



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΛΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΗ
ΧΛΩΡΙΔΑ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΑΛΛΑΝΤΙΚΩΝ ΦΡΑΝΚΦΟΥΡΤΗΣ



ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΝΤΖΙΑΔΗΜΑ ΧΑΡΙΚΛΕΙΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Ιωάννινα 2019

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΣΤΗΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

της

ΝΤΖΙΑΔΗΜΑ ΧΑΡΙΚΛΕΙΑΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΥ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Καθηγητής Κοντομηνάς Μιχαήλ- Επιβλέπων Καθηγητής
Επίκουρος Καθηγήτρια Μπαδέκα Αναστασία- Μέλος της εξεταστικής επιτροπής
Δρ. Σαμέλης Ιωάννης- Ερευνητής Α΄ ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ- Μέλος της εξεταστικής
επιτροπής

Η έγκριση της Διατριβής Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης από το τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνωμών της συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων –Τμήμα Γάλακτος της Γενικής Διεύθυνσης Αγροτικής Έρευνας του ΕΛΓΟ ΔΗΜΗΤΡΑ υπό την άμεση επίβλεψη του ερευνητή, Δρα Σαμέλη Ιωάννη και τη γενικότερη εποπτεία του καθηγητή Μ.Γ. Κοντομηνά.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Κοντομηνά Μιχαήλ για την ευκαιρία που μου έδωσε να ολοκληρώσω την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, για την κατανόησή του όλο αυτό το χρονικό διάστημα και για την καθοδήγησή του κατά τη συγγραφή της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρα Σαμέλη Ιωάννη, ο οποίος συνέβαλε καταλυτικά στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας. Κατά τη διάρκεια της συνεργασίας μας αποκόμισα πολύτιμες γνώσεις στο αντικείμενο της μικροβιολογίας τροφίμων γενικότερα και ειδικά στην ταυτοποίηση γαλακτικών βακτηρίων, ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον κεφάλαιο της μικροβιολογίας. Πολύ σημαντική ήταν επίσης και η βοήθειά του κατά την συγγραφή της παρούσας διατριβής. Με την καθοδήγησή του, τις επιστημονικές του γνώσεις και τις εύστοχες παρατηρήσεις και διορθώσεις του με βοήθησε να φέρω εις πέρας την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κα Κακούρη Αθανασία, υπεύθυνη του μικροβιολογικού εργαστηρίου, για την άπογη συνεργασία μας, τη βοήθειά της καθ' όλη την περίοδο διεξαγωγής του πειραματικού μέρους της εργασίας, όπως επίσης και τις γνώσεις που απέκτησα εργαζόμενη δίπλα της.

Τέλος οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον σύζυγό μου Στέργιο και στα δυο μας κοριτσάκια, Αγγελική και Κατερίνα, για την υποστήριξη, την κατανόηση και την αγάπη τους.

Αφιερωμένη

στη μνήμη της πολυαγαπημένης μου μανούλας...

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	1
1.1 Επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος	1
1.1.1. Αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας	2
1.1.2. Αλλαντικά/λουκάνικα Φρανκφούρτης	4
1.2. Μικροβιακή οικολογία αλλοίωσης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος	5
1.3. Αλλοίωση των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος από τα γαλακτικά βακτήρια	8
1.3.1. Γενικά	8
1.3.2. Μεταβολισμός των σακχάρων από τα γαλακτικά βακτήρια	10
1.3.3. Ταξινόμηση- Είδη γαλακτικών βακτηρίων	11
1.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό ανάπτυξης και τον τύπο των γαλακτικών βακτηρίων	22
1.3.5. Είδη αλλοιώσεων που προκαλούνται από τα γαλακτικά βακτήρια	27
1.4. Χρησιμοποιούμενες και αναδύομενες τεχνολογίες για τον έλεγχο της αλλοίωσης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος	32
1.4.1. Φυσικά αντιμικροβιακά	33
1.4.1.1. Οργανικά οξέα και άλατα αυτών	33
1.4.1.2. Προστατευτικές καλλιέργειες- βακτηριοσίνες	37
1.4.1.3. Αντιμικροβιακά μικροβιακής ή ζωικής προέλευσης	38
1.4.1.4. Φυτικά αντιμικροβιακά	40
1.4.2. Ακτινοβόληση	42
1.4.3. Υψηλή υδροστατική πίεση	42
1.4.4. Ενεργή συσκευασία	44
1.4.5. Κάπνισμα	47
2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	48
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
3.1. Παρασκευή και συντήρηση των αλλαντικών	49
3.2. Μικροβιολογικές αναλύσεις	49
3.3. Χαρακτηρισμός της μικροβιακής χλωρίδας των αλλαντικών	50
3.3.1. Μικροσκοπική εξέταση	52
3.3.2. Δοκιμή αντίδρασης στη χρώση κατά Gram	52
3.3.3. Δοκιμή καταλάσης	53
3.3.4. Παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα από τη γλυκόζη	53
3.3.5. Παραγωγή αμμωνίας με υδρόλυση της αργινίνης	53

3.3.6.	Παραγωγή δεξτράνης (βλέννας) από τη σακχαρόζη	54
3.3.7.	Ανάπτυξη σε διάφορες θερμοκρασίες	54
3.3.8.	Ανάπτυξη σε διάφορες συγκεντρώσεις άλατος (NaCl)	55
3.3.9.	Ζύμωση σακχάρων	55
3.4.	Χημικές αναλύσεις	57
3.5.	Οργανοληπτική εξέταση	57
3.6.	Στατιστική ανάλυση	58
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	59
4.1.	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αλλαντικών Φρανκφούρτης	59
4.2.	Ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων κατά τον χρόνο συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης	59
4.3.	Μεταβολές του pH κατά τον χρόνο συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης	62
4.4.	Οργανοληπτική αξιολόγηση των αλλαντικών Φρανκφούρτης κατά τον χρόνο συντήρησης	63
4.5.	Ταυτοποίηση των απομονωθέντων γαλακτικών βακτηρίων από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης	64
4.6.	Χαρακτηρισμός της οξυγαλακτικής χλωρίδας κατά τον χρόνο συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης	74
4.6.1.	Κατανομή των γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά Φρανκφούρτης συναρτήσει του αντιμικροβιακού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε.	74
4.6.2.	Κατανομή των γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά Φρανκφούρτης συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης και του είδους του αντιμικροβιακού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε	76
4.6.3.	Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης στο είδος γαλακτικών βακτηρίων που επιλέγονται να αναπτυχθούν.....	85
4.7.	Επιβεβαίωση της καταλληλότητας του TSAYE ως θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων	88
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	93
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	94
	ABSTRACT	96
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	98

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος

Σύμφωνα με το άρθρο 91 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ) τα προϊόντα με βάση το κρέας (προϊόντα αλλαντοποιίας) ταξινομούνται στις παρακάτω κατηγορίες :

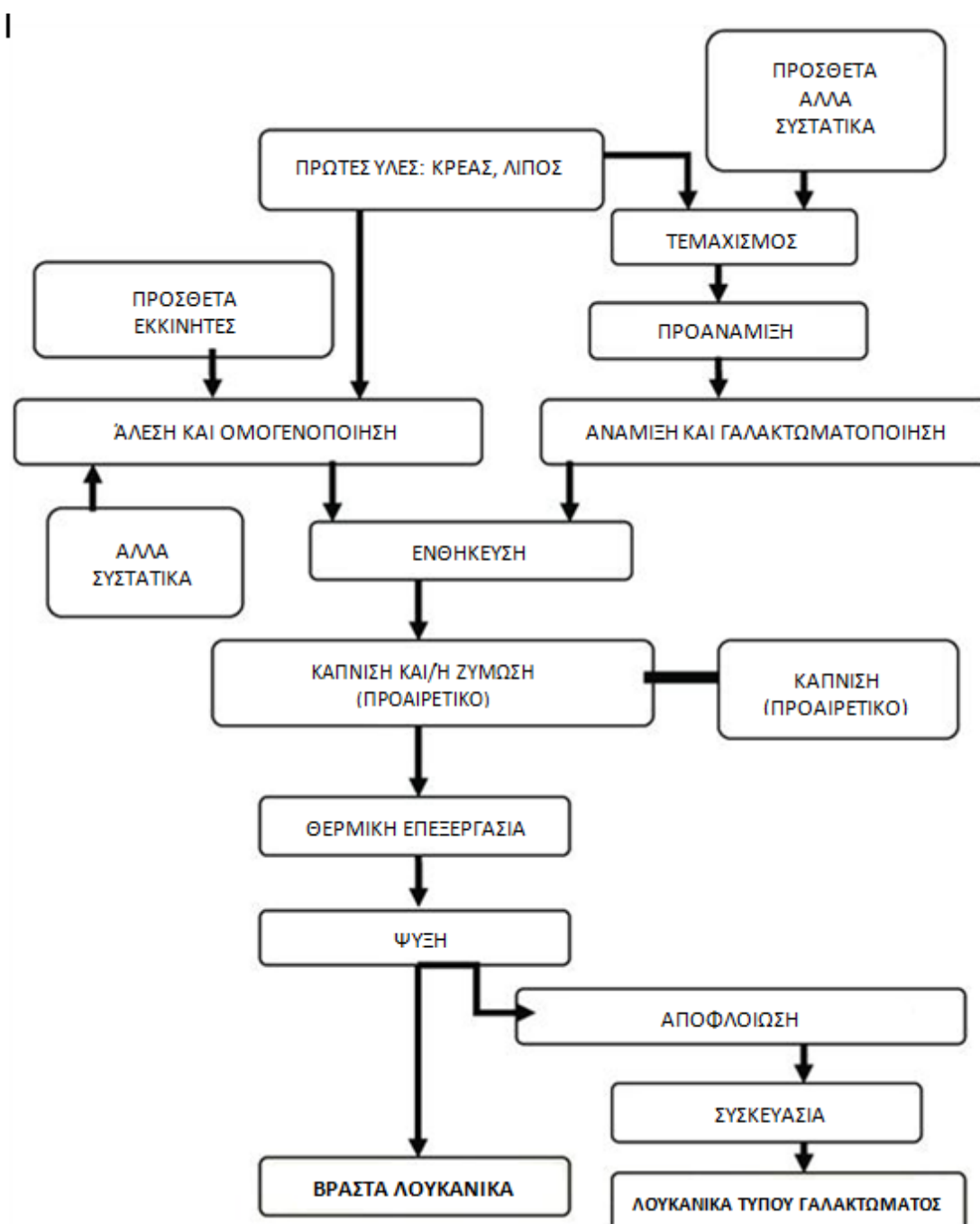
Πίνακας 1.1. Κατηγορίες προϊόντων με βάση το κρέας.

Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας	Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας από αυτοτελή τεμάχια κρέατος	<ul style="list-style-type: none">- βραστό χοιρομέρι ή ζαμπόν (χαμ, ham)- βραστή ωμοπλάτη (σπάλα)- βραστό και καπνιστό νουά και φιλέτο- μπέικον- φιλέτο ή στήθος γαλοπούλας και κοτόπουλου βραστό ή βραστό-καπνιστό
	Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας από σύγκοπτο κρέας με ή χωρίς τεμάχια κρέατος	<ul style="list-style-type: none">- λουκάνικα Φρανκφούρτης- παριζάκι, μορταδέλες-πικ-νικ, ζαμπονέλλο- μορφοποιημένα προϊόντα από τεμάχια κρέατος (μορφοποιημένο ζαμπόν, μορφοποιημένη σπάλα, μορφοποιημένο μπέικον ή μπέικον φόρμας, μορφοποιημένο στήθος γαλοπούλας ή κοτόπουλου, κλπ)
Προϊόντα ζύμωσης και ωρίμανσης	Προϊόντα ζύμωσης- ωρίμανσης από τεμάχια κρέατος	<ul style="list-style-type: none">- χοιρομέρι (ζαμπόν) ωρίμανσης- αυτοτελή τεμάχια κρέατος ζύμωσης/ ωρίμανσης
	Προϊόντα ζύμωσης- ωρίμανσης από τεμαχισμένο (σύγκοπτο) κρέας	<ul style="list-style-type: none">-αλλαντικά αέρος διατηρητά-σουτζούκια και παρεμφερή προϊόντα- επαλειφόμενα αλλαντικά ζύμωσης/ ωρίμανσης- παστουρμάς
Προϊόντα μερικής ζύμωσης (ημίξηρα)	<ul style="list-style-type: none">- σαλάμι μπύρας- διάφορα λουκάνικα που ως βασικό χαρακτηριστικό έχουν την απουσία λεπτοτεμαχισμένης κρεατόπαστας.	
Προϊόντα διπλής θερμικής επεξεργασίας	Αλλαντικά ήπατος (πατέ), Φουά-γκρα, πηκτές, αλλαντικά αίματος	

ΚΤΠ (www.gcs1.gr/media/trofima/91-iss1n.pdf)

1.1.1. Αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας

Για την παραγωγή των αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι κρέατος όπως βοδινό, χοιρινό, κοτόπουλο κλπ. (Κνίρε, 2004b). Η τεχνολογία παραγωγής τους περιγράφεται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Διάγραμμα ροής παραγωγής λουκάνικων θερμικής επεξεργασίας (τροποποιημένο από Toldra & Reig, 2007).

Λειτουργικά συστατικά/πρόσθετα των αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας

Αλάτι: αποτελεί απαραίτητη βοηθητική ύλη για την παραγωγή αλλαντικών εξαιτίας των πολλαπλών του ιδιοτήτων. Από τεχνολογικής άποψης το χλωριούχο νάτριο συμβάλει στην εκχύλιση και τη διαλυτοποίηση των μυοϊνωδών πρωτεϊνών του κρέατος, διευκολύνοντας με τον τρόπο αυτό τη σύνδεση των σωματιδίων του κρέατος και του λίπους. Αυξάνει την ικανότητα συγκράτησης νερού του κρέατος κατά τη θερμική επεξεργασία (**Knipe, 2004a**) ενώ επιπρόσθετα προσδίδει γεύση στο τελικό προϊόν και αυξάνει το χρόνο συντήρησής του. Αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στην κρεατόμαζα καθώς προκαλεί μείωση της ενεργότητας του νερού (a_w) σε τιμές κοντά στο 0.96 (**Knipe, 2004b**).

Ζάχαρη ή/και άλλοι τύποι γλυκαντικών: προστίθενται ως ενισχυτικά γεύσης και αυξάνουν επίσης την ικανότητα συγκράτησης νερού, αποτρέποντας την απώλεια υγρασίας από τα προϊόντα κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας (**Knipe, 2004b**).

Νερό: δρα βοηθητικά στην εκχύλιση των πρωτεϊνών του κρέατος, βελτιώνει την ικανότητα σύνδεσης των λεπτοτεμαχισμένων σωματιδίων κρέατος και αντικαθιστά την υγρασία που χάνεται από τα προϊόντα αυτά κατά τη θερμική επεξεργασία (**Knipe, 2004b**).

Νιτρώδη άλατα: αποτελούν το πλέον βασικό πρόσθετο στην παρασκευή των αλλαντικών προσδίδοντας στο προϊόν το χαρακτηριστικό κοκκινωπό ή ρόδινο χρώμα (μέσω αντιδράσεων συνένωσης του μονοξειδίου του αζώτου με τη μυοσφαιρίνη του κρέατος) και γεύση. Ενίοτε προστίθενται και νιτρικά άλατα (συνήθως νιτρικό και νιτρώδες νάτριο). Ειδικά το απαλό ροζ χρώμα των θερμικά επεξεργασμένων αλλαντικών είναι αποτέλεσμα της προσθήκης νιτρωδών και/ή νιτρικών πριν τη θέρμανση και του επακόλουθου σχηματισμού της νιτροζομυοσφαιρίνης που μετά τη θέρμανση μετατρέπεται σε σταθερό νιτροζομυοχρωμογόνο (**Borch et al., 1996**). Εξίσου σημαντική είναι και η συμβολή τους στην μικροβιολογική σταθερότητα και ασφάλεια των αλλαντικών εξαιτίας των αντιμικροβιακών του ιδιοτήτων εμποδίζοντας την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων όπως το *Clostridium botulinum* (**Knipe, 2004b**). Επιπλέον ασκούν αντιοξειδωτική δράση επιβραδύνοντας την οξείδωση του λίπους και το σχηματισμό δυσάρεστων οσμών (**Knipe, 2004a**).

Αντιοξειδωτικά: προστίθενται προκειμένου να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής του προϊόντος αποτρέποντας την τάγγιση του λίπους και τη μεταβολή του χρώματος εξαιτίας της έκθεσης στο οξυγόνο. Από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι το ασκορβικό οξύ (E300) (**Essien, 2003**).

Άλλα συντηρητικά εκτός των νιτρωδών αλάτων : προστίθενται σε πολύ μικρές ποσότητες για να διατηρήσουν την ασφάλεια των τροφίμων για περισσότερο χρόνο, αποτρέποντας την ανάπτυξη μικροβίων που προκαλούν αλλοίωση και τροφική δηλητηρίαση. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είναι το διοξείδιο του θείου (E221) και το θειώδες νάτριο (E223) (**Essien, 2003**).

Γαλακτωματοποιητές/Σταθεροποιητές: χρησιμοποιούνται κυρίως διφωσφορικά (E450) και τριφωσφορικά (E451) άλατα (**Essien, 2003**). Τα φωσφορικά άλατα ρυθμίζουν το pH του μίγματος κρέατος και δρουν συνεργιστικά μαζί με το αλάτι αυξάνοντας την ικανότητα συγκράτησης νερού του μίγματος κρέατος και την εκχύλιση των μυϊκών πρωτεϊνών (**Knipe, 2004a**).

Συνδετικά συστατικά: χρησιμοποιούνται προκειμένου να ενισχύουν τη σύνδεση των συστατικών της κρεατόπαστας και κυρίως χρησιμοποιούνται ορός γάλακτος σε σκόνη, πρωτεΐνη σόγιας, λεύκωμα αυγού και άμυλα (**Essien, 2003**).

Κάπνισμα: προσδίδει χαρακτηριστική γεύση και ένα πιο σκούρο επιφανειακό χρώμα στο προϊόν. Επιπλέον παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας του φαινολικού κλάσματος του καπνού, (**Toldra & Reig, 2007**).

Στα λουκάνικα/αλλαντικά τύπου γαλακτώματος συγκαταλέγονται τα αλλαντικά Φρανκφούρτης, hot dogs, αλλαντικά Μπολόνια (bologna), wieners, μορταδέλες και άλλα παρόμοια προϊόντα (**Knipe, 2004a; Toldra & Reig, 2007**).

1.1.2 Αλλαντικά/λουκάνικα Φρανκφούρτης

Τα αλλαντικά Φρανκφούρτης θεωρούνται ότι κατάγονται από ομώνυμη πόλη της Γερμανίας και παρασκευάστηκαν για πρώτη φορά το 1487. Η ονομασία λουκάνικα Φρανκφούρτης χρησιμοποιείται συνώνυμα με τα αλλαντικά wiener και τα hot dogs. Τυπικά έχουν διάμετρο 20-25mm και μήκος 12.5cm. Παρασκευάζονται χρησιμοποιώντας είτε φυσικά περιβλήματα ή περιβλήματα κυτταρίνης. Το περίβλημα κυτταρίνης αφαιρείται πριν τη συσκευασία του προϊόντος- αποφλοιωμένα λουκάνικα Φρανκφούρτης. Στις περισσότερες περιπτώσεις πωλούνται σε λεπτοαλεσμένη -γαλακτωματοποιημένη μορφή, όμως μπορούν να παραχθούν και ως χοντροαλεσμένο προϊόν. Η γεύση τους οφείλεται συνήθως στο μαύρο πιπέρι, το μοσχοκάρυδο και πιθανόν τον κόλιανδρο, ενώ επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν σκόρδο και κρεμμύδι. Σε τοπικό επίπεδο μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλα καρυκεύματα, επειδή όμως καταναλώνονται συνήθως ζεστά δεν είναι έντονα

καρυκευμένα σε αντίθεση με τα αλλαντικά Μπολόνια τα οποία καταναλώνονται συνήθως κρύα (Knipe, 2004a).

1.2. Μικροβιακή οικολογία αλλοίωσης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος.

Η διάρκεια ζωής των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος καθορίζεται ως ο χρόνος συντήρησης μέχρι το προϊόν να εμφανίσει αλλοίωση. Το σημείο αλλοίωσης μπορεί να καθοριστεί από ένα ανώτατο αποδεκτό επίπεδο βακτηρίων, ή μια ανώμαλη/ μη αποδεκτή οσμή (off- odor), γεύση (off- flavor) ή εμφάνιση. Η διάρκεια ζωής εξαρτάται από τον αριθμό και τον τύπο των μικροοργανισμών, κυρίως βακτηρίων, που υπάρχουν αρχικά στο προϊόν, όπως επίσης και εκείνων που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια συντήρησης (Borch et al, 1996; Iulietto et al, 2015).

Ο τύπος και ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στη γλωρίδα αλλοίωσης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος είναι συνάρτηση των παρακάτω παραγόντων (Borch et al, 1996; Iulietto et al, 2015).

1. Του τύπου του προϊόντος και της μικροβιολογικής ποιότητας των πρώτων υλών

Η τεχνολογία παραγωγής επιδρά καθοριστικά στη γλωρίδα αλλοίωσης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος. Πιο συγκεκριμένα, τα ζυμούμενα αλλαντικά (αλλαντικά αέρος) επιμολύνονται από τις πρώτες ύλες δηλαδή το κρέας και το λίπος. Αντίθετα στα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας η αλλοίωση οφείλεται κυρίως σε επιμόλυνση μετά την παστερίωση, καθώς η θέρμανση αδρανοποιεί τα περισσότερα βακτήρια που υπάρχουν στα αλλαντικά πριν τη θερμική επεξεργασία. Ωστόσο έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις θερμοανθεκτικών βλαστικών (vegetative) κυττάρων τα οποία μπορεί να επιβιώσουν της θερμικής επεξεργασίας και να προκαλέσουν αλλοίωση. Φυσιολογικά επίπεδα επιμόλυνσης μετά την επεξεργασία εμπορικά παραχθέντων τεμαχισμένων ή αποφλοιωμένων αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας στη συσκευασία κυμαίνονται από 10 έως 10^3 cfu/g ή cm^2 , μέρος των οποίων είναι γαλακτικά βακτήρια. Ο χρόνος συντήρησης των προϊόντων αυτών υπό ψύξη μπορεί να μειωθεί στις λίγες μέρες, όταν οι πληθυσμοί της αρχικής επιμόλυνσης είναι υψηλότεροι από 10^3 cfu/g ή cm^2 . Ακόμη όμως και αν η αρχική επιμόλυνση είναι <10 cfu/g ή cm^2 , η αλλοίωση είναι αναπόφευκτη. Η επιμόλυνση μετά την επεξεργασία μπορεί να αποφευχθεί μόνο στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (RTE, Ready To Eat), τα οποία

υποβάλλονται σε θερμοκρασία υψηλής παστερίωσης ή αποστείρωσης σε ερμητικά κλειστούς περιέκτες (Samelis, 2006).

2. Της μικροβιακής χλωρίδας της μονάδας επεξεργασίας

Η αλλοίωση επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος μετά τη θερμική επεξεργασία είναι αποτέλεσμα ανεπαρκών πρακτικών υγιεινής κατά ένα ή περισσότερα στάδια της επεξεργασίας όπως τεμαχισμός, αποφλοιώση και συσκευασία (Clavero, 2010; Samelis, 2006).

3. Των συνθηκών συντήρησης (θερμοκρασία συντήρησης και μέθοδος συσκευασίας)

Τα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας είναι ευαίσθητα στη μικροβιολογική αλλοίωση και γι' αυτό θα πρέπει να συντηρούνται υπό ψύξη στον αέρα ή ακόμη καλύτερα υπό κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) (Samelis, 2006; Borch et al., 1996). Επιπλέον τα προϊόντα τα οποία μετά τη θερμική επεξεργασία υποβάλλονται σε τεμαχισμό ή αποφλοιώση και στη συνέχεια επανασυσκευάζονται μειώνεται η μικροβιολογική διάρκεια ζωής τους, λόγω επιμόλυνσης. Από την άλλη, τα ζυμούμενα αλλαντικά είναι σταθερά προϊόντα και μπορούν να συντηρηθούν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρούνται οργανοληπτικά ελαττώματα που σχετίζονται με την επικράτηση μη επιθυμητών μικροβιακών ειδών εξαιτίας αποκλίσεων κατά την παραγωγική διαδικασία (Samelis, 2006). Η θερμοκρασία συντήρησης επηρεάζει τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης (που ορθότερα ορίζεται ως μικροβιακή φάση προσαρμογής), το μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και την τελική συγκέντρωση των ζώντων κυττάρων (μικροβιακών πληθυσμών). Χαμηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης υπό ψύξη περιορίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη και τροποποιούν τη σύσταση της μικροβιακής χλωρίδας. Έτσι μπορούν να αναπτυχθούν ψυχρότροφα βακτήρια, θετικά κατά Gram όπως τα γαλακτικά βακτήρια, ή αρνητικά κατά Gram όπως τα *Pseudomonas* spp. (Iulietto et al., 2015).

4. Της σύστασης του προϊόντος

Ενδογενείς παράγοντες που συνεισφέρουν στη μικροβιακή σταθερότητα των αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας είναι κυρίως το περιεχόμενο αλάτι (3-5%), η ενεργότητα νερού a_w (0.96-0.99), το pH (6.0-6.5) και η συγκέντρωση νιτρικών (<100 $\mu\text{g/g}$ περιεχόμενο υπολειμματικού νιτρώδους). Όπως αναφέρθηκε τα νιτρώδη άλατα παρουσιάζουν παρεμποδιστική δράση στην ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών όπως τα *Enterobacteriaceae* και ο *B. thermosphacta* όχι όμως και των γαλακτικών βακτηρίων (Borch et al, 1996).

Αλλοίωση που προκαλείται από *Pseudomonas* spp. και άλλα αρνητικά κατά Gram βακτήρια

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα είδη *Pseudomonas* δεν αποτελούν σημαντικό αλλοιογόνο παράγοντα στα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας εξαιτίας της ευαισθησίας τους στα νιτρώδη άλατα και την παστερίωση. Επιπλέον καθώς οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι αερόβιοι, η ανάπτυξή τους δεν ευνοείται υπό κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα, μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την εμπορική συσκευασία και διακίνηση επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος. (Samelis, 2006; Clavero, 2010) Η επικράτηση *Pseudomonas* spp. στην αλλοιογόνο χλωρίδα επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος οφείλεται σε αστοχίες κατά την επεξεργασία (πχ. απουσία ή ελλιπής αλάτιση- νίτρωση, ελαττωματικό κενό, ανεπιτυχής σφράγιση συσκευασίας) ή σε υποβαθμισμένη (μικροβιολογικά) ποιότητα πρώτων υλών και σε μη τήρηση των ορθών πρακτικών υγιεινής στη μονάδα επεξεργασίας (Samelis, 2006).

Συγκεκριμένα ψυχροαθεκτικά και κυρίως αλατοαθεκτικά γένη και είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση συγκεκριμένων προϊόντων. Για παράδειγμα κάποια είδη *Vibrio* όπως *V. costicola* είναι γνωστό ότι προκαλούν αλλοίωση σε διάφορες ποικιλίες φρέσκων αλλαντικών ζαμπόν και μπέικον. Με εξαίρεση την περίπτωση ελλιπών συνθηκών υγιεινής, τα Enterobacteriaceae είναι μη σημαντικοί αλλοιογόνοι παράγοντες σε συσκευασμένα υπό κενό αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας. Αυτό συμβαίνει γιατί οι αρχικοί πληθυσμοί τους, εφόσον υπάρχουν, γρήγορα υπερκαλύπτονται από τα γαλακτικά βακτήρια τα οποία είναι ανταγωνιστικά υπό αναερόβιες συνθήκες συντήρησης υπό ψύξη (Samelis, 2006).

Η αλλοίωση που οφείλεται σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια συχνά χαρακτηρίζεται από την παραγωγή/σχηματισμό προϊόντων που περιέχουν θείο, όπως το H_2S , το διμεθυλσουλφίδιο και η μεθυλμερκαπτάνη. Ο σχηματισμός βλέννας, πρασινίσματος, και η παραγωγή ενός χαρακτηριστικού αλλοιογόνου μεταβολίτη (διμεθυλσουλφίδιο) μπορεί να αποδίδεται στην ανάπτυξη *Pseudomonas* spp. Η παραγωγή H_2S από την άλλη γενικά οφείλεται στην ανάπτυξη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων της οικογένειας Enterobacteriaceae (Clavero, 2010).

Αλλοίωση που προκαλείται από θετικά κατά Gram βακτήρια

Κατά τη διάρκεια παραγωγής και συντήρησης των αλλαντικών τα γαλακτικά βακτήρια, άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια και ζύμες έχουν ένα προβάδισμα να αναπτυχθούν και να κυριαρχήσουν συγκρινόμενα με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Αναλυτική περιγραφή

των γαλακτικών βακτηρίων και των αλλοιώσεων που αυτά προκαλούν, παρατίθεται στο κεφάλαιο που ακολουθεί.

Ο *Brochotrix thermosphacta* είναι επίσης ένα θετικό κατά Gram βακτήριο. Είναι ψυχρόφιλος, προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός, στενά συνδεδεμένος με το γένος *Listeria* (Vasilopoulos et al., 2015) και απαντάται σε υψηλούς πληθυσμούς σε κρέας που συντηρείται υπό αερόβιες συνθήκες ή σε κενό υπό ψύξη (Guerrero & Chabela, 1999). Υπό αναερόβιες συνθήκες μεταβολίζει τη γλυκόζη κυρίως (αν όχι αποκλειστικά) προς γαλακτικό οξύ, ενώ παρουσία οξυγόνου παράγονται εκτός του γαλακτικού οξέος, οξικό οξύ, αιθανόλη και διακετύλιο. Επιπλέον αποικοδομεί τη βαλίνη, τη λευκίνη και την ισολευκίνη παράγοντας μεθυλ-βουτυρικά οξέα και αλκοόλες, μεταβολίτες στους οποίους αποδίδεται η γλυκιά και βουτυρώδης οσμή αλλοίωσης προϊόντων κρέατος θερμικής επεξεργασίας (Vasilopoulos et al., 2015). Καθώς ο *B. thermosphacta* δεν διαθέτει το σύστημα ενζύμων 'ρεδουκτάση νιτρωδών' (nitrite reductase) για την αναγωγή των νιτρικών υπό αναερόβιες συνθήκες (αντίθετα από πολλά γαλακτικά βακτήρια), η ανάπτυξη του παρεμποδίζεται ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις νιτρικού νατρίου της τάξης των 25 mg/Kg που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αλλαντικών (Guerrero & Chabela, 1999).

1.3. Αλλοίωση των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος από τα γαλακτικά βακτήρια

1.3.1. Γενικά

Τα γαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν μια ποικιλόμορφη ομάδα θετικών κατά Gram, μη σπορογόνων, μη κινητών, αρνητικών στην καταλάση κόκκων, βακίλων ή κοκκοβακίλων. Σήμερα, θεωρούνται ως μια ταχέως αναπτυσσόμενη κατηγορία βακτηρίων. Διαχωρίζονται σε 6 οικογένειες (Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostocaceae και Streptococcaceae), κάθε μια εκ των οποίων περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα φυλογενετικά συγγενή γένη και είδη ανά γένος (Vandamme et al., 2014) τα σημαντικότερα από τα οποία για το κρέας και τα προϊόντα κρέατος θα αναφερθούν εκτενώς στη συνέχεια.

Έχουν χρησιμοποιηθεί από αρχαιοτάτων χρόνων σε παγκόσμιο επίπεδο για την παραγωγή ασφαλών τροφίμων. Σήμερα διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην παγκόσμια παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων (γαλακτοκομικά προϊόντα, προϊόντα κρέατος και λαχανικών) στα οποία χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης, ενώ χρησιμοποιούνται

επίσης για την παραγωγή οίνου, καφέ, κακάο, ενσιρώματος και προζυμιού (Giraffa, 2014). Θεωρούνται γενικά ασφαλείς μικροοργανισμοί (GRAS, Generally Recognized As Safe). Ως προστατευτικές καλλιέργειες που παράγουν βακτηριοσίνες δημιουργούν ένα μικροβιολογικό οικοσύστημα που αποτρέπει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Iulietto et al., 2015). Επιπλέον ορισμένα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ως προβιοτικές καλλιέργειες προάγοντας την υγεία του ανθρώπου και τέλος στην παραγωγή μακρομορίων, ενζύμων και μεταβολιτών (Giraffa, 2014).

Παρά το γεγονός ότι τα γαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν αξιοσημείωτες πλεονεκτικές δράσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί, εντούτοις κάποια στελέχη γαλακτικών βακτηρίων συνδέονται με την αλλοίωση των τροφίμων. Θεωρούνται ως ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί (SSO, Specific Spoilage Organisms) του κρέατος και των προϊόντων κρέατος που συντηρούνται υπό κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε θερμοκρασίες ψυγείου (Iulietto et al., 2015). Ο συνδυασμός μικροαερόφιλων συνθηκών, η παρουσία χλωριούχου νατρίου και νιτωδών αλάτων, και η μειωμένη ενεργότητα νερού ως αποτέλεσμα της προσθήκης χλωριούχου νατρίου και άλλων υγροσκοπικών ουσιών (φωσφορικά άλατα και γαλακτικό νάτριο), ευνοεί την ανάπτυξη των ψυχρότροφων γαλακτικών βακτηρίων.

Η γαλακτική χλωρίδα των προϊόντων αυτών αποτελείται κυρίως από προαιρετικά ετεροζυμωτικά/ομοζυμωτικά είδη *Lactobacillus* κυρίαρχα *L. sakei* και *L. curvatus*, υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά είδη των γενών *Leuconostoc* και *Weissella* και είδη του γένους *Carnobacterium* (Samelis et al., 2000a; Iulietto et al., 2015).

Τα τελευταία χρόνια η πρόοδος στην πολυφασική ταξινόμηση έχει διασαφηνίσει την ταξινομική θέση των περισσότερων αλλοιογόνων ειδών LAB του κρέατος που αναφέρονται ως "atypical" από τις αρχές μέχρι τα μέσα της δεκαετίας 1990. Μεταξύ των κύριων ειδών LAB είναι εκείνα που επικρατούν στην αλλοίωση του φρέσκου κρέατος όπως *L. sakei*, *Leuc. carnosum* και *Leuc. gelidum* μαζί με τα στενά συνδεδεμένα μ' αυτά οξεοπαραγωγικά (aciduric) είδη *L. curvatus*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuc. citreum* (που μετέπειτα ονομάστηκε/συνώνυμο *Leuc. amelibiosum*), *W. viridescens* και *W. paramesenteroides*. Στα παραπάνω ανήκουν και τα είδη (*Leuc. lactis*, *W. hellenica*, *W. halotolerans*, *W. minor*, *W. confusa*) ή άλλα γένη γαλακτικών βακτηρίων (*Carnobacterium*, *Lc. lactis*, *Lc. raffinolactis*, *E. faecalis*), τα οποία απομονώνονται περιστασιακά/σποραδικά αλλά σπάνια σε υψηλές συγκεντρώσεις σε αλλοίωση (Samelis, 2006).

1.3.2. Μεταβολισμός των σακχάρων από τα γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια διαχωρίζονται σε 3 ομάδες με βάση τη μεταβολική οδό που χρησιμοποιείται για τη ζύμωση της γλυκόζης και την ικανότητά τους να μεταβολίζουν τις πεντόζες:

- 1) **Υποχρεωτικώς ομοζυμοτικά γαλακτικά βακτήρια:** ακολουθούν τον κύκλο Embden- Meyerhof- Parnas μετατρέποντας ένα μόριο εξόζης σε δυο μόρια γαλακτικού οξέος. Διαθέτουν το ένζυμο FDP αλδολάση που καταλύει τη διάσπαση της εξόζης σε 2 τριόζες, οι οποίες στη συνέχεια μετατρέπονται σε δυο μόρια γαλακτικού οξέος με ταυτόχρονη παραγωγή 2 μορίων ATP. Δεν έχουν τη δυνατότητα ζύμωσης των πεντοζών λόγω έλλειψης του ενζύμου φωσφοκετολάση.
- 2) **Υποχρεωτικώς ετεροζυμοτικά γαλακτικά βακτήρια:** ακολουθούν την οδό του 6-φωσφορογλυκονικού οξέος/ φωσφοκετολάσης. Μεταβολίζουν τις εξόζες και τις πεντόζες με τη δράση του ενζύμου φωσφοκετολάση. Από 1 μόριο εξόζης παράγεται 1 μόριο γαλακτικού οξέος, 1 μόριο CO₂ και 1 μόριο αιθανόλης ή οξικού οξέος, ενώ παράγεται και 1 μόριο ATP. Οι πεντόζες ζυμώνονται προς γαλακτικό και οξικό οξύ.
- 3) **Προαιρετικώς ετεροζυμοτικά γαλακτικά βακτήρια:** μεταβολίζουν τις εξόζες αποκλειστικά προς γαλακτικό οξύ μέσω της οδού Embden- Meyerhof- Parnas. Η διάσπαση των πεντοζών πραγματοποιείται μέσω μιας επαγωγίμης φωσφοκετολάσης με παραγωγή γαλακτικού και οξικού οξέος.

Κάποια γαλακτικά βακτήρια μεταβολίζουν δισακχαρίτες (κελλοβιόζη, λακτόζη, μαλτόζη, μελιβιόζη, σακχαρόζη κ.α.) αφού πρώτα αυτοί διασπαστούν στους 2 επιμέρους μονοσακχαρίτες κατά περίπτωση.

Τα γαλακτικά βακτήρια παράγουν κυρίως D(-) και L(+) γαλακτικό οξύ. Η αναλογία με την οποία τα ισομερή παράγονται είναι σχεδόν ιδανική μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους και θεωρείται ένα από τα χαρακτηριστικά κλειδιά για την κατάταξη των γαλακτικών βακτηρίων σε υποομάδες. Βέβαια υπάρχουν και εξαιρέσεις καθότι δεν υπακούουν όλα τα είδη γαλακτικών βακτηρίων στον παραπάνω κανόνα. Για παράδειγμα το είδος *L. sakei* μεταβάλλει την αναλογία των 2 ισομερών παρουσία ή απουσία οξικού νατρίου. Παρουσία οξικού νατρίου παράγεται κυρίως το L(+) ισομερές, ενώ απουσία οξικού νατρίου παράγονται σχεδόν ισομοριακές ποσότητες των 2 ισομερών (Endo & Dicks, 2014).

1.3.3. Ταξινόμηση- Είδη γαλακτικών βακτηρίων

Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων (μορφολογία, βιοχημικές και φυσιολογικές ιδιότητες) αποτελούν ακόμη και σήμερα πολύ σημαντικούς και χρήσιμους δείκτες για την ταυτοποίηση και ταξινόμηση αυτών. Η γνώση της επιστημονικής κοινότητας ενισχύθηκε με την εφαρμογή σύγχρονων τεχνικών όπως ανοσοβιολογικές (serological) τεχνικές, ηλεκτροφορητικές μεθόδους και δεδομένα ειδικών αναλύσεων της σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος. Επιπλέον η εφαρμογή τεχνικών ανάλυσης του DNA (μελέτες υβριδισμού του DNA και συγκρίσεις αλληλουχίας του DNA) συνέβαλαν καθοριστικά στη μελέτη των ακριβών γενετικών ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ οργανισμών (**Limsowtin et al., 2002**).

1. Το γένος *Lactobacillus*

Είναι μη σπορογόνα, κυρίως μη κινητά, τυπικά ραβδόμορφα βακτήρια, όμως έχουν βρεθεί και κοκκοβάκιλοι, με τα κύτταρα συνήθως να οργανώνονται σε αλυσίδες. Το θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξής τους κυμαίνεται από τους 2⁰C έως τους 53⁰C, με άριστη θερμοκρασία 30-40⁰C, ενώ αναπτύσσονται σε τιμές pH 3.0 έως 8.0 (**Pot et al., 2014**). Είναι αυστηρώς ζυμωτικοί μικροοργανισμοί, με σύνθετες θρεπτικές απαιτήσεις, οξεοπαραγωγοί (aciduric) ή οξεόφιλοι. Σε τρόφιμα που περιέχουν ζυμώσιμους υδατάνθρακες μπορούν να μειώσουν το pH σε τιμές ίσες ή ακόμη και ελαφρά χαμηλότερες από την τιμή pH 4.0 (**Stiles & Holzapfel, 1997**).

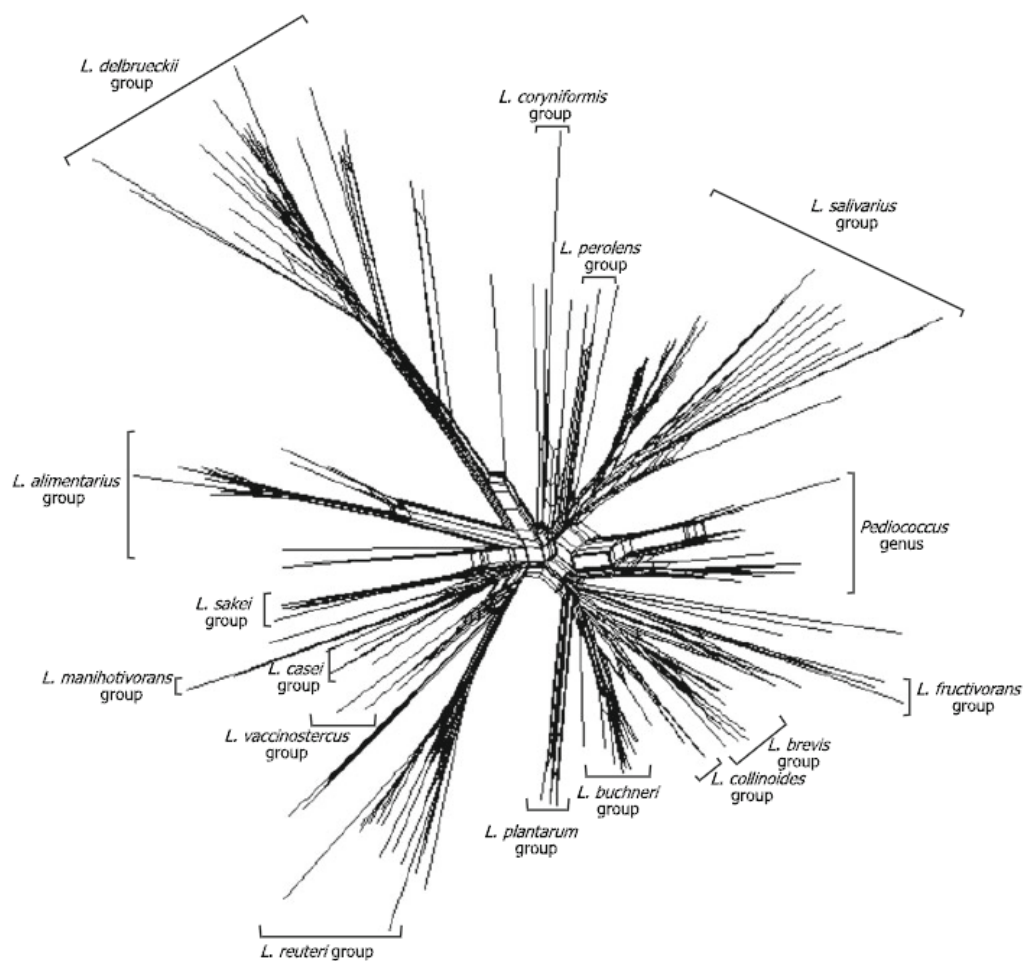
Σύμφωνα με την κλασική ταξινόμηση (Orla- Jensen 1919) το γένος περιλαμβάνει τρεις υποομάδες με βάση τα ζυμωτικά τους χαρακτηριστικά:

- (1) αυστηρώς ομοζυμωτικούς. Αντιπροσωπεύουν την ομάδα των thermobacteria κατά Orla- Jensen (1919). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μεταξύ άλλων τα είδη *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* και *L. helveticus*.
- (2) προαιρετικά ετεροζυμωτικούς. Αντιπροσωπεύουν την ομάδα των streptobacteria κατά Orla- Jensen (1919) τα κυριότερα είδη της ομάδας αυτής που σχετίζονται με τα τρόφιμα είναι *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* και *L. sakei*. Τα δυο τελευταία είδη αποτελούν σημαντικό μέρος της χλωρίδας συσκευασμένων υπό κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα κρέατος και προϊόντων κρέατος τα οποία συντηρούνται σε θερμοκρασίες ψύξης (<5⁰C). Είναι σημαντικές καλλιέργειες εκκίνησης για την παραγωγή ζυμούμενων προϊόντων κρέατος. Επιπλέον στελέχη *L. sakei* που παράγουν

θειούχες ενώσεις έχουν εμπλακεί στην αλλοίωση συσκευασμένου υπό κενό και συντηρημένου υπό ψύξη κρέατος (Stiles & Holzapfel, 1997).

(3) ασητηρώς ετεροζυμωτικούς. Αντιπροσωπεύουν την ομάδα των betabacteria κατά Orla- Jensen (1919) (Stiles & Holzapfel, 1997).

Το γένος *Lactobacillus* μέχρι τον Οκτώβριο του 2012 περιελάμβανε 152 είδη και ανήκει στην οικογένεια *Lactobacillaceae* μαζί με το γένος *Pediococcus* με το οποίο είναι φυλογενετικά στενά συνδεδεμένο (Salvetti et al., 2012). Στο σχήμα 1.2 απεικονίζονται οι ξεχωριστές ομάδες των δυο γενών και στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται τα είδη ανά ομάδα.



Σχήμα 1.2. Διάγραμμα διαχωρισμού σε ομάδες των ειδών *Lactobacillus* και *Pediococcus* με βάση την ανάλυση 16S rRNA αλληλουχίας γονιδίων (Salvetti et al., 2012).

➤ *L. curvatus*

Είναι βακιλόκοκκοι που απαντώνται σε ζεύγη ή κοντές αλυσίδες, ενώ μπορεί να σχηματίζουν μορφή πέταλου ή κλειστού δακτυλίου. Δεν αναπτύσσονται στους 45⁰C, αλλά τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται στους 42⁰C και 4⁰C, ενώ κάποια στελέχη αναπτύσσονται και στους 2⁰C. Είναι προαιρετικά ετεροζυμωτικά και παράγουν DL-γαλακτικό οξύ (Torriani et al., 1996).

L. curvatus subsp. curvatus

Παράγουν οξύ από τα εξής σάκχαρα: φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, μαλτόζη, μαννόζη και ριβόζη. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν οξύ από την αμυγδαλίνη, κελλοβιόζη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη. Λίγα στελέχη παράγουν οξύ από τη λακτόζη. Δεν παράγουν οξύ από την αραβινόζη, ινοσιτόλη, μαννιτόλη, μελεζιτόζη, μελιβιόζη, ραφφινόζη, ραμνόζη, σορβιτόλη και ξυλόζη. Δεν παράγουν αμμωνία από την αργινίνη. Τα περισσότερα στελέχη δεν αναπτύσσονται παρουσία 10% NaCl και δεν παράγουν ακετοΐνη από τη γλυκόζη (Torriani et al., 1996; Koort et al., 2004).

L. curvatus subsp. melibiosus

Παράγουν DL- γαλακτικό οξύ, ενώ συχνά υπάρχει περίσσεια του L+ ισομερούς. Παράγουν οξύ από τα εξής σάκχαρα: φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, μαννόζη, μελιβιόζη, ριβόζη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν οξύ από τη σαλικίνη. Λίγα στελέχη παράγουν οξύ από την κελλοβιόζη. Δεν παράγουν οξύ από την αμυγδαλίνη, αραβινόζη, λακτόζη, ινοσιτόλη, μαλτόζη, μαννιτόλη, μελεζιτόζη, ραφφινόζη, ραμνόζη, σορβιτόλη και ξυλόζη. Δεν παράγουν αμμωνία από την αργινίνη, δεν αναπτύσσονται παρουσία 10% NaCl και δεν παράγουν ακετοΐνη από τη γλυκόζη (Torriani et al., 1996).

➤ *L. sakei*

Τα κύτταρα είναι ραβδόμορφα με στρογγυλεμένα άκρα, κοίλα ή ακανόνιστα κυρίως κατά τη στατική φάση ανάπτυξης και απαντώνται σε κοντές αλυσίδες ή μονήρη. Δεν αναπτύσσονται στους 45⁰C, αλλά τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται στους 42⁰C και 4⁰C, ενώ κάποια στελέχη αναπτύσσονται και στους 2⁰C. Είναι προαιρετικά ετεροζυμωτικά και παράγουν DL-γαλακτικό οξύ και συχνά υπάρχει περίσσεια του L+ ισομερούς του γαλακτικού οξέος (Torriani et al., 1996).

L. sakei* subsp. *sakei

Παράγουν οξύ από τα σάκχαρα: αραβινόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, μαννόζη, μελιβιόζη, ριβόζη και σακχαρόζη. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν οξύ από την κελλοβιόζη, τη σαλικίνη και την τρεχαλόζη. Λίγα στελέχη παράγουν οξύ από την λακτόζη και τη μαλτόζη. Λίγα στελέχη δεν παράγουν οξύ από την αραβινόζη. Δεν παράγουν οξύ από την αμυγδαλίνη, ινοσιτόλη, μαννιτόλη, μελεζιτόζη, ραφφινόζη, ραμνόζη, σορβιτόλη και ξυλόζη. Πάντα παράγεται αμμωνία από την αργινίνη. Τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται παρουσία 10% NaCl και παράγουν ακετοΐνη από τη γλυκόζη (**Torriani et al., 1996**).

L. sakei* subsp. *carneus

Παράγουν οξύ από τα σάκχαρα: φρουκτόζη, γαλακτόζη, γλυκόζη, μαννόζη, μελιβιόζη, ριβόζη, σαλικίνη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη. Πολλά στελέχη δεν παράγουν οξύ από την αραβινόζη. Λίγα στελέχη παράγουν οξύ από την κελλοβιόζη. Δεν παράγουν οξύ από την αμυγδαλίνη, ινοσιτόλη, λακτόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη, μελεζιτόζη, ραφφινόζη, ραμνόζη, σορβιτόλη και ξυλόζη. Πάντα παράγεται αμμωνία από την αργινίνη. Τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται παρουσία 10% NaCl και παράγουν ακετοΐνη από τη γλυκόζη (**Torriani et al., 1996**).

Σήμερα θεωρείται ότι ο *L. curvatus* subsp. *melibiosus* είναι συνώνυμος με τον *L. sakei* subsp. *carneus* (**Koort et al., 2004**). Η Koort και συν. μελέτησαν 4 στελέχη του *L. curvatus* subsp. *melibiosus*. Η πιο ουσιώδης διαφοροποίηση που παρατηρείται είναι ότι ενώ οι **Torriani et al. (1996)** είχαν προσδιορίσει τον *L. curvatus* subsp. *melibiosus* ως ένα υποείδος που δεν υδρολύει την αργινίνη, οι **Koort et al. (2004)** αναφέρουν ότι τα 5 από τα 7 στελέχη του συγκεκριμένου υποείδους υδρολύουν την αργινίνη (παράγουν αμμωνία) (**Koort et al., 2004**).

➤ *L. plantarum*

Η ομάδα *L. plantarum* είναι μια φυλογενετικά ομοιογενής ομάδα προαιρετικώς ετεροζυμωτικών γαλακτοβακίλων και περιλαμβάνει έως σήμερα 6 είδη/υποείδη: *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *L. plantarum* subsp. *argentoratensis*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. fabifermentans* και *L. xiangfangensis*. Όσον αφορά τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά παρουσιάζουν ελάχιστες διαφορές ως προς τη ζύμωση των σακχάρων και γενικά αυξημένη ζυμωτική ικανότητα (Πίνακας 1.3) (**Pot et al., 2014**).

Πίνακας 1.3. Προφίλ ζύμωσης σακχάρων μεταξύ ειδών/υποειδών της ομάδας *L. plantarum*.

	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>argentoratensis</i>	<i>L.paraplantarum</i>	<i>L. pentosus</i>
Κελλοβιόζη	+	+	+	+
Μελβιόζη	+	+	+	+
Ραφφινόζη	+	+	d	+
Μαννιτόλη	+	+	+	+
Αμυγδαλίνη	+	+	+	+
Σακχαρόζη	+	+	+	+
Γαλακτόζη	+	+	+	+
Λακτόζη	+	+	+	+
Μαλτόζη	+	+	+	+
Μαννόζη	+	+	+	+
Σαλικίνη	+	+	+	+
Τρεχαλόζη	+	+	+	+
Αραβινόζη	d	d	d	+
Μελεζιτόζη	+	+	+	d
Ριβόζη	+	+	+	+
Σορβιτόλη	+	+	d	+
Ξυλόζη	d	d	-	+

Όλα τα στελέχη παράγουν DL γαλακτικό οξύ από τη ζύμωση της γλυκόζης, δεν παράγουν αμμωνία από την υδρόλυση της αργινίνης και αναπτύσσονται στους 15°C όχι όμως στους 45°C.

d: διαφορετική αντίδραση μεταξύ στελεχών

(Pot et al., 2014)

2. Το γένος *Leuconostoc*

Φυλογενετικά συγγενές με τα γένη *Lactobacillus* και *Pediococcus* (Bjorkroth et al., 2014a). Οι λευκόκοκκοι διαχωρίζονται από τους ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους που επίσης παράγουν αέριο, πρωτίστως από την ανικανότητά τους να παράγουν αμμωνία από την αργινίνη, ενώ σχηματίζουν αποκλειστικά D- γαλακτικό οξύ από τη γλυκόζη (Collins et al., 1993). Αντίθετα οι ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλοι παράγουν DL- γαλακτικό οξύ και τα περισσότερα είδη αυτών είναι θετικά στην παραγωγή αμμωνίας από την αργινίνη (Stiles & Holzapfel, 1997).

Τα κύτταρα είναι θετικά κατά Gram, μη κινητά, ασποριογόνα και αρνητικά στην καταλάση. Μορφολογικά θεωρούνταν παλαιότερα κοκκοειδή ή κοκκοβακιλώδη είδη. Τα τελευταία όμως χρόνια λίγα ραβδόμορφα είδη επαναταξινομήθηκαν στο νέο γένος *Fructobacillus*, γι' αυτό το γένος *Leuconostoc* αποτελείται επί του παρόντος αποκλειστικά από κοκκοειδή είδη (Bjorkroth et al., 2014a).

Σύμφωνα με παλαιότερη μελέτη ταξινόμησης το γένος *Leuconostoc* περιελάμβανε 3 κλάσματα: το *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* και άλλα δυο νέα είδη με την ονομασία

L. gelidum και *L. carnosum* (Shaw & Harding, 1989). Από τότε τα δεδομένα έχουν αλλάξει ριζικά. Έτσι τα τελευταία χρόνια με βάση αναλύσεις αλληλουχίας 16S rRNA και 23S RNA το γένος αποτελείται από την κυρίαρχη φυλογενετική ‘αντιπροσωπευτική’ ομάδα ονομαζόμενη *Leuconostoc sensu stricto*, ενώ οι άλλες δυο υποομάδες *Leuc. paramesenteroides* και *Leuc. oenos* κατατάχθηκαν σε νέα γένη (*Weissella* και *Oenococcus*, με τα ονόματα *W. paramesenteroides* και *O. oeni* αντίστοιχα) (Bjorkroth et al., 2014a). Η ομάδα *Leuconostoc sensu stricto* βασίζεται σε 97-99% ομολογία στην αλληλουχία rRNA. Έχουν διαχωριστεί 3 υποομάδες: 1) *Leuc. mesenteroides* και *Leuc. pseudomesenteroides*, 2) *Leuc. lactis* (Stiles & Holzapfel, 1997), συνώνυμο με τον *Leuc. argentinum* (Bjorkroth et al., 2014a) και *Leuc. citreum* (Stiles & Holzapfel, 1997), συνώνυμο με τον *Leuc. amelibiosum* (Bjorkroth et al., 2014a) και 3) τις αυθεντικές απομονώσεις από κρέας: *Leuc. gelidum* και *Leuc. carnosum* (Stiles & Holzapfel, 1997) και μεταγενέστερα *Leuc. gasicomitatum* (Bjorkroth et al., 2014a).

Ο *Leuc. amelibiosum* προσαρτήθηκε στον *Leuc. citreum* με βάση φαινοτυπικά χαρακτηριστικά και μελέτες DNA. Επιπλέον άτυπα στελέχη “*leuconostoc like*” που απομονώθηκαν από ξινολάχανο (*sauerkraut*) παρουσίαζαν 94-96% ομολογία με την ομάδα *Leuconostoc sensu stricto* και αποτέλεσαν ένα νέο είδος, τον *Leuc. fallax*. (Stiles & Holzapfel, 1997). Τα είδη *L. durionis*, *L. ficulneum* και *L. fructosum* επαναταξινομήθηκαν το 2008 στο νέο είδος *Fructobacillus* ως *Fructobacillus durionis*, *Fructobacillus ficulneus* και *Fructobacillus fructosus* (Bjorkroth et al., 2014a).

Μια από τις πιο πρόσφατες επαναταξινομήσεις ήταν αυτή του νέου είδους *L. gasicomitatum* κατά το έτος 2000, που αργότερα το 2014 επαναταξινομήθηκε ως υποείδος του *L. gelidum* (*L. gelidum* subsp. *gasicomitatum*) με αποτέλεσμα το είδος *L. gelidum* να περιέχει 3 ξεχωριστά φυλογενετικά υποείδη: *L. gelidum* subsp. *gelidum*, *L. gelidum* subsp. *gasicomitatum* και *L. gelidum* subsp. *aenigmaticum* (Rahkila et al., 2014).

Έτσι το γένος σήμερα περιλαμβάνει τα παρακάτω είδη: *L. gelidum* subsp. *gasicomitatum*, *L. gelidum* subsp. *gelidum*, *L. gelidum* subsp. *aenigmaticum*, *L. miyukkimchii* (Rahkila et al., 2014), *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. fallax*, *L. holzapfelii*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides* (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*), *L. palmae* και *L. pseudomesenteroides* (Bjorkroth et al., 2014a).

Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους είναι 20-30°C, ενώ σχεδόν δεν αναπτύσσονται πάνω από τους 40°C. Είναι συνήθως μη οξεόφιλα και προτιμούν αρχικό pH 6 έως 7.

Ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει αναφερθεί για πολλά είδη. Μεταξύ αυτών, στελέχη του *Leuc. gasicomitatum* αναπτύσσονται στους 4°C, ενώ στελέχη των *Leuc. carnosum*, *Leuc. gelidum* και *Leuc. inhae* σε ακόμη χαμηλότερες θερμοκρασίες (1°C) (Bjorkroth et al., 2014a).

Ψυχρότροφα μέλη όπως *L. carnosum*, *L. gelidum* και *L. gasicomitatum*, είναι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί σε συσκευασμένα τρόφιμα, κυρίως κρέας και προϊόντα κρέατος που συντηρούνται υπό ψύξη (Bjorkroth et al., 2014a).

➤ *L. mesenteroides*

L. mesenteroides subsp. *mesenteroides*

Τυπικά παράγεται δεξτράνη από τη ζύμωση της σακχαρόζης. Το θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξής τους κυμαίνεται από 10 έως 37°C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 20-30°C. Αναπτύσσονται παρουσία 3%NaCl, ενώ κάποια στελέχη έως και 6.5%NaCl. Ζυμώνουν την αραβινόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη, μαννόζη, ριβόζη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη αλλά ποικίλες είναι οι αντιδράσεις τους με την αμυγδαλίνη, κελλοβιόζη, λακτόζη, μαννιτόλη, μελεζιτόζη, ραφφινόζη, σαλικίνη και ξυλόζη (Bjorkroth et al., 2014a).

L. mesenteroides subsp. *dextranicum*

Τυπικά παράγεται δεξτράνη από τη σακχαρόζη, όμως λιγότερο ενεργά από τον *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, ενώ παρουσιάζει επίσης λιγότερο έντονο ζυμωτικό χαρακτήρα. Αναπτύσσονται μεταξύ 10-37°C (άριστη 20-30°C). Όλα τα στελέχη του υποείδους ζυμώνουν τα εξής σάκχαρα: γλυκόζη, φρουκτόζη, λακτόζη, μαλτόζη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη, ενώ δεν ζυμώνουν την αραβινόζη. Διαφοροποιήσεις ως προς τη ζύμωση παρατηρείται για την αμυγδαλίνη, κελλοβιόζη, γαλακτόζη, μαννιτόλη, μαννόζη, μελιβιόζη, ραφφινόζη, σαλικίνη και ξυλόζη (Bjorkroth et al., 2014a).

L. mesenteroides subsp. *cremoris*

Τα κύτταρα μπορεί να σχηματίζουν μακριές αλυσίδες. Παρουσιάζει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 18 και 25°C. Τα περισσότερα στελέχη δεν ζυμώνουν τη σακχαρόζη και σε σύγκριση με τα άλλα δυο υποείδη του *L. mesenteroides* ζυμώνει σχετικά λίγους υδατάνθρακες. Γενικά ζυμώνει την γλυκόζη και την λακτόζη, όχι όμως την αμυγδαλίνη, αραβινόζη, κελλοβιόζη, φρουκτόζη, μαννιτόλη, μαννόζη, μελιβιόζη, ραφφινόζη, σαλικίνη, σακχαρόζη, τρεχαλόζη και ξυλόζη. Η ζύμωση της γαλακτόζης και της μαλτόζης ποικίλλει μεταξύ των στελεχών (Bjorkroth et al., 2014a).

➤ *L. pseudomesenteroides*

Αναπτύσσεται μεταξύ 10-37⁰C. Όσον αφορά τη ζύμωση σακχάρων, δίνει θετική αντίδραση για τη φρουκτόζη, γλυκόζη, μαλτόζη, μαννόζη, μελιβιόζη, ραφφινόζη, ριβόζη, τρεχαλόζη, L- ξυλόζη και αρνητική για την D- αραβινόζη, μελεζιτόζη και ραμνόζη. Τα περισσότερα στελέχη ζυμώνουν επίσης την L- αραβινόζη, κελλοβιόζη, γαλακτόζη και σακχαρόζη (Bjorkroth et al., 2014a).

➤ *L. carnosum*

Αναπτύσσονται στους 10⁰C, αλλά τα περισσότερα στελέχη δεν αναπτύσσονται στους 37⁰C, ενώ από τα περισσότερα στελέχη παράγεται δεξτράνη από τη ζύμωση της σακχαρόζης. Παράγουν οξύ από τη φρουκτόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη, τρεχαλόζη και κάποια στελέχη κελλοβιόζη, μαλτόζη, μαννόζη, μελιβιόζη, ριβόζη και σαλικίνη. Δεν ζυμώνουν την αμυγδαλίνη, αραβινόζη, γαλακτόζη, λακτόζη, μαννιτόλη, μελεζιτόζη, ραφφινόζη, ραμνόζη, σορβιτόλη και ξυλόζη (Bjorkroth et al., 2014a).

➤ *L. gelidum*

Από μορφολογικής άποψης είναι ελλειπτικοί κόκκοι. Αναπτύσσονται στους 5⁰C, αλλά όχι στους 37⁰C. Παράγουν αέριο από τη ζύμωση της γλυκόζης ενώ δεν υδρολύουν την αργινίνη. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν (δεξτράνη) βλέννα από τη σακχαρόζη. Όλα τα στελέχη υδρολύουν την εσκουλίνη. Ζυμώνουν την L- αραβινόζη, κελλοβιόζη, D- φρουκτόζη, D- γλυκόζη, D-μαννόζη, μελιβιόζη, ραφφινόζη, σακχαρόζη, τρεχαλόζη και D- ξυλόζη. Δεν ζυμώνουν την D- αραβινόζη, γαλακτόζη, λακτόζη, μαννιτόλη, μελεζιτόζη και ραμνόζη. Η ζύμωση της αμυγδαλίνης, γαλακτόζης, μαλτόζης, ριβόζης και σαλικίνης, εξαρτάται από το στέλεχος (Rahkila et al., 2014; Bjorkroth, 2000; Shaw & Harding, 1989).

➤ *L. citreum*

Γενικά αναπτύσσεται στους 10 και 30⁰C, κάποια στελέχη αναπτύσσονται στους 37⁰C όχι όμως και στους 40⁰C. Ζυμώνει την D- φρουκτόζη, γλυκόζη, D- μαννόζη, μαλτόζη, σακχαρόζη, τρεχαλόζη, ενώ τα περισσότερα στελέχη ζυμώνουν και την αμυγδαλίνη, L- αραβινόζη, κελλοβιόζη, D- μαννιτόλη και σαλικίνη. Δεν ζυμώνει την D-αραβινόζη, λακτόζη, D- ξυλόζη, μελεζιτόζη, μελιβιόζη, ραφφινόζη, ριβόζη, L- ξυλόζη και L- ραμνόζη (Bjorkroth et al., 2014a).

3. Το γένος *Weissella*

Το νέο αυτό γένος δημιουργήθηκε από τον Collins και τους συνεργάτες του το 1993. Σ' αυτό συμπεριλήφθησαν ο *Leuconostoc paramesenteroides* και 5 είδη άτυπων ετεροζυμωτικών γαλακτοβακίλων: *Lb. viridescens*, *Lb. confusus*, *Lb. minor*, *Lb. kandleri* και *Lb. halotolerans* (οι οποίοι μετονομάστηκαν σε *W. viridescens*, *W. confusa*, *W. minor*, *W. kandleri* και *W. halotolerans* αντίστοιχα). Επιπλέον στο γένος αυτό συμπεριλήφθηκε και ένα νέο είδος με το όνομα *W. hellenica*, το οποίο απομονώθηκε από τον Collins και τους συνεργάτες του το 1993, από ελληνικό σαλάμι αέρος (Tsakalidou et al., 1997).

Πρόκειται γενικά για κοντά ραβδία με στρογγυλεμένα έως κωνικά άκρα ή κοκκοειδή σε σχήμα που απαντώνται κατά ζεύγη ή κοντές αλυσίδες. Είναι οξεοπαραγωγικά, αναπτύσσονται στους 15⁰C και όχι στους 45⁰C (με εξαίρεση κάποια στελέχη του *W. confusa*) (Collins et al., 1993). Για το είδος *W. halotolerans* έχει αναφερθεί καλή ανάπτυξη σε 12% NaCl και πολύ μικρή σε 14% NaCl, ενώ το είδος *W. paramesenteroides* είναι ανθεκτικό στο αλάτι και το όξινο pH (ανάπτυξη σε pH<5) (Bjorkroth et al., 2014b).

Σύμφωνα με την τρέχουσα ταξινόμηση το γένος περιλαμβάνει 4 φυλογενετικές ομάδες:

- 1) *W. hellenica*, *W. paramesenteroides* και *W. thailandensis*
- 2) *W. confusa* και *W. cibaria*
- 3) *W. minor*, *W. viridescens* και *W. halotolerans*
- 4) *W. kandleri*, *W. soli* και *W. koreensis* (Bjorkroth et al., 2014b).

Η διαφοροποίηση του γένους *Weissella* από το γένος *Leuconostoc* είναι αρκετά προβληματική και απαιτεί το συνδυασμό πολλών χαρακτηριστικών για το διαχωρισμό τους. Έτσι για παράδειγμα πολλά είδη όπως *W. confusa*, *W. halotolerans*, *W. kandleri* και *W. minor* μπορούν να διαχωριστούν από τα *Leuconostocs* από την ικανότητά τους να υδρολύουν την αργινίνη και το σχηματισμό DL- γαλακτικού οξέος. Τα είδη *W. paramesenteroides*, *W. hellenica* και *W. viridescens* παρουσιάζουν χαρακτηριστικά φαινοτυπικά προφίλ και μπορούν να ταυτοποιηθούν από μια σειρά βιοχημικών αναλύσεων. Για τον διαχωρισμό του γένους *Weissella* από τα μέλη της ομάδας *Leuconostoc sensu stricto* πιο αποτελεσματική αποδεικνύεται η εφαρμογή μοριακών τεχνικών όπως 16S rRNA (Collins et al., 1993).

Στον πίνακα 1.4 παρουσιάζονται τα κυριότερα χαρακτηριστικά των σημαντικότερων ειδών του γένους *Weissella*.

Πίνακας 1.4. Χαρακτηριστικά διαφοροποίησης ειδών του γένους *Weissella*.

χαρακτηριστικά	<i>W. kandleri</i>	<i>W. viridescens</i>	<i>W. minor</i>	<i>W. halotolerans</i>	<i>W. confusa</i>	<i>W. paramesenteroides</i>	<i>W. hellenica</i>
L-Αραβινόζη	-	-	-	-	-	d	+
Κελλοβιόζη	-	-	+	-	+	(d)	-
Γαλακτόζη	+	-	-	-	+	+	-
Μαλτόζη	-	+	+	+	+	+	+
Μελιβιόζη	-	-	-	-	-	+	-
Ραφφινόζη	-	-	-	-	-	d	-
Ριβόζη	+	-	+	+	+	NT	-
Σακχαρόζη	-	d	+	-	+	+	+
Τρεχαλόζη	-	d	+	-	-	+	+
Ξυλόζη	-	-	-	-	+	d	-
NH ₃	+	-	+	+	+	-	-
Δεξτράνη (βλέννα)	+	NT	-	NT	+	-	-
Ισομερές γαλακτικού οξέος	DL	DL	DL	DL	DL	D	D
Μορφολογία κυττάρων	Ασύμμετρα ραβδία	Μικρά ασύμμετρα ραβδία	Ασύμμετρα, κοντά κοκκοειδή ραβδία με στρογγυλεμένα έως κωνικά άκρα	Ασύμμετρα κοντά ή κοκκοειδή ραβδία	Κοντοί βάκιλοι με τάση να φαρδαινούν στο ένα άκρο	Σφαιρικά ή φακοειδή κύτταρα	Μεγάλα σφαιρικά ή φακοειδή κύτταρα

+ : 90% ή περισσότερα στελέχη θετικά, - : 90% ή περισσότερα στελέχη αρνητικά, **d** : 11-89% στελέχη θετικά, () : ασθενής αντίδραση, **D** : 90% ή περισσότερο γαλακτικό οξύ είναι D(-), **DL** : περισσότερο από 25% του συνολικού γαλακτικού οξέος είναι L(+), **NT** : δεν μελετήθηκε. **(Collins et al., 1993)**

1.3.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης και τον τύπο των γαλακτικών βακτηρίων

Τα γαλακτικά βακτήρια διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους να κυριαρχούν και τελικά να προκαλούν αλλοίωση στα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας (Samelis et al., 2000b). Τόσο ο ρυθμός ανάπτυξης όσο και ο τύπος των γαλακτικών βακτηρίων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες (Samelis et al., 2000a) όπως περιγράφονται παρακάτω.

1. Τη «χλωρίδα του εργοστασίου/χώρου επεξεργασίας» (Samelis et al., 2000a), ή περιβάλλον της κρεατοβιομηχανίας (Samelis et al., 2000b)

Τα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας επιμολύνονται στα στάδια που ακολουθούν τη θερμική επεξεργασία. Κατά την ψύξη η επιμόλυνση προέρχεται κυρίως από τον αέρα, ενώ κατά τη συσκευασία και τον τεμαχισμό, πηγές μόλυνσης αποτελούν το προσωπικό και ο εξοπλισμός. Επομένως είναι επιτακτική η ανάγκη διαχωρισμού των χώρων τεμαχισμού και συσκευασίας από τους χώρους στους οποίους χειρίζονται πρώτες ύλες και ζυμούμενα αλλαντικά. Επιπλέον απαραίτητη προϋπόθεση είναι η τήρηση των κανόνων υγιεινής του προσωπικού και ο αποτελεσματικός καθαρισμός και η εξυγίανση του εξοπλισμού (Korkeala & Björkroth, 1997). Ενδεικτικά αναφέρεται η επιμόλυνση κατά το στάδιο του τεμαχισμού αλλαντικών (πάριζα, μπέικον, λουκάνικα Φρανκφούρτης κ.α.) με 10^3 cfu/g ολικά βακτήρια- κυρίως γαλακτικά βακτήρια (Samelis et al., 2000a). Επίσης επιμόλυνση μετά τη θερμική επεξεργασία και συγκεκριμένα στο χώρο τεμαχισμού διαπιστώθηκε κατά την παραγωγή βραστής και καπνιστής γαλοπούλας (Samelis et al., 2000b) όπως επίσης και βραστού ζαμπόν σε φέτες (Samelis et al., 1998a).

2. Τον τύπο/σύσταση του προϊόντος (Samelis, 2006) και τη μέθοδο παραγωγής/επεξεργασίας (Samelis et al., 2000b)

Ενδογενείς παράγοντες όπως η υγρασία και το περιεχόμενο αλάτι επιδρούν καθοριστικά στη γαλακτική χλωρίδα των αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας. Αλλαντικά που παρασκευάζονται από ολόκληρα τεμάχια κρέατος (ζαμπόν, γαλοπούλα, μπέικον και χοιρινό φιλέτο) χαρακτηρίζονται από υψηλότερη υγρασία και χαμηλότερο περιεχόμενο άλατος και για τον λόγο αυτό παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων, με τα είδη που κυριαρχούν να είναι ο *Leuc. mesenteroides* και ο *Leuc.*

carnosum. Αντίθετα αλλαντικά τύπου γαλακτώματος όπως πάριζα, μορταδέλα και λουκάνικα Φρανκφούρτης, περιέχουν χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας και υψηλότερο ποσοστό χλωριούχου νατρίου και παρουσιάζουν μια πιο ποικίλη γαλακτική χλωρίδα στην οποία κυριαρχούν στελέχη της ομάδας *L. sakei/curvatus* (Samelis et al., 2000a).

Σημαντική είναι και η επίδραση του νιτρώδους νατρίου στον τύπο των γαλακτικών βακτηρίων που επιλέγονται. Σύμφωνα με παλαιότερες ερευνητικές εργασίες διαπιστώθηκε πως τα είδη *Leuconostoc*, που απομονώθηκαν από συσκευασμένα υπό κενό λουκάνικα θερμικής επεξεργασίας, είναι πιο ευαίσθητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις νιτρώδους νατρίου και χλωριούχου νατρίου, συγκρινόμενα με τους ομοζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους. Επιπλέον μεταξύ της ομάδας *L. sakei/curvatus* μεγαλύτερη ευαισθησία παρουσιάζει ο *L. curvatus* (Korkeala et al., 1992).

Η μέθοδος επεξεργασίας επηρεάζει καθοριστικά τον ρυθμό ανάπτυξης και το είδος των γαλακτικών βακτηρίων που επιλέγονται. Η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων ήταν πιο καθυστερημένη σε καπνιστά προϊόντα (καπνιστό χοιρινό, πάριζα, μορταδέλα, μπέικον και λουκάνικα Φρανκφούρτης) στα οποία η θερμική επεξεργασία πραγματοποιείται σε φούρνους μέχρις ότου επιτευχθεί θερμοκρασία πυρήνα 72-74⁰C. Αντίθετα στα αλλαντικά από τεμάχια κρέατος (ζαμπόν και φιλέτο γαλοπούλας) η θερμική επεξεργασία πραγματοποιείται σε ατμολέβητες ή βραστήρες (θερμοκρασία πυρήνα 68-70⁰C). Το θερμό κάπνισμα επιβραδύνει την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων εξαιτίας των παρεμποδιστικών ουσιών του καπνού και επιπλέον ενισχύει την ξήρανση της επιφάνειας του προϊόντος. Σε όλα τα καπνιστά αλλαντικά απομονώθηκε *W. viridescens* (Samelis et al., 2000a). Αυξημένη ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων επιβεβαιώθηκε εκ νέου από τους Samelis et al. 2000b, σε φέτες βραστής γαλοπούλας, συγκρινόμενη με καπνιστή γαλοπούλα. Ο *L. sakei* subsp. *carnosus* κυριάρχησε στην αλλοιογόνο χλωρίδα των καπνιστών προϊόντων τα οποία ανέπτυξαν μια ήπια, όξινη γεύση αλλοίωσης, ύστερα από 4 εβδομάδες συντήρησης υπό κενό στους 4⁰C. Αντίθετα στη βραστή γαλοπούλα κυριάρχησε ο *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Η χλωρίδα αλλοίωσης των προϊόντων αυτών ήταν πιο ποικίλη και περιελάμβανε είδη όπως *L. sakei*, *W. viridescens* και μια άτυπη ομάδα “*Leuconostoc* like” βακτηρίων. Η αλλοίωση ήταν ταχύτερη (μετά από 2 εβδομάδες συντήρησης στους 4⁰C) και παρατηρήθηκε διόγκωση της συσκευασίας, ανάπτυξη έντονης όξινης οσμής και γεύσης και άφθονη βλέννα. Επιπλέον επιβεβαιώθηκε και η σημαντική συμβολή της εφαρμοζόμενης θερμοκρασίας κατά τη θερμική επεξεργασία των αλλαντικών (θερμοκρασία πυρήνα 72-74⁰C για τα καπνιστά και 70⁰C ή χαμηλότερη για τα βραστά

προϊόντα) δικαιολογώντας την επιβίωση της θέρμανσης βακτηρίων πιο συχνά στα μη καπνιστά αλλαντικά (**Samelis et al., 2000b**).

Όσον αφορά την θερμοανθεκτικότητα των γαλακτικών βακτηρίων, από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε στελέχη γαλακτικών βακτηρίων από αλλοιωμένα λουκάνικα τύπου Βιέννης, διαπιστώθηκε πως ο *L. sakei* είναι ο πλέον θερμοανθεκτικός και ακολουθούν οι *Leuc. mesenteroides* και *L. curvatus* (**Franz & von Holy, 1996**).

3. Τη θερμοκρασία συντήρησης

Στα συσκευασμένα υπό κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα προϊόντα κρέατος η ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων κυριαρχεί ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας ψύξης που εφαρμόζεται. Η παράμετρος που μεταβάλλεται είναι ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων (κατ' επέκταση και ο ρυθμός αλλοίωσης των προϊόντων αυτών), ο οποίος και αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης (**Samelis et al., 1998a; Samelis & Georgiadou, 2000; Borch et al., 1996; Zurea-Cosano et al. 1988; Korkeala & Björkroth 1997**).

Υψηλότερος ρυθμός ανάπτυξης γαλακτικών βακτηρίων παρατηρήθηκε σε ελληνικά λουκάνικα τύπου «χωριάτικα» (tavern sausages), όταν τα προϊόντα αυτά συντηρήθηκαν στους 10⁰C αντί στους 4⁰C (**Samelis & Georgiadou, 2000**). Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και σε συσκευασμένο υπό κενό βραστό ζαμπόν σε φέτες που συντηρήθηκε σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες 4 και 12⁰C. Ύστερα από 12-14 ημέρες συντήρησης στους 12⁰C η συσκευασία των αλλαντικών είχε αρχίσει να χάνει την ακεραιότητά της και επιπλέον υπήρχε άφθονη, ορατή βλέννα. Αντίθετα στους 4⁰C η αλλοίωση ήταν λιγότερο έντονη και πιο καθυστερημένη. Τα αλλαντικά ήταν ακατάλληλα προς κατανάλωση ύστερα από 18 ημέρες στους 12⁰C και 40 ημέρες στους 4⁰C. Όσον αφορά το είδος των γαλακτικών βακτηρίων, βρέθηκε πως ο *L. sakei* αναπτύσσεται ταχύτερα στους 4⁰C ενώ ο *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ήταν πιο ανταγωνιστικός στους 12⁰C. Ωστόσο κατά την παρατεταμένη συντήρηση, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση των απομονώσεων *L. sakei* και για τις δύο θερμοκρασίες, πιθανόν λόγω της μεγαλύτερης ανθεκτικότητας των ειδών αυτών στο οξύ (**Samelis et al., 1998a**).

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη συμβολή των αυστηρά ψυχρότροφων γαλακτικών βακτηρίων στην αλλοίωση των τροφίμων. Απαιτείται διαχωρισμός των μεσόφιλων ειδών που εγκλιματίζονται σε χαμηλές θερμοκρασίες (cold-acclimatized) (*L. sakei*, *L. curvatus*, *Leuc. carnosum*, *Leuc. mesenteroides*, *Carnobacterium* spp. και *Weissela* spp.) και των αυστηρά ψυχρότροφων γαλακτικών

βακτηρίων (*Leuc. gelidum* subsp *gelidum*, *Leuc. gelidum* subsp. *gasicomitatum*, *Leuc. gelidum* subsp. *aenigmaticum*, *L. algidus*, *L. fuchuensis* και *Lc. piscium*). Στη Φινλανδία, ήδη από το 1990, η Σκανδιναβική Επιτροπή Ανάλυσης Τροφίμων είχε συστήσει για την απαρίθμηση των γαλακτικών βακτηρίων χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης (20-25⁰C). Αντίθετα το πρότυπο ISO 13721:1995 ορίζει ως θερμοκρασία επώασης τους 30⁰C, οδηγώντας σε μεγάλη απόκλιση ως προς τον αριθμό των γαλακτικών βακτηρίων εξαιτίας των αυστηρά ψυχρότροφων ειδών (**Pothakos et al., 2015**). Σε μελέτη που περιελάμβανε διάφορα τρόφιμα της αγοράς του Βελγίου (έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες λαχανικών, φρέσκο κρέας, προϊόντα κρέατος θερμικής επεξεργασίας και σύνθετα τρόφιμα), διαπιστώθηκε πως παρά την ποικιλομορφία των χαρακτηριστικών των οικοσυστημάτων των τροφίμων, κοινό γνώρισμα τους ήταν η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης (4 και 7⁰C) και η τεχνολογία συσκευασίας (χαμηλή διαθεσιμότητα σε οξυγόνο), τα οποία σε συνδυασμό οδηγούν στην ανάπτυξη πολύ συγκεκριμένων ομάδων βακτηρίων. Όλα τα γαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν αναπτύσσονταν στους 22⁰C, όμως στην πλειονότητά τους (73%) δεν αναπτύσσονταν στους 30⁰C. Η ταξινόμησή τους με τη μέθοδο PCR (αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης) έδειξε πως η πλειονότητα των απομονώσεων ανήκε σε ψυχρότροφα μέλη των ειδών *L. gasicomitatum*, *L. gelidum* και *Lc. piscium* (**Pothakos et al., 2014**).

4. Τη μέθοδο συσκευασίας

Η συσκευασία υπό κενό αυξάνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων όταν χρησιμοποιούνται υλικά συσκευασίας με χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο, παρεμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό την ανάπτυξη αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών (**Korkeala & Björkroth, 1997**). Όσον αφορά τη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, αυξημένες συγκεντρώσεις CO₂ σε συνδυασμό με χλωριούχο νάτριο σε επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων, καθώς η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων επιβραδύνεται ενώ άλλα αλλοιογόνα βακτήρια και ζύμες αναστέλλονται. Γενικά όσο υψηλότερη η συγκέντρωση O₂ εντός της συσκευασίας ή υψηλότερη η διαπερατότητα σε O₂ του φιλμ συσκευασίας, τόσο ταχύτερη η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων και τόσο πιο ποικίλη η σύνθεση της χλωρίδας αλλοίωσης εξαιτίας της ταυτόχρονης ανάπτυξης άλλων αλλοιογόνων βακτηρίων (*B. thermosphacta*, *Staphylococci*, *Enterobacteria*, ζύμες) (**Samelis, 2006**). Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση

επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος όταν αυτά συσκευάζονται στον αέρα ή σε υψηλή συγκέντρωση O₂ υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ή κάτω από ανεπαρκές κενό, λόγω ατελούς απομάκρυνσης του αέρα από τη συσκευασία ή λανθασμένης σφράγισης των περιεκτών κενού (Samelis, 2006).

Σε αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας (ζαμπόν και αλλαντικά Φρανκφούρτης) βρέθηκε πως η ανάπτυξη γαλακτικών βακτηρίων ήταν ταχύτερη όταν τα προϊόντα συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες απ' ότι όταν συσκευάστηκαν υπό κενό (Samelis et al., 2000a). Επίσης σε χωριάτικα λουκάνικα (tavern sausages) η συντήρηση στον αέρα αποδείχθηκε η χειρότερη μέθοδος συντήρησης. Τα αλλαντικά εμφάνισαν δυσάρεστη οσμή και το χρώμα τους μετατράπηκε σε φαιό/πράσινο, αλλοιώσεις που σχετίζονται με το υψηλό περιεχόμενο σε οξικό οξύ των λουκάνικων. Η ατμόσφαιρα 100% CO₂ δεν είχε σημαντική επίδραση στην παράταση του χρόνου συντήρησης σε σύγκριση με τη συσκευασία υπό κενό (Samelis & Georgiadou, 2000).

Στον πίνακα 1.5., που ακολουθεί, παρουσιάζονται τα είδη γαλακτικών βακτηρίων που επιλέγονται συναρτήσει της μεθόδου συντήρησης αλλαντικών.

Πίνακας 1.5. Είδη γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας τα οποία συντηρήθηκαν υπό ψύξη (4°C) υπό διαφορετικές μεθόδους συσκευασίας (αερόβια, υπό κενό και τροποποιημένη ατμόσφαιρα).

	ZAMΠION	ΑΛΛΑΝΤΙΚΑ ΦΡΑΝΚΦΟΥΡΤΗΣ	ΧΩΡΙΑΤΙΚΑ ΛΟΥΚΑΝΙΚΑ
ΑΕΡΑΣ	50% <i>Leuc. carnosum</i> 10% <i>Leuc. gelidum</i> 20% <i>Leuc. mesenteroides</i> sbsp. <i>dextranicum</i> 20% <i>W. minor</i>	35% <i>L. sakei/curvatus</i> 35% <i>Leuc. mesenteroides</i> sbsp. <i>mesenteroides</i> , 15% <i>Leuc. citreum</i> 5% <i>Leuc. gelidum</i> 10% <i>W. viridescens</i>	86% <i>L. sakei/curvatus</i> 14% <i>Leuc. mesenteroides</i> sbsp. <i>mesenteroides</i>
KENO	80% <i>Leuc. mesenteroides</i> sbsp. <i>mesenteroides</i> 10% <i>Leuc. carnosum</i> 10% <i>W. minor</i>	70% <i>L. sakei/curvatus</i> 20% <i>Leuc. mesenteroides</i> sbsp. <i>mesenteroides</i> , 5% <i>Leuc. citreum</i> 5% <i>W. viridescens</i>	92% <i>L. sakei/curvatus</i> 4% <i>Leuc. mesenteroides</i> sbsp. <i>mesenteroides</i> 4% <i>W. paramesenteroides</i>
MAP (100% CO₂)	-	-	96% <i>L. sakei/curvatus</i> 4% <i>Leuc. mesenteroides</i> sbsp. <i>mesenteroides</i>
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Samelis et al., 2000a	Samelis et al., 2000a	Samelis & Georgiadou, 2000

5. Το στάδιο της επεξεργασίας

Οι τύποι γαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται κατά την παραγωγή αλλαντικών πριν το στάδιο της θερμικής επεξεργασίας δεν είναι απαραίτητα όμοιοι με εκείνους που επιμολύνουν το προϊόν στα στάδια που ακολουθούν τη θερμική επεξεργασία (αποφλοιώση, τεμαχισμός, συσκευασία).

Οι **Samelis et al. (1998)**, μελέτησαν τις μεταβολές τόσο των πληθυσμών όσο και των τύπων των μικροβίων καθ' όλη τη γραμμή παραγωγής βραστού ζαμπόν. Σκοπός ήταν να προσδιορισθεί η σύσταση και η προέλευση της αλλοιογόνου χλωρίδας του προϊόντος. Στα αρχικά στάδια επεξεργασίας όπως το στάδιο της νίτρωσης/αλάτισης και της επακόλουθης μάλαξης του νωπού χοιρινού κρέατος, ο *L. sakei* και ο *Leuc. mesenteroides* δεν απομονώνονταν σε υψηλούς πληθυσμούς, ενώ αντίθετα κυριαρχούσαν τα *carnobacteria* κυρίως *Carn. divergens* και ο *B. thermosphacta*. Παρατηρήθηκε μια μεταστροφή της μικροχλωρίδας από αρνητικά κατά Gram βακτήρια στα αρχικά στάδια, σε θετικά κατά Gram βακτήρια πριν τη θερμική επεξεργασία. Η επικράτηση των *L. sakei* και *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* στο τελικό προϊόν ήταν αποτέλεσμα επιμόλυνσης στο τμήμα τεμαχισμού (**Samelis et al., 1998a**).

Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και κατά την παραγωγή βραστής γαλοπούλας, όπου στα αρχικά στάδια κυριάρχησαν επίσης τα *carnobacteria* (κυρίως *Carn. maltaromaticum*) και ο *B. thermosphacta*. Η απουσία τους από το συσκευασμένο υπό κενό προϊόν κατά τη συντήρηση στους 4⁰C, οφείλεται είτε στην πλήρη αδρανοποίησή τους κατά τη θερμική επεξεργασία, είτε στην ανικανότητά τους να ανταγωνιστούν τα γαλακτικά βακτήρια (κυρίως *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) που επιμόλυναν το προϊόν κατά το στάδιο του τεμαχισμού (**Samelis et al., 2000b**).

1.3.5. Είδη αλλοιώσεων που προκαλούνται από τα γαλακτικά βακτήρια

Η μεταβολική δραστηριότητα των LAB οδηγεί σε ελαττώματα παρόμοια με εκείνα που συμβαίνουν στο φρέσκο κρέας, όμως τα ελαττώματα μπορεί να είναι πιο έντονα εξαιτίας της προσθήκης, στην κρεατόμαζα των επεξεργασμένων κρεάτων, υδατανθράκων (γλυκόζη, σακχαρόζη, μαλτοδεξτρίνες, άμυλο πατάτας, αποβουτυρωμένου γάλακτος κλπ.) και άλλων ενισχυτικών συστατικών (πχ. μπαχαρικών) που ευνοούν την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων (**Samelis, 2006**). Έτσι η μεταβολική δραστηριότητα των γαλακτικών βακτηρίων μπορεί να οδηγήσει όχι μόνο σε οξίνιση (παραγωγή γαλακτικού

κυρίως οξέος από τη ζύμωση της γλυκόζης και επιπλέον οξικού οξέος, μυρμηγκικού οξέος, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα), αλλά και σε ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών και γεύσεων (παραγωγή πτητικών ενώσεων από το μεταβολισμό των αμινοξέων κατά την αναερόβια συντήρηση). Επίσης και άλλοι τύποι αλλοίωσης παρατηρούνται στα προϊόντα κρέατος θερμικής επεξεργασίας όπως ο σχηματισμός βλέννας, η παραγωγή υδρόθειου, όπως επίσης και η παραγωγή βιογενών αμινών.

Η ανάπτυξη ειδών *Leuconostoc* και *Carnobacteria* ευνοείται από το υψηλό pH του κρέατος και από την παρουσία των νιτροδών αλάτων. Μέσω μοριακών τεχνικών (ribotyping) έχει παρατηρηθεί ότι διάφορα στελέχη που απαντώνται σε μονάδες παραγωγής είναι ικανά να προκαλέσουν αλλοίωση, όμως αυτό δεν ισχύει για όλα τα στελέχη. Επίσης δεν είναι όλα τα στελέχη του *Leuc. carnosum* σε ζαμπόν ικανά να οδηγήσουν σε απόρριψη του προϊόντος. Παρόμοια ποικιλομορφία παρατηρείται και μεταξύ των στελεχών του *Leuc. gasicomitatum*.

Σε συσκευασμένα υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα προϊόντα κρέατος θερμικής επεξεργασίας τα *Leuconostocs* αποτελούν την κύρια ανησυχία και συγκεκριμένα τα *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* και *Leuc. carnosum*. Επίσης σχετικά πρόσφατα ο *Leuc. gasicomitatum* αναγνωρίστηκε ως αλλοιογόνος μικροοργανισμός των προϊόντων αυτών. Τα *Leuconostocs* σχετίζονται με απόρριψη του προϊόντος εξαιτίας της παραγωγής ετεροζυμωτικών τελικών προϊόντων όπως οξικού οξέος και αιθανόλης ως αποτέλεσμα της ζύμωσης της γλυκόζης. Επίσης παράγουν πτητικές ενώσεις από τον καταβολισμό των αμινοξέων (αλδεΐδες, φαινόλες, αλκοόλες και αμμωνία) και δεξτράνη (σχηματισμός βλέννας) στο κρέας. Η παραγωγή αερίου (CO₂) είναι κυρίως αποτέλεσμα του μεταβολισμού της γλυκόζης ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις προέρχεται από τον μεταβολισμό των αμινοξέων (αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων). Αλλοίωση οφειλόμενη σε αέριο και βλέννα από *Leuconostocs* έχει παρατηρηθεί πχ. σε λουκάνικα Βιέννης και βραστό ζαμπόν. (Vasilopoulos et al., 2015)

Παρακάτω περιγράφονται οι κυριότερες αλλοιώσεις που οφείλονται στα γαλακτικά βακτήρια

➤ Οξίνιση

Τα γαλακτικά βακτήρια παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ κατά τη λογαριθμική φάση- και συγκεκριμένα κατά τη στατική φάση ανάπτυξής τους (Korkeala & Bjorkroth, 1997; Iulietto et al, 2015). Τα πιο κοινά γαλακτικά βακτήρια στα οποία αποδίδεται η όξινη αλλοίωση σε προϊόντα κρέατος θερμικής επεξεργασίας είναι *L. sakei*,

L. curvatus και *Leuc. mesenteroides*. Γενικά τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια όπως τα *Leuconostocs* παρουσιάζουν μικρότερη ικανότητα οξίνισης σε σύγκριση με τα ομοζυμωτικά και/ή προαιρετικά ετεροζυμωτικά όπως ο *L. sakei*. Τα τελευταία χρόνια ο *L. sakei* και ο *L. curvatus* θεωρούνται τα κύρια αλλοιογόνα γαλακτικά βακτήρια σε προϊόντα κρέατος θερμικής επεξεργασίας. Ο *L. sakei* παρουσιάζει ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα, καθώς μπορεί να προσαρμόζεται στο κρέας και τις χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, ενώ η ικανότητά του να αναπτύσσεται σε επιφάνειες με χαμηλές τιμές a_w τον καθιστά ανθεκτικό στη διαδικασία του καπνίσματος των συγκεκριμένων προϊόντων (**Vasilopoulos et al., 2015**). Σύμφωνα με ερευνητικά αποτελέσματα, καθώς οι πληθυσμοί των γαλακτοβακίλων φτάνουν τους 5×10^7 cfu/g στο επιφανειακό στρώμα λουκάνικων θερμικής επεξεργασίας η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος αυξάνεται σημαντικά. Το όξινο άρωμα/οσμή και γεύση είναι τα κύρια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ως αποτέλεσμα της αλλοίωσης των υπό κενό συσκευασμένων λουκάνικων θερμικής επεξεργασίας. Έχει βρεθεί ότι η υποβάθμιση αυτών των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε cooked ring sausages συμβαίνει όταν οι γαλακτοβάκλιοι φτάσουν 1.4×10^7 cfu/g, ενώ σε τιμές 10^7 - 10^8 cfu/g τα προϊόντα κρίνονται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση. Επιπλέον το pH από μια αρχική τιμή 6.3 μειώνεται ισχυρά καθώς οι πληθυσμοί των γαλακτοβακίλων φτάνουν 6×10^7 cfu/g και σε τιμές κάτω από 5.8- 5.9 το προϊόν θεωρείται αλλοιωμένο. Τιμές από 4.6-5.5 ανευρίσκονται μόνο όταν τα λουκάνικα είναι ιδιαιτέρως αλλοιωμένα. Σε συσκευασμένα υπό κενό λουκάνικα Βιέννης οι τιμές pH μειώθηκαν από 6.1 (μη αλλοιωμένα δείγματα) σε 4.8-4.6 (αλλοιωμένα δείγματα), ενώ σε συσκευασμένα υπό κενό λουκάνικα Φρανκφούρτης παρατηρήθηκαν μικρές μόνο μειώσεις στην τιμή pH. Στους 2°C η αλλοίωση δεν θεωρείται πάντα μικροβιολογική και τα λουκάνικα θεωρούνται αλλοιωμένα χωρίς κάποια αξιοσημείωτη αύξηση στους μικροβιακούς πληθυσμούς. Στις περιπτώσεις αυτές τα δείγματα αναπτύσσουν μια οσμή και γεύση μπαγιάτικου/μούχλας και όχι όξινη οσμή/γεύση (**Korkeala & Bjorkroth, 1997**).

➤ Σχηματισμός αερίου

Το συσκευασμένο υπό κενό κρέας και τα προϊόντα κρέατος μπορεί να επηρεαστεί από την επονομαζόμενη αποκόλληση της συσκευασίας, αλλοίωση η οποία χαρακτηρίζεται από συσσώρευση υψηλών ποσοτήτων αερίων, οσμή σήψης, παρουσία εξιδρωμάτων, εκτεταμένη πρωτεόλυση και μεταβολές του pH και του χρώματος. Ο τύπος αυτός υποβάθμισης των προϊόντων οφείλεται σε ψυχρόφιλα και ψυχρότροφα βακτήρια. Εκτός των ειδών *Clostridium* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων αερίων,

τα γαλακτικά βακτήρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή πτητικών οργανικών ενώσεων που ανευρίσκονται στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας αλλοιωμένου κρέατος (Julietto et al., 2015). Η συγκέντρωση CO₂ που ανευρίσκεται στις συσκευασίες κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αποδίδεται σε μεταβολικά υποπροϊόντα των ετεροζυμωτικών γαλακτοβακίλων και *Leuconostocs*. Οι συσκευασίες χάνουν την ακεραιότητά τους εξαιτίας του σχηματισμού αερίου. Η συγκέντρωση CO₂ σε συσκευασία κενού έχει βρεθεί ότι αρχικά είναι σταθερή κάτω από 10%, αλλά αυξάνει έντονα σε 40-60% καθώς οι γαλακτοβάκλιοι ξεπερνούν τους 6.4x10⁶ cfu/g (Korkeala & Bjorkroth, 1997).

➤ Βλέννα και φαιό/γκρι υγρό

Ο σχηματισμός βλέννας συνδέεται άμεσα με τη δράση συγκεκριμένων όμο- ή ετεροζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων που ανήκουν στα είδη *Lactobacillus* και *Leuconostoc* και η παρουσία σακχαρόζης είναι υπεύθυνη για την παραγωγή βλέννας. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι στελέχη που παράγουν δεξτράνη μπορεί να είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από άλλα στελέχη του ίδιου είδους, ευνοώντας την αλλοίωση κάτω από συνθήκες ελλιπούς θερμικής επεξεργασίας (Vasilopoulos et al., 2015). Σύμφωνα με ερευνητικές εργασίες έχει παρατηρηθεί συσσώρευση βλέννας και γαλακτώδους υγρού εντός της συσκευασίας λουκάνικων κατά τη συντήρηση υπό κενό. Σε πολλές περιπτώσεις η βλέννα είναι σχοινώδης και το προϊόν κρίνεται ακατάλληλο. Η ποσότητα του οπού στις συσκευασίες αυξάνεται με τον χρόνο συντήρησης και το γαλακτικό οξύ που σχηματίζεται μεταβάλλει την εμφάνιση του οπού από λευκό σε φαιό. Ο μέσος μέγιστος όγκος εξιδρώματος ανά κιλό λουκάνικων έχει βρεθεί να είναι 35 ml (Korkeala & Bjorkroth, 1997).

➤ Σχηματισμός σχοινώδους βλέννας

Ο σχηματισμός βλέννας οφείλεται στην απέκκριση από τα γαλακτικά βακτήρια μεγάλης αλυσίδας, υψηλής μοριακής μάζας ιξωδών ή σε μορφή γέλης εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών στο περιβάλλον. Οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες ή εξωπολυσακχαρίτες (Exopolysaccharides-EPS) είναι πολυσακχαρίτες που εκκρίνονται εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος του μικροοργανισμού που τους παράγει. Τα γαλακτικά βακτήρια συνθέτουν μια μεγάλη γκάμα EPS: η σύνθεση μπορεί να συμβαίνει εξωκυτταρικά από τη σακχαρόζη μέσω των ενζύμων γλυκαν- σουκράσες (glucansucrases) ή ενδοκυτταρικά από νουκλεοτιδικά σάκχαρα μέσω των ενζύμων γλυκοζυλ- τρανφεράσες (glucosyltransferases). Δυο μορφές EPS παράγονται από τα γαλακτικά βακτήρια:

ενθλακωμένοι -capsular polysaccharides (CPS) όταν παραμένουν προσκολλημένοι στα κύτταρα και εξωπολυσακχαρίτες -exopolysaccharides (EPS) όταν δεν είναι προσκολλημένοι στα κύτταρα αλλά απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Με βάση τη σύνθεσή τους διαχωρίζονται σε ετεροπολυσακχαρίτες (συντίθενται από διαφορετικούς μονοσακχαρίτες όπως γαλακτόζη, γλυκόζη και ραμνόζη) και ομοπολυσακχαρίτες (αποτελούνται μόνο από έναν τύπο μονοσακχαρίτη, είτε γλυκόζη/γλυκάνες είτε φρουκτόζη/φρουκτάνες) (Iulietto et al., 2015). Η σχοινώδης βλέννα σχηματίζει μακριές, μη επιθυμητές ίνες από πολυσακχαρίτες μεταξύ των λουκάνικων ή ανάμεσα στις φέτες λουκάνικου κάνοντας την εμφάνιση σαφώς διαφορετική από μια βλενώδη βακτηριακή μάζα. Πολλά περιστατικά σχηματισμού σχοινώδους βλέννας σε συσκευασμένα υπό κενό λουκάνικα θερμικής επεξεργασίας παρατηρήθηκαν στην Φινλανδία κατά τη δεκαετία του 1980. Η αλλοίωση είναι εμφανής πριν την ημερομηνία λήξης του προϊόντος, όταν τα βακτήρια βρίσκονται ακόμη στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης και πριν μειωθεί το pH του προϊόντος (Korkeala & Bjorkroth, 1997).

Πέντε είδη γαλακτικών βακτηρίων έχουν βρεθεί να προκαλούν τον τύπο αυτό αλλοίωσης με βάση τεχνικές ανάλυσης του DNA. Οι τέσσερις από αυτές τις ομάδες περιέχουν στελέχη του *L. sakei*, ενώ μόνο ένα στέλεχος *Leuc. gelidum* (Korkeala & Bjorkroth, 1997). Τα στελέχη του *L. sakei* είναι αυτά που συνεισφέρουν πιο σημαντικά στο σχηματισμό σχοινώδους βλέννας (Korkeala & Bjorkroth, 1997; Dykes & von Holy, 1994) και η επιμόλυνση από ζυμούμενα αλλαντικά μπορεί να αποτελέσει σημαντικό πρόβλημα για τη βιομηχανία. Σε ελληνική βιομηχανία κρέατος οι Samelis και Georgiadou, (2000) παρατήρησαν μια φυσική επιλογή στελεχών *L. sakei* που δεν παράγουν βλέννα σε σαλάμι αέρος και λουκάνικα τύπου χωριάτικα (tavern sausages). Τα ποσοστά στελεχών του εν λόγω βακτηρίου που παρήγαγαν βλέννα ήταν της τάξης του 13 και 35% αντίστοιχα. Αντίθετα η συχνότητα απομόνωσης στελεχών *L. sakei* που παράγει βλέννα από βραστό ζαμπόν σε φέτες άλλης ελληνικής βιομηχανίας ήταν πολύ μεγαλύτερης τάξης του 72% (Samelis & Georgiadou, 2000).

Τα στελέχη που παράγουν σχοινώδη βλέννα δεν επιβιώνουν της θερμικής επεξεργασίας σε θερμοκρασία πυρήνα 68°C, αλλά προέρχονται από επιμόλυνση στα στάδια που ακολουθούν τη θερμική επεξεργασία (ψύξη, αποφλοίωση, τεμαχισμό και συσκευασία) (Korkeala & Bjorkroth, 1997).

Σύμφωνα με νεότερα ερευνητικά δεδομένα έχει διαπιστωθεί πως είδη *Leuconostoc* και κάποια στελέχη του είδους *Lactobacillus* συνθέτουν γλυκάνες ή φρουκτάνες από τη

σακχαρόζη (Julietto et al., 2015). Σε συσκευασμένα σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα προϊόντα κρέατος θερμικής επεξεργασίας ο σχηματισμός σχοινώδους βλέννας αποδίδεται σε γαλακτικά βακτήρια όπως *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. amelibiosum* και *L. sakei*. Η επικράτηση στελεχών *Leuconostoc* σε μη καπνιστά προϊόντα κρέατος έχει επιβεβαιωθεί με μοριακές τεχνικές. Σύμφωνα με άλλα ερευνητικά αποτελέσματα σε βραστό ζαμπόν έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί δυο διαφορετικοί τύποι *Leuc. carnosum* ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης (Vasilopoulos et al., 2015). Παρόλα αυτά ο σχηματισμός σχοινώδους βλέννας δεν αποτρέπεται από την απουσία σακχαρόζης από τα προϊόντα κρέατος. Αρκετοί διαφορετικοί ετεροπολυσακχαρίτες εκκρίνονται από γαλακτικά βακτήρια ανάλογα με τη σύσταση σε σάκχαρα και το μοριακό βάρος (Julietto et al., 2015).

1.4. Χρησιμοποιούμενες και αναδυόμενες τεχνολογίες για τον έλεγχο της αλλοίωσης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος

Για την παραγωγή ασφαλών και καλής ποιότητας επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος είναι απαραίτητη η εφαρμογή προγραμμάτων GMP, GHP και GSP όπως επίσης και HACCP. Η μικροβιολογική σταθερότητα των περισσότερων από αυτά τα προϊόντα καθορίζεται από τη θερμική επεξεργασία και το στάδιο της νίτρωσης/αλάτισης, ενώ το κάπνισμα και η αφυδάτωση που εφαρμόζεται σε πολλούς τύπους προϊόντων συνεισφέρουν περαιτέρω στην παράταση του χρόνου συντήρησης των προϊόντων. Όμως τόσο η έρευνα όσο και η εμπειρία έχουν δείξει ότι τα προγράμματα GMP και τα αυστηρά μέτρα υγιεινής κατά την αποφλοίωση ή τον τεμαχισμό δεν είναι ικανά να διασφαλίσουν πλήρη αποφυγή της μόλυνσης μετά τη θερμική επεξεργασία, με συγκεκριμένα αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια όπως τα γαλακτικά βακτήρια και η *L. monocytogenes*. Για το λόγο αυτό απαιτείται να εισαχθούν επιπρόσθετα εμπόδια κατά τη συσκευασία και να δράσουν σ' αυτό το στάδιο ή εντός της συσκευασίας για τον έλεγχο της αλλοίωσης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος και πουλερικών (Samelis, 2006). Εφαρμογές στα προϊόντα κρέατος με εμπόδια τα οποία είναι εκτενέστερα μελετημένα και υποσχόμενα παρουσιάζονται πιο κάτω.

1.4.1. Φυσικά αντιμικροβιακά

1.4.1.1. Οργανικά οξέα και άλατα αυτών

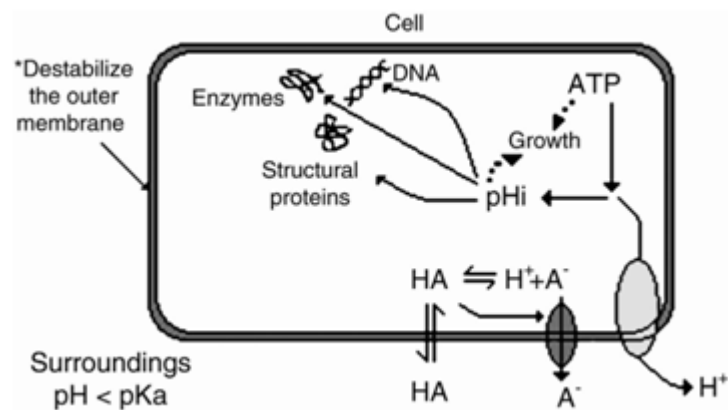
Η προσθήκη οργανικών οξέων ή αλάτων αυτών ως συντηρητικά σε υψηλού pH επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος και πουλερικών έχει μελετηθεί εκτενώς και πολυάριθμες εμπορικές εφαρμογές έχουν προταθεί. Η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη χρήση γαλακτικού νατρίου ή γαλακτικού καλίου, οξικού νατρίου, διοξικού νατρίου και σορβικού καλίου ή βενζοϊκού καλίου προκειμένου να αναστείλουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* κατά τη συντήρηση υπό ψύξη συσκευασμένων υπό κενό έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων κρέατος. Η επιμόλυνση με *L. monocytogenes* μετά τη θερμική επεξεργασία μπορεί να ελεγχθεί είτε με την ενσωμάτωση αλάτων των οργανικών οξέων στην κρεατόμαζα των αλλαντικών πριν την παστερίωση είτε με εμβάπτιση ή ψεκασμό των προϊόντων με οξύ ή διάλυμα άλατος πριν τη συσκευασία τους υπό κενό. Πέραν του γεγονότος ότι τα άλατα οργανικών οξέων οδηγούν σε παραγωγή ασφαλών προϊόντων, επιπλέον επιδρούν στον χρόνο συντήρησης των προϊόντων καθυστερώντας την ανάπτυξη της φυσικής χλωρίδας (τα αλλοιογόνα βακτήρια του κρέατος αναστέλλονται επίσης παρουσία οργανικών οξέων και αλάτων αυτών) (Samelis, 2006).

Τα ασθενή οργανικά οξέα δεν δίστανται πλήρως σε υδατικά διαλύματα. Η ισορροπία μεταξύ της αδιάστατης μορφής του οξέος (HA) και των φορτισμένων ανιόντων (A^-) και πρωτονίων (H^+) εξαρτάται από την τιμή του pH. Σε χαμηλές τιμές pH η συγκέντρωση πρωτονίων είναι υψηλότερη, μετατοπίζοντας την ισορροπία προς την αδιάστατη μορφή του οξέος.

Τα οργανικά οξέα στην αδιάστατη μορφή τους- και εφόσον είναι λιποδιαλυτά- διαχέονται μέσω της λιπόφιλης κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσα στο κυτταρόπλασμα των μικροβιακών κυττάρων. Μεταξύ των οργανικών οξέων, το οξικό οξύ είναι λιποδιαλυτό και διαχέεται γρήγορα μέσω της μεμβράνης, ενώ το γαλακτικό οξύ παρουσιάζει έναν βαθμό λιποδιαλυτότητας και διαχέεται πιο αργά μέσω της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Εξαιτίας του ουδέτερου pH στο εσωτερικό του κυτταροπλάσματος, τα οξέα δίστανται σε φορτισμένα ανιόντα και πρωτόνια, τα οποία αδυνατούν να διαχυθούν έξω από το μικροβιακό κύτταρο και συσσωρεύονται εντός του κυτταροπλάσματος. Η εκτεταμένη συσσώρευση πρωτονίων τελικά προκαλεί πτώση της τιμής του κυτταροπλασματικού pH (pHi). Το χαμηλό pHi οδηγεί σε αποικοδόμηση των νουκλεϊκών οξέων και ενζύμων, αναστέλλει το μεταβολισμό και αποτρέπει την ενεργό

μεταφορά η οποία απαιτεί διαβάθμιση συγκέντρωσης πρωτονίων (ΔH^+ gradient). Η ενεργός άντληση με σκοπό την απομάκρυνση πρωτονίων από το εσωτερικό του κυττάρου μέσω συνδεδεμένων με την κυτταροπλασματική μεμβράνη ενζύμων (H^+ -ATP-άσες) θα οδηγούσε σε αύξηση της τιμής του pH_i αλλά παράλληλα θα απαιτούσε υπερβολική κατανάλωση ATP με αποτέλεσμα την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης λόγω της εξάντλησης ενέργειας (Stratford, 1999). Επιπλέον ορισμένα οργανικά οξέα (μηλικό και κιτρικά) έχει αποδειχθεί ότι αποσταθεροποιούν την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων μέσω δημιουργίας χηλικών συμπλόκων (chelation) ή παρεμβολής (intercalation) (Mani-Lopez et al., 2012).

Ο αντιμικροβιακός μηχανισμός των αλάτων γαλακτικού οξέος βασίζεται κυρίως: 1) στη μείωση της τιμής της ενεργότητας του νερού (a_w) με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Stekelenburg, 2003; Samelis, 2006) και 2) στη βακτηριοστατική δράση της αδιάστατης μορφής του γαλακτικού οξέος προκαλώντας αύξηση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης (φάση προσαρμογής) των μικροοργανισμών. Μελέτες αναφορικά με την ειδική δράση του γαλακτικού οξέος υποδεικνύουν μηχανισμούς που εμπλέκονται με τον μεταβολισμό των βακτηρίων, όπως η ενδοκυτταρική οξίνιση (Stekelenburg, 2003). Στο Σχήμα 1.3 που ακολουθεί απεικονίζεται ο μηχανισμός δράσης των οργανικών οξέων στα μικροβιακά κύτταρα.



Σχήμα 1.3. Μηχανισμός δράσης οργανικών οξέων στα μικροβιακά κύτταρα (Mani-Lopez et al., 2012).

Αλκαλότροφα γαλακτικά βακτήρια όπως τα γένη *Carnobacterium* και *Aerococcus* και οπωσδήποτε είδη των γενών *Weissella* και *Leuconostoc* (*W. hellenica* και *Leuc. carnosum*)

είναι ευαίσθητα στην παρουσία οξέος, ιδίως του οξικού οξέος. Αντίθετα τα *L. sakei*, *L. curvatus* καθώς επίσης και τα *Leuc. mesenteroides*, *W. viridescens* και άλλα γαλακτικά βακτήρια δεν επηρεάζονται από την παρουσία οξέος (**Samelis, 2006**).

Η δραστηριότητα του γαλακτικού οξέος ενισχύεται σημαντικά παρουσία οξικού ή διοξικού νατρίου. Όταν συνδυάζεται με 0.25% οξικό νάτριο ή προτιμότερα με 0.1-0.2% διοξικό νάτριο το γαλακτικό νάτριο μπορεί να παρατείνει το χρόνο συντήρησης των επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος, ευνοώντας την επιλογή οξυ-ανθεκτικών ειδών γαλακτικών βακτηρίων που δεν παράγουν αέριο και τα οποία παρουσιάζουν ένα ήπιο δυναμικό αλλοίωσης. Επίπεδα διοξικού νατρίου υψηλότερα από 0.2% μπορεί να έχουν αρνητική επίδραση στην οργανοληπτική ποιότητα των προϊόντων. Επιπλέον ο συνδυασμός αλάτων οργανικών οξέων φαίνεται να είναι πιο σημαντικός για το χρόνο συντήρησης επεξεργασμένων προϊόντων κρέατος και πουλερικών κάτω από συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας συντήρησης (abuse) απ' ό τι κατά τη συντήρηση υπό ψύξη (**Samelis, 2006**)

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.6) παρουσιάζονται ορισμένες από τις δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες αναφορικά με την εφαρμογή αλάτων οργανικών οξέων σε επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος.

Πίνακας 1.6. Επίδραση διαφόρων τύπων αλάτων οργανικών οξέων σε συσκευασμένα υπό κενό αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας.

Προϊόν	Αντιμικροβιακός παράγοντας	Αντιμικροβιακή δράση	Βιβλιογραφική Πηγή
Λουκάνικα Φρανκφούρτης χοιρινά (4°C)	Ενσωμάτωση στην κρεατόπαστα: 1.8% ΓΝ ή 1.8% ΓΝ 0.25% ΟΝ ή ΔΟΝ ή GDL* Επιφανειακός εμβολιασμός με <i>L. monocytogenes</i> (10^3 - 10^4 cfu/cm ²)	Αναστολή της ανάπτυξης της <i>L. monocytogenes</i> : -1.8% ΓΝ: για 35-50 ημέρες συντήρησης - 1.8% ΓΝ, 0.25% ΟΝ ή ΔΟΝ ή GDL: για 120 ημέρες συντήρησης	Samelis et al., 2002b
Αλλαντικά Μπολόνια σε φέτες (4°C)	Εμβάπτιση για 1min σε: ΓΟ ή ΟΟ (2.5 ή 5%), ΟΝ ή ΔΟΝ (2.5 ή 5%), ΓΝ (5 ή 10%), ΣΚ ή ΒΚ (5%)** <i>L. monocytogenes</i> (10^2 - 10^3 cfu/cm ²)	M: >7logcfu/cm ² εντός 20 ημερών 2.5 ή 5% ΟΟ, 5% ΔΟΝ και 5% ΒΚ: διατήρηση χαμηλών πληθυσμών της <i>L. monocytogenes</i> για 120 ημέρες. 5% ΣΚ, 5% ΓΟ: ανάπτυξη του παθογόνου μετά τις 50 και 90 ημέρες συντήρησης αντίστοιχα. ΓΝ: επέτρεψε την ανάπτυξη του παθογόνου εντός 20-35 ημερών.	Samelis et al., 2001
Αλλαντικά Μπολόνια σε φέτες (4 ή 10°C)	Ενσωμάτωση στην κρεατόπαστα: 1.8% ΓΝ ή 0.125 ή 0.25% ΔΟΝ ή 0.125% ή 0.25% GDL ή μίγματα των παραπάνω αντιμικροβιακών Επιφανειακός εμβολιασμός με <i>L. monocytogenes</i> (10^3 - 10^4 cfu/cm ²)	Μίγμα 1.8% ΓΝ+0.25% ΔΟΝ: η πιο απόδοξη αντιστασιακή μεταχείριση (4 και 10°C)- διατήρηση των πληθυσμών του παθογόνου στις αρχικές τιμές (3logcfu/cm ²) στους 4°C για 90 ημέρες, ενώ στους 10°C σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις για 28 ημέρες συντήρησης. Επιβράδυνση της ανάπτυξης LAB*** στους 4°C (1.8% ΓΝ+0.25% ΔΟΝ) ενώ στους 10°C (0.125% GDL)	Barmpalia et al., 2005
Λουκάνικα Φρανκφούρτης χοιρινά (10°C)	Ενσωμάτωση στην κρεατόπαστα : 1.8% ΓΝ ή 0.25% ΔΟΝ ή μίγμα 1.8% ΓΝ,+0.25% ΔΟΝ Επιφανειακός εμβολιασμός με <i>L. monocytogenes</i> (10^2 - 10^3 cfu/cm ²) Εμβάπτιση για 2min σε 2.5% υδατικά διαλύματα γαλακτικού ή οξικού οξέος	- ΔΟΝ: πιο αποτελεσματικό, οδήγησε σε παράταση την λανθάνουσα φάση και πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης του παθογόνου σε σύγκριση με το ΓΝ -Πλήρης αναστολή της ανάπτυξης της <i>L. monocytogenes</i> με 1.8%ΓΝ+ 0.25%ΔΟΝ για 40 ημέρες συντήρησης -μίγμα 1.8%ΓΝ+ 0.25%ΔΟΝ και επιπλέον εμβάπτιση σε διάλυμα οξέος οδήγησε σε λισταριοκτόνο δράση (μείωση κατά 0.6-1.0logcfu/ cm ² για 28-40 ημέρες) -διατήρηση των πληθυσμών LAB στην επιφάνεια των προϊόντων σε χαμηλά επίπεδα ιδίως μετά την εμβάπτιση στα διαλύματα οξέος.	Barmpalia et al., 2004
Βραστό ζαμπόν (4°C)	Ενσωμάτωση στην κρεατόπαστα: 2.5 ή 3.3% ΓΝ ή 0.1 ή 0.2% ΔΟΝ Εμβολιασμός με <i>L. curvatus</i> (10^4 /g) και <i>L. monocytogenes</i> (10^2 /g)	-το ΔΟΝ μόνο του δεν επηρέασε την ανάπτυξη του <i>L. curvatus</i> -το ΓΝ μείωσε τον ρυθμό ανάπτυξης και αύξησε τη λανθάνουσα φάση ανάπτυξης του <i>L. curvatus</i> - <i>L. curvatus</i> : 10^7 cfu/g, εντός 2 έως 2.5 εβδομάδες για Μ και 0.1- 0.2% ΔΟΝ (3 και 5 εβδομάδες για 2.5% ΓΝ και 3.3% ΓΝ αντίστοιχα) -απουσία ανάπτυξης <i>L. monocytogenes</i> για 2.5-3.3% ΓΝ και 0.2% ΔΟΝ	Stekelenburg & Kant-Muermans, 2001
Λουκάνικα Φρανκφούρτης (4°C)	Ενσωμάτωση στην κρεατόπαστα : 0.1% ΔΟΝ ή 3% ΓΚ** ή (2, 2.5 ή 3%) ΓΚ/ΔΟΝ Εμβολιασμός με <i>L. sake</i> (10^4 /g), <i>L. monocytogenes</i> (10^2 /g)	Το ΔΟΝ (μόνο του) δεν επηρέασε την ανάπτυξη του <i>L. sake</i> Μ: <i>L. sake</i> 7logcfu/g εντός 8 ημερών (14 ημέρες για μίγματα ΓΚ/ΔΟΝ) ΓΚ και μίγματα ΓΚ/ΔΟΝ: παράταση του χρόνου συντήρησης κατά 75-125%. Μίγματα ΓΚ/ΔΟΝ: πλήρης αναστολή της ανάπτυξης της <i>L. monocytogenes</i> για 29 ημέρες	Stekelenburg, 2003

*ΓΝ: γαλακτικό νάτριο, ΟΝ: οξικό νάτριο, ΔΟΝ: διοξικό νάτριο, GDL: γλυκονο-δ-λακτόνη, **ΟΟ: οξικό οξύ, ΓΚ: γαλακτικό κάλιο, ΣΚ: σορβικό κάλιο, ΒΚ: βενζοϊκό κάλιο,

***LAB: οξυγαλακτικά βακτήρια

1.4.1.2. Προστατευτικές καλλιέργειες- βακτηριοσίνες

Με τον όρο προστατευτικές καλλιέργειες περιγράφονται οι ανταγωνιστικές καλλιέργειες που προστίθενται στα προϊόντα κρέατος προκειμένου να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών ή/και να αυξήσουν τον χρόνο συντήρησής τους, μεταβάλλοντας κατά το ελάχιστο δυνατόν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των προϊόντων. Ο τρόπος δράσης τους βασίζεται στον ανταγωνισμό τους για θρεπτικά συστατικά και/ή την παραγωγή ενός ή περισσότερων αντιμικροβιακά ενεργών μεταβολιτών όπως οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό), υπεροξειδίου του υδρογόνου, αντιμικροβιακά ένζυμα, βακτηριοσίνες και ρευτερίνη (reuterin) (Vermeiren et al., 2004).

Οι βακτηριοσίνες είναι αντιμικροβιακά πολυπεπίδια ή πρωτεΐνες που συντίθενται ριβοσωμικά και εκδηλώνουν την αντιμικροβιακή τους δράση έναντι φυλογενετικά συγγενών στελεχών βακτηρίων. Εξαιτίας της πρωτεϊνικής τους φύσης αδρανοποιούνται από πρωτεάσες στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Hugas, 1998). Η αντιμικροβιακή τους δράση (βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνος) περιορίζεται κυρίως στα θετικά κατά Gram βακτήρια, ενώ τα αρνητικά κατά Gram θεωρούνται ανθεκτικά πιθανών λόγω της διαφορετικής σύστασης του κυτταρικού τοιχώματος αυτών (στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια υπάρχει μια εξωτερική στιβάδα που αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες (LPS) που την καθιστούν αδιαπέραστη για τα περισσότερα μόρια) (Abee et al., 1995).

Γαλακτικά βακτήρια μεταξύ εκείνων που συμμετέχουν στη γλωρίδα του κρέατος, είναι αποτελεσματικά ενάντια σε παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Vermeiren et al., 2004). Μεταξύ αυτών, στελέχη των *L. sakei* και *Leuc. carnosum* που παράγουν σακασίνες (sakacins) και λευκοσίνες (leucocins) αντίστοιχα, και είδη του γένους *Pediococcus* που παράγουν πεδιοσίνες, θεωρούνται κατάλληλα για να παρέχουν *in situ* αναστολή της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (Samelis, 2006). Από τις βακτηριοσίνες, η νισίνη παραμένει η πιο ευρέως εμπορικά χρησιμοποιούμενη, εξαιτίας της πολύχρονης ασφαλούς χρήσης της και της αποτελεσματικότητάς της έναντι σημαντικών θετικών κατά Gram παθογόνων και αλλοιογόνων βακτηρίων (Coma, 2008).

Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.7) καταγράφονται ερευνητικά δεδομένα αναφορικά με την χρήση προστατευτικών καλλιεργειών/ βακτηριοσινών σε προϊόντα κρέατος.

Πίνακας 1.7. Επίδραση διαφόρων τύπων προστατευτικών καλλιεργειών/βακτηριοσινών σε συσκευασμένα υπό κενό αλλαντικά σε φέτες που συντηρήθηκαν υπό ψύξη.

Προϊόν	Προστατευτική καλλιέργεια/ βακτηριοσίνη	Αντιμικροβιακή δράση	Βιβλιογραφική Πηγή
Πάριζα (6-8°C)	<i>Lb. alimentarius</i> BJ-33 (<i>FloraCarn</i> L-2) σε 2 συγκεντρώσεις 1.6×10^3 cfu/cm ² , 1.6×10^5 cfu/cm ²	-Περιορισμός της ανάπτυξης <i>Pseudomonas</i> , <i>B. thermosphacta</i> -Παράταση του χρόνου συντήρησης κατά 19 ημέρες (1.6×10^3 cfu/cm ²) και 28 ημέρες (1.6×10^5 cfu/cm ²)	(Kotzekidou & Bloukas, 1998)
Βραστό ζαμπόν σε φέτες (4°C)	<i>Lb. alimentarius</i> BJ-33 (<i>FloraCarn</i> L-2)	Παράταση κατά μια εβδομάδα του χρόνου συντήρησης	(Kotzekidou & Bloukas, 1996)
Παστεριωμένα αλλαντικά	<i>L. sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	-Αναστολή της ανάπτυξης <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>B. thermosphacta</i> -έλεγχος της <i>L. monocytogenes</i>	Vermeiren et al., 2004
Βραστό ζαμπόν σε φέτες (4°C)	<i>L. sakei</i> B-2	-Καταστολή των <i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> -Παράταση του χρόνου συντήρησης κατά 20 ημέρες	Hu et al., 2008
Αλλαντικά Μπολόνια (8°C)	Νισίνη (Nisaplin) 25mg/g στην κρεατόπαστα	Παράταση για τολάχιστον 6 εβδομάδες του χρόνου συντήρησης	Davies et al., 1999
Ζαμπόν, αλλαντικά Μπολόνια* (8°C)	Νισίνη, λυσοζύμη, EDTA	-Αποτροπή της ανάπτυξης <i>B. thermosphacta</i> για 4 εβδομάδες και στα δύο προϊόντα -περιορισμός της ανάπτυξης του <i>L. curvatus</i> για 3 εβδομάδες -περιορισμός της ανάπτυξης <i>Leuc. mesenteroides</i> , και <i>L. monocytogenes</i> για 2 εβδομάδες	Gill & Holley, 2000
Αλλαντικά Μπολόνια** (4°C)	Νισίνη (5000IU/ml), διοξικό νάτριο (3 ή 5% w/v), βενζοϊκό κάλιο (3% w/v)	Αναστολή της ανάπτυξης της <i>L. monocytogenes</i> για 90-120 ημέρες	Samelis et al., 2005

*τα αλλαντικά εμβολιάστηκαν με διάφορους μικροοργανισμούς *B. thermosphacta*, *E. coli* O157:H7, *L. sakei*, *L. curvatus*, *Leuc. mesenteroides*, και *L. monocytogenes* κ.α.

**Τα αλλαντικά εμβολιάστηκαν με κοκτέιλ στελεχών της *L. monocytogenes*.

1.4.1.3. Αντιμικροβιακά μικροβιακής ή ζωικής προέλευσης

Η λυσοζύμη είναι πρωτεΐνη (αποτελείται από ένα πολυπεπτίδιο) με μοριακό βάρος 14.6 kDa η οποία παρουσιάζει ενζυμική δράση ενάντια στους β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ του N- ακετυλομουραμικού οξέος και της N- ακετυλογλυκοζαμίνης που

απαντώνται στην πεπτιδογλυκάνη. Η πεπτιδογλυκάνη είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος τόσο των θετικών κατά Gram όσο και των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Η υδρόλυση του κυτταρικού τοιχώματος από τη λυσοζύμη μπορεί να καταστρέψει τη δομική ακεραιότητα του κυτταρικού τοιχώματος και να οδηγήσει σε λύση των βακτηριακών κυττάρων (**Gill & Holley, 2000**). Έχει αποδειχθεί πως η λυσοζύμη παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων καθώς η πεπτιδογλυκάνη (κύριο συστατικό-στόχος τους) είναι ελεύθερα προσβάσιμη σε αντίθεση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια τα οποία προστατεύονται από ένα στρώμα λιποπολυσακχαρίτη στην εξωτερική μεμβράνη τους που δρα ως φυσικός φραγμός και εμποδίζει την πρόσβαση της λυσοζύμης στη στιβάδα της πεπτιδογλυκάνης (**Benkerroum, 2008**). Σε εμπορική μορφή η λυσοζύμη χρησιμοποιείται πρωτίστως για να αποτρέψει το όψιμο φούσκωμα (διόγκωση) σε ημίσκληρα τυριά, το οποίο είναι αποτέλεσμα της δράσης του *Clostridium tyrobutyricum* (αναερόβιο, σπορογόνο βακτήριο που παράγει βουτυρικό οξύ και CO₂) (**Sinigaglia et al, 2008**).

Εκτός από τη λυσοζύμη σε συνδυασμό με βακτηριοσίνες, ένα άλλο υποσχόμενο φυσικό αντιμικροβιακό για τη συντήρηση των επεξεργασμένων κρεάτων είναι η χιτοζάνη (**Samelis, 2006**).

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό πολυμερές προερχόμενο από την απακετυλίωση της χιτίνης (**Ye et al., 2008**). Η χιτίνη είναι ένα άφθονο συστατικό των κελυφών των οστρακοειδών (crustacean shells) και μυκήτων (**Samelis, 2006**). Η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη στο νερό, διαλυτή σε ασθενή διαλύματα οργανικών οξέων, έχει αποδειχθεί μη τοξική και βιοαποικοδομήσιμη (**Ye et al., 2008**) και έχει αναγνωριστεί ως GRAS (Generally recognized as safe) από τον FDA το 2001 (**Coma, 2008**). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη συντήρηση των τροφίμων καθώς έχει αποδειχθεί η αντιμικροβιακή της δράση ενάντια σε αλλοιογόνους μικροοργανισμούς ενώ επιπρόσθετα παρουσιάζει και αντιοξειδωτική δράση (**Friedman & Juneja, 2010**). Είναι πιο αποτελεσματική έναντι των ζυμών, ενώ επίσης αναστέλλει την ανάπτυξη των θετικών κατά Gram βακτηρίων και ορισμένων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Ο κύριος μηχανισμός που φαίνεται να υπερισχύει στην βακτηριοστατική και βακτηριοκτόνο δράση της χιτοζάνης σχετίζεται με τη σύνδεση των θετικά φορτισμένων αμινομάδων της με τις αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλομάδες που υπάρχουν στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών των βακτηρίων, προκαλώντας διάρρηξη των μεμβρανών και διαρροή των κυτταρικών συστατικών (**Friedman & Juneja,**

2010). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1.8) παρουσιάζονται οι ευεργετικές δράσεις της χιτοζάνης σε αλλαντικά.

Πίνακας 1.8: Βιβλιογραφική ανασκόπηση της χρήσης της χιτοζάνης σε προϊόντα κρέατος.

Προϊόν	Είδος αντιμικροβιακού παράγοντα	Αντιμικροβιακή δράση	Βιβλιογραφική πηγή
Χοιρινά λουκάνικα ελληνικού τύπου	Χιτοζάνη 0.5 ή 1% (στην κρεατόπαστα)	-μείωση των γαλακτικών βακτηρίων κατά 1 έως 1.5logcfu/g -αντιοξειδωτική δράση	Soultos et al., 2008
Χοιρινά λουκάνικα (7°C)	Χιτοζάνη 1% διάλυμα εμφάπτισης	περιορισμός της μικροβιακής χλωρίδας (γαλακτικά βακτήρια, ζύμες, μύκητες) κατά 1-3logcfu/g για 15 ημέρες	Sagoo et al., 2002
Χοιρινά λουκάνικα (4°C)	Χιτοζάνη (X) Αιθέριο έλαιο δενδρολίβανου (ΕΕΔ) (στην κρεατόπαστα)	-αντιοξειδωτική δράση τα δείγματα X και ΕΕΔ -διπλασιασμός του χρόνου συντήρησης παρουσία X -παράταση του χρόνου συντήρησης κατά 8 ημέρες στα δείγματα μόνο με ΕΕΔ	Georgantelis et al., 2007
Χοιρινά λουκάνικα κοκτέιλ (0-3°C)	Μίγμα χιτοζάνης και εκχυλίσματος μέντας (στην κρεατόπαστα)	-αύξηση του χρόνου συντήρησης κατά 1 εβδομάδα -αντιοξειδωτική δράση	Kanatt et al., 2008

Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι μέτριες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου που περιέχονται στα προϊόντα αλλαντοποιίας μπορούν να εξουδετερώσουν τον αντιμικροβιακό χαρακτήρα της χιτοζάνης, της λυσοζύμης και άλλων οξυγαλακτικών βακτηριοσινών όπως η σακασίνη Κ. Για τον λόγο αυτό η ακριβής αποτελεσματικότητα αυτών των αντιμικροβιακών στα επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος μπορεί να μειωθεί σημαντικά εξαιτίας της παρουσίας των νιτροδών αλάτων, επιπρόσθετα των άλλων παραμέτρων (χαμηλή διάχυση, σύνδεση με τα λιπίδια, ενζυματική αποικοδόμηση, ανάπτυξη βακτηριακής αντίστασης) δυσχεραίνοντας την εφαρμογή τους (Samelis, 2006).

1.4.1.4. Φυτικά αντιμικροβιακά

Τα μπαχαρικά και τα βότανα χρησιμοποιούνται εκτενώς στη βιομηχανία κρέατος. Στο εμπόριο είναι διαθέσιμα μίγματα μπαχαρικών/βοτάνων, εκχυλίσματα βοτάνων και αιθέρια έλαια αυτών (Samelis, 2006). Ρίγανη, δενδρολίβανο, κανέλα, γαρύφαλλο, σκόρδο, κόλιανδρος, μαϊντανός, φασκόμηλο, κ.α. χρησιμοποιούνται μόνα τους ή σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές συντήρησης (Pisoschi et al., 2018). Είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις όπως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα, τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η απ' ευθείας ενσωμάτωση αιθέριων ελαίων στα προϊόντα

κρέατος οδηγεί σε άμεση μείωση των βακτηριακών πληθυσμών, όμως σε αυξημένες συγκεντρώσεις μπορεί να επιδράσουν αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Coma, 2008).

Η δράση τους βασίζεται σε μεταβολή της διαπερατότητας των βακτηριακών κυττάρων, επιτρέποντας την απώλεια βιομορίων όπως η ριβόζη και το γλουταμινικό νάτριο από το εσωτερικό τους. Αντιδρούν με τις πρωτεΐνες των μεμβρανών των βακτηριακών κυττάρων, μεταβάλλοντας τη δομή και τη λειτουργία τους (πχ. μεταφορά ηλεκτρονίων, πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, σύνθεση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων και ενζυμική δραστηριότητα) (Pisoschi et al., 2018).

Πίνακας 1.9. Εφαρμογή αντιμικροβιακών φυτικής προέλευσης σε συσκευασμένα υπό κενό αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας.

Προϊόν	Αντιμικροβιακός παράγοντας/συνθήκες	Αντιμικροβιακή δράση	Βιβλιογραφική πηγή
Λουκάνικα τύπου γαλακτώματος Μορφοποιημένο ζαμπόν (σε φέτες) (7°C)	Εμπορικό παρασκεύασμα μπαχαρικών ζύμωσης “SuperSpice Arom” (SF) 20 x10 ³ μg/g Γαλακτικό νάτριο (ΓΝ) 15 x10 ³ μg/g -εμβολιασμός δειγμάτων με <i>L. innocua</i> LTH 3096 ή <i>L. curvatus</i> LTH 683 (10 ³ cfu/φέτα)	Καθυστέρηση της ανάπτυξης της <i>L. innocua</i> SF: κατά 16 ημέρες (λουκάνικα) και 10 ημέρες (ζαμπόν) ΓΝ: κατά 6 ημέρες (λουκάνικα) και 4 ημέρες (ζαμπόν) Μικρή καθυστέρηση του <i>L. curvatus</i> στα δείγματα λουκάνικων (ΓΝ)	Terjung et al., 2016
Αλλαντικό γαλοπούλας με μειωμένο περιεχόμενο άλατος (σε φέτες, 4°C)	HPP: 600MPa -180sec-25°C Καρβακρόλη (E)200ppm Εμβολιασμός με <i>L. innocua</i> (10 ⁶ cfu/g) F _C , F _{SR} , F _{SRE} , F _C +HPP, F _{SR} +HPP, F _{SRE} +HPP*	-Απουσία ανάπτυξης LAB** σε όλα τα δείγματα HPP έως τις 20 ημέρες -ο συνδυασμός F _{SRE} +HPP μείωσε τον ρυθμό ανάπτυξης των LAB και των ψυχρότροφων βακτηρίων και επέτυχε παράταση της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης της <i>L. innocua</i> κατά 10 ημέρες σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα	Oliveira et al., 2015
Αλλαντικά Φρανκφούρτης (αποφλοιωμένα, 4°C)	TC 0.1%, 0.2%, CR 0.1, 0.2%, TH 0.1, 0.2%, EG 0.3, 0.4%*** Ενσωμάτωση των αντιμικροβιακών σε διάλυμα χιτοζάνης (X) για την επικάλυψη των δειγμάτων Εμβολιασμός με κοκτέιλ στελεχών <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶ cfu/αλλαντικό)	μετά από 42 ημέρες συντήρησης: - μείωση της <i>L. monocytogenes</i> κατά 1-1.5 logcfu/αλλαντικό (επικάλυψη μόνο με X) - μείωση της <i>L. monocytogenes</i> κατά 4-5 logcfu/αλλαντικό (παρουσία των αντιμικροβιακών) -πιο αποτελεσματική CR(0.2%) και EG (0.4%) με πληθυσμούς <i>L. monocytogenes</i> 1.5-2logcfu/αλλαντικό (5.5 logcfu/αλλαντικό στα δείγματα X)	Upadhyay et al., 2015

*HPP: High pressure processing (επεξεργασία υψηλής πίεσης), F_C : δείγματα ελέγχου με κανονικό ποσοστό NaCl (2%), F_{SR} : δείγματα με μειωμένο ποσοστό NaCl (κατά 30%), F_{SRE}: δείγματα με μειωμένο ποσοστό NaCl (κατά 30%) και καρβακρόλη

** LAB: γαλακτικά βακτήρια

*** Trans-κινναμωμική αλδεϋδη (TC), Καρβακρόλη (CR), Θυμόλη (TH), Ευγενόλη (EG)

1.4.2. Ακτινοβόληση

Η ακτινοβόληση είναι μια μη θερμική τεχνολογία η οποία περιλαμβάνει τη χρήση χαμηλών δόσεων ιονίζουσας ακτινοβολίας και χρησιμοποιείται για να παρατείνει τη διάρκεια ζωής και να ενισχύσει την ασφάλεια των τροφίμων (Horita et al., 2018). Πρόκειται για ελεγχόμενη εφαρμογή ενέργειας από ιονίζουσες ακτινοβολίες γ , X και δέσμη ηλεκτρονίων. Οι εγκεκριμένες πηγές ακτινοβολίας γ για την επεξεργασία των τροφίμων είναι τα ραδιοϊσότοπα κοβάλτιο και καίσιο (Co-60 και Cs-137). Οι ακτίνες X και η δέσμη ηλεκτρονίων παράγονται από συσκευές που χρησιμοποιούν ηλεκτρική ενέργεια. Η ακτινοβόληση επιφέρει ελάχιστες χημικές αλλαγές στα τρόφιμα, παρόμοιες με εκείνες άλλων μεθόδων συντήρησης όπως η θερμική επεξεργασία. (Gautam & Tripathi, 2016).

Στις μέρες μας η εφαρμογή ακτινοβόλησης τροφίμων εφαρμόζεται σε πάνω από 60 χώρες παγκοσμίως (Gautam & Tripathi, 2016). Σύμφωνα με το Codex Alimentarius Commission (Codex) η δόση ακτινοβόλησης δεν θα πρέπει να ξεπερνά τα 10 kGy (Horita et al., 2018). Παρά τα πλεονεκτήματα, ο κύριος περιορισμός ακτινοβόλησης των τροφίμων είναι η αποδοχή του καταναλωτικού κοινού. Επιπλέον η ανάγκη μεταφοράς του τελικού προϊόντος σε μια μονάδα ακτινοβόλησης περιορίζει την χρήση της (Horita et al., 2018).

Σε εμπορικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται δόσεις κάτω από 3 kGy (για να αποφευχθεί η οξείδωση του λίπους), οι οποίες μπορούν να μειώσουν τους πληθυσμούς της *L. monocytogenes* έως και 5 logs. Θα πρέπει να λαμβάνεται όμως υπόψη ότι τα γαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση στην ακτινοβόληση. Έχει διαπιστωθεί ότι είδη του γένους *Lactobacillus* κυριαρχούν στα ακτινοβολημένα προϊόντα κρέατος καθώς έχουν βρεθεί να επιβιώνουν σε δόσεις 2.5-5.0 kGy (Horita et al., 2018).

Η εφαρμογή ακτινοβόλησης σε δόσεις 1.5-2.5 kGy έχει αναφερθεί ότι προκαλεί μείωση κατά 3log της *L. monocytogenes* σε προϊόντα κρέατος όπως αλλαντικά Μπολόνια και καπνιστή γαλοπούλα. Σε άλλα προϊόντα (λουκάνικα Φρανκφούρτης και ζαμπόν), δόση 2.0 kGy επέφερε μείωση της *L. monocytogenes* κατά 3 logs (Foong et al., 2004).

1.4.3. Υψηλή υδροστατική πίεση (HPP, High Pressure Processing)

Η επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης αποτελεί μια ελκυστική τεχνολογία συντήρησης, ήπια για τα τρόφιμα αλλά αποτελεσματική όσον αφορά τους παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Garriga et al., 2004). Βασίζεται στη χρήση πολύ

υψηλών πιέσεων 100-1000 MPa, σε θερμοκρασίες από -20 έως 60°C και για σύντομο χρόνο (λίγα δευτερόλεπτα έως 20 λεπτά) (Barba et al., 2017). Η εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 10 λεπτά στους 22°C, είναι ικανή να προάγει την αδρανοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων στα συσκευασμένα υπό κενό προϊόντα κρέατος (Horita et al., 2018).

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τη βιομηχανία κρέατος από την εφαρμογή της μεθόδου είναι η αυξημένη αίσθηση/αντίληψη αλμυρότητας στα προϊόντα κρέατος στα οποία εφαρμόζεται. Θεωρείται ότι η εφαρμογή πίεσης μεταβάλλει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιόντων νατρίου και των πρωτεϊνών, οδηγώντας στην απελευθέρωση ιόντων Na⁺ κάνοντάς τα πιο προσιτά από τους γευστικούς κάλυκες. Μελέτες έχουν δείξει αυξημένη αλμυρότητα σε dry-cured ζαμπόν που κατεργάστηκε σε υψηλή πίεση >500 MPa.

Επομένως σε τρόφιμα που πρόκειται να κατεργαστούν με υψηλή πίεση η ποσότητα του άλατος που προστίθεται κατά την παραγωγική διαδικασία μπορεί να μειωθεί έως και 50% χωρίς να επηρεάζει τη γεύση του προϊόντος (Barba et al., 2015). Ορισμένες εφαρμογές της μεθόδου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.10.

Πίνακας 1.10: Δεδομένα ερευνητικών εργασιών αναφορικά με την εφαρμογή HHP σε αλλαντικά.

Προϊόν	Συνθήκες επεξεργασίας	Αντιμικροβιακή δράση	Βιβλιογραφική πηγή
Βραστό ζαμπόν σε φέτες	600 MPa, 6 min, 31°C	Μείωση των πληθυσμών γαλακτικών βακτηρίων κατά 6.1 logcfu/g μετά από 60 ημέρες συντήρησης στους 4°C	Garriga et al., 2004
Ζαμπόν	400 MPa, 15 min	Παράταση του χρόνου συντήρησης κατά 66 ημέρες	Slongo et al., 2009
Λουκάνικα θερμικής επεξεργασίας (συσκ. κενό 2-8°C)	500 MPa, 5 ή 15 min, 65°C	-μείωση των ολικών και γαλακτικών βακτηρίων κατά 4 logcfu/g -ασήμαντη ανάπτυξη εντεροβακτηρίων και <i>Listeria</i> για 18 εβδομάδες	Yuste et al., 2000
Ζαμπόν	400 ή 600 MPa, 10 min, 22°C	-Απουσία <i>L. sakei</i> και <i>L. curvatus</i> για 90 ημέρες συντήρησης -επιβίωση <i>W. viridescens</i> και <i>L. monocytogenes</i> σε πίεση 600 MPa	Han et al., 2011
Βραστό ζαμπόν σε φέτες	200 MPa, 10 min 400 MPa, 10 min και εντεροσίνη LM-2 256 και 2560 AU/g Εμβολιασμός με <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. enteritidis</i>	Ο συνδυασμός των δύο αντιμικροβιακών παραγόντων επέτυχε την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών Πιο αποτελεσματική 400 MPa, 10 min και εντεροσίνη 2560 AU/g, παράταση του χρόνου συντήρησης ως 90 ημέρες	Liu et al., 2012

1.4.4. Ενεργή συσκευασία

Κατά την τεχνολογία ενεργού συσκευασίας το υλικό συσκευασίας, το τρόφιμο και το περιβάλλον αλληλεπιδρούν προκειμένου να παραταθεί η διάρκεια ζωής του προϊόντος ή να αυξηθεί η ασφάλειά του ή οι οργανοληπτικές του ιδιότητες, διατηρώντας παράλληλα την ποιότητα αυτού (Suppakul et al., 2003).

Τα κυριότερα συστήματα ενεργού συσκευασίας που εφαρμόζονται στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι: απορροφητές υγρασίας, απορροφητές οξυγόνου, εκπομποί διοξειδίου του άνθρακα και η αντιμικροβιακή συσκευασία (Realini & Marcos, 2014). Οι τρεις πρώτοι τύποι ενεργού συσκευασίας χρησιμοποιούνται κυρίως για τη συντήρηση του φρέσκου κρέατος και για τον λόγο αυτό δεν γίνεται εκτενής αναφορά τους στο κεφάλαιο αυτό (Realini & Marcos, 2014).

Αντιμικροβιακή συσκευασία

Τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποτελούν άριστο υπόστρωμα ανάπτυξης για ποικίλους μικροοργανισμούς. Η μικροβιακή ανάπτυξη επιταχύνει αλλαγές στο άρωμα, το χρώμα και την υφή του τροφίμου, οδηγώντας σε μείωση της διάρκειας ζωής του προϊόντος, επιπλέον του αυξημένου κινδύνου τροφικών λοιμώξεων. Τα αντιμικροβιακά υλικά συσκευασίας παρατείνουν τη λανθάνουσα φάση (φάση προσαρμογής) και μειώνουν την φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών προκειμένου να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής και να διατηρήσουν την ποιότητα και την ασφάλεια του τροφίμου (Realini & Marcos, 2014). Αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται ευρέως στη συσκευασία τροφίμων είναι βακτηριοσίνες (κυρίως νισίνη), ένζυμα (λυσοζύμη), βότανα και αιθέρια έλαια, συντηρητικά (οργανικά οξέα και άλατα αυτών) κ.α. (Coma, 2008; Appendini & Hotchkiss, 2002; Horita et al., 2018). Η αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής συσκευασίας είναι συνάρτηση διαφόρων παραγόντων όπως: οι φυσικές και χημικές ιδιότητες του αντιμικροβιακού παράγοντα, το υλικό συσκευασίας, οι συνθήκες συντήρησης, η μέθοδος ενσωμάτωσης του αντιμικροβιακού παράγοντα στη συσκευασία, η σύνθεση του τροφίμου και ο ρυθμός απελευθέρωσης των αντιμικροβιακών ενώσεων εντός της συσκευασίας. (Horita et al., 2018)

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορούν να ενσωματωθούν, να επικαλυφθούν ή να ακινητοποιηθούν πάνω στο υλικό συσκευασίας, ενώ επίσης υπάρχουν και πολυμερή με εγγενή αντιμικροβιακή δράση (Appendini & Hotchkiss, 2002).

➤ **Απ' ευθείας ενσωμάτωση πτητικών ή μη πτητικών αντιμικροβιακών παραγόντων στα πολυμερή**

Τα αντιμικροβιακά ενσωματώνονται στα υλικά συσκευασίας (κυρίως φιλμ) σε ποσοστό 0.1-5% w/w. Η ενσωμάτωσή τους εντός του πολυμερούς πραγματοποιείται για τα μεν θερμοσταθερά αντιμικροβιακά, κατά τη θερμική επεξεργασία των πολυμερών (εξώθηση ή χύτευση με έγχυση), για τα δε θερμοευαίσθητα αντιμικροβιακά (ένζυμα και πτητικές ενώσεις) με τη μέθοδο της υγρής ανάμιξης (solvent compounding) (**Appendini & Hotchkiss, 2002**).

Αντιμικροβιακά υλικά που βασίζονται στον άργυρο χρησιμοποιούνται ευρέως στην Ιαπωνία και τις ΗΠΑ (**Realini & Marcos, 2014**). Υποκατεστημένοι με άργυρο ζεόλιθοι ενσωματώνονται σε πολυμερή όπως πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο και νάιλον σε ποσοστά 1-3%. Εμπορική εφαρμογή αποτελεί το AgION[®] το οποίο είναι συμβατό με μεγάλο εύρος πολυμερών και συνήθως προστίθεται κατά την παραγωγή του φιλμ συσκευασίας (κατά την εξώθηση) (**Coma, 2008**). Εναλλακτικά ο υποκατεστημένος με άργυρο ζεόλιθος λαμινάρεται υπό μορφή λεπτού στρώματος (3-6μm) στην επιφάνεια του πολυμερούς που έρχεται σε επαφή με το τρόφιμο (**Coma, 2008**).

➤ **Επικάλυψη ή προσρόφηση των αντιμικροβιακών στην επιφάνεια του πολυμερούς**

Στην περίπτωση αυτή οι αντιμικροβιακοί παράγοντες είτε απελευθερώνονται μέσω εξάτμισης στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας (πτητικές ενώσεις), ή μεταναστεύουν στο τρόφιμο (μη πτητικές ενώσεις) μέσω διάχυσης. Το σύστημα αυτό είναι πιο αποτελεσματικό από την απ' ευθείας εφαρμογή του αντιμικροβιακού παράγοντα πάνω στην επιφάνεια του κρέατος, καθώς επιβραδύνει τη μετανάστευση του αντιμικροβιακού από το πολυμερές προς την επιφάνεια του τροφίμου, βοηθώντας έτσι να διατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις του αντιμικροβιακού παράγοντα (**Coma, 2008**).

➤ **Χρήση πολυμερών με εγγενή αντιμικροβιακή δράση**

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα κατιονικά πολυμερή, χιτοζάνη και πολυ-L-λυσίνη, εκ των οποίων η χιτοζάνη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τα τελευταία χρόνια (**Appendini & Hotchkiss, 2002**). Μερικές από τις εφαρμογές σε πολυμερή βακτηριοσινών, χιτοζάνης, και άλλων φυσικών αντιμικροβιακών

παρεμποδιστών, σε επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος περιγράφονται στον Πίνακα 1.11 που ακολουθεί.

Πίνακας 1.11. Εφαρμογές βακτηριοσινών, χιτοζάνης και άλλων φυσικών αντιμικροβιακών στη συσκευασία αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας.

Προϊόν	Αντιμικροβιακός παράγοντας- συνθήκες	Αντιμικροβιακή δράση	Βιβλιογραφική πηγή
Χοιρινά λουκάνικα Φρανκφούρτης (4°C)	Εντεροσίνη 416K1 σε φιλμ επικάλυψης φιλμ LDPE (spin coating) Εμβάπτιση των δειγμάτων για 5 min σε καλλιέργεια <i>L. monocytogenes</i> NCTC 10888 (10 ⁸ cfu/ml)	Ταχύτατη μείωση της <i>L. monocytogenes</i> εντός 24h (>1 logcfu/g), διατήρηση της διαφορά για 14 ημέρες στους 4°C	Iseppi et al., 2008
Αποφλοιωμένα λουκάνικα Φρανκφούρτης (Σ.Κ.*, 4°C)	Νισίνη 2500 IU/ml: ενσωμάτωση σε φιλμ περιτυλίγματος βακτηριακής κυτταρίνης (<i>Glucanacetobacter xylinus</i> K3) Εμβάπτιση δειγμάτων σε διάλυμα <i>L. monocytogenes</i> (10 ⁶ cfu/ml) για 2sec	-Μείωση της <i>L. monocytogenes</i> κατά 2 logcfu/g και των ολικών αερόβιων βακτηρίων κατά 3.3 logcfu/g μετά από 14 ημέρες συντήρησης	Nguyen et al., 2008
Hot dogs (Σ.Κ.*, 4°C)	Νισίνη 7500 και 10000 IU/ml : ενσωμάτωση σε φιλμ επικάλυψης MC/HPMC** και επίστρωση σε φιλμ Cryovac Εμβολιασμός με <i>L. monocytogenes</i> (κοκτέιλ 5 στελεχών) 5 logcfu/ συσκευασία	Μείωση των πληθυσμών της <i>L. monocytogenes</i> στην επιφάνεια των δειγμάτων, κατά 6-7 logcfu/συσκευασία μετά από 60 ημέρες συντήρησης	Franklin et al., 2004
Βραστό ζαμπόν, παστουρμάς, αλλαντικά τύπου Μπολόνια (Σ.Κ.*, 4°C)	Φιλμ χιτοζάνης (X), με ενσωμάτωση οξικού οξέος (O) ή προπιονικού οξέος (Π) και προσθήκη ή όχι λαουρικού οξέος (Λ) ή κινναμαλδεΐδης (Κ) -επιφανειακός εμβολιασμός δειγμάτων με <i>L. sakei</i> ή <i>Serratia liquefaciens</i>	-καμία επίδραση στους πληθυσμούς των ενδογενών γαλακτικών βακτηρίων -επιβράδυνση ή αναστολή των ενδογενών εντεροβακτηρίων Μετά από 21 ημέρες συντήρησης: -μείωση κατά 1.1 logcfu/ cm ² του εμβολιασμένου <i>L.sakei</i> στα δείγματα X/Π/Κ -μείωση κατά 4.13 logcfu/cm ² της <i>S. liquefaciens</i> στα δείγματα X/O/Κ Μεγαλύτερη αναστολή των φιλμ με κινναμωμική αλδεΐδη και στα αλλαντικά Μπολόνια (λόγω της πιο αργής απελευθέρωσης των οξέων από το αντιμικροβιακό φιλμ)	Ouattara et al., 2000
Αλλαντικά Μπολόνια σε φέτες	-Φιλμ χιτοζάνης (X) -φιλμ χιτοζάνης με αιθέριο έλαιο ρίγανης 1 ή 2% (X/EEP) -εμβολιασμός των δειγμάτων με <i>L. monocytogenes</i> ή <i>E. coli</i> O157:H7 -συντήρηση για 5 ημέρες σε 10°C	-μείωση κατά 2 log της <i>L. monocytogenes</i> στα φιλμ X και κατά 3.6-4 logs στα φιλμ X/EEP -μείωση της <i>E. coli</i> O157:H7 κατά 3 logs	Zivanovic et al., 2005

*Σ.Κ. συσκευασμένα υπό κενό

**MC: μεθυλοκυτταρίνη, HPMC: υδροξυπροπυλομεθυλοκυτταρίνη

1.4.5. Κάπνισμα

Η μέθοδος του καπνίσματος αποτελεί παραδοσιακή τεχνολογία συντήρησης των τροφίμων και εφαρμόζεται εκτενώς στη βιομηχανία των αλλαντικών. Επιπλέον της αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης του καπνού, το κάπνισμα προσδίδει την χαρακτηριστική, επιθυμητή γεύση και ένα πιο σκούρο επιφανειακό χρώμα στα προϊόντα (Essien, 2003; Toldra & Reig, 2007). Χρησιμοποιείται φυσικός καπνός ξύλου (οξιά, δρυς, καρυδιά, κέδρος), είτε υγρός καπνός (Toldra & Reig, 2007). Για την παραγωγή υγρού καπνού, αρχικά πραγματοποιείται πυρόλυση του ξύλου και ακολουθεί συμπίκνωση του παραγόμενου καπνού με ταυτόχρονη απομάκρυνση των καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων. Τα κύρια προϊόντα της πυρόλυσης του ξύλου (φαινόλες, καρβονύλια και οργανικά οξέα) είναι υπεύθυνα για το χρώμα, τη γεύση και τις αντιμικροβιακές ιδιότητες του υγρού καπνού. Σύμφωνα με μελέτες τόσο *in vitro* όσο και σε τρόφιμα, το υγρό κάπνισμα είναι αποτελεσματικό έναντι παθογόνων μικροοργανισμών όπως *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* και *Staphylococcus* (Lingbeck et al., 2014).

Η εφαρμογή του καπνίσματος πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας, όπως για παράδειγμα κατά τη ζύμωση, την ωρίμανση ή ακόμη και στο τελικό στάδιο της επεξεργασίας των αλλαντικών. Κατά την παρασκευή βραστών λουκάνικων, το κάπνισμα πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια ή αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία (Toldra & Reig, 2007).

Καθώς η συμβατική μέθοδος καπνίσματος (θερμό κάπνισμα) οδηγεί στον σχηματισμό καρκινογόνων πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, η εφαρμογή υγρού καπνού αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για τη συντήρηση των προϊόντων κρέατος χωρίς να προκαλεί κίνδυνο για την υγεία. Επιπλέον το υγρό κάπνισμα παρουσιάζει και άλλα πλεονεκτήματα, όπως η ελεγχόμενη και ομοιόμορφη κατανομή της γεύσης στο προϊόν, είναι μέθοδος πιο φιλική προς το περιβάλλον και με περισσότερες επιλογές εφαρμογής όπως εμβάπτιση, ψεκασμός ή ανάμιξη. Σε πειραματικό επίπεδο, η εφαρμογή υγρού καπνίσματος αποδείχθηκε σχεδόν το ίδιο αποτελεσματική με την παραδοσιακή μέθοδο του θερμού καπνίσματος, διατηρώντας σε επιθυμητά επίπεδα τις μελετώμενες παραμέτρους (οξειδωση του λίπους, μικροβιολογική ασφάλεια και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά) έως και 15 ημέρες συντήρησης χοιρινών λουκάνικων υπό ψύξη (Bhuyan et al., 2018).

2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Άλατα οργανικών οξέων έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε πολυάριθμες ερευνητικές εργασίες προκειμένου να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή τους δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (κυρίως *L. monocytogenes*), γεγονός πολύ σημαντικό καθώς τα συγκεκριμένα προϊόντα μετά τη θερμική επεξεργασία υποβάλλονται σε μεταχειρίσεις όπως τεμαχισμός και αποφλοιώση με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος επιμόλυνσης με παθογόνα βακτήρια. Από την άλλη ελάχιστες είναι οι δημοσιευμένες ερευνητικές εργασίες αναφορικά με την επίδραση που έχουν τα συγκεκριμένα αντιμικροβιακά στο είδος των μικροοργανισμών που επιλέγονται να αναπτυχθούν (κυρίως γαλακτικά βακτήρια) και να προκαλέσουν την αλλοίωση των αλλαντικών.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η μελέτη της επίδραση αλάτων οργανικών οξέων στη χλωρίδα αλλοίωσης αλλαντικών Φρανκφούρτης παρασκευασμένων σε βιομηχανική κλίμακα. Χρησιμοποιήθηκαν άλατα οργανικών οξέων, τα οποία βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στη βιομηχανία κρέατος χάρη στην αντιμικροβιακή τους δράση. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν γαλακτικό νάτριο (1.8% ΓΝ) μόνο του ή σε συνδυασμό με οξικό νάτριο (1.8% ΓΝ+0.25% ΟΝ). Αλλαντικά στα οποία δεν προστέθηκαν τα παραπάνω άλατα οργανικών οξέων χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (Μ). Τα αλλαντικά συντηρήθηκαν σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (4 και 12°C) για διάστημα 90 ημερών. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε συγκεκριμένες ημέρες συντήρησης (0, 7, 15, 30, 45, 60 και 90) με παράλληλη μέτρηση του pH, καταμέτρηση της OMX και των γαλακτικών βακτηρίων και οργανοληπτική εξέταση. Ακολούθησε απομόνωση στελεχών γαλακτικών βακτηρίων και βιοχημικός χαρακτηρισμός τους με περιορισμένο αριθμό δοκιμών, προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια διαφορά ως προς το είδος των γαλακτικών βακτηρίων που επιλέγονται να κυριαρχήσουν μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων (Μ, ΓΝ, ΓΝ+ΟΝ) και των διαφορετικών θερμοκρασιών συντήρησης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Παρασκευή και συντήρηση των αλλαντικών

Όλα τα δείγματα αλλαντικών Φρανκφούρτης (μήκους 12 cm και διαμέτρου 24 mm) παρασκευάστηκαν σε εμπορικές συνθήκες, σύμφωνα με συμβατική μέθοδο παρασκευής που χρησιμοποιείται στην αλλαντοβιομηχανία ΒΙ.Κ.Η. Α.Ε. (Φιλιπιάδα, Πρεβέζης). Η βασική συνταγή (πάστα) των αλλαντικών περιείχε τα συνήθη προσθετικά, όπως χλωριούχο νάτριο, σάκχαρα, μπαχαρικά, νιτρώδη, φωσφορικά και ασκορβικό οξύ, ενώ δεν περιείχε άλλες αντιμικροβιακές ουσίες και ιδίως άλατα του γαλακτικού, οξικού ή άλλων οργανικών οξέων.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του γαλακτικού νατρίου (GN) και του οξικού νατρίου (ON), κάθε φορά γινόταν διαχωρισμός 150 kg βασικής πάστας για την προσθήκη των αλάτων σε κάθε πειραματική περίπτωση (παρτίδα) αλλαντικών. Παρασκευάστηκαν τρεις (3) πειραματικές περιπτώσεις: (1) λουκάνικα με 1.8% GN (3% του εμπορικού προϊόντος, καθαρότητας 60%), (2) λουκάνικα με 1.8% GN και 0.25% ON (GN+ON), και (3) λουκάνικα μόνο με τη βασική πάστα, χωρίς δηλαδή GN ή ON, ως δείγματα-μάρτυρες (M).

Μετά τη θερμική επεξεργασία (μαζί με κάπνισμα) και ψύξη στους ειδικούς βιομηχανικούς θαλάμους, όλες οι παρτίδες αλλαντικών διατηρήθηκαν στους 4°C για 18 ώρες. Την επόμενη ημέρα αποφλοιώθηκαν στην ειδική αυτόματη αποφλοιωτική μηχανή, και αμέσως μετά συσκευάστηκαν σε σακούλες κενού (8 λουκάνικα ανά πακέτο συσκευασίας) στο συσκευαστήριο της μονάδας υπό κανονικές συνθήκες παραγωγής. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν υπό ψύξη στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Ινστιτούτου Γάλακτος, όπου και διαχωρίστηκαν προς συντήρηση σε δύο επωαστικούς θαλάμους, θερμοκρασίας 4 και 12°C, μέχρι τις 90 ημέρες.

3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Τα αλλαντικά αναλύθηκαν μικροβιολογικά στις 0, 7, 15, 30, 45, 60 και 90 ημέρες συντήρησης. Κάθε ημέρα δειγματοληψίας, δύο πακέτα (δείγματα) ανά παρτίδα αλλαντικών λαμβάνονταν προς ανάλυση: 25 g από κάθε δείγμα, που προερχόταν από μικρά τεμάχια και από τα 8 λουκάνικα εντός της κάθε συσκευασίας, μεταφέρονταν σε

χωριστές αποστειρωμένες σακούλες stomacher, όπου ομογενοποιούνταν με 225 ml 0.1 % (β/ο) ρυθμιστικό πεπτονόχο διάλυμα (Buffered Peptone Water (BPW), Lab M Ltd.) σε συσκευή stomacher (Lab Blender, Seward 400, London, UK) για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γίνονταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε BPW και επίστρωση 0.1 ml από τις κατάλληλες αραιώσεις σε διπλά τρυβλία με το κατάλληλο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, για τους ερευνητικούς στόχους της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, όλα τα δείγματα αλλαντικών εξετάστηκαν μόνο ως προς τους πληθυσμούς της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX) και των ολικών γαλακτικών βακτηρίων, σε όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Τα μικροβιολογικά υποστρώματα (Lab M Ltd.) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

-Για την OMX, το υπόστρωμα tryptic soya agar (TSA) εμπλουτισμένο με 0.6% yeast extract (TSAYE), με επώαση στους 30°C για 72 h.

-Για τα ολικά γαλακτικά βακτήρια, το υπόστρωμα de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) agar, με επώαση στους 30°C για 72 h υπό αναερόβιες συνθήκες (Gas-Pack System, BBL, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA).

Μετά την επώαση έγινε καταμέτρηση-καταγραφή του συνολικού αριθμού των αποικιών που αναπτύσσονταν πάνω στο κάθε στερεό υπόστρωμα, χωρίς ουδεμία δοκιμή διάκρισης αυτών σε αρχικό πειραματικό στάδιο. Το κατώτατο όριο ανίχνευσης για τις παραπάνω τεχνικές απαρίθμησης ήταν 10^2 cfu g⁻¹.

3.3. Χαρακτηρισμός της μικροβιακής χλωρίδας των αλλαντικών

Οι πιθανές ποιοτικές διαφορές στη σύσταση της επικρατούσας φυσικής μικροβιακής χλωρίδας αλλοίωσης που αναπτυσσόταν στα δείγματα αλλαντικών, με ή χωρίς την προσθήκη αλάτων, κατά τη συντήρηση στους 4°C και 12°C παρακολουθήθηκαν με βάση τον χαρακτηρισμό αντιπροσωπευτικών απομονώσεων, από τρυβλία μεγάλων αραιώσεων (10^{-5} έως 10^{-7} κατά περίπτωση) TSAYE και MRS agar. Συγκεκριμένα, γνωρίζοντας από προηγούμενες εργασίες ότι η επικρατούσα μικροβιακή χλωρίδα αλλοίωσης διαφόρων τύπων αλλαντικών συσκευασμένων σε κενό αποτελείται σχεδόν αποκλειστικά από διάφορα είδη γαλακτικών βακτηρίων του κρέατος, οι μικροβιακές απομονώσεις έγιναν κατά βάση από τρυβλία TSAYE, δηλαδή από το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καταμέτρηση της OMX. Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης επιλέχθηκε ως το βασικό υπόστρωμα των απομονώσεων επειδή: (1) αναμενόταν να καταδείξει την πιθανή

παρουσία άλλων, μη γαλακτικών βακτηρίων, αν φυσικά υπήρχαν σε σημαντικά ποσοστά επί του συνόλου της OMX, και (2) εκτός των ανθεκτικών στα οργανικά οξέα *Lactobacillus* spp., υποστηρίζει την ανάπτυξη ορισμένων γενών και ειδών γαλακτικών βακτηρίων (*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc/Weissella*) που δεν παράγουν, ούτε αντέχουν, αυξημένες συγκεντρώσεις οργανικών οξέων. Για την σύγκριση της επιλεκτικότητας των δυο υποστρωμάτων, οι απομονώσεις από TSAYE συμπληρώθηκαν με αντίστοιχο αριθμό απομονώσεων από τα τρυβλία MRS, οι οποίες όμως έγιναν σε ορισμένες μόνο ημέρες δειγματοληψίας κατά τη συντήρηση των δειγμάτων αλλαντικών, όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια.

Ειδικότερα, όταν το ύψος της OMX στα δείγματα των αλλαντικών ανερχόταν σε 10^6 cfu g⁻¹, ενδεικτικό πληθυσμό πάνω από τον οποίο είχε πλέον αρχίσει η διαδικασία αλλοίωσης που θα επιδρούσε στην τελική διάρκεια ζωής του προϊόντος, επιλέγονταν 10 τυχαίες αποικίες προς απομόνωση από ένα τυχαίο τρυβλίο TSAYE της πλέον κατάλληλης μεγάλης αραίωσης, που συνήθως περιελάμβανε από 30 έως 100 αποικίες. Συνεπώς, ο αριθμός των αντιπροσωπευτικών απομονώσεων ήταν ίσος ή μεγαλύτερος από την τετραγωνική ρίζα του συνόλου των επικρατούσων αποικιών στο κάθε δείγμα. Επιπλέον, 10 τυχαίες απομονώσεις έγιναν από τρυβλία MRS agar των 15 και 30 ημερών συντήρησης όλων των δειγμάτων στους 12°C και των 30 ημερών των δειγμάτων M, GN και GN+ON στους 4°C, αντίστοιχα. Με βάση το παραπάνω πρωτόκολλο, απομονώθηκαν συνολικά 270 αποικίες, 180 στελέχη από TSAYE και 90 στελέχη από MRS agar, για περαιτέρω βιοχημικό χαρακτηρισμό.

Όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε MRS broth στους 30°C, ελέγχθηκαν ως προς την καθαρότητά τους με επιφανειακή εξάπλωση σε MRS agar και συντηρήθηκαν σε MRS broth με 20% γλυκερίνη (Merck, Darmstadt, Germany) στους -30°C. Τα τρυβλία με τις καθαρές καλλιέργειες του κάθε στελέχους χρησιμοποιήθηκαν για άμεσο έλεγχο της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο (phase contrast microscopy), τη δοκιμή αντίδρασης κατά Gram και τη δοκιμή καταλάσης. Μόνο τα θετικά κατά Gram και αρνητικά στην καταλάση στελέχη, δηλαδή μόνο όσα στελέχη ανήκαν στα γαλακτικά βακτήρια, χαρακτηρίστηκαν περαιτέρω με βάση τον ακόλουθο περιορισμένο αριθμό δοκιμών: παραγωγή αερίου από τη γλυκόζη, υδρόλυση αργινίνης, ανάπτυξη στους 45°C, παραγωγή βλέννας από την σακχαρόζη, και ζύμωση των παρακάτω 13 επιλεγμένων σακχάρων (Merck or Sigma Aldrich Co., Ltd, UK) σε μικροπλακίδια των 96 οπών: L-αραβινόζη, κελλοβιόζη, γαλακτόζη, λακτόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη, μελιβιόζη, ραφφινόζη,

ριβόζη, σακχαρόζη, σορβιτόλη, τρεχαλόζη και ξυλόζη. Ακολούθησε κατηγοριοποίηση των στελεχών με βάση τις παραπάνω δοκιμές. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αντιπροσωπευτικά στελέχη από κάθε κατηγορία υποβλήθηκαν σε επιβεβαιωτικές δοκιμές ανάπτυξης σε χαμηλές θερμοκρασίες 4°C και 10°C και σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (8 και 10%). Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τις παραπάνω δοκιμές είναι αυτές που αναφέρονται από τους **Samelis et al. (1994)**, ενώ οι αρχές των μεθόδων και τα διάφορα αντιδραστήρια διεξαγωγής αυτών περιγράφονται κυρίως στο εγχειρίδιο των **Harrigan & McCance (1976)**. Μια συνοπτική περιγραφή των μεθόδων ταυτοποίησης δίνεται παρακάτω.

3.3.1 Μικροσκοπική εξέταση

Χρησιμοποιήθηκε φρέσκια καλλιέργεια 18 h κάθε στελέχους μετά από ανάπτυξη σε MRS broth στην κατάλληλη θερμοκρασία επώασης. Η παρατήρηση του σχήματος και μεγέθους των κυττάρων έγινε στα παρασκευάσματα μετά από προσήλωση και χρώση πάνω σε υάλινα πλακίδια μικροσκόπησης. Η προσήλωση των κυττάρων έγινε με ήπια θέρμανση του μικροσκοπικού παρασκευάσματος για κάθε στέλεχος πάνω από λύχνο Bunsen και στη συνέχεια χρώση με υδατικό διάλυμα 0.5% crystal violet για 1 λεπτό. Μετά τη χρώση τα παρασκευάσματα ξεπλένονταν με αιθυλική αλκοόλη 95°, στεγνώνονταν πάνω σε διηθητικό χαρτί και ακολουθούσε η παρατήρηση στο μικροσκόπιο (phase contrast microscopy) με τη βοήθεια ελαιο-καταδυτικού φακού.

3.3.2 Δοκιμή αντίδρασης στη χρώση κατά Gram

Αντί της κλασικής διαδοχικής χρώσης των κυττάρων με διάλυμα crystal violet και σαφρανίνης, χρησιμοποιήθηκε η εναλλακτική μέθοδος διασποράς των κυττάρων σε διάλυμα καυστικού καλίου. Η μέθοδος αυτή, που είναι εξίσου αξιόπιστη με την κλασική χρώση, είναι πολύ ταχύτερη και εύκολη ως διαδικασία, συνεπώς επιτρέπει την εξέταση μεγάλου αριθμού στελεχών σε σύντομο χρόνο. Σε μια σταγόνα υδατικού διαλύματος KOH (Merck) 3% πάνω σε υάλινη πλάκα προστέθηκε μικρή ποσότητα ιζήματος κυττάρων από φρέσκια καλλιέργεια του κάθε στελέχους. Ο σχηματισμός βλεννώδους μάζας από την ανάμιξη αυτή σήμαινε ότι το προς εξέταση στέλεχος ήταν Gram αρνητικό (-) βακτήριο. Σε αντίθετη περίπτωση επρόκειτο για Gram θετικό (+) βακτήριο. Η βλεννώδης μάζα σχηματίζεται μόνο στην περίπτωση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων λόγω

αντίδρασης του πεπτιδογλυκανικού στρώματος του κυτταρικού τοιχώματος αυτών με το παραπάνω αλκαλικό διάλυμα.

3.3.3 Δοκιμή καταλάσης

Χρησιμοποιήθηκε η κλασική δοκιμή με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συγκεκριμένα, 1-2 σταγόνες διαλύματος 3% H₂O₂ ρίχθηκαν απ' ευθείας πάνω σε τρυβλίο με φρέσκια καλλιέργεια του κάθε στελέχους. Ως θετική αντίδραση, δηλαδή βακτήριο θετικό στην καταλάση, θεωρήθηκε η άμεση εμφάνιση αφρισμού- έκλυσης φυσαλίδων από τις αποικίες λόγω της άμεσης διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση με την παραγωγή αερίου οξυγόνου. Όσα στελέχη δεν παρουσίαζαν αφρισμό χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικά στην παραγωγή καταλάσης.

3.3.4 Παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα από τη γλυκόζη

Η παραγωγή CO₂ από τη ζύμωση της γλυκόζης αποτελεί βασικότατο χαρακτηριστικό διάκρισης των γαλακτικών βακτηρίων καθώς με βάση το κριτήριο αυτό διακρίνονται σε υποχρεωτικώς ομοζυμωτικά και ετεροζυμωτικά γένη και είδη. Παρατηρήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που ο καθένας περιείχε 7 ml τροποποιημένο MRS broth, μέσα στο οποίο είχε τοποθετηθεί ένας ανεστραμμένος κώδωνας Durham για τη συλλογή του αερίου. Το τροποποιημένο MRS broth παρασκευάστηκε από τα βασικά συστατικά, αλλά με αντικατάσταση του κιτρικού διαμμωνίου με θειικό αμμώνιο, προς αποφυγή της πιθανής παραγωγής αερίου από την αφομοίωση των κιτρικών και άρα της εξαγωγής εσφαλμένων αποτελεσμάτων. Όσα στελέχη αναπτύχθηκαν με εμφάνιση θολώματος και ταυτόχρονη συσσώρευση αερίου μέσα στους κώδωνες μετά από επώαση σε θερμοκρασία 30°C μέχρι 72 h χαρακτηρίστηκαν ως ετεροζυμωτικά, ενώ όσα αναπτύχθηκαν χωρίς παραγωγή αερίου χαρακτηρίστηκαν ως ομοζυμωτικά.

3.3.5 Παραγωγή αμμωνίας με υδρόλυση της αργινίνης

Αποτελεί επίσης βασικότατο κριτήριο ταυτοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων σε επίπεδο είδους. Η ανάπτυξη των στελεχών έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με τροποποιημένο MRS broth που περιείχε μειωμένη ποσότητα γλυκόζης (0.05% αντί 2%), δεν περιείχε εκχύλισμα κρέατος, ενώ επίσης προστέθηκε 0.3% αργινίνη και έγινε

αντικατάσταση του κιτρικού διαμμωνίου με κιτρικό νάτριο για την αποφυγή παραγωγής NH_3 από το αμμωνιακό άλας. Τα στελέχη επώαστηκαν σε θερμοκρασία 30°C για 48 h. Η ανίχνευση της παραγωγής NH_3 έγινε με τη βοήθεια μίγματος (50:50) αντιδραστηρίου Nessler που παρασκευαζόταν λίγο πριν τη δοκιμή από τα εμπορικά αντιδραστήρια Nessler A και B (Merck). Συγκεκριμένα μετά την επώαση, 1 ml καλλιέργειας μεταφερόταν σε μικρό δοκιμαστικό σωλήνα και ακολουθούσε ανάμιξη με 1ml μίγματος (50:50) αντιδραστηρίου Nessler. Ως θετική αντίδραση θεωρήθηκε η άμεση εμφάνιση πορτοκαλί χρώματος, ενώ ως αρνητική θεωρήθηκε η αντίδραση κατά την οποία το χρώμα της καλλιέργειας παρέμενε υποκίτρινο.

3.3.6 Παραγωγή δεξτράνης (βλέννας) από την σακχαρόζη

Μικρή ποσότητα υγρής καλλιέργειας του κάθε στελέχους εξαπλώνονταν με τη βοήθεια βακτηριολογικού κρίκου πάνω σε τρυβλίο με MRS agar το οποίο περιείχε 5% σακχαρόζη αντί γλυκόζης. Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων στους 30°C από 1 έως 5 ημέρες, διάστημα κατά το οποίο ελέγχονταν καθημερινά για εμφάνιση βλενώδους πολυσακχαρίτη στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού. Σε περίπτωση αρνητικής αντίδρασης το στέλεχος αναπτυσσόταν χωρίς παραγωγή δεξτράνης.

3.3.7 Ανάπτυξη σε διάφορες θερμοκρασίες

Η δυνατότητα ανάπτυξης σε διάφορες θερμοκρασίες αποτελεί ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά ταυτοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων. Βάσει του εύρους των θερμοκρασιών που αναπτύσσονται είναι δυνατή η κατάταξή τους σε ψυχρόφιλα, μεσόφιλα ή θερμόφιλα γένη και είδη. Συγκεκριμένα, στις παλαιότερες κλασικές κλείδες ταξινόμησης που δεν βασίζονταν τόσο σε μοριακές τεχνικές, τα γαλακτικά βακτήρια και ειδικότερα το γένος *Lactobacillus* διαχωρίζονταν παραδοσιακά με μεσόφιλα και θερμόφιλα είδη με βάση την ικανότητα ανάπτυξης των ειδών σε θερμοκρασία 15°C και 45°C , αντίστοιχα.

Στην παρούσα εργασία, η ικανότητα ανάπτυξης επιλεγμένων στελεχών από κάθε κατηγορία ελέγχθηκε σε σωλήνες με MRS broth που επώαστηκαν στους 4, 10, και 45°C για 10, 5 και 1 ημέρες, αντίστοιχα. Οι σωλήνες εμβολιάστηκαν προηγουμένως με βακτηριολογικό κρίκο, προς αποφυγή μεταφοράς μεγάλης ποσότητας εμβολίου κάτι που θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Ο έλεγχος της ανάπτυξης στους 45°C έγινε με επώαση σε υδατόλουτρο για μεγαλύτερη ακρίβεια της θερμοκρασίας. Η

διαπίστωση της ικανότητας ανάπτυξης γινόταν αντιληπτή από την εμφάνιση θολώματος και σχηματισμό ιζήματος μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα.

3.3.8 Ανάπτυξη σε διάφορες συγκεντρώσεις άλατος (NaCl)

Παρασκευάστηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με 7 ml MRS broth στο οποίο είχε προστεθεί 8% ή 10% (w/v) χλωριούχο νάτριο (NaCl) πριν την αποστείρωση. Στη συνέχεια τα επιλεγμένα στελέχη κάθε κατηγορίας εμβολιάστηκαν στους σωλήνες και επωάστηκαν στους 30°C μέχρι 5 ημέρες. Η διαπίστωση της ικανότητας ανάπτυξης παρουσία του άλατος γινόταν αντιληπτή από την εμφάνιση θολώματος και σχηματισμό ιζήματος μέσα στο δοκιμαστικό σωλήνα.

3.3.9 Ζύμωση σακχάρων

Όλα τα στελέχη εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα ζύμωσης 12 σακχάρων που επιλέχθηκαν με βάση τις κλειδες ταξινόμησης, με έμφαση στα γαλακτικά βακτήρια που αναφέρονται ότι ενδημούν σε κρέας και προϊόντα κρέατος. Χρησιμοποιήθηκαν προ-αποστειρωμένα πλακίδια των 96 οπών (12 οπές οριζοντίως χ 8 οπές καθέτως). Σε κάθε κάθετη σειρά των 8 οπών τοποθετούνταν κάθε φορά ένα από τα 12 επιλεγμένα σάκχαρα (ανάλογα με τον τύπο του στελέχους υπό εξέταση), που ήταν τα ακόλουθα: L-αραβινόζη, γαλακτόζη, κελλοβιόζη, λακτόζη, μαλτόζη, μαννιτόλη, μελιβιόζη, ξυλόζη, ραφφινόζη, ριβόζη, σακχαρόζη, σορβιτόλη, και τρεχαλόζη. Συνεπώς σε κάθε πλακίδιο υπήρχαν 11 κάθετες σειρές (στήλες) με διαφορετικά σάκχαρα, καθώς η πρώτη κάθετη σειρά (στήλη) δεν περιείχε κανένα σάκχαρο, δηλαδή χρησίμευε ως μάρτυρας. Με τον τρόπο αυτό, σε κάθε πλακίδιο εμβολιάζονταν 8 στελέχη, που κάθε ένα εξεταζόταν οριζοντίως ως προς την ζύμωση 11 προ-επιλεγμένων σακχάρων.

Η προετοιμασία των πλακιδίων γινόταν ως εξής: Αρχικά παρασκευάστηκαν μητρικά υδατικά διαλύματα σακχάρων (10% w/v) σε απεσταγμένο νερό που αποστειρώθηκαν με φίλτρο 0.22 μm και φυλάσσονταν σε ψυγείο 4°C σε καλά πωματισμένα φιαλίδια. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε MRS broth προσδιορισμού που περιείχε (g/l): πεπτόνη 10.0, εκχύλισμα ζύμης 4.0, οξικό νάτριο-3H₂O 5.0, όξινο φωσφορικό κάλιο 2.0, κιτρικό τριαμμώνιο 2.0, θειικό μαγνήσιο-7H₂O 0.2, θειικό μαγγάνιο-4H₂O 0.05, Tween 80 1 ml, πορφυρούν της βρωμοκρεζόλης 0.17, και με τελικό pH 6.9-7.0. Στο pH αυτό ο δείκτης βρωμοκρεζόλης δίνει χρώμα μωβ που σταδιακά μετατρέπεται σε πράσινο και τελικά σε

κίτρινο, όταν στο υλικό προστεθεί κάποιο σάκχαρο που σταδιακά μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ μέσω της ζύμωσης από το υπό εξέταση γαλακτικό στέλεχος. Το MRS broth προσδιορισμού παρασκευαζόταν με σταδιακή προσθήκη όλων των συστατικών υπό συνεχή ανάδευση και μέχρι θερμοκρασία βρασμού. Ακολούθως γινόταν διαμοίραση του υγρού υλικού ανά 10 ml σε δοκιμαστικούς σωλήνες και αποστείρωση στους 121°C για 15 min. Παράλληλα προετοιμάστηκαν σωλήνες με 10 ml αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού Ringer με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για την έκπλυση των κυττάρων.

Η διαδικασία πλήρωσης των οπών σε κάθε πλακίδιο γινόταν ως εξής: Αρχικά στις 8 κυψελίδες της πρώτης στήλης τοποθετήθηκε μια σταγόνα αποστειρωμένου νερού (στήλη μάρτυρας), ενώ σε κάθε μια από τις υπόλοιπες 11 στήλες τοποθετήθηκε μια σταγόνα από κάθε ένα διάλυμα σακχάρου. Η τοποθέτηση των σταγόνων στις κυψελίδες γινόταν με την βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur. Στη συνέχεια, για τον εμβολιασμό των κυψελίδων με κάθε ένα στέλεχος, σε οριζόντια διάταξη, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία προετοιμασίας του εμβολίου:

- Ανάπτυξη του στελέχους σε MRS broth για 24 h σε θερμοκρασία 30°C
- Μεταφορά της υγρής καλλιέργειας σε γυάλινους προ-αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρου πωματισμένους με βαμβάκι.
- Φυγοκέντρωση στις 3.200 rpm για 15 min.
- Απόχυση της υγρής φάσης και έκπλυση του ιζήματος κυττάρων με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer - Ανάδευση σε συσκευή vortex. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δυο φορές.
- Παραλαβή της καθαρής κυτταρικής βιομάζας ως ίζημα στο σωλήνα.
- Προσθήκη 2 ml MRS προσδιορισμού - καλή ανάδευση.
- Προσθήκη σε νέο σωλήνα με MRS προσδιορισμού ποσότητας 0.2 -1 ml από το παραπάνω κυτταρικό εναιώρημα. Η ποσότητα ήταν τέτοια κατά περίπτωση ώστε με προσθήκη σε 10 ml MRS προσδιορισμού να δώσει οπτική πυκνότητα 0.2-0.4 στα 525 nm.

Στη συνέχεια, το παραπάνω κυτταρικό εναιώρημα κάθε στελέχους εμβολιάστηκε στο αντίστοιχο πλακίδιο, με τη βοήθεια αποστειρωμένης πιπέτας Pasteur, σε οριζόντια διάταξη, δηλαδή ένα στέλεχος ανά σειρά. Σε κάθε κυψελίδα τοποθετούνταν 4 σταγόνες MRS προσδιορισμού εμβολιασμένου με το υπό εξέταση στέλεχος, ώστε η τελική συγκέντρωση του σακχάρου στο μίγμα να είναι περίπου 2%. Στη συνέχεια, σε όλες τις κυψελίδες μεταφέρονταν 2 σταγόνες αποστειρωμένο παραφινέλαιο για τη δημιουργία

αναερόβιων συνθηκών. Η διαδικασία πλήρωσης των κυψελίδων γινόταν σε σύντομο χρόνο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα πλακίδια μετά τον εμβολιασμό επωάζονταν στους 30°C μέχρι 5 ημέρες. Η εξέτασή τους γίνονταν καθημερινά. Ως θετική ζύμωση σακχάρου θεωρήθηκε η αλλαγή χρώματος του δείκτη βρωμοκρεζόλης από μωβ σε κίτρινο ή ανοιχτό πρασινοκίτρινο λόγω παραγωγής οξέος. Η μεταβολή του χρώματος από μωβ σε βαθύ πράσινο ήταν ενδεικτική ασθενούς ζύμωσης.

3.4. Χημικές αναλύσεις

Μετρήθηκε το pH όλων των δειγμάτων αλλαντικών αμέσως μετά τη δειγματοληψία για μικροβιολογική ανάλυση, με ανάμιξη 10 g αλλαντικού σε 90 ml απεσταγμένο νερό, και μέτρηση σε πεχάμετρο Crison Micro-pH 2001 (Alella, Spain). Επίσης στην αρχή της συντήρησης (0η ημέρα), προσδιοριζόταν η περιεκτικότητα σε υγρασία, λίπος, πρωτεΐνη, και αλάτι κάθε παρτίδας αλλαντικών. Ειδικά οι αρχικές αυτές μετρήσεις ρουτίνας έγιναν με μεθόδους αναφοράς κατά AOAC, από το προσωπικό του εργαστηρίου ποιοτικού ελέγχου της B.I.K.H. A.E., και μας δόθηκαν ως αρχικά δεδομένα μαζί με τα αντίστοιχα δείγματα των αλλαντικών προς συντήρηση στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Ινστιτούτου Γάλακτος Ιωαννίνων.

3.5 Οργανοληπτική εξέταση

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, τα δείγματα αλλαντικών Φρανκφούρτης δεν εξετάστηκαν οργανοληπτικά βάσει βαθμολόγησης από ομάδα έμπειρων δοκιμαστών με βάση κάποιο πρότυπο. Απλά αξιολογήθηκαν μακροσκοπικά καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης για την ύπαρξη ελαττωμάτων εμφάνισης των συσκευασιών κενού (αποκόλληση, φούσκωμα, συσώρευση οπού), καθώς και αλλαγών του χρώματος, της οσμής και για παρουσία βλέννας μετά το άνοιγμα της κάθε συσκευασίας προς μικροβιολογική ανάλυση.

3.6 Στατιστική ανάλυση

Όλα τα πειράματα έγιναν εις διπλούν. Τα δεδομένα των ποσοτικών μικροβιολογικών αναλύσεων και των μετρήσεων pH κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων αλλαντικών στους 4 και 12°C υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση της διασποράς με χρήση του πακέτου Statgraphics (Rockville, MD, USA). Οι μικροβιακοί πληθυσμοί μετατράπηκαν αρχικά σε $\log \text{cfu g}^{-1}$. Οι ανεξάρτητες μεταβλητές περιελάμβαναν τις μεταχειρίσεις και το χρόνο συντήρησης καθώς επίσης και τις αλληλεπιδράσεις μεταχείρισης και χρόνου συντήρησης. Υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις, και προσδιορίστηκαν οι στατιστικώς σημαντικές διαφορές των τιμών F με την μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων (LSD) για επίπεδο σημαντικότητας $p < 0.05$.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των γαλακτικών βακτηρίων, αυτά παρουσιάζονται σε ραβδογράμματα ως % ποσοστά απομονωθέντων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων για κάθε δείγμα αλλαντικού, προκειμένου να γίνει μια σύγκριση ως προς τα διαφορετικά είδη γαλακτικών βακτηρίων που επιλέγονται ανά πειραματική παρτίδα (M, ΓN και ΓN+ON).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αλλαντικών Φρανκφούρτης

Τα κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αλλαντικών Φρανκφούρτης στην αρχή της συντήρησης (0η ημέρα) ήταν παρόμοια ($p > 0.05$), δηλαδή ήταν ανεξάρτητα των αλάτων που προστέθηκαν σε κάθε παρτίδα. Οι μέσες τιμές υγρασίας, λίπους, πρωτεΐνης και άλατος ήταν 59.8 ± 2.5 , 17.2 ± 0.8 , 11.0 ± 0.7 και 2.3 ± 0.3 , αντίστοιχα. Παρόμοιες τιμές έχουν καταγραφεί για αλλαντικά Φρανκφούρτης του εμπορίου στην Τουρκία: 63.31 ± 2.80 , 16.52 ± 2.67 , 13.19 ± 1.24 και 2.35 ± 0.29 αντίστοιχα (Apaydin et al., 2008), ενώ σύμφωνα με τους Samelis et al. (2000a) οι αρχικές τιμές υγρασίας και χλωριούχου νατρίου στα αλλαντικά Φρανκφούρτης ήταν 57.8% και 2.2% αντίστοιχα.

Μικρές γενικά διαφορές παρατηρήθηκαν και στην αρχική τιμή του pH των αλλαντικών, που ήταν 6.4 ± 0.2 , 6.3 ± 0.2 και 6.3 ± 0.2 για τα δείγματα M, ΓN και ΓN+ON αντίστοιχα. Η αρχική τιμή pH που καταγράφηκε για τα δείγματα των μαρτύρων (M) είναι σε συμφωνία με άλλες ερευνητικές εργασίες για αλλαντικά Φρανκφούρτης (πχ. 6.3; Samelis et al., 2000a; Drosinos et al., 2006, 6.25 ± 0.21 ; Nowak & Krysiak, 2005 ενώ χαμηλότερες τιμές 6.07 ± 0.04 ανέφεραν οι Barmpalia et al., 2004).

4.2 Ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων κατά τον χρόνο συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης

Ο αρχικός πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) κατά την 0η ημέρα ήταν $2.6 \pm 0.2 \log_{10} \text{cfu/g}$, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$) μεταξύ των αλλαντικών κάθε παρτίδας. Αντίστοιχους πληθυσμούς γαλακτικών βακτηρίων κατέγραψαν και οι Samelis et al. (2000a) ($2.7 \log_{10} \text{cfu/g}$) ενώ οι Drosinos et al. (2006) ανέφεραν χαμηλότερους πληθυσμούς της τάξης των $2 \log_{10} \text{cfu/g}$.

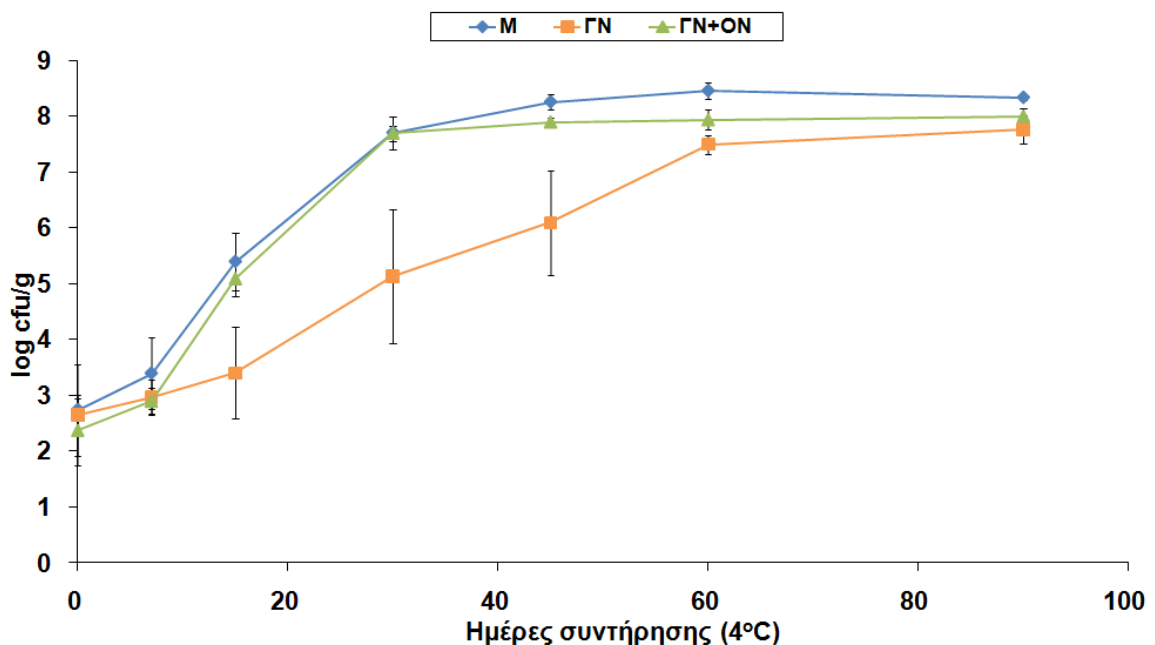
Τα γαλακτικά βακτήρια άλλοτε ταχύτερα και άλλοτε αργότερα υπερέβησαν σε πληθυσμό τους $6 \log_{10} \text{cfu/g}$ κατά τη διάρκεια της συντήρησης τόσο στους 4°C (Σχήμα 4.1) όσο και στους 12°C (Σχήμα 4.2).

Η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων όπως αναμενόταν ήταν ταχύτερη στους 12°C (Σχήμα 4.2) απ' ότι στους 4°C (Σχήμα 4.1), ανεξάρτητα αν τα αλλαντικά περιείχαν άλατα ή όχι και είναι σε συμφωνία με άλλες ερευνητικές εργασίες (Samelis & Georgiadou,

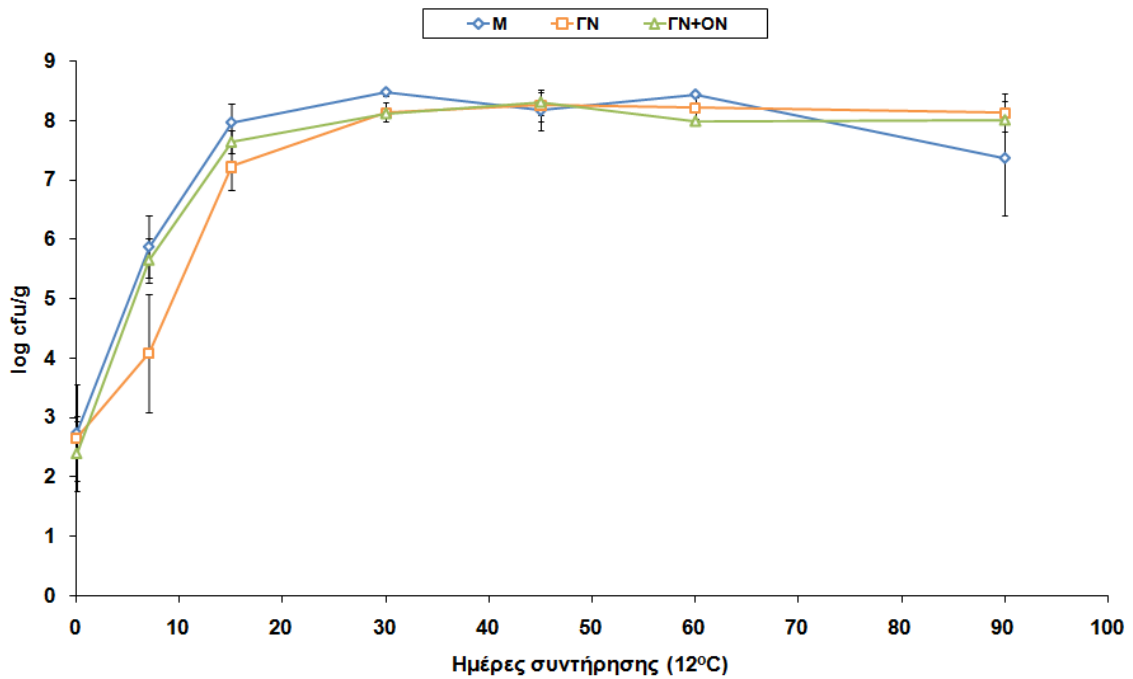
2000; Samelis et al., 1998a; Borch et al., 1996; Korkeala & Björkroth, 1997; Zurea-Cosano et al., 1988).

Μετά από 20 ημέρες συντήρησης των αλλαντικών στους 4°C, όπως ήταν αναμενόμενο τα γαλακτικά βακτήρια αυξήθηκαν και έφτασαν για τα δείγματα M τους 6 logcfu/g, ενώ υψηλότερους πληθυσμούς (8 logcfu/g) διαπίστωσαν υπό τις ίδιες συνθήκες οι **Drosinos et al. (2006)**. Οι **Nowak & Krysiak (2005)** ανέφεραν πληθυσμούς 6.77 ± 0.38 μετά από 18 ημέρες συντήρησης. Στην παρούσα εργασία μετά από 30 ημέρες συντήρησης οι πληθυσμοί έφτασαν τους 7.7 logcfu/g και ήταν αυξημένοι κατά περίπου 1 log συγκρινόμενοι με την αντίστοιχη τιμή αλλαντικών Φρανκφούρτης υπό τις ίδιες συνθήκες (**Samelis et al., 2000a**).

Η ταχύτητα αύξησης των γαλακτικών βακτηρίων ήταν συνάρτηση του είδους και συνδυασμού των αλάτων που περιείχαν τα δείγματα της κάθε παρτίδας, αλλά και της θερμοκρασίας συντήρησης (Σχήματα 4.1 και 4.2). Συγκεκριμένα στους 4°C, η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων ήταν μεγαλύτερη στα δείγματα των αλλαντικών με την εξής σειρά: M > ΓN+ON > ΓN (Σχήμα 4.1). Η ίδια ακριβώς σειρά παρατηρήθηκε και για τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 12°C που η ανάπτυξη ήταν σημαντικά ταχύτερη λόγω της υψηλότερης θερμοκρασίας συντήρησης (Σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.1. Ανάπτυξη της οξυγαλακτικής χλωρίδας αλλοίωσης σε αλλαντικά Φρανκφούρτης που παρασκευάστηκαν κάτω από βιομηχανικές συνθήκες με προσθήκη 1.8% γαλακτικού νατρίου (ΓN) μόνο του ή σε συνδυασμό με 0.25% οξικού νατρίου (ΓN+ON), ή παρασκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη ΓN ή ON (δείγματα- μάρτυρες, M) και συντηρήθηκαν σε εμπορική συσκευασία κενού σε θερμοκρασία 4°C.



Σχήμα 4.2. Ανάπτυξη της οξυγαλακτικής χλωρίδας αλλοίωσης σε αλλαντικά Φρανκφούρτης που παρασκευάστηκαν κάτω από βιομηχανικές συνθήκες με προσθήκη 1.8% γαλακτικού νατρίου (GN) μόνο του ή σε συνδυασμό με 0.25% οξικού νατρίου (GN+ON), ή παρασκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη GN ή ON (δείγματα- μάρτυρες, M) και συντηρήθηκαν σε εμπορική συσκευασία κενού σε θερμοκρασία 12°

Ειδικότερα, σε σύγκριση με τα δείγματα M, το GN καθυστέρησε την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων κατά 2.3 και 1.0 λογαριθμούς μετά από 45 και 60 ημέρες συντήρησης στους 4°C, αντίστοιχα, ενώ το μίγμα GN+ON δεν ήταν αποτελεσματικό μετά την 7^η ημέρα. Μετά από 90 ημέρες συντήρησης στους 4°C, όλα τα δείγματα είχαν πληθυσμούς 7.8-8.4 logcfu/g (Σχήμα 4.1). Αντίθετα στους 12°C προσθήκη GN παρεμπόδιζε σημαντικά την οξυγαλακτική ανάπτυξη για μόλις 7 ημέρες (Σχήμα 4.2).

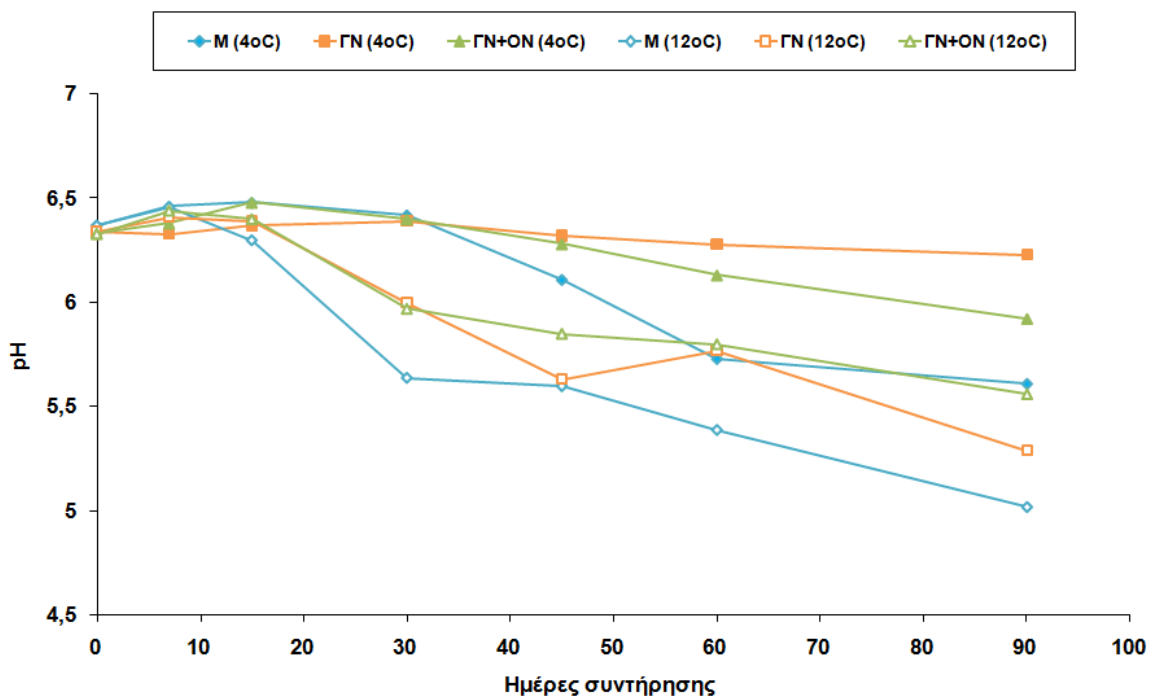
Στην εργασία τους οι **Drosinos et al. (2006)** παρατήρησαν αύξηση των πληθυσμών των γαλακτικών βακτηρίων μετά την 12^η ημέρα συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης στους 4 °C τόσο για το γαλακτικό νάτριο μόνο το υ (1.8%) όσο και για το μίγμα 1.8% γαλακτικού νατρίου, 0.5% οξικού νατρίου και 0.15% σορβικού καλίου. Μετά από 20 και 40 ημέρες συντήρησης, οι πληθυσμοί στα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε μόνο γαλακτικό νάτριο βρέθηκαν να είναι 4 και 5.3 logcfu/g αντίστοιχα, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (4 και 5.7 logcfu/g αντίστοιχα). Αντίθετα το αντιμικροβιακό μίγμα αλάτων που χρησιμοποίησαν οι παραπάνω ερευνητές αποδείχθηκε πιο αποτελεσματικό, διατηρώντας τους πληθυσμούς των γαλακτικών βακτηρίων σε χαμηλότερα επίπεδα. Μετά από 20 και 40 ημέρες συντήρησης τα γαλακτικά βακτήρια βρισκόταν σε πληθυσμούς 3 και 5.3 logcfu/g αντίστοιχα, ενώ στην παρούσα εργασία οι αντίστοιχοι πληθυσμοί ήταν 5 και 8 logcfu/g. Βέβαια η σημαντική αυτή

διαφορά πιθανώς να οφείλεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του οξικού νατρίου και επιπλέον στην παρουσία του σορβικού καλίου στο αντιμικροβιακό μίγμα.

Επιβράδυνση της ανάπτυξης γαλακτικών βακτηρίων έχει διαπιστωθεί σε αλλαντικά Φρανκφούρτης (Barmpalia et al., 2005) και Μπολόνια (Barmpalia et al., 2005) στα οποία ενσωματώθηκε στην κρεατόπαστα μίγμα 1.8% ΓΝ και 0.25% διοξικό νάτριο (ΔΟΝ). Επίσης περιορισμός της ανάπτυξης των εμβολιασμένων *L. sakei* και *L. curvatus* σε λουκάνικα Φρανκφούρτης (Stekelenburg, 2003) και βραστό ζαμπόν (Stekelenburg & Kant-Muermans, 2001) αντίστοιχα, παρατηρήθηκε παρουσία γαλακτικού καλίου (ΓΚ) και ΓΚ/ΔΟΝ (στα αλλαντικά Φρανκφούρτης) και ΓΚ (στο βραστό ζαμπόν), ενώ διαπιστώθηκε ότι το διοξικό νάτριο μόνο του δεν επηρέασε την ανάπτυξη των συγκεκριμένων ειδών γαλακτικών βακτηρίων (Stekelenburg & Kant-Muermans, 2001; Stekelenburg, 2003).

4.3 Μεταβολές του pH κατά τον χρόνο συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης

Στο Σχήμα 4.3 που ακολουθεί απεικονίζεται ο ρυθμός πτώσης του pH συναρτήσει του χρόνου συντήρησης για τα αλλαντικά Φρανκφούρτης παρουσία ή απουσία αντιμικροβιακών αλάτων και για τις δυο θερμοκρασίες συντήρησης που εφαρμόστηκαν.



Σχήμα 4.3. Μεταβολές του pH συναρτήσει του χρόνου συντήρησης, σε αλλαντικά Φρανκφούρτης που παρασκευάστηκαν κάτω από βιομηχανικές συνθήκες με προσθήκη 1.8% γαλακτικού νατρίου (ΓΝ) μόνο του ή σε συνδυασμό με 0.25% οξικού νατρίου (ΓΝ+ΟΝ), ή παρασκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη ΓΝ ή ΟΝ (δείγματα- μάρτυρες, Μ) και συντηρήθηκαν σε εμπορική συσκευασία κενού σε θερμοκρασία 4 καC12°

Η τιμή του pH των αλλαντικών όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.3, άρχισε να μειώνεται μετά την 15^η ημέρα συντήρησης στους 12°C και μετά την 30^η ημέρα συντήρησης στους 4°C. Έτσι για τα δείγματα M μετά από 30 ημέρες συντήρησης στους 4°C το pH κυμάνθηκε στα αρχικά επίπεδα (6.4) ενώ σύμφωνα με τις εργασίες των **Samelis et al. (2000a)** και **Drosinos et al. (2006)** οι αντίστοιχες τιμές ήταν ελαφρώς χαμηλότερες (6.0 και 5.7 αντίστοιχα).

Μικρή πτώση της τιμής του pH παρατηρήθηκε και για τα αλλαντικά στα οποία προστέθηκαν αντιμικροβιακά άλατα και συντηρήθηκαν στους 4°C. Έτσι μετά από 40 ημέρες το pH κυμάνθηκε σε τιμές 6.3 τόσο για τα δείγματα ΓN όσο και για τα δείγματα ΓN+ON, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των **Drosinos et al. (2006)** (6.2 και 6.3 για τα δείγματα ΓN και τα δείγματα ΓN+ON+ΣΚ αντίστοιχα). Το τελικό pH (90^η ημέρα) των αλλαντικών M, ΓN+ON και ΓN ήταν 5.0, 5.6 και 5.3 στους 12°C, και 5.6, 5.9 και 6.2 στους 4°C, αντίστοιχα (Σχήμα 4.3).

Μεταξύ των αλλαντικών που περιείχαν αντιμικροβιακά άλατα, αξιοσημείωτο ήταν ότι ενώ τα δείγματα ΓN παρουσίασαν την αμέσως μεγαλύτερη πτώση του pH μετά τα δείγματα M στους 12°C, κάτι ανάλογο δεν συνέβη στους 4°C όπου το pH των ΓN+ON ήταν το αμέσως μικρότερο μετά τα δείγματα M (Σχήμα 4.3). Άρα, στους 4°C, τα γαλακτικά βακτήρια που επιλέγονταν στα δείγματα ΓN πιθανόν ήταν διαφορετικά από εκείνα στα δείγματα με ON, δηλαδή δεν αναπτύσσονταν γρήγορα ώστε να μειώσουν το pH, όπως επιβεβαιώνεται και από το Σχήμα 4.1. Η παρατήρηση αυτή θα γίνει προσπάθεια να διασαφηνιστεί στη συνέχεια, με την ταυτοποίηση του είδους των γαλακτικών βακτηρίων που κυριαρχούν σε κάθε παρτίδα αλλαντικών.

4.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση των αλλαντικών Φρανκφούρτης κατά τον χρόνο συντήρησης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 3, τα αλλαντικά εξετάστηκαν μακροσκοπικά κατά το χρόνο συντήρησης και συγκεκριμένα κατά το άνοιγμα της συσκευασίας προς μικροβιολογική ανάλυση, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν ελαττώματα της συσκευασίας όπως αποκόλληση, φούσκωμα, συσσώρευση οπού, όπως επίσης και μεταβολές του χρώματος και της οσμής και η παρουσία βλέννας.

Παρατηρήθηκε πως η παραγωγή αερίου, βλέννας και όξινης δυσσομίας μειωνόταν στα δείγματα στους 4°C: ΓN+ON (αποδεκτό στις 90 ημέρες) < ΓN (αποδεκτό ή αλλοιωμένο

μεταξύ 60 και 90 ημερών) < M (αλλοιωμένο στις 30 ημέρες). Οι αλλοιώσεις ήταν παρόμοιες, πλην όμως ταχύτερες και εντονότερες στους 12°C, όπου τα δείγματα μάρτυρες (M) χαρακτηρίζονταν ως μη αποδεκτά από τη δεύτερη εβδομάδα συντήρησης.

4.5 Ταυτοποίηση των απομονωθέντων γαλακτικών βακτηρίων από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης

Από τα δείγματα αλλαντικών Φρανκφούρτης που μελετήθηκαν απομονώθηκαν συνολικά 270 βακτηριακά στελέχη εκ των οποίων τα 120 προέρχονταν από αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 4°C και 150 από αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 12°C. Από αυτά τα 269 βρέθηκαν θετικά κατά Gram και αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης και χαρακτηρίστηκαν ως γαλακτικά βακτήρια. Μόνο ένα στέλεχος, που απομονώθηκε από τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 4°C, ήταν θετικός στην καταλάση αερόβιος βάκιλος και εξαιρέθηκε της ταυτοποίησης.

Τα απομονωθέντα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων διαχωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες με βάση την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα από τη ζύμωση της γλυκόζης. Σύμφωνα με το βασικό αυτό κριτήριο κατατάχθηκαν σε προαιρετικά ετεροζυμωτικά/ομοζυμωτικά (213 στελέχη) και ετεροζυμωτικά (56 στελέχη) γαλακτικά βακτήρια.

Στη συνέχεια τα στελέχη γαλακτικών βακτηρίων κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τα βιοχημικά και φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα, την αντίδρασή τους στην παραγωγή αμμωνίας από την υδρόλυση της αργινίνης, στην παραγωγή βλέννας από τη ζύμωση της σακχαρόζης και στη ζύμωση επιλεγμένων σακχάρων. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια προέκυψαν 10 φαινοτυπικές ομάδες γαλακτικών βακτηρίων, των οποίων αναλυτική περιγραφή παρουσιάζεται στους Πίνακες 4.1 και 4.2. Ακολούθησε ταυτοποίηση των φαινοτυπικών ομάδων σε επίπεδο είδους/υποείδους και τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.1. Βιοχημικά-φαινοτυπικά χαρακτηριστικά διάκρισης 213 στελεχών προαιρετικά ετεροζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από αλλαντικά Φρανκφούρτης κατά την διάρκεια της συντήρησης σε θερμοκρασία 4 °C ή 12°C σε συσκευασία κενού.

Χαρακτηριστικό	Φαινοτυπική ομάδα											
	1A	1B	1C	1D	2A	2B	2C	2D	2E	3	4	5
Αριθμός στελεχών (απομονώσεων)	89	61	13	10	9	12	3	4	1	2	5	4
Μορφολογία κυττάρων	B	B	B	B	B	B	B	B	B			
Παραγωγή CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Παραγωγή NH ₃	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Παραγωγή βλέννας	-	1/61	-	-	-	-	-	-	-	½	-	-
Μαλτόζη	13/89	6/61	-	3/10	+	+	+	-	+	+	3/5	+
Μαννιτόλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Λακτόζη	37/89	26/61	-	4/10	+	+	-	+	+	+	++d	+
Ριβόζη	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4/5	+
L-αραβινόζη	+	-	-	6/10	-	-	-	-	-	+	-	¾
Ξυλόζη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Ραφφινόζη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	¼
Μελιβόζη	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	4/5	¾
Σακχαρόζη	+	+	+	9/10	-	-	-	-	+	+	+	+
Κελλοβιόζη	75/89	11/61	-	+/+d	3/9	+	+	-	+	NT	4/5	+
Τρεχαλόζη	+	+	+	9/10	+	-	-	-/+d	+	+	+	+
Γαλακτόζη	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT
Σορβιτόλη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT

Οι ομάδες 1A και 1B είναι τυπικές του είδους *L. sakei* (Torriani et al., 1996; Pot et al., 2014) με παραγωγή αμμωνίας από την υδρόλυση της αργινίνης και με θετική αντίδραση στη ζύμωση των σακχάρων: μελιβιόζη (βασικό σάκχαρο διαχωρισμού μεταξύ *L. sakei* και *L. curvatus*), σακχαρόζη, τρεχαλόζη, γαλακτόζη και ριβόζη. Όλα τα στελέχη βρέθηκαν αρνητικά στη ζύμωση των σακχάρων: μαννιτόλη, ξυλόζη, ραφφινόζη και σορβιτόλη. Σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων αποτελεί η ζύμωση της L-αραβινόζης (θετική αντίδραση για την ομάδα 1A και αρνητική για την ομάδα 1B). Πιθανόν η ομάδα 1A να αντιπροσωπεύει στελέχη του *L. sakei* subsp. *sakei* και η ομάδα 1B του *L. sakei* subsp. *carneus*, καθώς σύμφωνα με τις περιγραφές των Torriani et al. (1996) ο *L. sakei* subsp. *sakei* δίνει θετική αντίδραση για την αραβινόζη ενώ για τον *L. sakei* subsp. *carneus* αναφέρεται ότι πολλά στελέχη δίνουν αρνητική αντίδραση με την αραβινόζη.

Η ομάδα 1C περιλαμβάνει στελέχη τυπικά του είδους *L. sakei*, καθώς παράγουν αμμωνία από την υδρόλυση της αργινίνης, είναι αρνητικά στη ζύμωση των σακχάρων: μαννιτόλη, ξυλόζη, ραφφινόζη και σορβιτόλη και θετικά στη ζύμωση των σακχάρων: ριβόζη, γαλακτόζη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη. Ταυτόχρονα όμως, όλα τα στελέχη είναι αρνητικά στη ζύμωση της μελιβιόζης (κύριο χαρακτηριστικό του είδους *L. curvatus*) και αρνητικά στη ζύμωση των σακχάρων: μαλτόζη, λακτόζη και L-αραβινόζη. Σύμφωνα με τους Samelis & Georgiadiou (2000) τέτοια στελέχη, τα οποία παραμένουν επί του παρόντος αταξινομητα, απομονώνονται συχνά από προϊόντα κρέατος και μονάδες επεξεργασίας προϊόντων κρέατος. Παρουσιάζουν ένα απόλυτα ενδιάμεσο φαινοτυπικό προφίλ μεταξύ του *L. sakei* και του *L. curvatus* (*L. sakei/curvatus*) καθώς παράγουν αμμωνία από την υδρόλυση της αργινίνης (τυπικό χαρακτηριστικό του *L. sakei*) και δεν ζυμώνουν την μελιβιόζη και τη μαλτόζη (τυπικό χαρακτηριστικό του *L. curvatus*). Οι Samelis et al. (1994) ήταν οι πρώτοι που απομόνωσαν παρόμοια στελέχη από παραδοσιακό ελληνικό σαλάμι αέρος. Οι μεταγενέστερες ταξινομικές μελέτες των παραπάνω ερευνητών αποκάλυψαν ότι ο συγκεκριμένος φαινότυπος συνδέεται πιο στενά με τον *L. sakei* από ότι με τον *L. curvatus*, με βάση τα προφίλ των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών και λιπαρών οξέων (Samelis et al., 1995; Rementzis & Samelis, 1996). Επιπρόσθετα επιβεβαιώθηκε ότι τρία αντιπροσωπευτικά στελέχη από ζυμούμενα λουκάνικα ταυτοποιήθηκαν ως *L. sakei* με τη μέθοδο RAPD. Είναι όμως επιβεβλημένη η ανάγκη να γίνει ταυτοποίηση μεγαλύτερου αριθμού τέτοιων ενδιάμεσων στελεχών με μεθόδους αλληλουχίας RNA (Samelis & Georgiadiou, 2000).

Η ομάδα 1D περιλαμβάνει στελέχη τα οποία δεν παράγουν αμμωνία από την υδρόλυση της αργινίνης (τυπικό χαρακτηριστικό του είδους *L. curvatus*) ταυτόχρονα όμως τα άτυπα αυτά στελέχη ζυμώνουν τη μελιβιόζη το πλέον βασικό χαρακτηριστικό των τυπικών στελεχών *L. sakei* των ομάδων 1A και 1B. Τα στελέχη αυτά ως προς τη ζύμωση των βασικών σακχάρων συμφωνούν με τις περιγραφές των **Torriani et al. (1996)** για τον *L. curvatus* subsp. *melibiosus*.

Η ομάδα 2 περιλαμβάνει στελέχη τυπικά του είδους *L. curvatus* με κοινό χαρακτηριστικό την μη παραγωγή αμμωνίας από την υδρόλυση της αργινίνης και την αρνητική αντίδραση με την μελιβιόζη (**Torriani et al., 1996**). Διαχωρίζονται σε 5 υποομάδες (2A, 2B, 2C, 2D και 2E) με βάση τις διαφορετικές αντιδράσεις τους για τα σάκχαρα: μαλτόζη, λακτόζη, σακχαρόζη, κελλοβιόζη και τρεχαλόζη. Η θετική τους αντίδραση στη ζύμωση των σακχάρων: ριβόζη και γαλακτόζη και η αρνητική στη ζύμωση των σακχάρων: μαννιτόλη, αραβινόζη, ξυλόζη, ραφφινόζη και σορβιτόλη βρίσκονται σε συμφωνία με τις περιγραφές των **Torriani et al. (1996)** για τον *L. curvatus* subsp. *curvatus*. Διαφέρουν μόνο τα στελέχη της υποομάδας 2D ως προς τη ζύμωση της μαλτόζης. Σύμφωνα με τους **Torriani et al. (1996)** το συγκεκριμένο υποείδος του *L. curvatus* ζυμώνει τη μαλτόζη, ενώ αντίθετα τα στελέχη της ομάδας 2D δίνουν αρνητική αντίδραση ως προς τη ζύμωση της μαλτόζης.

Οι ομάδες 3 και 4 περιλαμβάνουν άτυπα ομοζυμωτικά είδη του γένους *Lactobacillus* με κοινό τους χαρακτηριστικό την παραγωγή αμμωνίας από την υδρόλυση της αργινίνης. Τα στελέχη της ομάδας 3 ζυμώνουν την ξυλόζη και τη ραφφινόζη (χαρακτηριστικό που δεν παρατηρείται σε κανένα εκ των στελεχών των ομάδων 1 και 2), ενώ δίνουν αρνητική αντίδραση στη ζύμωση των σακχάρων μαννιτόλη και σορβιτόλη. Τα στελέχη της ομάδας 4 ζυμώνουν τη μαννιτόλη (χαρακτηριστικό που δεν παρατηρείται σε κανένα εκ των στελεχών των ομάδων 1 και 2) χωρίς όμως να ζυμώνουν την ξυλόζη και την ραφφινόζη.

Η ομάδα 5 περιλαμβάνει στελέχη που δεν παράγουν αμμωνία από την υδρόλυση της αργινίνης, ενώ παρουσιάζουν ένα έντονα ζυμωτικό προφίλ. Χαρακτηριστικό τους είναι η αδυναμία ζύμωσης της ξυλόζης. Τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά συμφωνούν με την περιγραφή των **Pot et al. (2014)** για τον *L. paraplantarum*.

Ενδεικτικά στην εικόνα που ακολουθεί παρουσιάζεται το προφίλ ζύμωσης σακχάρων προαιρετικά ετεροζυμωτικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από την 15^η ημέρα συντήρησης αλλαντικών Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν στους 12°C.



Εικόνα 4.1. Προφίλ ζύμωσης σακχάρων απομονωθέντων στελεχών προαιρετικά ετεροζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων από αλλαντικά Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν στους 12° C.

Οι μικροοργανισμοί 17 έως 20 προέρχονται από τα δείγματα αλλαντικών στα οποία έχει προστεθεί 1.8% γαλακτικό νάτριο, ενώ τα στελέχη 21, 26, 28 και 29 από αλλαντικά με προσθήκη 1.8% γαλακτικού νατρίου και 0.25% οξικού νατρίου. Τα στελέχη 17, 18, 19 και 26 παρουσιάζουν το ίδιο ακριβώς προφίλ ζύμωσης σακχάρων και ταυτοποιήθηκαν ως *L. sakei* subsp. *sakei*. Η θετική αντίδραση στη ζύμωση των σακχάρων: μαλτόζη, ριβόζη, L-αραβινόζη, μελιβιόζη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη γίνεται αντιληπτή μέσω της αλλαγής του χρώματος του δείκτη βρωμοκρεζόλης από μωβ σε κίτρινο, εξαιτίας της παραγωγής γαλακτικού οξέος.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.2) παρουσιάζονται αναλυτικά τα βιοχημικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ετεροζυμωτικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης και στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά οι φαινοτυπικές ομάδες των συγκεκριμένων στελεχών όπως προέκυψαν από την βιοχημική ταυτοποίηση.

Πίνακας 4.2. Βιοχημικά-φαινοτυπικά χαρακτηριστικά διάκρισης 56 στελεχών υποχρεωτικά ετεροζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από αλλαντικά Φρανκφούρτης κατά την διάρκεια της συντήρησης σε θερμοκρασία 4°C ή 12°C σε συσκευασία κενού.

Χαρακτηριστικό	Φαινοτυπική ομάδα						
	6A	6B	7A	7B	8	9	10
Αριθμός στελεχών (απομονώσεων)	23	3	7	11	1	10	1
Μορφολογία κυττάρων	KB	KB	KB	KB	KB	KB	B
Παραγωγή CO ₂	+	+	+	+	+	+	+
Παραγωγή NH ₃	-	-	-	-	-	-	+
Παραγωγή βλέννας	+	+	+	-	-	-	-
Μαλτόζη	+	+	3/7	8/11	-	+	+
Μαννιτόλη	17/23	1/3	-	-	-	-/(+)d	-
Λακτόζη	22/23	+	-	-	-	+/+d	+
Ριβόζη	+	+	6/7	+/+d	+	+	+
L-αραβινόζη	+	-	-	-	-	+	+
Ξυλόζη	+	+	-	-	-	8/10	+
Ραφφινόζη	+/+d	+/+d	-	-	-	9/10d	+d
Μελιβιόζη	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Σακχαρόζη	+	+	+	+	+	+	+
Κελλοβιόζη	5/23	-/+d	3/7	8/11	-	NT	+
Τρεχαλόζη	+	+	4/7	8/11	-	+	+
Γαλακτόζη	+	+	-	-	+	+	+
Σορβιτόλη	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Η ομάδα 6 περιλαμβάνει ετεροζυμωτικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων και συγκεκριμένα του είδους *Leuconostoc mesenteroides*, με τυπικά χαρακτηριστικά την παραγωγή βλέννας από τη σακχαρόζη και την αδυναμία παραγωγής αμμωνίας από την υδρόλυση της αργινίνης. Τα στελέχη των υποομάδων 6A και 6B διαφέρουν κυρίως ως προς τη ζύμωση της αραβινόζης. Σύμφωνα με τις περιγραφές των **Bjorkroth et al. (2014a)** για τα υποείδη του *Leuc. mesenteroides*, τα στελέχη της ομάδας 6A ανήκουν στον *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. Τα παραπάνω στελέχη ζυμώνουν την αραβινόζη, γαλακτόζη, μαλτόζη, ριβόζη, σακχαρόζη, τρεχαλόζη, ξυλόζη και ραφφινόζη, ενώ ποικίλες είναι οι αντιδράσεις τους για τα υπόλοιπα σάκχαρα. Τα στελέχη της ομάδας 6B σύμφωνα με την περιγραφή των **Bjorkroth et al. (2014a)** ανήκουν στον *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* για τον οποίο αναφέρεται αρνητική αντίδραση στη ζύμωση της αραβινόζης, θετική για τα σάκχαρα: μαλτόζη, λακτόζη, σακχαρόζη και τρεχαλόζη, ενώ ποικίλες είναι οι αντιδράσεις για τα σάκχαρα: κελλοβιόζη, γαλακτόζη, μαννιτόλη, μελιβιόζη, ραφφινόζη και ξυλόζη.

Η ομάδα 7 περιλαμβάνει στελέχη του *Leuc. carnosum* με τυπικά χαρακτηριστικά την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα από τη ζύμωση της γλυκόζης (ετεροζυμωτικά στελέχη) και τη μη παραγωγή αμμωνίας από την υδρόλυση της αργινίνης. Διαφοροποιούνται με βάση την παραγωγή βλέννας από τη ζύμωση της σακχαρόζης σε δυο υποομάδες: 7A και 7B. Η ομάδα 7A περιλαμβάνει στελέχη θετικά στην παραγωγή βλέννας από τη σακχαρόζη και η ομάδα 7B στελέχη που δεν παράγουν βλέννα από τη ζύμωση της σακχαρόζης. Όλα τα στελέχη της ομάδας 7 δίνουν αρνητική αντίδραση για τα σάκχαρα: μαννιτόλη, λακτόζη, αραβινόζη, ξυλόζη, ραφφινόζη, και γαλακτόζη και θετική αντίδραση για την σακχαρόζη. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι σε συμφωνία με την περιγραφή του συγκεκριμένου είδους από τους **Bjorkroth et al. (2014a)**. Διαφοροποίηση παρατηρείται μόνο ως προς τη ζύμωση της τρεχαλόζης που θεωρείται ως θετική για τον *Leuc. carnosum* ενώ από τα στελέχη της παρούσας εργασίας της ομάδας 7 υπάρχουν και κάποια που δίνουν αρνητική αντίδραση στη ζύμωση της τρεχαλόζης. Επίσης οι **Bjorkroth et al. (2014a)** αναφέρουν ότι τα περισσότερα στελέχη παράγουν βλέννα από τη σακχαρόζη.

Το ένα στέλεχος που αποτελεί την ομάδα 8 προσομοιάζει με στελέχη της ομάδας 7A με σημαντική διαφορά τη θετική αντίδραση στη ζύμωση της γαλακτόζης. Θεωρείται ότι ανήκει στο γένος *Leuconostoc*.

Η ομάδα 9 περιλαμβάνει στελέχη αρνητικά στην παραγωγή αμμωνίας από την υδρόλυση της αργινίνης τα οποία δεν παράγουν βλέννα από την σακχαρόζη. Διαφέρει από

τις ομάδες 6A και 6B μόνο ως προς την παραγωγή βλέννας από τη σακχαρόζη. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους είναι σε συμφωνία με εκείνα που δίνονται από τους **Collins et al. (1993)** για τον *W. paramesenteroides*.

Η ομάδα 10 περιλαμβάνει ένα στέλεχος και το οποίο είναι και το μοναδικό ετεροζυμωτικό στέλεχος που παράγει αμμωνία από την υδρόλυση της αργινίνης. Πιθανόν να πρόκειται για κάποιο ετεροζυμωτικό στέλεχος του γένους *Lactobacillus* ή του γένους *Weissella*.

Στον πίνακα 4.3 παρουσιάζεται η βιοχημική ταυτοποίηση των διάφορων φαινοτυπικών ομάδων γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης από τις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (4 και 12°C).

Πίνακας 4.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των φαινοτυπικών ομάδων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων των Πινάκων 4.1 και 4.2 σε είδη-υποείδη.

Φαινοτυπική ομάδα	Αριθμός στελεχών	Από δείγματα 4°C	Από δείγματα 12°C	Βιοχημική ταυτοποίηση
1A	89	43	46	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>
1B	61	36	25	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>
1C	13	10	3	<i>Lactobacillus sakei/curvatus</i>
1D	10	0	10	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>melibiosus</i>
2A	9	0	9	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
2B	12	3	9	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
2C	3	0	3	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
2D	4	2	2	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
2E	1	0	1	<i>Lactobacillus curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>
3	2	0	2	<i>Lactobacillus</i> spp.
4	5	0	5	<i>Lactobacillus</i> spp.
5	4	1	3	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
6A	23	9	14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
6B	3	1	2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
7A	7	7	0	<i>Leuconostoc carnosum</i>
7B	11	1	10	<i>Leuconostoc carnosum</i>
8	1	1	0	<i>Leuconostoc</i> spp.
9	10	4	6	<i>Weissella paramesenteroides</i>
10	1	1	0	<i>Lactobacillus</i> spp./ <i>Weissella</i> spp.
Σύνολο	269	119	150	

Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζεται μια γενική εικόνα των ειδών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται στις δυο διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης (4°C και 12°C), ανεξαρτήτως της παρουσίας ή όχι αντιμικροβιακών αλάτων στα αλλαντικά.

Πίνακας 4.4: Κατανομή του συνολικού αριθμού των 270 μικροβιακών απομονώσεων από δείγματα συσκευασμένων σε κενό αλλαντικών Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 ή 12°C σε γένη ή βασικές γονοτυπικές ομάδες ειδών γαλακτικών ή άλλων βακτηρίων.

	Γένος/ομάδα ειδών	Δείγματα 4°C (%)	Δείγματα 12°C (%)	Σύνολο απομονώσεων (%)
ΟΜΟΖΥΜΩΤΙΚΟΙ	Τυπικοί της ομάδας <i>Lactobacillus sakei/curvatus</i>	94 (78.4%)	108 (72.0%)	202 (74.8%)
	Ατυποι (παραγωγή NH ₃ από αργινίνη) <i>Lactobacillus</i> spp.	0 (0.0%)	7 (4.6%)	7 (2.6%)
	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	1 (0.8%)	3 (2.0%)	4 (1.5%)
ΕΤΕΡΟΖΥΜΩΤΙΚΟΙ	<i>Leuconostoc</i> spp. (με παραγωγής βλέννας από την σακχαρόζη)	17 (14.2%)	16 (10.7%)	33 (12.2%)
	<i>Leuconostoc/Weissella</i> spp. (χωρίς παραγωγή βλέννας)	6 (5.0%)	16 (10.7%)	22 (8.1%)
	<i>Lactobacillus/Weissella</i> spp. (παραγωγή NH ₃ από αργινίνη)	1 (0.8%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)
	Μη γαλακτικά βακτήρια (θετικοί στην καταλάση αερόβιοι βάκιλλοι)	1 (0.8%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)
	Σύνολο απομονώσεων	120	150	270

Χαρακτηριστικό των υπό μελέτη αλλαντικών είναι η υψηλή συχνότητα απομόνωσης ομοζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων και για τις δυο θερμοκρασίες συντήρησης. Το συνολικό ποσοστό των ομοζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων για τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 4°C ήταν 79,2% και για τα αλλαντικά στους 12°C ήταν 78,6%. Τα είδη αυτά γαλακτικών βακτηρίων, όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία, προκαλούν κυρίως οξίνιση μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος με αποτέλεσμα την πτώση της τιμής του pH των τροφίμων γενικά.

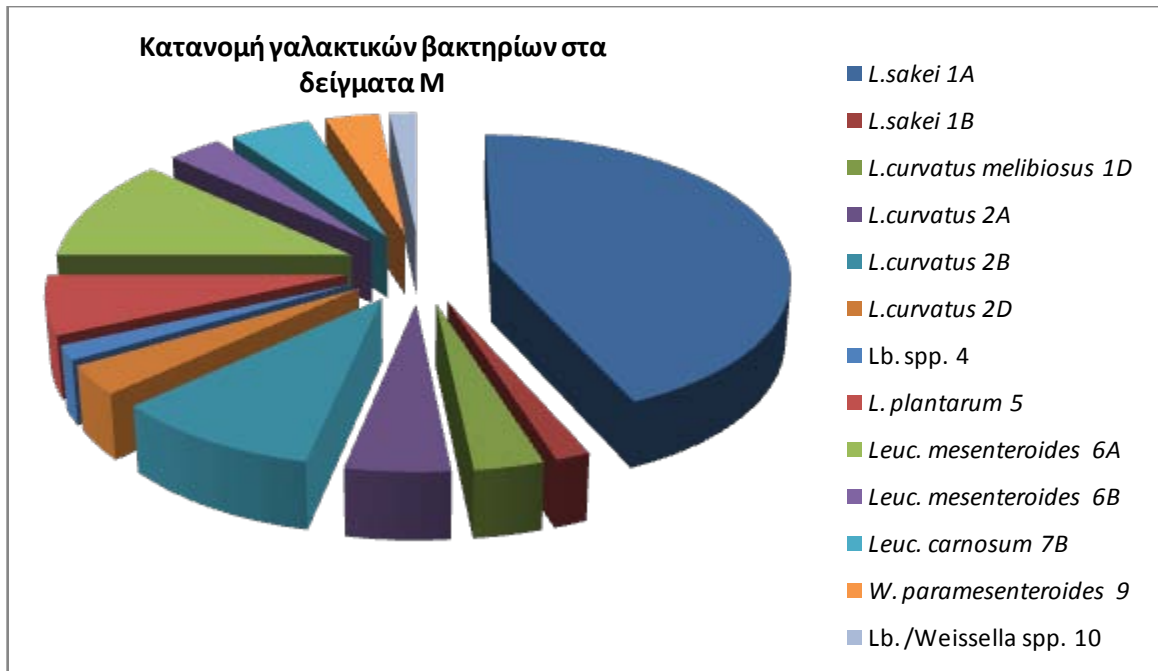
Τα υποχρεωτικώς ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια απομονώθηκαν σε παρόμοια ποσοστά και για τις δύο θερμοκρασίες συντήρησης και συγκεκριμένα 20% για τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 4°C και 21,4% για τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 12°C. Μεταξύ αυτών, τα είδη *Leuconostoc* που παράγουν βλέννα από τη σακχαρόζη, χαρακτηριστικό μείζονος σημασίας για τη βιομηχία κρέατος/αλλαντικών, απομονώνονται και στις δυο θερμοκρασίες σε σχετικά χαμηλά ποσοστά (14,2% και 10,7% για τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 4°C, αντίστοιχα). Στους μικροοργανισμούς αυτούς αποδίδεται κυρίως η ανάπτυξη βλέννας στα αλλαντικά, καθιστώντας τα μη επιθυμητά από τον καταναλωτή. Σε συνδυασμό με τα άλλα ετεροζυμωτικά είδη των γενών *Leuconostoc* και *Weissella* που δεν παράγουν βλέννα από τη ζύμωση της σακχαρόζης είναι υπεύθυνα για τη δημιουργία αερίου εντός της συσκευασίας, ιδιότητας επίσης ανεπιθύμητης για τη βιομηχανία κρέατος/αλλαντικών. Γενικά είναι προτιμότερο η χλωρίδα των αλλαντικών να αποτελείται από είδη που προκαλούν μόνο οξίνιση, παρά από ετεροζυμωτικά είδη τα οποία προκαλούν πιο σοβαρά ελαττώματα όπως παραγωγή αερίου και βλέννας.

Μια επίσης σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι ετεροζυμωτικά στελέχη *Leuconostoc/Weissella* spp. που δεν παράγουν βλέννα από τη σακχαρόζη, απομονώνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό (διπλάσιο) από τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 12°C απ' ότι από τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν υπό ψύξη (4°C). Επιπλέον μόνο από τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 12°C απομονώθηκαν άτυπα ομοζυμωτικά είδη του γένους *Lactobacillus* που παράγουν αμμωνία από την υδρόλυση της αργινίνης, σε ποσοστό 4,6%.

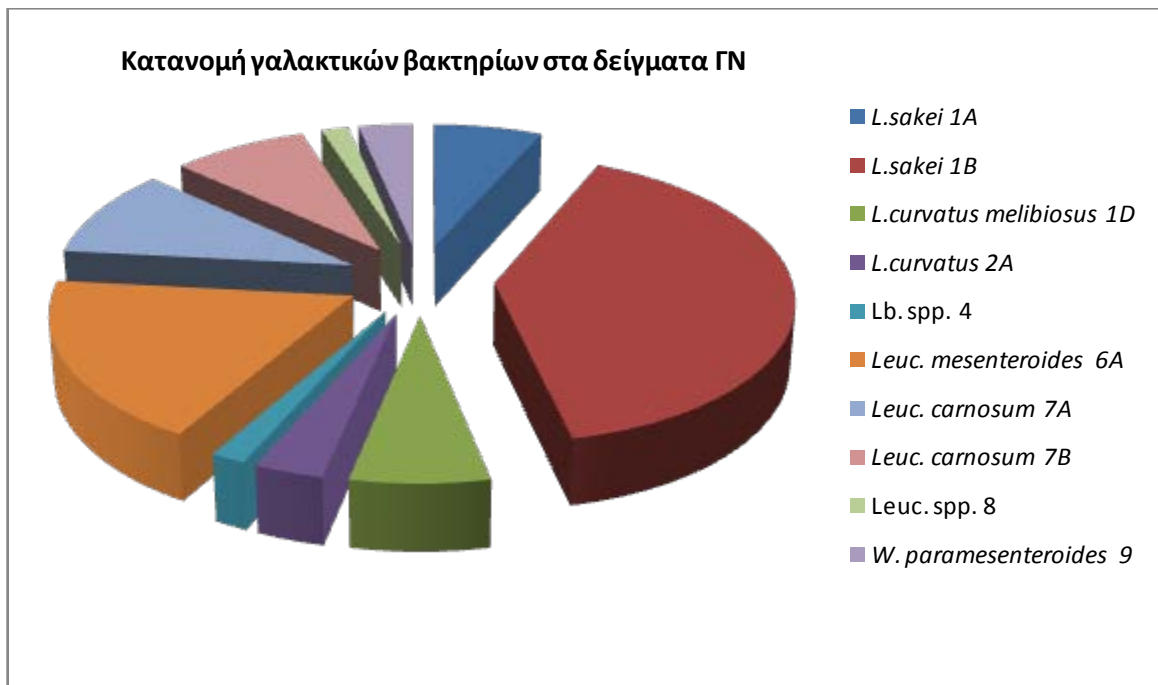
4.6 Χαρακτηρισμός της οξυγαλακτικής χλωρίδας κατά τον χρόνο συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης.

4.6.1 Κατανομή των γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά Φρανκφούρτης συναρτήσει του αντιμικροβιακού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε.

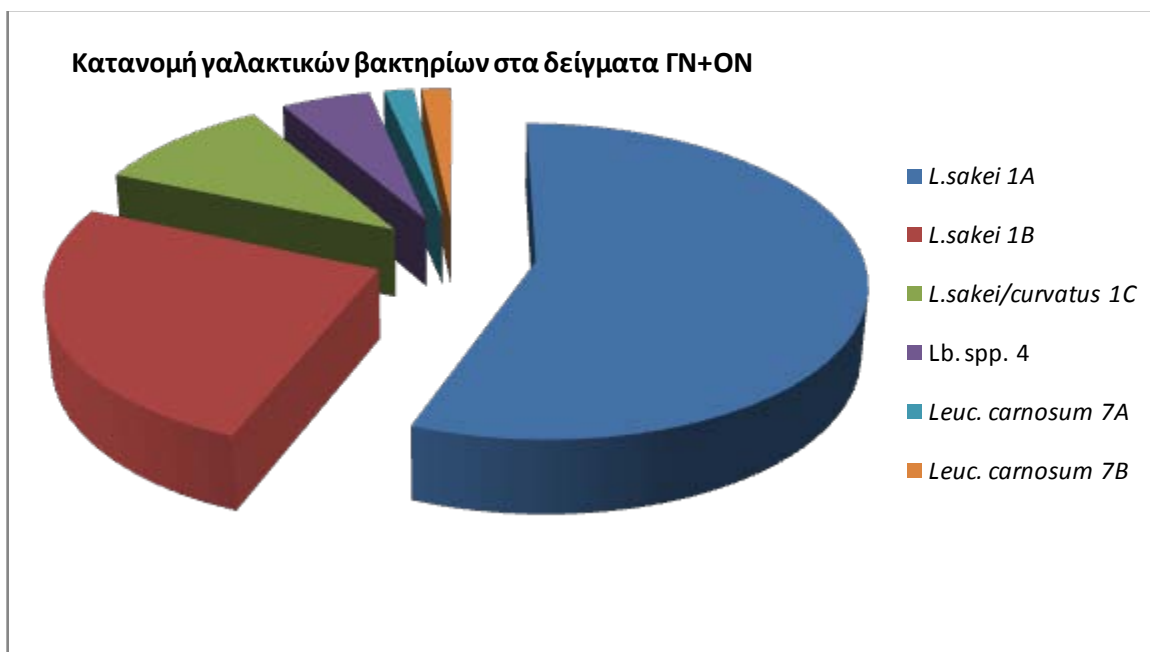
Στη συνέχεια στα Σχήματα 4.4, 4.5 και 4.6 παρουσιάζονται αναλυτικά τα είδη/υποείδη γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν (από το θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης TSAYE) από τα δείγματα αλλαντικών M, ΓN και ΓN+ON αντίστοιχα, και ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας συντήρησής τους.



Σχήμα 4.4. Κατανομή στελεχών γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά Φρανκφούρτης που παρασκευάστηκαν χωρίς προσθήκη αντιμικροβιακών αλάτων (Μ).



Σχήμα 4.5. Κατανομή στελεχών γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά Φρανκφούρτης που παρασκευάστηκαν με προσθήκη 1.8% γαλακτικού νατρίου (ΓΝ).

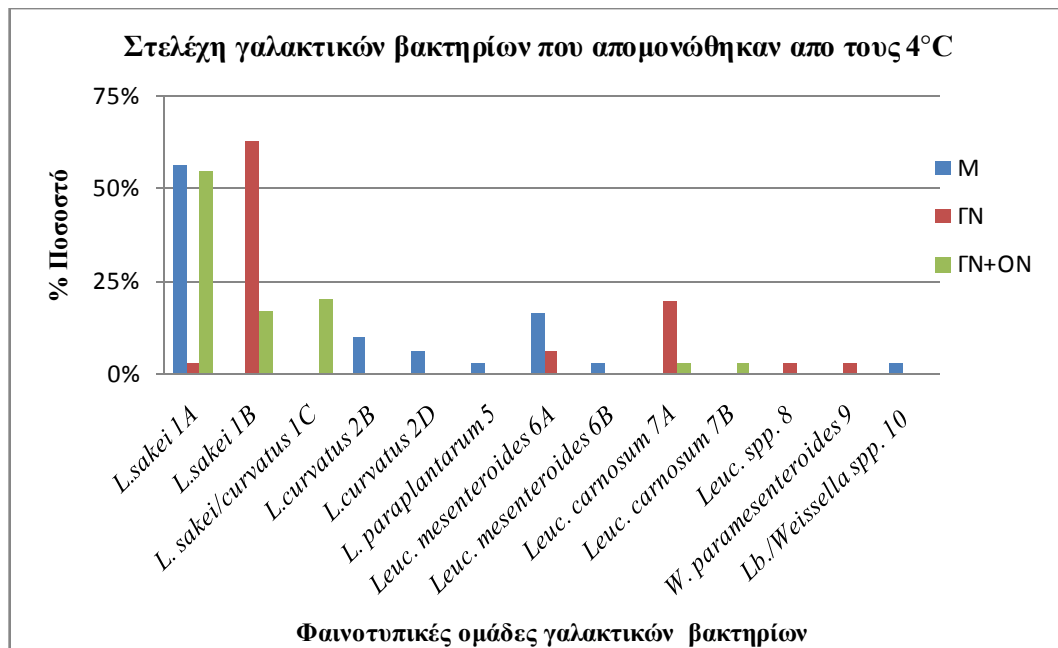


Σχήμα 4.6. Κατανομή στελεχών γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά Φρανκφούρτης που παρασκευάστηκαν με προσθήκη 1.8% γαλακτικού νατρίου (ΓΝ) και 0.25% οξικού νατρίου (ΟΝ).

Τα δείγματα Μ (Σχήμα 4.4) παρουσιάζουν την πιο ποικίλη οξυγαλακτική χλωρίδα και ακολουθούν τα δείγματα ΓΝ (Σχήμα 4.5) και ΓΝ+ΟΝ. (Σχήμα 4.6). Στα δείγματα Μ κυριαρχούν ο *L. sakei 1A* (43%), ο *Leuc. mesenteroides 6A* (12%) και ο *L. curvatus 2B* (10%). Στα δείγματα ΓΝ σε υψηλά ποσοστά απομονώνεται ο *L. sakei 1B* (40%) και ακολουθούν τα ετεροζυμωτικά είδη του γένους *Leuconostoc* που παράγουν βλέννα από τη ζύμωση της σακχαρόζης, και συγκεκριμένα ο *Leuc. mesenteroides 6A* (18%) και ο *Leuc. carnosum 7A* (10%). Τέλος στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ κυριαρχεί ο *L. sakei 1A* (56%) και ακολουθούν ο *L. sakei 1B* (25%) και *L. sakei/curvatus* (10%).

4.6.2 Κατανομή των γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά Φρανκφούρτης συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης και του είδους του αντιμικροβιακού παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε.

Μια αναλυτική εικόνα των φαινοτυπικών ομάδων των γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα δείγματα Μ, ΓΝ, ΓΝ+ΟΝ κατά τη συντήρηση στους 4°C δίνεται στο γράφημα που ακολουθεί (Σχήμα 4.7).



Σχήμα 4.7. Γραφική απεικόνιση των φαινοτυπικών ομάδων των στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από TSAYE από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης (M, GN, GN+ON) που συντηρήθηκαν στους 4°C.

Με βάση το παραπάνω γράφημα παρατηρείται υψηλή συχνότητα απομόνωσης στελεχών *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A) από τα δείγματα M και GN+ON (56,7 και 55,2% αντίστοιχα), ενώ ο *L. sakei* subsp. *carnosus* (φαινοτυπική ομάδα 1B) απομονώνεται σε υψηλά ποσοστά από τα δείγματα GN. Επίσης τυπικά στελέχη του *L. curvatus* subsp. *curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 2) απομονώνονται μόνο από τα δείγματα M. σημαντική επίσης παρατήρηση η απουσία στελεχών *Leuc. mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6) από τα δείγματα GN+ON και το υψηλό ποσοστό *Leuc. carnosum* (φαινοτυπική ομάδα 7A) στα δείγματα GN.

Αναλυτικά τα είδη γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν στους 4°C σε ναρτήσει του χρόνου συντήρησής τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.5 που ακολουθεί.

Πίνακας 4.5. Κατανομή των 90 απομονωθέντων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων από τρυβλία TSAYE των δειγμάτων αλλαντικών Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C.

Είδος/υποείδος	Ομάδα	Μ			ΓΝ			ΓΝ + ΟΝ		
		30	60	90	30	60	90	30	60	90
<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	1A	7	4	6	1				7	9
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>	1B				9	10		3	2	
<i>L. sakei/curvatus</i>	1C							6		
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>melibiosus</i>	1D									
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2A									
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2B		2	1						
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2C									
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2D	1	1							
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2E									
<i>Lactobacillus</i> spp.	3									
<i>Lactobacillus</i> spp.	4									
<i>L. paraplantarum</i>	5			1						
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i>	6A	2	2	1			2			
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranicum</i>	6B			1						
<i>Leuc. Carnosum</i>	7A						6			1
<i>Leuc. Carnosum</i>	7B							1		
<i>Leuconostoc</i> spp.	8						1			
<i>W. paramesenteroides</i>	9						1			
<i>Lactobacillus/Weissella</i> spp.	10		1							
Σύνολο απομονώσεων		10	10	10	10	10	10	9	10	10

Σύμφωνα με τον πίνακα 4.5, μετά από 30 ημέρες συντήρησης στους 4°C στα δείγματα Μ επικρατούσαν οι ομοζυμωτικοί λακτοβάκιλοι και συγκεκριμένα σε ποσοστό 80% (70% *L.sakei* και 10% *L. curvatus* subsp. *curvatus*). Παρόμοια ποσοστά ομοζυμωτικών γαλακτοβακίλων απομόνωσαν σε αλλαντικά Φρανκφούρτης και οι **Samelis et al. (2000a)** (50% *L.sakei*, 20% *L. curvatus* subsp. *curvatus*). Τα ποσοστά *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6A) ήταν της τάξης του 20%, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των **Samelis et al. (2000a)**, οι οποίοι απομόνωσαν επιπλέον *Leuc. citreum* και *W. viridescens* σε ποσοστό 5% για τον κάθε μικροοργανισμό. Σε λουκάνικα τύπου χωριάτικα (tavern sausages) τα ποσοστά ομοζυμωτικών γαλακτοβακίλων ήταν ακόμη υψηλότερα για όλο το χρόνο συντήρησης (92%) ενώ ο *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* απομονώθηκε σε χαμηλά ποσοστά (4%) (**Samelis & Georgiadou, 2000**). Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι η αποκλειστική απομόνωση από τα δείγματα Μ της 30^{ης} ημέρας στελεχών *L. sakei* με φαινότυπο 1A, ο οποίος και ταυτοποιήθηκε ως *L. sakei* subsp. *sakei*. Επίσης τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια που απομονώθηκαν παρήγαγαν βλέννα από τη σακχαρόζη (*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*).

Μια αξιοσημείωτη παρατήρηση για τα δείγματα ΓΝ είναι ότι ενώ μέχρι την 60^η ημέρα συντήρησης απομονώνονται αποκλειστικά ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια, την 90^η ημέρα συντήρησης παρατηρείται μεταστροφή της γαλακτικής χλωρίδας από 100% ομοζυμωτικά σε 100% ετεροζυμωτικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Στην χλωρίδα αυτή κυριαρχούν σε ποσοστό 80% στελέχη που παράγουν βλέννα από τη σακχαρόζη και συγκεκριμένα *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6A) και *Leuc. carnosum* (φαινοτυπική ομάδα 7A), ενώ το προϊόν είναι αλλοιωμένο. Αντίθετα στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ την 60^η και 90^η ημέρα απομονώνονται ετεροζυμωτικά είδη γαλακτικών βακτηρίων σε χαμηλό ποσοστό 10% και συγκεκριμένα *Leuc. carnosum*.

Στην παρούσα εργασία 13 άτυπα στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως *L. sakei/curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 1C) και τα οποία απομονώθηκαν κατά αποκλειστικότητα από τα αλλαντικά ΓΝ+ΟΝ στους 4°C την 30^η ημέρα συντήρησης (Πίνακας 4.5). Τα στελέχη αυτά μοιράζονταν ένα ενδιάμεσο φαινότυπο μεταξύ των 2 ειδών (*L. sakei* και *L. curvatus*). Κάτι αντίστοιχο έχει παρατηρηθεί και σε λουκάνικα τύπου χωριάτικα τα οποία μοιράζονται πολλά τεχνολογικά χαρακτηριστικά ως προς την παραγωγή τους με τα λουκάνικα Φρανκφούρτης (**Samelis & Georgiadou, 2000**). Η ομάδα 1C στην παρούσα εργασία ήταν φαινοτυπικά όμοια με την αντίστοιχη των χωριάτικων λουκάνικων με μόνη

διαφορά την αρνητική ζύμωση της κελλοβιόζης. Στην εργασία των **Samelis & Georgiadiou (2000)** τα 5 από τα 7 στελέχη *L. sakei/curvatus* έδιναν θετική αντίδραση στη ζύμωση της κελλοβιόζης. Οι **Samelis & Georgiadiou, (2000)** διαπίστωσαν πως τα περισσότερα στελέχη *L. sakei* ήταν φαινοτυπικά όμοια με εκείνα που κυριαρχούν στην επιθυμητή γλωρίδα ζυμούμενων αλλαντικών υψηλής ποιότητας που παράγονται στην ίδια βιομηχανία και τα οποία δίνουν αρνητική αντίδραση στη ζύμωση της αραβινόζης.

Σύμφωνα με το σχήμα 4.3, το pH των αλλαντικών στους 4^o ακολουθεί την εξής σειρά: M<ΓN+ON<ΓN, δηλαδή τα γαλακτικά βακτήρια που επιλέγονται στα δείγματα ΓN+ON προκαλούν μεγαλύτερη πτώση του pH σε σύγκριση με εκείνα μόνο με ΓN. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.5, στα δείγματα ΓN επιλέγονται σχεδόν αποκλειστικά στελέχη *L. sakei* 1B τα οποία ταυτοποιήθηκαν ως *L. sakei* subsp. *carneus*. Αντίθετα από τα δείγματα M και ΓN+ON απομονώνονται επιπλέον στελέχη *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A) και στελέχη *L. sakei/curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 1C). Πιθανόν τα στελέχη *L. sakei* subsp. *carneus* να επιφέρουν μικρότερη πτώση της τιμής του pH.

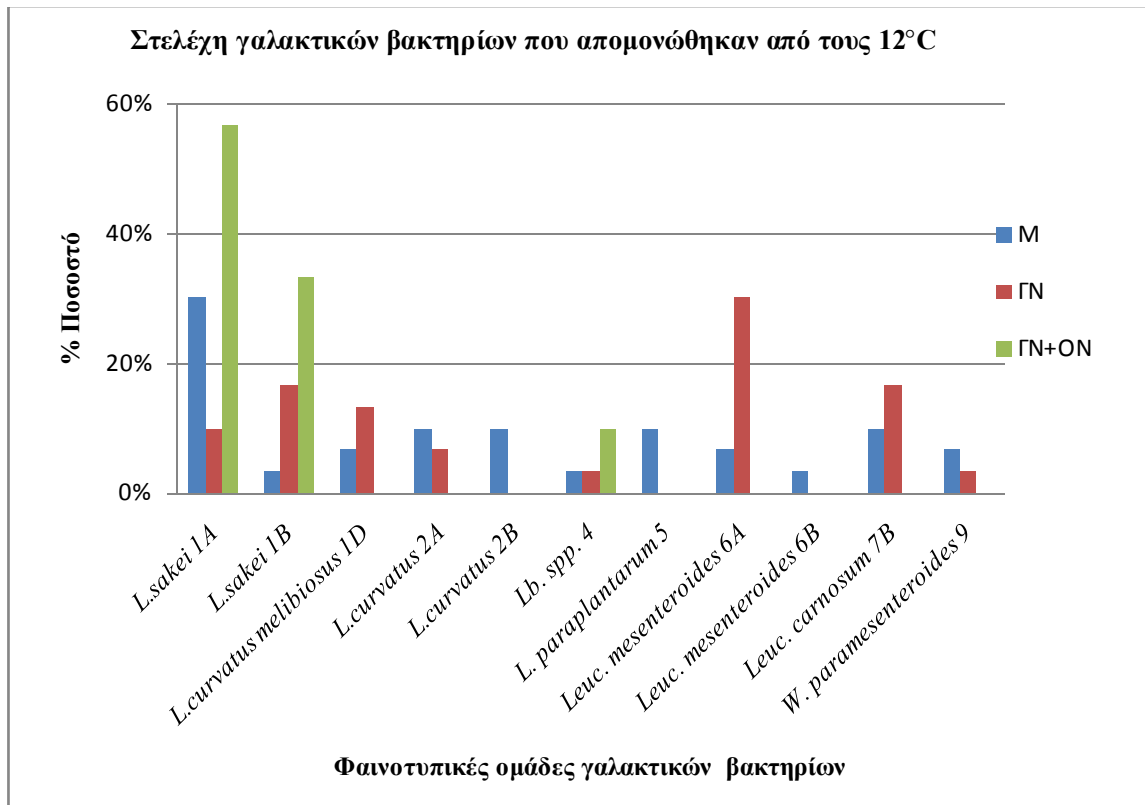
Όσον αφορά τα είδη αλλοίωσης (παραγωγή αερίου, βλέννας και όξινης δυσσομίας) που παρουσίαζαν τα αλλαντικά Φρανκφούρτης στα 4^o βεβαιώνονται με την ταυτοποίηση των απομονωθέντων γαλακτικών βακτηρίων (Πίνακας 4.5). Η τάση όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι: ΓN+ON (αποδεκτό στις 90 ημέρες) < ΓN (αποδεκτό ή αλλοιωμένο μεταξύ 60 και 90 ημερών) < M (αλλοιωμένο στις 30 ημέρες).

- Πράγματι στα δείγματα M την 30^η ημέρα συντήρησης απομονώνονται σε υψηλά ποσοστά της τάξης του 70% στελέχη *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A), ενώ σε χαμηλά ποσοστά της τάξης του 10% απομονώθηκαν στελέχη του *L. curvatus* subsp. *curvatus* (και συγκεκριμένα του φαινότυπου 2D). Από τα ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια απομονώνονται αποκλειστικά στελέχη που παράγουν βλέννα από τη ζύμωση της σακχαρόζης και συγκεκριμένα *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6A) σε ποσοστό 20%. Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα ετεροζυμωτικά αυτά γαλακτικά βακτήρια παράγουν βλέννα και αέριο εντός της συσκευασίας καθιστώντας το τρόφιμο ακατάλληλο προς κατανάλωση.
- Στα αλλαντικά ΓN+ON μέχρι και την 30^η ημέρα συντήρησης απομονώνονται αποκλειστικά ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια και ειδικότερα στελέχη *L. sakei/curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 1C) σε ποσοστό 66,7% και στελέχη *L. sakei* subsp. *carneus* (φαινοτυπική ομάδα 1B) σε ποσοστό 33,3% και τα οποία

προκαλούν κυρίως οξίνιση των αλλαντικών λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος. Μετά την 60^η ημέρα συντήρησης απομονώνονται ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια σε χαμηλά ποσοστά (10%) και μόνο την 90^η ημέρα απομονώνονται ετεροζυμωτικά στελέχη που παράγουν βλέννα από τη σακχαρόζη και συγκεκριμένα *Leuc. carnosum* (φαινοτυπική ομάδα 7A) σε ποσοστό 10%. Σημαντική παρατήρηση επίσης αποτελεί η αποκλειστική απομόνωση κατά την 90^η ημέρα στελεχών *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A) και μάλιστα σε ποσοστό 90%.

- Στα αλλαντικά ΓΝ όπως έχει ήδη αναφερθεί μετά την 60^η ημέρα συντήρησης παρατηρείται μια αλλαγή στη χλωρίδα των αλλαντικών από 100% ομοζυμωτικά σε 100% ετεροζυμωτικά είδη γαλακτικών βακτηρίων. Ειδικότερα κατά την 90^η ημέρα συντήρησης απομονώνονται στελέχη *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6A) σε ποσοστό 20% και στελέχη *Leuc. carnosum* (φαινοτυπική ομάδα 7A) σε ποσοστό 60%. Επιπλέον απομονώνονται και άλλα ετεροζυμωτικά είδη του γένους *Leuconostoc* (φαινοτυπική ομάδα 8) όπως επίσης και *W. paramesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 9) σε συνολικό ποσοστό 20%. Τα ετεροζυμωτικά αυτά γαλακτικά βακτήρια προκαλούν αλλοίωση των προϊόντων λόγω της παραγωγής αερίου και βλέννας εντός της συσκευασίας.

Όσον αφορά τα αλλαντικά Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν στους 12^ο, μια εικόνα των φαινοτυπικών ομάδων γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από TSAYE δίνεται στο Σχήμα 4.8.



Σχήμα 4.8. Γραφική απεικόνιση των φαινοτυπικών ομάδων των στελεχών γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από TSAYE από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης (M, GN, GN+ON) που συντηρήθηκαν στους 12°C.

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.8 ο *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A) απομονώνεται σε υψηλά ποσοστά από τα δείγματα GN+ON και μαζί με τον *L. sakei* subsp. *carnosus* (φαινοτυπική ομάδα 1B) αποτελούν το 90% της οξυγαλακτικής χλωρίδας των συγκεκριμένων δειγμάτων. Στελέχη *W. paramesenteroides* απομονώνονται από τα δείγματα M και GN σε ποσοστά 6,7 και 3,3% αντίστοιχα. Επίσης σε υψηλά ποσοστά (30%) απομονώνεται από τα δείγματα GN *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6A).

Αναλυτικά τα είδη γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης (M, GN, GN+ON) που συντηρήθηκαν στους 12°C συναρτήσει του χρόνου συντήρησής τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.5 που ακολουθεί.

Πίνακας 4.6. Κατανομή των 90 απομονωθέντων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων από τρυβλία TSAYE των δειγμάτων αλλαντικών Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 12°C.

Είδος/υποείδος	Ομάδα	Μ			ΓΝ			ΓΝ+ΟΝ		
		15	30	60	15	30	60	15	30	60
<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	1A	6	1	2	3			8	4	5
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>	1B			1	1	4		2	6	2
<i>L. sakei/curvatus</i>	1C									
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>melibiosus</i>	1D		1	1	4					
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2A		1	2			2			
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2B		3							
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2C									
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2D									
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2E									
<i>Lactobacillus</i> spp.	3									
<i>Lactobacillus</i> spp.	4		1				1			3
<i>L. paraplantarum</i>	5			3						
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	6A	1		1	1	3	5			
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	6B	1								
<i>Leuc. carnosum</i>	7A									
<i>Leuc. carnosum</i>	7B		3			3	2			
<i>Leuconostoc</i> spp.	8									
<i>W. paramesenteroides</i>	9	2			1					
<i>Lactobacillus/Weissella</i> spp.	10									
Σύνολο απομονώσεων		10	10	10	10	10	10	10	10	10

Σύμφωνα με τον Πίνακα 4.6, στα δείγματα Μ που συντηρήθηκαν στους 12°C, παρατηρείται μια μείωση της συχνότητας απομόνωσης ετεροζυμωτικών στελεχών συναρτήσει του χρόνου (40% την 15^η, 30% την 30^η και 10% την 60^η ημέρα συντήρησης). Αντίστροφη τάση παρατηρείται στα δείγματα με ΓΝ, στα οποία το ποσοστό απομόνωσης ετεροζυμωτικών στελεχών αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου (20% την 15^η, 60% την 30^η και 70% την 60^η ημέρα συντήρησης στους 12°C). Όσον αφορά τα δείγματα που περιείχαν ΓΝ και ΟΝ παρατηρείται απουσία ετεροζυμωτικών στελεχών καθ' όλη την περίοδο συντήρησης των 60 ημερών στους 12°C. Μεταξύ των ομοζυμωτικών στελεχών γαλακτικών βακτηρίων κυριαρχούσαν ο *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1Α) και ακολουθούσαν ο *L. sakei* subsp. *carneus* ενώ σε χαμηλά ποσοστά απομονώθηκαν άτυπα ομοζυμωτικά είδη του γένους *Lactobacillus* (φαινοτυπικά ομάδα 4).

Σύμφωνα με το Σχήμα 4.3, η σειρά που ακολουθείται όσον αφορά το pH των αλλαντικών στους 12°C είναι η εξής: Μ<ΓΝ<ΓΝ+ΟΝ (αντίθετα με τους 4°C όπου ήταν Μ<ΓΝ+ΟΝ<ΓΝ). Συγκεκριμένα από την 15^η έως την 30^η ημέρα το pH των αλλαντικών μειώνεται με ταχύ ρυθμό και μάλιστα παρατηρείται ίδιος ρυθμός πτώσης του pH ανεξαρτήτως του είδους του αντιμικροβιακού, εντούτοις όμως η οξυγαλακτική χλωρίδα των αλλαντικών με ΓΝ και εκείνων με ΓΝ και ΟΝ παρουσιάζει διαφορές. Έτσι ενώ στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ κυριαρχούν στελέχη *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1Α) και συγκεκριμένα σε ποσοστό 80% την 15^η ημέρα και 40% την 30^η ημέρα, τα δείγματα ΓΝ περιέχουν μια πιο ποικίλη χλωρίδα. Την 15^η ημέρα απομονώνονται 30% *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1Α) και 10% *L. sakei* subsp. *carneus* (φαινοτυπική ομάδα 1Β) και επιπλέον 40% *L. curvatus* subsp. *melibiosus* και 20% ετεροζυμωτικά στελέχη (*Leuconostoc* και *Weissella*). Την 30^η ημέρα απομονώνονται 40% *L. sakei* subsp. *carneus* (φαινοτυπική ομάδα 1Β) και 60% *Leuconostocs*.

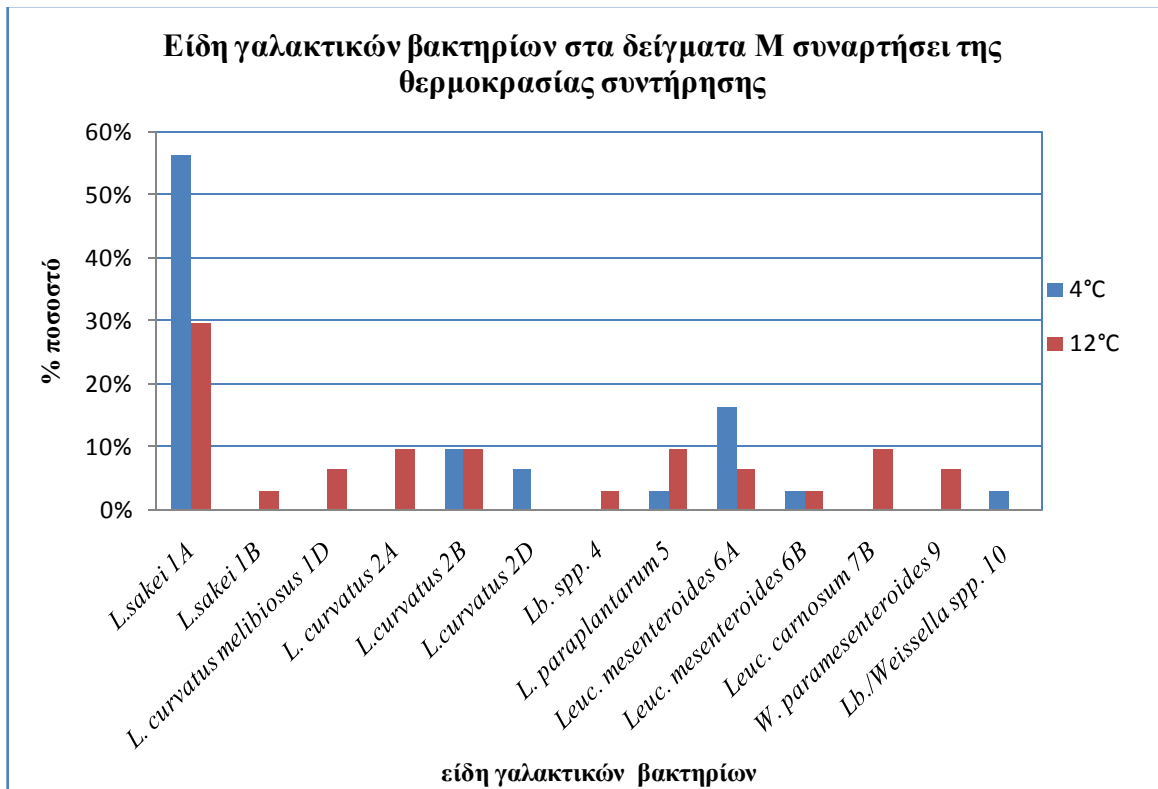
Από τους Πίνακες 4.5 και 4.6 παρατηρείται αυξημένη συχνότητα απομόνωσης στελεχών του είδους *L. sakei* σε σύγκριση με τα στελέχη του είδους *L. curvatus*, παρατήρηση που είναι σε συμφωνία με άλλα ερευνητικά αποτελέσματα (Samelis et al., 2000a; Samelis & Georgiadou, 2000).

Κατά τη συντήρηση των αλλαντικών στους 12°C, οι αλλοιώσεις ήταν παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν στα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 4°C πλην όμως ήταν ταχύτερες και εντονότερες.

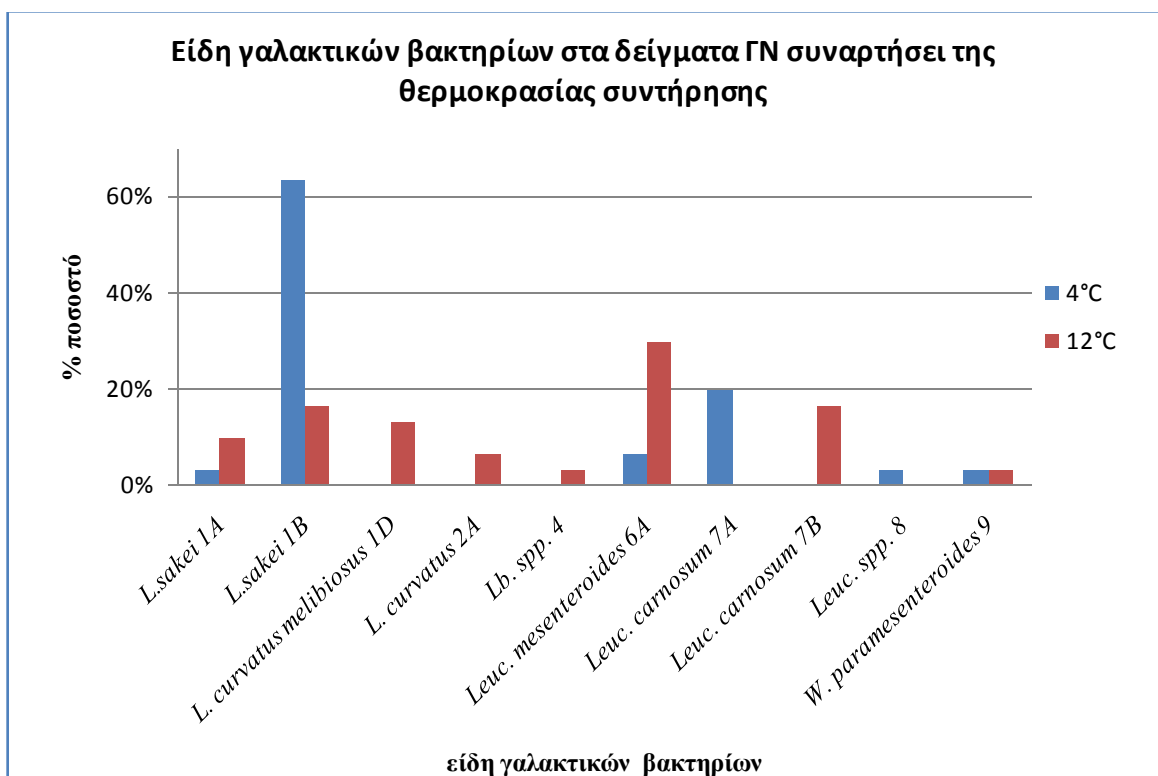
- Συγκεκριμένα τα δείγματα μάρτυρες (M) χαρακτηρίζονταν ως μη αποδεκτά από τη δεύτερη εβδομάδα συντήρησης. Στη χλωρίδα των αλλαντικών αυτών κυριαρχούν την 15^η ημέρα στελέχη *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A) σε ποσοστό 60%. Επιπλέον απομονώνονται ετεροζυμωτικά στελέχη που παράγουν βλέννα από τη ζύμωση της σακχαρόζης και συγκεκριμένα στελέχη *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6A) σε ποσοστό 10%, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (φαινοτυπική ομάδα 6B) σε ποσοστό επίσης 10% και *W. paramesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 9) σε ποσοστό 20%. Στα υψηλά αυτά ποσοστά ετεροζυμωτικών στελεχών αποδίδεται η αλλοίωση των αλλαντικών λόγω της παραγωγής αερίου και βλέννας.
- Τα δείγματα ΓN θεωρούνται αποδεκτά ή αλλοιωμένα μεταξύ της 60^{ης} και 90^{ης} ημέρας συντήρησης. Την 60^η ημέρα σύμφωνα με τον πίνακα 4.6, απομονώνονται σε υψηλά ποσοστά στελέχη ετεροζυμωτικών ειδών γαλακτικών βακτηρίων και συγκεκριμένα 50% *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (φαινοτυπική ομάδα 6A) και 20% *Leuc. carnosum* (φαινοτυπική ομάδα 7B) στα οποία προφανώς και αποδίδεται η αλλοίωση των αλλαντικών.
- Από τη χλωρίδα των αλλαντικών ΓN+ON επιβεβαιώνεται η κατάταξή τους ως αποδεκτά ως την 60^η ημέρα συντήρησης, καθώς αποτελούνται αποκλειστικά από ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια καθ' όλη την περίοδο συντήρησης (ωστόσο υψηλής αναλογίας *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A).

4.6.3 Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης στο είδος γαλακτικών βακτηρίων που επιλέγονται να αναπτυχθούν.

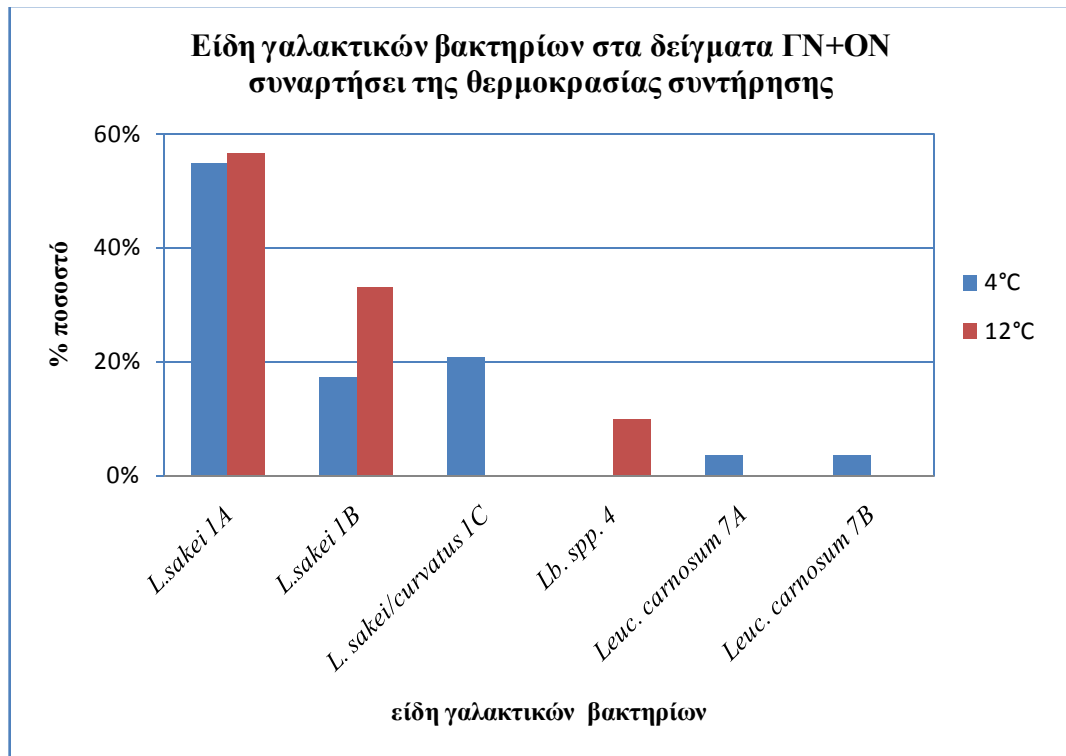
Στα σχήματα 4.9, 4.10 και 4.11 παρουσιάζεται η κατανομή των ειδών γαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα M, ΓN και ΓN+ON αντίστοιχα στις δυο διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης.



Σχήμα 4.9: Κατανομή γαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα Μ συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης.



Σχήμα 4.10: Κατανομή γαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα ΓΝ συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης.



Σχήμα 4.11: Κατανομή γαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα GN+ON συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης.

Από τα παραπάνω σχήματα παρατηρείται η αποκλειστική απομόνωση άτυπων στελεχών του γένους *Lactobacillus* (φαινοτυπική ομάδα 4) από τους Ψγια όλα τα αλλαντικά Φρανκφούρτης (M, ΓN και ΓN+ON). Πιθανόν τα στελέχη αυτά να ευνοούνται από την υψηλή θερμοκρασία συντήρησης των αλλαντικών, χωρίς να επηρεάζεται η ανάπτυξή τους από την παρουσία των αλάτων γαλακτικού και οξικού οξέος. Ο *L. paraplantarum* (φαινοτυπική ομάδα 5) απομονώνεται μόνο από τα δείγματα M και μάλιστα σε διπλάσιο ποσοστό στους 12 απ' ό τι στους 4°C. Πιθανόν το συγκεκριμένο είδος γαλακτοβακίλων να είναι ευαίσθητο στην παρουσία γαλακτικού και οξικού νατρίου και επιπλέον η ανάπτυξή του να ευνοείται από την υψηλότερη θερμοκρασία συντήρησης των αλλαντικών. Επιπλέον στελέχη του *L. curvatus* subsp. *melibiosus* απομονώνονται μόνο στους 12°C από τα δείγματα M και ΓN. Αντίθετα στα δείγματα ΓN+ON δεν απομονώνονται τυπικά στελέχη του *L. curvatus* subsp. *curvatus*, αλλά απομονώνονται κατά αποκλειστικότητα στελέχη της ομάδας *L. sakei/curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 1C) και μόνο από τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 4°C.

4.7 Επιβεβαίωση της καταλληλότητας του TSAYE ως θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων.

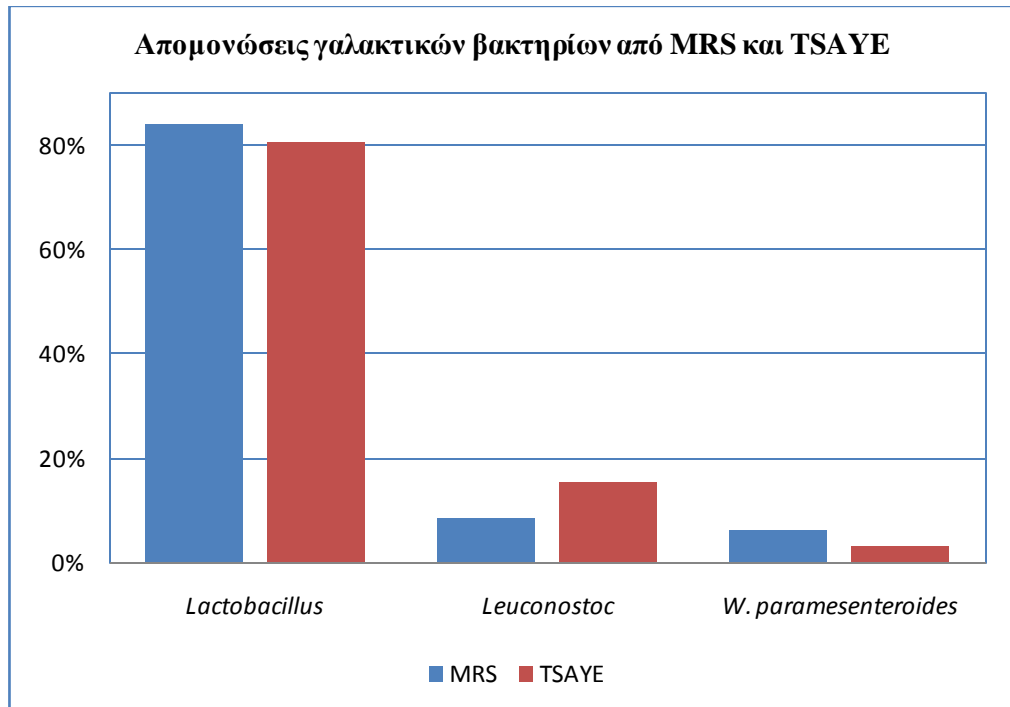
Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, ως βασικό υπόστρωμα ανάπτυξης για την απομόνωση των γαλακτικών βακτηρίων στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το TSAYE, ενώ κατά βάση το υλικό απομόνωσης γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιείται είναι το MRS agar. Για την σύγκριση της επιλεκτικότητας των δύο υποστρωμάτων οι απομονώσεις από TSAYE (Πίνακες 4.5 και 4.6) συμπληρώθηκαν με αντίστοιχο αριθμό απομονώσεων από τρυβλία MRS (Πίνακας 4.7) οι οποίες όμως έγιναν σε ορισμένες μόνο ημέρες δειγματοληψίας κατά την συντήρηση των αλλαντικών Φρανκφούρτης.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά οι απομονώσεις σε MRS agar στελεχών γαλακτικών βακτηρίων από δείγματα αλλαντικών στους 4 και 12°C.

Πίνακας 4.7. Κατανομή 90 απομονωθέντων στελεχών γαλακτικών βακτηρίων από τρυβλία MRS των δειγμάτων αλλαντικών Φρανκφούρτης που συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C και 12°C.

Είδος/υποείδος	Ομάδα	4°C/30 ⁿ ημέρα			12°C/15 ⁿ ημέρα			12°C/30 ⁿ ημέρα		
		M	ΓN	ΓN+ON	M	ΓN	ΓN+ON	M	ΓN	ΓN+ON
<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	1A	3	1	5	4	3	6			4
<i>L. sakei</i> subsp. <i>camosus</i>	1B	2	9	1		2	4			
<i>L. sakei/curvatus</i>	1C			4						3
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>melibiosus</i>	1D				1	2		1		
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2A				2			2	3	
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2B				3			3		
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2C									3
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2D							2		
<i>L. curvatus</i> subsp. <i>curvatus</i>	2E							1		
<i>Lactobacillus</i> spp.	3					2				
<i>Lactobacillus</i> spp.	4									
<i>L. paraplantarum</i>	5									
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	6A	2				1			3	
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	6B									
<i>Leuc. Carnosum</i>	7A									
<i>Leuc. Carnosum</i>	7B								2	
<i>Leuconostoc</i> spp.	8									
<i>W. paramesenteroides</i>	9	3						1	2	
<i>Lactobacillus/Weissella</i> spp.	10									
Σύνολο απομονώσεων		10	10	10	10	10	10	10	10	10

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζονται σε επίπεδο γένους/είδους τα γαλακτικά βακτήρια ανά θρεπτικό υπόστρωμα απομόνωσης.



Σχήμα 4.12. Απομονώσεις των γενών *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Weissella* συναρτήσει του θρεπτικού υποστρώματος ανάπτυξής τους.

Με βάση τους Πίνακες 4.5, 4.6, 4.7 και το Σχήμα 4.12, επιβεβαιώνεται η καταλληλότητα του TSAYE ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων καθώς τα ποσοστά απομόνωσης του γένους *Lactobacillus* είναι σχεδόν ίδια με εκείνα από το MRS, τα είδη του γένους *Leuconostoc* απομονώθηκαν σε μεγαλύτερα ποσοστά από το TSAYE και μόνο για την *W. paramesenteroides* τα ποσοστά απομόνωσης από TSAYE ήταν χαμηλότερα από εκείνα σε MRS.

Επιπλέον από τις απομονώσεις γαλακτικών βακτηρίων από MRS παρατηρείται όπως από τις απομονώσεις από TSAYE, η κατά αποκλειστικότητα απομόνωση στελεχών *L. sakei/curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 1C) από τα δείγματα ΓΝ+ΟΝ στους C4Για το συγκεκριμένο θρεπτικό υλικό στελέχη της συγκεκριμένης ομάδας απομονώθηκαν και από τους 12°C και πάλι όμως μόνο στα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε οξικό νάτριο ως

αντιμικροβιακός παράγοντας. Επίσης τα συγκεκριμένα στελέχη απομονώνονται μόνο από την 30^η ημέρα συντήρησης των αλλαντικών και για τις δυο θερμοκρασίες και για τα δυο θρεπτικά υποστρώματα.

Συνοψίζοντας θα μπορούσαμε να αναφέρουμε ότι τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες όσον αφορά στη θετική επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας συντήρησης στην επιτάχυνση της ανάπτυξης της οξυγαλακτικής χλωρίδας και συνεπώς στην ταχύτερη αλλοίωση των αλλαντικών (Samelis & Georgiadiou, 2000; Samelis et al., 1998a; Borch et al., 1996; Korkeala & Björkroth, 1997; Zureta-Cosano et al., 1988). Επιπλέον η παρουσία αλάτων οργανικών οξέων επιδρά θετικά επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων (Drosinos et al., 2006; Barmpalia et al., 2005; Barmpalia et al., 2004; Stekelenburg & Kant-Muermans, 2001; Stekelenburg, 2003).

Από την ταυτοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων των αλλαντικών Φρανκφούρτης παρατηρήθηκαν τα εξής:

- Υψηλή συχνότητα απομόνωσης ομοζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων της τάξης του 80% από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης και για τις δύο θερμοκρασίες συντήρησης.
- Μεταξύ των αλλαντικών τα δείγματα Μ παρουσίαζαν την πιο ποικίλη οξυγαλακτική χλωρίδα και ακολουθούσαν τα δείγματα ΓΝ και ΓΝ+ΟΝ. Επιπλέον η υψηλή θερμοκρασία συντήρησης (12^ο) επέτρεψε την ανάπτυξη περισσότερων ειδών γαλακτικών βακτηρίων.
- Η αρχική υπόθεση (με βάση την πτώση της τιμής του pH των αλλαντικών) πως τα γαλακτικά βακτήρια που επιλέγονται στα δείγματα ΓΝ στους 4^ο είναι διαφορετικά από εκείνα που επιλέγονται στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ, επιβεβαιώθηκαν με την ταυτοποίησή τους. Πιθανόν ο *L. sakei* subsp. *carneus* (φαινοτυπική ομάδα 1B) που κυριαρχεί στα δείγματα ΓΝ να προκαλεί μικρότερη πτώση της τιμής του pH σε σχέση με τον *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A) και τα στελέχη της ομάδας *L.sakei/curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 1C) που κυριαρχούν στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ.
- Στους 4^ο, παρατηρήθηκε μεταστροφή της οξυγαλακτικής χλωρίδας των αλλαντικών ΓΝ μετά την 60^η ημέρα συντήρησης από 100% ομοζυμωτικά σε 100%

ετεροζυμωτικά είδη γαλακτικών βακτηρίων. Αντίθετα στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ επιλέγονταν σχεδόν κατά αποκλειστικότητα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια. Η επικράτηση των ομοζυμωτικών, έναντι των ετεροζυμωτικών, γαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά στα οποία προστέθηκε ΓΝ+ΟΝ είχε ως αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου συντήρησης των συγκεκριμένων αλλαντικών. Τα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια προκαλούν κυρίως πτώση της τιμής του pH λόγω της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος ενώ τα ετεροζυμωτικά είναι υπεύθυνα για πιο σοβαρές αλλοιώσεις εξαιτίας της επιπρόσθετης παραγωγής αερίου και βλέννας.

- Στους 12°C στα δείγματα ΓΝ απομονώνονταν ήδη από την 15^η ημέρα συντήρησης ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια και μάλιστα λόγω της αυξημένης θερμοκρασίας αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου. Αντίθετα στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ επιλέγονταν κατά αποκλειστικότητα ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια. Επιπλέον στα δείγματα ΓΝ, δεν είναι ξεκάθαρο σε ποια είδη γαλακτικών βακτηρίων αποδίδεται η μεγαλύτερη πτώση της τιμής του pH καθώς αυτά περιέχουν μια ποικίλη ομοζυμωτική χλωρίδα και εκτός των *L. sakei* subsp. *sakei* και *L. sakei* subsp. *carneus* απομονώνονται επίσης στελέχη *L. curvatus* subsp. *melibiosus* (φαινοτυπική ομάδα 1D), *L. curvatus* subsp. *curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 2D), και ομοζυμωτικά *Lb. spp.* (φαινοτυπική ομάδα 4). Αντίθετα στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ απομονώνονται σε υψηλά ποσοστά (56,7%) στελέχη *L. sakei* subsp. *sakei* (φαινοτυπική ομάδα 1A) ενώ ο *L. sakei* subsp. *carneus* (φαινοτυπική ομάδα 1B) σε χαμηλότερα ποσοστά (33,3%).
- Στελέχη του *L. paraplantarum* (φαινοτυπική ομάδα 5) απομονώθηκαν μόνο από τα δείγματα Μ και σε διπλάσιο ποσοστό στους 12°C απ' ό τι στους 4°C.
- Άτυπα στελέχη ομοζυμωτικών γαλακτοβακίλων (φαινοτυπική ομάδα 4) επιλέγονται μόνο στα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 12°C, χωρίς η ανάπτυξή τους να επηρεάζεται από την παρουσία γαλακτικού ή οξικού νατρίου.
- Στελέχη *L. curvatus* subsp. *melibiosus* (φαινοτυπική ομάδα 1D) απομονώνονται μόνο από τα αλλαντικά Μ και ΓΝ που συντηρήθηκαν στους 12°C.
- Στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ δεν επιλέγονται τυπικά στελέχη *L. curvatus* subsp. *curvatus* αλλά απομονώνονται κατά αποκλειστικότητα από στελέχη 4° *L.sakei/curvatus* (φαινοτυπική ομάδα 1D).

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνεται:

- Η δυσμενής επίδραση της αυξημένης θερμοκρασίας συντήρησης στην μικροβιολογική ποιότητα των αλλαντικών Φρανκφούρτης.
- Η θετική επίδραση των αλάτων οργανικών οξέων στην επιβράδυνση της ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων

Επιπλέον:

- Διαπιστώνεται πως η χρήση μίγματος 1.8%ΓΝ και 0.25%ΟΝ στα αλλαντικά Φρανκφούρτης πλεονεκτεί αναφορικά με τον χρόνο συντήρησής τους σε σύγκριση με τη χρήση μόνο ΓΝ.
- Από την ταυτοποίηση των απομονωθέντων γαλακτικών βακτηρίων, επιβεβαιώνεται η κατάταξη με βάση την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων που συντηρήθηκαν στους 4°C (ΓΝ+ΟΝ: αποδεκτά στις 90 ημέρες, ΓΝ: αποδεκτά ή αλλοιωμένα μεταξύ 60^{ης} και 90^{ης} ημέρας και Μ: αλλοιωμένα στις 30 ημέρες συντήρησης). Συγκεκριμένα στους 4°C στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ επιλέγονται σχεδόν αποκλειστικά ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια (*L. sakei* subsp. *sakei*, *L. sakei* subsp. *carneus* και *L. sakei/curvatus*) με χαμηλότερο δυναμικό αλλοίωσης- κυρίως παραγωγή γαλακτικού οξέος. Από τα δείγματα Μ απομονώνονταν ετεροζυμωτικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (κυρίως *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) καθ' όλη την περίοδο συντήρησης στους 4°C, ενώ στα δείγματα ΓΝ μετά την 60^η ημέρα συντήρησης παρατηρείται μια μεταστροφή της οξυγαλακτικής χλωρίδας από 100% ομοζυμωτικά σε 100% ετεροζυμωτικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων. Η παρουσία ετεροζυμωτικών στελεχών και ειδικότερα στελεχών που παράγουν βλέννα από τη σακχαρόζη ευθύνεται για την υποβάθμιση της ποιότητας των αλλαντικών Μ και ΓΝ, εξαιτίας της παραγωγής αερίου και βλέννας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, όσον αφορά την ταυτοποίηση των γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από τα αλλαντικά Φρανκφούρτης, χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης προκειμένου να επιβεβαιωθούν με μοριακές τεχνικές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης αλάτων οργανικών οξέων στην οξυγαλακτική χλωρίδα αλλοίωσης αλλαντικών Φρανκφούρτης. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν σε εμπορική κλίμακα αλλαντικά με προσθήκη 1.8% γαλακτικού νατρίου (ΓΝ) ή 1.8% γαλακτικού νατρίου και 0.25% οξικού νατρίου (ΓΝ+ΟΝ), ενώ αλλαντικά χωρίς προσθήκη αλάτων χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (Μ). Μετά την αποφλοιώση όλα τα αλλαντικά (pH 6.3-6.4) συσκευάστηκαν υπό κενό, συντηρήθηκαν στους 4 ή 12°C και αναλύθηκαν μικροβιολογικά με παράλληλη μέτρηση του pH και οργανοληπτική αξιολόγηση την 0, 7, 15, 30, 45, 60 και 90^η ημέρα συντήρησης.

270 συνολικά αποικίες απομονώθηκαν από TSAYE και MRS agar (180 και 90 αποικίες, αντίστοιχα) κατά την περίοδο συντήρησης των αλλαντικών Φρανκφούρτης. Στελέχη θετικών κατά Gram και καταλάση αρνητικών γαλακτικών βακτηρίων ταυτοποιήθηκαν περαιτέρω με βάση περιορισμένο αριθμό δοκιμών: παραγωγή αερίου από τη γλυκόζη, υδρόλυση της αργινίνης, σχηματισμός βλέννας και ζύμωση 13 επιλεγμένων σακχάρων.

Η αρχική επιμόλυνση των αλλαντικών με γαλακτικά βακτήρια κυμάνθηκε από 2.4 έως 2.7 log cfu/g. Κατά τη συντήρηση, η ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων ήταν μεγαλύτερη στα δείγματα αλλαντικών με την εξής σειρά: Μ > ΓΝ+ΟΝ > ΓΝ, ενώ ήταν ταχύτερη στους 12°C σε σχέση με τους 4°C, ανεξάρτητα από το είδος των δειγμάτων. Ειδικότερα, σε σύγκριση με τα δείγματα Μ, το ΓΝ καθυστέρησε (P < 0.05) την οξυγαλακτική ανάπτυξη κατά 2.3 και 1 λογαρίθμους μετά από 45 και 60 ημέρες στους 4°C, αντίστοιχα, ενώ το μίγμα ΓΝ+ΟΝ δεν ήταν αποτελεσματικό μετά την 7^η ημέρα. Μετά από 90 ημέρες στους 4°C, όλα τα δείγματα είχαν πληθυσμούς 7.8-8.4 log cfu/g. Αντίθετα, στους 12°C, οι πληθυσμιακές διαφορές δεν ήταν τόσο έντονες καθώς η προσθήκη ΓΝ παρεμπόδιζε σημαντικά την οξυγαλακτική ανάπτυξη για μόλις 7 ημέρες. Το τελικό pH (90^η ημέρα) των αλλαντικών Μ, ΓΝ+ΟΝ και ΓΝ ήταν 5.0, 5.6 και 5.3 στους 12°C, και 5.6, 5.9 και 6.2 στους 4°C, αντίστοιχα. Η παραγωγή αερίου, βλέννας και όξινης δυσσομίας μειωνόταν στα δείγματα στους 4°C: ΓΝ+ΟΝ (αποδεκτό στις 90 ημέρες) < ΓΝ (αποδεκτό ή αλλοιωμένο μεταξύ 60 και 90 ημερών) < Μ (αλλοιωμένο στις 30 ημέρες). Οι αλλοιώσεις ήταν εντονότερες στους 12°C.

Η βιοχημική ταυτοποίηση έδειξε υψηλή συχνότητα απομόνωσης ομοζυμωτικών γαλακτικών βακτηρίων (79,2% στους 4°C και 78,6% στους 12°C), ενώ τα ανεπιθύμητα είδη του γένους *Leuconostoc* που παράγουν βλέννα από τη σακχαρόζη απομονώθηκαν σε ποσοστό 14,2% και 10,7% στους 4°C και 12°C, αντίστοιχα.

Μεταξύ των τριών κατεργασιών και ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας συντήρησης, τα δείγματα Μ παρουσίαζαν την πιο ποικίλη οξυγαλακτική χλωρίδα. Μεταξύ των υποειδών του *L. sakei*, ο *L. sakei* subsp. *carnosus* απομονώθηκε από τα δείγματα ΓΝ σε ποσοστό 40%, ενώ στα δείγματα Μ και ΓΝ+ΟΝ κυριαρχούσε ο *L. sakei* subsp. *sakei* (43% και 56% αντίστοιχα).

Στα δείγματα ΓΝ στους 4°C μετά την 60^η ημέρα συντήρησης παρατηρήθηκε μεταστροφή της οξυγαλακτικής χλωρίδας από 100% ομοζυμωτικά σε 100% ετεροζυμωτικά στελέχη (κυρίως *Leuc. carnosum* και *Leuc. mesenteroides*) επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης (αποδεκτό ή αλλοιωμένο μεταξύ 60 και 90 ημέρες συντήρησης).

Στα δείγματα ΓΝ+ΟΝ που συντηρήθηκαν στους 4°C αποκλειστικά ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια (*L. sakei* subsp. *sakei*, *L. sakei/curvatus* και *L. sakei* subsp. *carnosus*) με χαμηλότερο δυναμικό αλλοίωσης- κυρίως παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αντίθετα από τα δείγματα Μ απομονώνονταν ετεροζυμωτικά στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (κυρίως *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) καθ' όλη την περίοδο συντήρησης στους 4°C. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι υπεύθυνοι για πιο σοβαρά ελαττώματα όπως η παραγωγή βλέννας και αερίου, επιβεβαιώνοντας έτσι την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων (ΓΝ+ΟΝ: αποδεκτά στις 90 ημέρες και Μ: αλλοιωμένα στις 30 ημέρες συντήρησης).

Κατά τη συντήρηση των αλλαντικών ΓΝ στους 12°C απομονώθηκαν ετεροζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια από τις 2 πρώτες εβδομάδες συντήρησης (μετά την 60^η ημέρα στους 4°C). Επιπροσθέτως η υψηλή θερμοκρασία συντήρησης ήταν ευνοϊκή για την ανάπτυξη σε όλα τα δείγματα άτυπων ειδών του γένους *Lactobacillus* ανεξαρτήτως της παρουσίας αλάτων οργανικών οξέων.

Συμπερασματικά, η προσθήκη 0.25% ΟΝ σε συνδυασμό με 1.8% ΓΝ επιμηκύνει σημαντικά το χρόνο συντήρησης αλλαντικών Φρανκφούρτης με βασικό κριτήριο τα μακροσκοπικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλλοίωσης, τόσο σε συνθήκες ψυγείου όσο και σε υψηλότερη θερμοκρασία συντήρησης.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of organic acid salts on the lactic acid bacteria spoilage flora of Frankfurters. For this purpose, frankfurters were formulated in a commercial meat plant with inclusion of 1.8% sodium lactate (SL) or 1.8% sodium lactate and 0.25% sodium acetate (SL+SA), while frankfurters without salts served as controls (CN). Peeled Frankfurters (pH 6.3-6.4) were vacuum packaged, stored at 4 or 12°C and analyzed microbiologically, along with pH measurement and sensory evaluation at 0, 7, 15, 30, 45, 60 and 90 days of storage.

A total of 270 colonies were isolated from TSAYE and MRS agar (180 and 90 colonies, respectively) during storage of Frankfurters. Strains of lactic acid bacteria (Gram-positive and catalase-negative) were further identified by a limited number of tests: gas production from glucose, arginine hydrolysis, slime formation and fermentation of 13 selected sugars.

Initial LAB contamination of frankfurters ranged from 2.4 to 2.7 log cfu/g between treatments. During storage, LAB growth was more pronounced in the order CN > SL+SA > SL, while it was faster at 12 than at 4°C, irrespective of treatment. Specifically, as compared to the CN, SL singly ($P < 0.05$) LAB growth decreased by 2.3 and 1.0 log units, after 45 and 60 days of storage at 4°C, whereas SL+SA was not effective after day 7. After 90 days at 4°C, all treatments had LAB counts of 7.8-8.4 log cfu/g. Conversely, at 12°C, differences in LAB counts were not so large since SL could delay ($P < 0.05$) LAB growth for only 7 days. The final (day-90) pH values of the CN, SL+SA and SL, Frankfurters were 5.0, 5.6, and 5.3 at 12°C, and 5.6, 5.9 and 6.2 at 4°C, respectively. In-package gas and slime formation and off odors at opening decreased in the order SL+SA (acceptable at 90 days) < SL (acceptable or spoiled at 60 to 90 days) < CN (spoiled at 30 days) Frankfurters at 4°C. Sensory defects were stronger upon storage at 12°C.

Biochemical identification indicated a dominance of homofermentative lactic acid bacteria (79,2% at 4°C and 78,6% at 12°C) while undesirable slime producing species of the genus *Leuconostoc* were isolated at 14,2% and 10,7% at 4°C and 12°C, respectively.

From the three treatments and irrespective of storage temperature used, CN samples had the most diverse lactic acid bacteria flora. Between subspecies of *L.sakei*, *L. sakei* subsp. *carneus* was isolated from samples SL at a percentage of 40%, while CN and SL+SA samples were dominated by *L. sakei* subsp. *sakei* (43% and 56% respectively).

In SL samples stored at 4°C after day 60, a shift of lactic acid bacteria flora was observed from 100% homofermentative to 100% heterofermentative strains (mainly *Leuc.carnosum* and *Leuc. mesenteroides*) confirming the results of sensory evaluation (acceptable or spoiled between 60 and 90 days of storage).

SL+SA samples stored at 4°C, dominated almost exclusively by homofermentative lactic acid bacteria (*L. sakei* subsp *sakei*, *L.sakei/curvatus* και *L. sakei* subsp. *carnosus*) with a mild spoilage potential –mainly production of lactic acid. Conversely in CN samples heterofermentative LAB strains (mainly *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) were isolated during the whole period of storage at 4°C. These microorganisms are responsible for more serious defects like slime and gas production, confirming the sensory evaluation (SL+SA: acceptable at 90 days and CN: spoiled at 30 days).

In SL samples stored at 12°C, heterofermentative lactic acid bacteria were isolated from the first two weeks of storage (after day 60 at 4°C). Furthermore, the elevated storage temperature favored the growth of atypical species of the genus *Lactobacillus* in all samples, irrespective of the presence of organic acid salts.

In conclusion, 0.25% SA combined with SL at 1.8% in product formulation significantly extends shelf life of commercial frankfurters, as far as macroscopic organoleptic spoilage defects are concerned, under both refrigeration and temperature abusive conditions of storage.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abee, T., Kröckel, L. and Hill, C. (1995) Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 169-185.
- Apaydin, G., Ceylan, Z.G., Atasever, M. and Kaya, M. 2008. A survey on Microbiological and chemical quality of vacuum-packaged Frankfurters. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 39 (1), 109-113.
- Appendini, P. and Hotchkiss, J.H. (2002) Review of antimicrobial food packaging. *Innov. Food Sci. Emerg. Techn.*, 3, 113-126.
- Barba, F.J., Koubaa, M., do Prado-Silva, L., Orlien, V., and Sant'Ana, A.S. (2017) Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. *Trends in Food Sci. & Technol.*, 66, 20-35.
- Barba, F.J., Terefe, N.S, Buckow, R., Knorr, D. and Orlien, V. (2015) New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Research Internat.* 77, 725-742.
- Barmpalia, I. M., Geornaras, I., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N. (2004) Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. *J. Food Prot.* 67(11), 2456-2464.
- Barmpalia, I.M., Koutsoumanis, K.P., Geornaras, I., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N. (2005) Effect of antimicrobials as ingredients of pork bologna for *Listeria monocytogenes* control during storage at 4 or 10⁰C. *Food Microbiol.* 22, 205-211.
- Benkerroum, N. (2008) Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African J. Biotech.* 7, 25, 4856-4867.
- Bhuyan, D., Das, A., Laskar, S.K., Bora, D.P, Tamuli, S. and Hazarika, M. (2018) Effect of different smoking methods on the quality of pork sausages. *Veterinary World*, 11(12), 1712-1719.
- Bjorkroth, J, Dicks, L.M.T. and Endo, A. (2014b) The genus *Weissella*. In Holzappel, W.H and Wood, B.J.B (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 1st edn, Wiley & Sons Ltd, pp. 417-428.

- Bjorkroth, J, Dicks, L.M.T., Endo, A. and Holzapfel, W.H. (2014a) The genus *Leuconostoc*. In Holzapfel, W.H and Wood, B.J.B (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 1st edn, Wiley & Sons Ltd, pp. 391-400.
- Bjorkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W.H., Korkeala, H.J. and Vandamme, P. (2000) Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato- marinated broiler meat strips packaged under modified- atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3764-3772.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L. and Blixt, Y. (1996) Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 103-120.
- Clavero, R. (2010) Solving microbial spoilage problems in processed foods, chapter 3. In Kornacki, J. L (Ed), *Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment, Food Microbiology and Food Safety*, Springer Science & Business Media, New York, pp. 63-67.
- Collins, M.D. Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbanks, S. (1993) Taxonomic studies on some *leuconostoc*- like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 595-603.
- Coma, V. (2008) Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Sci.* 78, 90-103.
- Davies, E.A., Milne, C.F., Bevis, H.E., Potter, R.W., Harris, J.M., Williams, G. C., Thomas, L.V and Delves-Broughton, J. (1999) Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed Bologna-type sausage. *J. Food Prot.* 62(9), 1004-1010.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Kampani, A., Kritikos, D. and Metaxopoulos, I. (2006) Inhibitory effect of organic acid salts on spoilage flora in culture medium and cured cooked meat products under commercial manufacturing conditions. *Meat Sci.* 73, 75-81.
- Dykes, A. and von Holy, A. (1994) Taxonomic status of atypical *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus curvatus* strains associated with vacuum-packaged meat spoilage. *Current Microbiol.* 28, 197-200.
- Endo, A. and Dicks, L.M.T. (2014) Physiology of LAB. In Holzapfel, W.H and Wood, B.J.B (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 1st edn, Wiley & Sons Ltd, pp. 13-30.
- Essien, E. (Ed) (2003). *Sausage manufacture: Principles and practice*, Woodhead publishing Ltd, Cambridge, England, chapt. 3, pp. 15-27.

- Foong, S.C.C., Gonzalez, G.L. and Dickson, J.S. (2004) Reduction and survival of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats after irradiation. *J. Food Prot.* 67(1), 77-82.
- Franklin, N.B., Cooksey, K.D. and Getty, J.K. (2004) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the surface of individually packaged hot dogs with a packaging film coating containing nisin. *J. Food Prot.* 67, 3, 480-485.
- Franz, C.M.A.P. and von Holy, A. (1996) Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 29, 59-73.
- Friedman, M. and Juneja, V.K. (2010) Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *J. Food Protect.* 73(9):1737-1761.
- Garriga, M., Grebol, N., Aymerich, M.T., Monfort, J.M. and Hugas, M. (2004) Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 451-457.
- Gautam, S. and Tripathi, J. (2016) Food processing by irradiation- an effective technology for food safety and security. *Indian J. Experimental Biol.* 54, 700-707.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G. and 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 Sci.* 76:172-181.
- Gill, A.O. and Holley, R.A. (2000) Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research Int.* 33, 83-90.
- Giraffa, G. (2014) Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. In Holzapfel, W.H and Wood, B.J.B (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 1st edn, Wiley & Sons Ltd, pp. 45-53.
- Guerrero, I. and Chabela, L.P. (1999) Spoilage of cooked meats and meat products. In Robinson, R.K., Batt, C.A. and Patel, P. (eds) 1st edn, vol. 2, *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, San Diego, California, pp. 1266-1272.
- Han, Y., Jiang, Y., Xu, X., Sun, X., Xu, B. and Zhou, G. (2011) Effect of high pressure treatment on microbial populations of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Sci.* 88, 682-688.
- Harrigan, W.F., McCance, M.E. (1976) *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*, Academic Press, New York.
- Horita, C.N., Baptista, R.C., Caturla, M.Y.R., Lorenzo, J.M. (2018) Combining reformulation, active packaging and non-thermal post-packaging decontamination technologies to

- increase the microbial quality and safety of cooked ready-to-eat meat products. *Trends in Food Sci & Technol.* 72, 45-61.
- Hu, P., Xu, X.L., Zhou, G.H., Han, Y.Q., Xu, B.C. and Liu, J.C. (2008) Study of the *Lactobacillus sakei* protective effect towards spoilage bacteria in vacuum packed cooked ham analyzed by PCR-DGGE. *Meat Sci.* 80, 462-469.
- Hugas, M. (1998) Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* 49, S139-S150.
- Iseppi, R., Pilati, F., Marini, M., Toselli, M., de Niederhausern, S., Guerrieri, E., Messi, P., Sabia, C., Manicardi, G., Anacarso, I. and Bondi, M. (2008) Anti-listerial activity of polymeric film coated with hybrid coating doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *Int. J. Food Microbiol.* 123, 281-287.
- Iulietto, M.F., Sechi, P., Borbogni, E., Cenci- Goga, B.T. (2015) Meat spoilage: a critical review of a neglected alteration due to ropy slime producing bacteria. *Ital. J. Anim. Sci.* 14, 316-326.
- Kanatt, S.R., Chander, R. and Sharma, A. (2008) Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chem.* 107, 845-852.
- Knipe, C.L. (2004a) Sausages, Types of/Emulsion. In Jensen, W.K., Devine, C. and Dikeman, M. (Eds), *Encyclopedia of Meat Sciences*, Elsevier, pp. 1216-1220.
- Knipe, C.L. (2004b) Sausages, Types of/Cooked. In Jensen, W.K., Devine, C. and Dikeman, M. (Eds), *Encyclopedia of Meat Sciences*, Elsevier, pp. 1220-1224.
- Koort, J., Vandamme, P., Schillinger, U., Holzapfel, W. and Björkroth, J. (2004) *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* is a later synonym of *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1621-1626.
- Korkeala, H., Alanko, T. and Tiusanen, T. (1992) Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Vet. Scand.* 33(1), 27-32.
- Korkeala, H.J. and Björkroth, K.J. (1997) Microbiological spoilage and contamination of vacuum-packaged cooked sausages: a review. *J. Food Prot.* 60(6), 724-731.
- Kotzekidou, P. and Bloukas, J.G. (1996) Effect of protective cultures and packaging film permeability on shelf-life of sliced vacuum-packed cooked ham. *Meat Sci.* 42(3), 333-345.
- Kotzekidou, P. and Bloukas, J.G. (1998) Microbial and sensory changes in vacuum-packed frankfurter-type sausage by *Lactobacillus alimentarius* and fate of inoculated *Salmonella enteritidis*. *Food Microbiol.* 15(1), 101-111.

- Limsowtin, G.K.Y., Broome, M.C. and Powell, I.B. (2002) Lactic acid bacteria, taxonomy. In Roginski, H., Fuquay, J.W. and Fox, P.F. (Eds), *Encyclopedia of dairy science*, 1st edn., Elsevier Ltd, Vol. 3, pp. 1470-1478.
- Lingbeck, J.M., Cordero, P., O' Bryan, C.A., Johnson, M.G., Ricke, S.C. and Crandall, P.G. (2014) Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Sci.* 97(2), 197-206.
- Liu, G., Wang, Y., Gui, M., Zheng, H., Dai, R. and Li, P. (2012) Combined effect of high hydrostatic pressure and enterocin LM-2 on the refrigerated shelf-life of ready-to-eat sliced vacuum-packed cooked ham. *Food Control*, 24, 64-71.
- Mani-López , E., García, H.S., López-Malo, A. (2012) Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. *Food Research Int.* 45, 713-721.
- Nguyen, V. T., Gidley, M.J. and Dykes, G.A. (2008) Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiol.* 25, 471-478.
- Nowak, A. and Krysiak, E. (2005) Predominant microflora of vacuum-packed Frankfurters. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 55 (14), 91-94.
- Oliveira, T.L.C, de Castro Leite Junior, B.R., Ramos, A.L.S., Ramos. E.M., Piccoli, R.H. and Cristianini, M. (2015) Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum- packed turkey breast ham. *Food Sci. Techn.* 64, 1297-1308.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Begin, A. and Holley, R. (2000) Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 139-148.
- Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcuş, V., Olah, N.K. and Mathe, E. (2018) An overview of antimicrobials role in food. *Europ. J. Medic. Chem.* 143, 922-935.
- Pot, B., Felis, G.E., De Bruyne, K., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., Leisner, J. and Vandamme, P. (2014) The genus *Lactobacillus*. In Holzappel, W.H and Wood, B.J.B (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 1st edn, Wiley & Sons Ltd, pp. 249-353.
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Bjorkroth, J. and Ercolini, D. (2015) Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Sci.* 109, 66-74.
- Pothakos, V., Snauwaert, C., De Vos, P. and Huys, G. (2014) Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at

- the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. *Food Microbiol.* 39, 61-67.
- Rahkila, R., De Bruyne, K., Johansson, P., Vandamme, P. and Bjorkroth, J. (2014) Reclassification of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* comb. nov., description of *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* subsp. nov., designation of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gelidum* subsp. nov. and emended description of *Leuconostoc gelidum*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 64, 1290-1295.
- Realini, C.E. and Marcos, B. (2014) Active and intelligent packaging systems for a modern society. *Meat Sci.* 98, 404-419.
- Rementzis, J. and Samelis, J. (1996) Rapid GC analysis of cellular fatty acids for characterizing *Lactobacillus sake* and *Lact. curvatus* strains of meat origin. *Letters in Applied Microbiology* 23, 379-384.
- Sagoo, S., Board, R. and Roller, S. (2002) Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food Microbiol.* 19, 175-182.
- Salveti, E., Torriani, S. and Felis, G.E. (2012) The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics & Antimicrob. Proteins* 4(4), 217-226.
- Samelis, J. (2006) Managing microbial spoilage in the meat industry. In C. de W. Blackburn (Ed), *Food Spoilage Microorganisms*, CRP Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK pp. 230-237, 252-257.
- Samelis, J. and Georgiadou, K.G. (2000) The microbial association of Greek tavern sausage stored at 4 and 10⁰C in air, vacuum or 100% carbon dioxide, and its spoilage potential. *J. Appl. Microbiol.* 88, 58-68.
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A and Smith, G.C. (2002b) Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of Frankfurters at 4⁰C in vacuum packages. *J. Food Protect.* 65 (2), 299-307.
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A. and Smith, G.C. (2005) Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4⁰C in vacuum packages. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 38, 21-28.
- Samelis, J., Kakouri, A. and Rementzis, J. (2000a) Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4⁰C. *Food Microbiol.* 17, 329-340.

- Samelis, J., Kakouri, A. and Rementzis, J. (2000b) The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 133-143.
- Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K.G. and Metaxopoulos, J. (1998a) Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *J. Appl. Microbiol.* 84, 649-660.
- Samelis, J., Maurogenakis, F. and Metaxopoulos, J. (1994) Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 179-196.
- Samelis, J., Sofos, J.N., Kain, L.M, Scanga, J.A., Belk, K.E. and Smith, G.C. (2001) Organic acids and their salts as dipping solutions to control *Listeria monocytogenes* inoculated following processing of sliced pork bologna stored at 4⁰C in vacuum packages. *J. Food Prot.* 64(11), 1722-1729.
- Samelis, J., Tsakalidou, E., Metaxopoulos, J. and Kalantzopoulos, G. (1995) Differentiation of *Lactobacillus sake* and *Lact. curvatus* from naturally fermented Greek dry salami by SDS-PAGE electrophoresis of whole-cell proteins. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 157-163.
- Shaw, B.G. and Harding, C.D. (1989) *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill- stored meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 217-223.
- Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Pati, S. and Del Nobile, M.A. (2008) Use of active compounds for prolonging the shelf life of mozzarella cheese. *Int. Dairy J.* 18, 624-630.
- Siragusa, G.R., Cutter, C.N. and Willett, J.L. (1999) Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.* 16, 229-235.
- Slongo, A.P., Rosenthal, A., Camargo, L.M.Q., Deliza, R., Mathias, S.P. and Aragao, G.M.F. (2009) Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *LTW- Food Sci. & Technol.* 42, 303-306.
- Soultos, N., Tzikas, Z., Abraham, A., Georgantelis, D. and Ambrosiadis, I. (2008) Chitosan effects on quality of Greek style fresh pork sausages. *Meat Sci.* 80, 1150-1156.
- Stekelenburg F.K. (2003) Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* in Frankfurter sausage by the addition of potassium lactate and sodium diacetate mixtures. *Food Microbiol.* 20, 133-137.

- Stekelenburg, F.K., Kant-Muermans, M.L.T. (2001) Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 66(3), 197-203.
- Stiles, M.E. and Holzapel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1-29.
- Stratford, M. (1999) Traditional preservatives- organic acids. In Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, P.D. (Eds), *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, New York, pp. 1729-1737.
- Suppakul, P., Miltz, J. Sonneveld, K., and Bigger, S.W. (2003) Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.* 68, 2, 408-420.
- Terjung, N., Holzwarth, S., Loeffler, M., Gibis, M., Herrmann, K., Hinrichs, J. and Weiss, J. (2016) Antimicrobial efficacy of a spice ferment in emulsion type sausages and restructured ham. *Food Control* 59, 139-147.
- Toldra, F. and Reig, M. (2007) Sausages: In Hui, Y. H. (Ed), *Food product manufacturing*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 251-264.
- Torriani, S., van Reenen, C.A., Klein, G., Reuter, G., Dellaglio, F. and Dicks, L.M.T. (1996) *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov., new subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo- Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein et al. 1996, Emended Descriptions), respectively. *Int. J. System. Bacteriol.* 1158-1163.
- Tsakalidou, E., Samelis, J. Metaxopoulos, J. and Kalantzopoulos, G. (1997) Atypical *Leuconostoc*- like *Weissella* strains isolated from meat, sharing low phenotypic relatedness with the so far recognized arginine- negative *Weissella* spp. as revealed by SDS- PAGE of whole cell proteins. *System. Appl. Microbiol.* 20, 659-664.
- Upadhyay, A., Upadhyaya, I, Karumathil, D.P., Yin, H-B., Nair, M. S., Bhattaram, V., Chen, C-H., Flock, G., Mooyottu, S. and Venkitanarayanan, K. (2015) Control of *Listeria monocytogenes* on skinless frankfurters by coating with phytochemicals. *LWT- Food Sci Technol.* 63, pp. 37-42.

- Vandamme, P., De Bruyne, K. and Pot, B. (2014) Phylogenetics and systematics. In Holzapfel, W.H and Wood, B.J.B (Eds), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 1st edn, Wiley & Sons Ltd, pp. 31-44.
- Vasilopoulos, C., De Vuyst, L. and Leroy, F. (2015) Shelf-life reduction as an emerging problem in cooked hams underlines the need for improved preservation strategies. *Crit. Rev. Food Sci. & Nutrition* 55, 1425-1443.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J. (2004) Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 149-164.
- Ye, M., Neetoo, H. and Chen, H. (2008) Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiol.* 25, 260-268.
- Yuste, J., Pla, R., Capellas, M., Ponce, E. and Mor-Mur, M. (2000) High-pressure processing applied to cooked sausages: bacterial populations during chilled storage. *J. Food Prot.* 63(8), 1093-1099.
- Zivanovic, S., Chi, S. and Draughon, A.F. (2005) Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *J. Food Sci.* 70(1), M45-M51.
- Zurero-Cosano, G., Rincon-Leon, F., Moreno-Rojas, R. and Pozo-Lora, R. (1988) Microbial growth in vacuum packaged frankfurters produced in Spain. *Food Microbiol.* 5, 213-218.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

www.gcs1.gr/media/trofima/91-iss1n.pdf.