A.**, and Hunt (2005). Current research in meat colour. *Meat Science* 71, 100-121.
- 235) **Maragkoudakis P.A.**, Mountzouris K.C., Psyrras D., Cremonese S., Fischer J., Cantor M. D., Tsakalidou E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and

- application on raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 219-226.
- 236) **Marques A.**, Encarnacao S., Pedro S., Nunes M.L. (2008). In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24, 2357-2360.
- 237) **Marshall D.L.**, Andrews L.S., Wells J.H., Farr A.J. (1992). Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken. *Food Microbiology* 9, 303-309.
- 238) **Marshall D.L.**, Schmidt R.H. (1988). Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 °C in milk pre-incubated with selected Pseudomonads. *Journal of Food Protection* 51, 277-282.
- 239) **Marshall D.L.**, Schmidt R.H. (1991). Physiological evaluation of stimulated growth of *Listeria monocytogenes* by *Pseudomonas* species in milk. *Canadian Journal of Microbiology*. 37, 594-599.
- 240) **Marug J.**, Ledebor A.M., Vandenberg P.A., Henderson J.T. (1991). Cloned gene encoding for bacteriocin from pediococcus acidilactici. European Patent EP0493779.
- 241) **Mastromatteo M.**, Lucera A., Sinigaglia M., Corbo M.R. (2009). Combined effects of thymol, carvacrol and temperature on the quality of non conventional poultry patties. *Meat Science* 83, 246-254.
- 242) **Mataragas M.**, Drosinos E.H., Siana P., Skandamis P., Metaxopoulos I. (2006). Determination of the growth limits and kinetic behaviour of *Listeria monocytogenes* in a sliced cooked cured meat product: validation of the predictive growth model under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Protection* 69, 1312-1321.
- 243) **Mathur N.K.**, Narang C.K (1990). Chitin and chitosan, versatile polyssacharides from marine animals. *Journal of Chemical Education* 67, 938-942.
- 244) **Maurer** (2003). Poultry/Chicken. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2003), p.p. 4680-4686.
- 245) **Mazas M.**, Gonzalez I., Lopez M., Gonzalez J., Martin-Sarmiento R. (1995). Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Science and Technology* 30, 71-78
- 246) **Mead G.C.** (2004). Meat quality and consumer requirements. In: G.C. Mead, Editor, *Poultry meat processing and quality*, pp. 1–20, Woodhead Publishing Limited, Cambridge,.
- 247) **Mead, P.S.**, Slutsker L., Detz V., McCaig L.F., Breese J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. (1999). Food related illnesses and dead in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.

- 248) **Mellefont** L.A., McMeekin T.A., Ross T. (2008). Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in co-culture. *International Journal of Food Microbiology* 121, 157-168.
- 249) **Melton** S.L. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology* 37, 105-11.
- 250) **Meng** J., Doyle M.P. (1998). Emerging and evolving foodborne pathogens. *Bulletin de l'Institut Paster* 96, 151-164.
- 251) **Mexis** S.F., Chouliara E., Kontominas M.G. (2009). Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 °C. *Food Microbiology* 26, 598-605.
- 252) **Millares** R., and Fellers C.R. (1948). Amino acid content of chicken. *Journal of the American Dietetic Association* 24, 1057.
- 253) **Mor-Mur** M., and Yuste J. (2010). Emerging bacterial pathogens in meta and poultry: An overview. *Food and Bioprocess Technology* 3, 24-35.
- 254) **Mountney** G.J. & Parkhurst C.R. (1995). Chemical and nutritive characteristics. In: Poultry products technology (3rd edition). Food Products Press, Haworth Press Inc., New York.
- 255) **Nalbantsoy** A., Akpolat O., Karaboz I., Deliloglu-Gurhan S.I. (2007). Production and kinetics of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in Vibrofermentor. *Biotechnology* 6, 593-596.
- 256) **Nantel** A.J. (1999). *Clostridium botulinum*. International programme on chemical safety poisons information monograph 858 Bacteria, World Health Organization.
- 257) **Nassar**, T. J., Al-Mashhadi, A. S., Fawal, A. K., & Shalhat, A. F. (1997). Decontamination of chicken carcasses artificially contaminated with *Salmonella*. *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics), 16, 891–897.
- 258) **Nauta** M.J., Litman S., Barker G.C., Carlin F. (2003). A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 83, 205-218.
- 259) **Neumeier**, K., Ross, T., Thompson, G. T. and McMeekin T.A. (1997). Validation of a predictive model describing the effects of temperature and water activity on the growth of psychotropic pseudomonads. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 55-63.
- 260) **Nguyen-the** C., and Carlin F., (1994). *The microbiology of minimally processed fresh fruit and vegetables*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34, 371-401.
- 261) **Nicholson**, W. L., Munakata N., Horneck G., Melosh H. J. , Setlow P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 548-572.

- 262) **Nissen** H., Alvseike O., Bredholt S., Holck A., Nesbakken T. (2000). Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *International Journal of Food Microbiology* 59, 211-220.
- 263) **No** H.K., Park N.Y., Lee S.H., Hwang H.J., Meyers S.P. (2002). Antibacterial Activities of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights on Spoilage Bacteria Isolated from Tofu. *Journal of Food Science* 67, 1511-1514.
- 264) **Noah** N. (2005). Food Safety/Bacterial Contamination. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 329-340.
- 265) **Nychas** G.-J. E., Skandamis P.N., Tassou C.C., Koutsoumanis K.P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78, 77–89
- 266) **Nychas** G.J.E. (1994). Modified Atmosphere Packaging of meats. In: R.P. Singh and F.A.R. Oliveira (editors) *Minimal Processing of Foods and Process Optimisation, An Interface*. CRC Press Inc., London, pp. 417-436.
- 267) **Nychas** G-J E. and Drosinos E.H. (1999). Meat and Poultry/Spoilage of meat. In: *Encyclopedia of Food Microbiology, 2004, pp. 1253-1260*, Academic Press.
- 268) **O’Sullivan** C.M., Lynch A.M., Lynch P.B., Buckley J., Kerry J.P. (2004). Use of Antioxidants in Chicken Nuggets Manufactured with and Without the Use of Salt and/or Sodium Tripolyphosphate: Effects on Product Quality and Shelf-life Stability. *International Journal of Poultry Science* 3, 345-353
- 269) **Oblinger** J.L., Kraft A.A. (1970). Inhibitory effects of *Pseudomonas* on selected *Salmonella* and bacteria from poultry. *Journal of Food Science* 35, 30-32.
- 270) **Ojagh** S.M., Rezaei M., razavi S.H., Hosseini S.M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* 120, 193-198.
- 271) **Oral** N., Vatanserver L., Sezer C., Aydm B., Guven A., Gulmez M., Baser K.H.C., Kurkcuglou M. (2009). Effect of absorbent pads containing oregano essential oil on the shelf life extension of overwrap packed chicken drumsticks stored at four degrees Celsius. *Poultry Science* 88, 1459-1465.
- 272) **Orsat** V., Raghavan V. (2005). Microwave technology for food processing: an overview in the microwave processing of foods. *Woodhead*.
- 273) **Oscar T.P.** (2007). Predictive models for growth of *Salmonella typhimurium* DT104 from low and high initial density on ground chicken with a natural microflora. *Food Microbiology* 24, 640-651.

- 274) **Ouattara B.**, Simard R.E., Piette G., Begin A., Holley R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology* 62, 139-148.
- 275) **Pal A.**, Labuza T.P., Diez-Gonzalez F. (2008a). Shelf-life evaluation for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth. *International Journal of Food Microbiology* 126, 49-56.
- 276) **Pal A.**, Labuza T.P., Diez-Gonzalez F. (2008b). Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. *Food Microbiology* 25, 460-470.
- 277) **Parish, M. L.**, Beuchat, I. R., Suslow, T.V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farbe, J. N., (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety* 2, 161-173.
- 278) **Paster N.**, Juven B.J., Shaaya E., Menasherov M., Nitzan R., Weisslowicz H., Ravid U. (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in applied Microbiology* 11, 33-37.
- 279) **Patsias A.**, Badeka A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2008). Combined effect of freeze chilling and MAP on quality parameters of raw chicken fillets. *Food Microbiology* 25, 575-581.
- 280) **Patsias A.**, Chouliara I., Badeka A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2006). Shelf life of a pre-cooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology* 23, 423-429.
- 281) **Pawar S.C.**, Sarate R.M., Ghosh J.S. (2011). Spoilage of chilled chicken meat and liver by psychrophilic lipase. *American Journal of Food Technology* 6, 166-172.
- 282) **Pearson A.M.** and Dutson T.R. (1994). Quality attributes and their measurement in meat poultry and fish products. In: *Advances in Meat Research Series 9*, Aspen Publishers.
- 283) **Peck M.W.**, Goodburn K.E, Betts R.R., Stringer S.C. (2008). Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short commercial foods designed to be stored chilled. *Trends in Food Science and Technology* 19, 207-216.
- 284) **Periago P.M.**, Palop A., Fernandez P. S. (2001). Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. *Food Science and Technology International* 7, 487-492.

- 285) **Peters** A.C., Thomus L., Wimpenny J.W.T. (1991). Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature. *FEMS Microbiology Letters* 77, 309-314.
- 286) **Pexara** E.S., Metaxopoulos J., Drosinos E.H. (2002). Evaluation of shelf life of cured, cooked, sliced turkey fillets and cooked pork sausages—‘piroski’—stored under vacuum and modified atmospheres at 4 °C and 10 °C. *Meat Science* 62, 33-43.
- 287) **Phillips**, C.A. (1996). Review: Modified Atmosphere Packaging and its effect on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology* 31, 463-479.
- 288) **Pin** C., and Baranyi J. (1998). Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 41, 59-72.
- 289) **Pirttijarvi** T.S., Andersson M.A., Scoging A.C., Salkinoja Salonen M.S. (1999). Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Systematic Applied Microbiology*, 22, 133-144.
- 290) **Pittard** B.T., Freeman L.R., Later D.W. (1982). Identification of volatile organic compounds produced by fluorescent pseudomonads on chicken breast muscle. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1504-1506.
- 291) **Pol** I.E., Mastwijk H.C., Slump R.A., Popa M.E., Smid E.J. (2001). Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combination of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *Journal of Food Protection* 64, 1012-1018.
- 292) **Ponce** A.G., Roura S.I., del Valle C.E., Moreira M.R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 294-300.
- 293) **Pranoto** Y., Rakshit S.K., Salokhe V.M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 38, 859-865.
- 294) **Prashanth** K.V.H., and Tharanathan R.N. (2007). Chitin/Chitosan: modifications and their unlimited application potential: An overview. *Trends in Food Science and Technology* 18, 117-131.
- 295) **Pucciarelli** A.B., Benassi F.O. (2005). Inactivation of *Salmonella enteritidis* on raw poultry using microwave heating. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48, 939-945.
- 296) **Raafat** D., barga K., haas A., Sahl H.-G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3764-3773

- 297) **Radin D.**, Niebuhr S.E., Dickson J.S (2006). Impact of population of spoilage microflora on the growth of *Listeria monocytogenes* on Frankfurters. *Journal of Food Protection* 69, 679-681.
- 298) **Ragaert P.**, Devlieghere F., Debevere J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 44, 185–194
- 299) **Rajkovic A.**, Uyttendaele M., Debevere J. (2007). Computer aided boar semen motility analysis for cereulide detection in different food matrices. *International Journal of Food Microbiology* 114, 92-99.
- 300) **Rajkovic A.**, Uyttendaele M., Courtens T., Debevere J. (2005). Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food Microbiology* 22, 189–197.
- 301) **Riesenman, P. J.**, and Nicholson W. L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 620-626.
- 302) **Ringle P.**, Vincent J.P., Catteau M. (1991). Evolution de *Listeria* dans les produits de gamme. In: Les microorganismes Contaminants dans les industries agroalimentaires. Colonisation, Detection, Maitrise (ed. C. Lahellec). Paris, Societe Francaise de Microbiologie, pp. 324-328.
- 303) **Rio E.**, Panizo-Moran M., Prieto M., Allosa-Calleja C., Capita R. (2007). Effect of various decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology* 115, 268-280.
- 304) **Rodriguez-Marval M.**, Geornaras I., Kendall P.A., Scanga J.A., Belk K.E., Sofos J.N. (2009). Microwave oven heating for inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters before consumption. *Journal of Food Science* 74, 453-460
- 305) **Roitt I.**, Brostoff J., Male D. (1995). Ανοσολογία. Επιστημονικές εκδόσεις. Παρισίανος, Αθήνα.
- 306) **Roller S.**, Covill N. (2000). The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. *Journal of Food Protection* 63, 212-209.
- 307) **Roller S.**, Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'Mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald G., Fogden M., Owen M., Fletcher H. (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science* 62, 165-177.
- 308) **Rössland E.**, Langsrud T., Sørhaug T. (2005). Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 103, 69-77.

- 309) **Rota C.**, Carraminana J.J., Burillo J., Herrera A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 67, 1252-1256.
- 310) **Sagoo, S.**, Board, R., Roller, S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food microbiology* 19, 175-182.
- 311) **Sahin O.**, Zhang Q., Meitzler J.C., Harr B.S., Morishita T.Y. (2001). Prevalence, antigenic specificity and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3951-3957.
- 312) **Sallam K.I.**, and Samejima K. (2004). Effects of trisodium phosphate and sodium chloride dipping on the microbial quality and shelf life of refrigerated tray-packaged chicken breasts. *Food Science and Biotechnology* 13(4), 425-429.
- 313) **Sallam K.I.** (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control* 18, 566-575.
- 314) **Sallam K.I.** Ishioroshi M., Samejima K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 37, 849-855.
- 315) **Sanchez-Gonzalez L.**, Gonzalez-Martinez C., Chiralt A., Chafer M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of Food Engineering* 98, 443–452
- 316) **Sarantopoulos C.I.G.L.**, Vercelino Alves R.M., Contreras C.J.C., Galvao M.T.E.L., Gomes T.C. (1998). Use of Modified Atmosphere Masterpack for extending the shelf life of chicken cuts. *Packaging Technology and Science* 11, 217-229.
- 317) **Sawaya W.N.**, Elnawawy a.S., Abu-Ruwaida A.S., Khalafawi S., Dashti B. (1995). Influence of modified atmosphere packaging on shelf-life of chicken carcasses under refrigerated storage conditions. *Journal of Food Safety* 15, 35-51.
- 318) **Sawyer C.A.**, Biglari S.D., Thompson S.S. (1984). Internal end temperature and survival of bacteria on meats with and without a polyvinylidene chloride wrap during microwave heating. *Journal of Food Science* 49, 972-974.
- 319) **Schmedes, A.**, and Hølmer G. (1989). A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation. *Journal of American Oil Chemistry Society* 66, 813-817
- 320) **Schmitt R.E.**, Gallo L., Schmidt-Lorenz W. (1988). Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. IV. Effect of slaughtering procedures on the microbial association of poultry carcasses. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 21, 235-238.
- 321) **Schnepf M.**, and Barbeau W.E. (1989). Survival of *Salmonella typhimurium* in roasting chickens cooked in a microwave, convention microwave and a conventional electric oven. *Journal of Food Safety* 9, 245-252.

- 322) **Selby** T.L., Berzins A., Gerrard D.E., Corvalan C.M., Grant A.L., Linton R.H. (2006). Microbial heat resistance of *Listeria monocytogenes* and the impact on ready-to-eat meat quality after post-package pasteurization. *Meat Science* 74, 425-434.
- 323) **Senter** S.D., Arnold J.W., Chew V. (2000). APC values and volatile compounds formed in commercially processed, raw chicken parts during storage at 4 and 13 °C and under simulated temperature abuse conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1559-1564.
- 324) **Seydim** A.C., Acton J.C., Hall M.A., Dawson P.L. (2006). Effects of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat. *Meat Science* 73, 203-510.
- 325) **Shahidi** F., and Wanasundara U. (1996). Methods for evaluation of oxidative stability of lipid-containing foods. *Food Science and Technology International* 2, 73-81.
- 326) **Shahidi** F., Arachchi L.K.V., Jeon Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* 10, 37-51.
- 327) **Shalaby**, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675–690.
- 328) **Shelef** L.A., Jyothi E.K., Bulgarelli M.A. (1984). Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *Journal of Food Science* 49, 737-740.
- 329) **Sikkema** J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1995). Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology Reviews* 59, 201-202.
- 330) **Silva** C.M.G. and Gloria M.B.A. (2002). Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 °C and in chicken-based meat products. *Food Chemistry* 78, 241–248
- 331) **Simpson** B.K., Gagne N., Ashie I.N.A., Noroozi E. (1997). Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus Borealis*). *Food Biotechnology* 11, 25-44.
- 332) **Skandamis** N.P. and Nychas G.-J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology* 79, 35-45.
- 333) **Skandamis** N.P., Tsigarida E., Nychas G.-J.E. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology* 19, 97-103.
- 334) **Smiddy** M., Papkovskaia D.B., Kerry J.P. (2002). Use of oxygen sensors for the non-destructive measurement of the oxygen content in modified atmosphere and vacuum packs of cooked chicken patties: impact of oxygen content on lipid oxidation. *Food research International* 35, 577-584.

- 335) **Smith** A.G. & Day B.P.F. (2003). Effect of Modified-Atmosphere Packaging on food quality. Chill foods/Effect of Modified-atmosphere Packaging on food quality. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 1157-1163.
- 336) **Smith-Palmer** A., Stewart J., Fyfe L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology* 26, 118-122.
- 337) **Smolander** M., Alakomi H.L., Ritvanen T., Vainionpaa J., Ahvenainen R. (2004). Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature conditions. A. Time–temperature indicators as quality-indicating tools. *Food Control* 15, 217-229.
- 338) **Soldatou** N., Nerantzaki A., Kontominas M.G., Savvaidis I.N. (2009). Physicochemical and microbiological changes of “Souvlaki” – A Greek delicacy lamb meat product: Evaluation of shelf-life using microbial, colour and lipid oxidation parameters. *Food Chemistry* 113, 36-42.
- 339) **Solomakos** N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology* 25, 120-127.
- 340) **Sosa Mejia** Z., Zwietering M.H., Beumer R., 2010. Risk evaluation and management to reaching a suggested FSO in a steam meal. *Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.fm.2010.08.012
- 341) **Soultos**, N., Tzikas, Z., Abraham, A., Georgantelis, D., Amvrosiadis, I. (2008). Chitosan effects on quality properties of Greek-style fresh pork sausages. *Meat Science* 80, 1150-1156.
- 342) **Soyutemiz** G.E., and Cetinkaya F. (2005). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in Inegol meatballs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29, 319-323.
- 343) **Stecchini** M.L., Sarais I., Giavedoni P. (1993). Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection* 56, 406-409.
- 344) **Stolle** A, and Schalch B. (1999). Heat treatment of foods/Action of microwaves. In: *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2004, pp. 1036-1041. Academic Press
- 345) **Suga** R., Ijuin T., Hashimoto O., Takatomi T., Watanabe S. (2007). Analytical study of uneven heating relaxation of food inside industrial microwave oven by means of water film. *Microwave and Optical Technology Letters* 49, 518-521.
- 346) **Szczawinska** M.E., Thayer D.W., Phillips J.G. (1991). Fate of unirradiated *Salmonella* in irradiated mechanically deboned chicken meat. *International Journal of Food Microbiology* 14, 313-324.

- 347) **Tassou** C.C., Drosinos E.H., Nychas G.-J.E. (1995). Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. *Journal of Food Protection* 59, 31-34.
- 348) **Tepe** B., Sokmen M., Akpulat A.H., daferera D., Polissiou M., Sokmen A. (2005). Antioxidant activity of the essential oil of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* and *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *rosulans*. *Journal of Food Engineering* 66, 447-454.
- 349) **Thomas** V.L. and Wimpenny J.W.T. (1996). Competition between *Salmonella* and *Pseudomonas* species growing in and on agar, as affected by pH, sodium chloride concentration and temperature. *International Journal of food Microbiology* 29, 361-370.
- 350) **Thorsen** L., Budde B.B., Koch A.G., Klinberg T.D. (2009). Effect of modified atmosphere and temperature abuse on the growth from spores and cereulide production of *Bacillus weihenstephanensis* in a cooked chilled meat sausage. *International Journal of Food Microbiology* 130, 172-178.
- 351) **Tienungoon** S., Ratkowsky A., McMeekin T.A., Ross T. (2000). Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. *Applied Environmental Microbiology* 66, 4979-4987.
- 352) **Tripathi** S., Mehrotra G.K., Tripathi C.K.M., Banerjee B., Joshi A.K., Dutta P.K. (2008). Chitosan based bioactive film: Functional properties towards biotechnological needs. *Asian Chitin Journal* 4, 29-36.
- 353) **Tsai** G.-J., Tsai M.-T., lee J.-M., Zhong M.-Z. (2006). Effects of chitosan and a low-molecular-weight chitosan on *Bacillus cereus* and application in the preservation of cooked rice. *Journal of Food Protection* 69, 2168-2175.
- 354) **Tsigarida** E., Skandamis P., G.-J.E. Nychas (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology* 89, 901-909.
- 355) **Turgis** M., Han J., Borsa J., Lacroix M. (2008). Combined Effect of Natural Essential Oils, Modified Atmosphere Packaging, and Gamma Radiation on the Microbial Growth on Ground Beef. *Journal of Food Protection* 71, 1237-1243.
- 356) **Ultee** A., and Smid E.J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology* 64, 373-378.
- 357) **Ultee** A., Bennik M.H.J., Moezelaar R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1561-1568.

- 358) **USDA** (United States Department of Agriculture) (1997). Code of Federal Regulations, Title 9, Part 381.66—poultry products; temperatures and chilling and freezing procedures. Office of the Federal Register National Archives and Records Administration, Washington, DC.
- 359) **USDA** (United States Department of Agriculture), (2009). Pathogens and Contaminants: *Salmonella*. http://fsrio.nal.usda.gov/document_fsheet.php?product_id=223
- 360) **Uyttendaele M.**, Neyts K., Vanderswalmen H., Notebaert E., Debevere J. (2004). Control of *Aeromonas* on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water or thyme oil solution. *International Journal of food Microbiology* 90, 263-271
- 361) **Vaara M.** (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56, 395-411.
- 362) **Valero M.**, Hernandez Herrero L.A., Fernandez P.S., Salmeron M.C. (2002). Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiology*, 19 (5), 491-499.
- 363) **Van Netten P.**, van de Moosdijk A., van Hoensen P. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 73-79.
- 364) **Vargas M.**, Albors A., Chiralt A., Gonzalez M.C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Post-harvest Biology and Technology* 41, 164–171.
- 365) **Vishu Kumar A.B.**, Varadaraj M.C., Gowda L.G., Tharanathan R.N. (2007). Low molecular weight chitosan-Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1770, 495–505
- 366) **Viuda-Martos M.**, Navajas R.Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.A. (2010). Effect of added citrus fibre and spice essential oils on quality characteristics and shelf-life of mortadella. *Meat Science* 85, 568-576.
- 367) **Walker S.J.**, Archer P., Banks J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Applied Bacteriology* 68, 157-162.
- 368) **Wan J.**, Wilcock A., Coventry M.J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 152-158.
- 369) **Wang X.**, Du Y., Fan L., Liu H., Hu Y (2005). Chitosan-metal complexes as antimicrobial agents: Synthesis, characterization, and structure-activity studies. *Polymer Bulletin* 55, 105-113.

- 370) **Ward** S.M., Delaquis P.J., Holley R.A., Mazza G. (1998). Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria on agar and pre-cooked roasted beef by volatile horseradish distillates, *Food Rerearsch International* 31, 19–26.
- 371) **Warke** R., Kamat A., Kamat M., Thomas P. (2000). Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, India. *Food Control* 11, 77-83.
- 372) **Wei** H., Wolf G., Hammes W.P. (2006). Indigenous microorganisms from iceberg lettuce with adherence and antagonistic potential to use as protective culture. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7, 294-301.
- 373) **Weissinger** W.R, Chantarapanont W., Beuchat L.R. (2000). Survival and growth of *Salmonella baidon* in shredded lettuce and diced tomatoes, and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. *International Journal of Food Microbiology* 62, 123–131
- 374) **WHO** (World Health Organization) 1999-2000. WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe 8th Report 1999-2000 Country Reports: Greece
- 375) **WHO** (World Health Organization) 2010a. *Listeria* infections www.who.int/topics/listeria_infections/en/
- 376) **WHO** (World Health Organization), 2010b. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Fact sheet No 125. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>
- 377) **Whyte** R., and Wong T.L. (2004). Microbiological safety of meat/*Bacillus cereus*. ESR Ltd, Christchurch, New Zealand, 2004 Elsevier Ltd.
- 378) **Wijnands** L.M., Dufrenne J.B., van Leusden F.M., Abee T. (2007). Germination of *Bacillus cereus* spores is induced by germinants from differentiated Caco-2 cells, a human cell line mimicking the epithelial cells of the small intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.02390-06
- 379) **Wijnands** LM, Dufrenne J.B., van Leusden F.M. (2005). *Bacillus cereus*: characteristics, behaviour in the gastrointestinal tract, and interaction with CaCo-2 cells. RIVM report 250912003/2005.
- 380) **Wimpfheimer** L., Altman N.S., Hotchkiss J.H. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A, serotype 4 and competitive spoilage microorganisms in raw chicken packaged under modified atmospheres and in air. *International Journal of Food Microbiology* 11, 205-214.
- 381) **Woo** I.S, Rhee I.K., Park H.D. (2000). Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Applied and Enviromental Microbiology* 66, 2243-2247.
- 382) **Wu** C-M, and Liou S-E. (1986). Effect of Tissue Disruption on Volatile Constituents of Bell Peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34, 770-772.

- 383) **Yanishlieva** N.V., Marinova E.M., Gordon M.H., Raneva V.G. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry* 64, 59-66.
- 384) **Ye** M., Neetoo H., Chen H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology* 25, 260-268
- 385) **Yen** M.T., Yang J.H., Mau J.L. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 74, 840-844.
- 386) **Yilmaz** I., Arici M., Gumus T. (2005). Changes of microbiological quality in meatballs after heat treatment. *European Food Research and Technology* 221, 281-283.
- 387) **Yingyuad** B.S., Ruamsin S., Reekprkhon D., Douglas S., Pongamphai S., Siripatrawan U. (2006). Effect of chitosan coating and Vacuum Packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science* 19, 149-157.
- 388) **Youn** S.K., Park S.M., Kim Y.J., Ahn D.H. (1999). Effect on storage property and quality in meat sausage by added chitosan. *Journal of Chitin and Chitosan* 4, 189-195.
- 389) **Yuste** J., Mor-Mur M., Capellas M., Guamis B., Pla R. (1998). Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. *Food Microbiology* 15, 407-414.
- 390) **Zeitoun** A.A.M. and Debevere J.M. (1991). Inhibition, survival and growth of *Listeria monocytogenes* on poultry as influenced by buffered lactic acid treatment and modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology* 14, 1616-170.
- 391) **Zhai** M., Zhao L., Yoshii F., Kume T. (2004). Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation. *Carbohydrate Polymers* 57, 83-88.
- 392) **Zhang**, H., Kong, B., Xiong, Y.L., Sun, X. (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science* 81, 686-692.
- 393) **Zhuang** R.Y., Beuchat L.R., Angulo F.J. (1995). Fate of *Salmonella* Montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2127-2131.
- 394) **Zimmermann** M. & Schieberle P. (2000). Important odorants of sweet bell pepper powder (*Capsicum annum* cr. *anuum*): differences between samples of Hungarian and Moroccan origin. *European Food Research and Technology* 211, 175-180.
- 395) **Zinoviadou** K.G., Koutsoumanis K.P., Billiaderis C.G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science* 82, 338-345.

- 396) **Zivanovic S.**, Chi S., Draughon A.A.E. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science* 70, 45-51.
- 397) **Zwietering M.H.**, Wit J.C., Notermans S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΕΛΛΗΝΙΚΗ)

- 398) **Αρσένη Α.** (1994). Κλινική Μικροβιολογία και Εργαστηριακή Διάγνωση Λοιμώξεων. Τόμος 1, 4^η έκδοση ΖΗΤΑ ιατρικές εκδόσεις.
- 399) **Βουδούρης Ε.Κ.**, Κοντομηνάς Μ.Γ. (2002). Εισαγωγή στην Χημεία Τροφίμων. ΟΕΔΒ, Αθήνα, έκδοση 2002.
- 400) **Γεωργάκης Σ.Α.**, Βραζέλης Κ.Π., Αμβροσιάδης Ι.Α., (2002). Τεχνολογία Τροφίμων ζωϊκής Προέλευσης. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη 2002.
- 401) **Μπεζιρτζόγλου Ε.** (2005). Γενική Μικροβιολογία. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισίανου, Αθήνα.
- 402) **Παπαβέργου Α.**, Τσιμίδου Μ., Μποσκού Δ. (1994). Συγκριτική μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης της ρίγανης και του δενδρολίβανου σε σάρκα ωμού ψαριού. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας. Θεσσαλονίκη, Δεκέμβριος 1994.
- 403) **Υπ.Α.Α.Τ.** (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης & Τροφίμων), 2007. Προοπτικές τομέα πτηνοτροφίας (με βάση προτάσεις & συμπεράσματα των περιφερειακών μελετών της νέας ΚΑΠ). Σεπτέμβριος 2007. http://www.minagric.gr/greek/ENHM_FYLADIA_ZWIKHS

