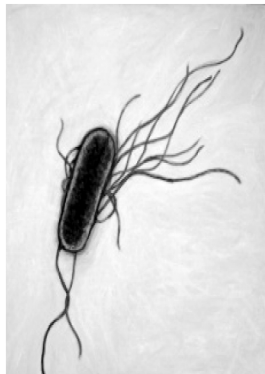




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**«Μελέτη της Επίδρασης Συσκευασίας και  
Φυσικών Αντιμικροβιακών Παραγόντων  
στην Ποιότητα και Υγιεινή Παραδοσιακών  
Ελληνικών Προϊόντων – Τροφίμων»**



**Μαρία Ι. Τσιράκη**  
Γεωπόνος, M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2013



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών  
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των  
γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2



**Ημερομηνία αίτησης της Μαρίας Ι. Τσιράκη, Γεωπόνου, Μ.Δ.Ε :** 18-01-2010

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:**

773<sup>A</sup>/ 22-01-2010

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής**

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

Μέλη: · Κυριάκος Ρηγανάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας,  
Παν/μίου Ιωαννίνων

· Ιωάννης Αρβανιτογιάννης, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας  
και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Παν/μίου Θεσσαλίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 10-06-2011

**Θέμα: «Μελέτη της Επίδρασης Συσκευασίας και Φυσικών Αντιμικροβιακών  
Παραγόντων στην Ποιότητα και Υγιεινή Παραδοσιακών Ελληνικών  
Προϊόντων-Τροφίμων»**

**Ορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ. :** 865<sup>A</sup>/05-04-2013

1. Ιωάννης Σαββαΐδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Κυριάκος Ρηγανάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Ιωάννης Αρβανιτογιάννης, Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Παν/μίου Θεσσαλίας
4. Μαρία Τασιούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Αθανάσιος Βλεσσίδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Κωνσταντίνος Σταλίκας, Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Μάμαντος Προδρομίδης, Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας, Παν/μίου Ιωαννίνων

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα, 10» στις 25/10/2013**





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Ημερομηνία: 25-10-2013

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 45110

Τηλ. +3026510 08343

Fax. +3026510 08795

E-mail: isavvaidd@uoi.gr

## ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ

### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΤΣΙΡΑΚΗ ΜΑΡΙΑΣ

Σήμερα Παρασκευή 25/10/2012 και ώρα 14:00 στην αίθουσα Χ2-094 του Τμήματος Χημείας συνεδρίασε η επταμελής Εξεταστική Επιτροπή που ορίστηκε με απόφαση της Γ.Σ. του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Αρ. Συν. 1462/11-04-2013) αποτελούμενη από τους:

1. Ι. Σαββαΐδη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων (Επιβλέπων),
2. Ι. Αρβανιτογιάννη, Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Παν/μίου Θεσσαλίας (μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής),
3. Κ.Α. Ρηγανάκο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων (μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής),
4. Αθ. Βλεσσίδα, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων,
5. Μ. Προδρομίδα, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων,
6. Κ. Σταλικά, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων, και
7. Μ. Τασιούλα, Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Παν/μίου Ιωαννίνων,

Ενώπιον της παραπάνω επιτροπής η υποψήφια διδάκτωρ κ. Τσιράκη κάτοχος Μ.Δ.Ε. στην Χημεία και Τεχνολογία Τροφίμων, υποστήριξε την Διδακτορική της Διατριβή με τίτλο: **“Μελέτη της Επίδρασης Συσκευασίας και Φυσικών Αντιμικροβιακών Παραγόντων στην Ποιότητα και Υγιεινή Παραδοσιακών Ελληνικών Προϊόντων Τροφίμων”**, και δέχτηκε ερωτήσεις από το ακροατήριο και την επταμελή εξεταστική επιτροπή. Στη συνέχεια και αφού αποχώρησε το ακροατήριο, η επταμελής εξεταστική επιτροπή, κατόπιν συζήτησης, έκρινε ότι η Διδακτορική Διατριβή της κ. Μαρίας Τσιράκη είναι πρωτότυπη και αποτελεί συμβολή στην επιστήμη και αποφάσισε ομόφωνα την έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό ΑΡΙΣΤΑ.

**Η Εξεταστική Επιτροπή:**





1. Ι. Σαββαΐδης,  
Επιβλέπων της Διδακτορικής Διατριβής,



2. Κ.Α. Ρηγανάκος,  
Μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,



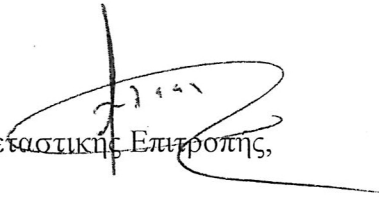
3. Ι. Αρβανιτογιάννης,  
Μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,



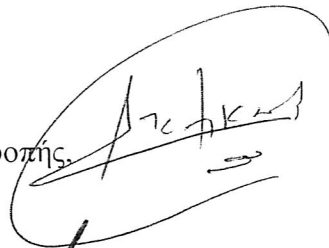
4. Μ. Τασιούλα,  
Μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,




5. Αθ. Βλεσσίδης  
Μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,



6. Κ. Σταλίκας,  
Μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής,



7. Μ. Προδρομίδης,  
Μέλος της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.



Παρακαλώ για τις δικές σας ενέργειες.

Με τιμή,



Ι. Σαββαΐδης  
Αναπληρωτής Καθηγητής



**Αφιερώνεται στη μάνα μου,  
Αγνή Τσιράκη**



---

## Πρόλογος

---

Η ερευνητική εργασία της παρούσης διδακτορικής διατριβής έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Χημείας-Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε υπό την εποπτεία και καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή Μικροβιολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Ιωάννη Σαββαΐδη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος της εργασίας, την πολύτιμη συμβουλευτική του υποστήριξη και τη συνεχή καθοδήγησή του σε όλο το διάστημα της ερευνητικής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα δύο μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Κυριάκο Ρηγανάκο και τον κ. Ιωάννη Αρβανιτογιάννη, Καθηγητή του Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την άρτια επιστημονική τους συμμετοχή και την πολύτιμη συμβουλευτική υποστήριξη κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαρία Τασιούλα Επίκουρη Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Αθανάσιο Βλεσσίδα Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, τον κ. Κωνσταντίνο Σταλικά Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και τον κ. Μάμαντο Προδρομίδα Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τις επιστημονικές συμβουλές και το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη της παρούσης διατριβής.

Ευχαριστώ επίσης τους υποψήφιους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Χημείας-Τεχνολογίας Τροφίμων για το κλίμα συνεργασίας που επικράτησε κατά την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων της διδακτορικής μου διατριβής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Γιάννη και Αγνή, για τη συνεχή ηθική και οικονομική στήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της διδακτορικής μου διατριβής. Ευχαριστώ ακόμη τα αδέρφια μου, Νίκο και Μαρίνα, για την συνεχή συμπαράσταση τους σε κάθε σημαντικό εγχείρημα της ζωής μου. Τέλος,

xiv

ευχαριστώ τους φίλους μου που με στήριξαν ψυχολογικά σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα σχετικά με την εκπόνηση των πειραμάτων και της συγγραφής της διδακτορικής μου διατριβής.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1**.....1

### **Θεωρητικό Μέρος και Σκοπός της Εργασίας**

1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2. Παραδοσιακό Φύλλο.....	6
1.2.1. Το αλεύρι και τα συστατικά του.....	10
1.2.2. Τα κύρια συστατικά του ζυμαριού.....	14
1.2.3. Ο ρόλος της επεξεργασίας του ζυμαριού.....	18
1.2.4. Μικροχλωρίδα των προϊόντων αρτοποιίας.....	19
1.3. Τζατζίκι.....	21
1.3.1. Τα κύρια συστατικά στο τζατζίκι.....	25
1.3.2. Αντιμικροβιακές ιδιότητες των συστατικών του τζατζικιού.....	32
1.3.3. Μικροχλωρίδα της παραδοσιακής σαλάτας τζατζίκι.....	34
1.4. Συσκευασία.....	36
1.4.1. Συσκευασία υπό κενό.....	38
1.4.2. Ενεργός συσκευασία.....	40
1.5. Ψύξη.....	45
1.6. Συντηρητικές Ουσίες Τροφίμων.....	50
1.6.1. Ναταμυκίνη.....	53
1.6.2. Χιτοζάνη.....	58
1.6.3. Εκχύλισμα Εσπεριδοειδών (Citrox).....	63
1.7. Παθογόνοι Μικροοργανισμοί.....	67
1.7.1. <i>Salmonella enterica</i> .....	69

1.7.2. <i>Listeria spp.</i> .....	73
1.7.3. <i>Escherichia coli (O157:H7)</i> .....	77
1.7.4. <i>Bacillus cereus</i> .....	80
1.8. Οργανοληπτική Εξέταση Τροφίμων .....	83
1.9. Σκοπός της Εργασίας .....	86

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2** .....

### **Μελέτη της Επίδρασης της Συσκευασίας και Φυσικών Αντιμικροβιακών Παραγόντων στα Ποιοτικά Χαρακτηριστικά του Χωριάτικου- Παραδοσιακού Φύλλου για Πίτα υπό ψύξη**

2.1. Σκοπός των Πειραμάτων .....	89
2.2. Υλικά και Μέθοδοι .....	89
2.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων .....	89
2.2.2. Μικροβιολογική ανάλυση .....	93
2.2.3. Προσδιορισμός του pH .....	94
2.2.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση .....	95
2.2.5. Στατιστική επεξεργασία .....	95
2.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	96
2.3.1. Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στο φύλλο στους 4° C .....	96
2.3.2. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων στο φύλλο στους 4° C .....	103
2.3.3. Μεταβολή του πληθυσμού των Κολοβακτηριοειδών στο φύλλο στους 4° C .....	107
2.3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντερόκοκκων στο φύλλο στους 4° C .....	112
2.3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των Οξυγαλακτικών Βακτηρίων στο φύλλο στους 4° C .....	113
2.3.6. Μεταβολή του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο φύλλο στους 4° C .....	117



2.3.7.	Μεταβολή του πληθυσμού των Ψυχρότροφων Βακτηρίων στο φύλλο στους 4° C.....	122
2.3.8.	Προσδιορισμός του pH στο φύλλο στους 4° C.....	126
2.3.9.	Οργανοληπτική Εξέταση και χρόνος ζωής του φύλλου στους 4° C.....	129
2.4.	Συμπεράσματα .....	135

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3** .....

**Πορεία Ανάπτυξης/Επιβίωσης της *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*,  
*Escherihia coli* 0157:H7 και *Bacillus cereus* στο Χωριάτικο-  
Παραδοσιακό Φύλλο για Πίτα, με ή χωρίς την Προσθήκη  
Χιτοζάνης, υπό κενό και υπό ψύξη (4° C)**

3.1.	Σκοπός των Πειραμάτων .....	139
3.2.	Υλικά και Μέθοδοι .....	139
3.2.1.	Καλλιέργειες των παθογόνων βακτηρίων .....	139
3.2.2.	Προετοιμασία των δειγμάτων .....	141
3.2.3.	Μικροβιολογική ανάλυση .....	146
3.2.4.	Στατιστική επεξεργασία .....	147
3.3.	Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	147
3.3.1.	Επιβίωση της <i>Listeria spp.</i> στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C.....	147
3.3.2.	Επιβίωση της <i>Escherihia coli</i> 0157H7 στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C.....	153
3.3.3.	Επιβίωση της <i>Salmonella enterica</i> στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C.....	158
3.3.4.	Επιβίωση του <i>Bacillus cereus</i> στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C.....	163
3.4.	Συμπεράσματα .....	169

**Μελέτη της Επίδρασης της Συσκευασίας και Φυσικών  
Αντιμικροβιακών Παραγόντων (Citrox και Ναταμυκίνης)  
στα Ποιοτικά Χαρακτηριστικά της Παραδοσιακής Ελληνικής  
Σαλάτας «Τζατζίκι» συντηρημένης υπό Ψύξη (4° C)**

4.1. Σκοπός των Πειραμάτων .....	171
4.2. Υλικά και Μέθοδοι .....	171
4.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων .....	171
4.2.2. Μικροβιολογική ανάλυση .....	174
4.2.3. Προσδιορισμός του pH .....	175
4.2.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση .....	175
4.2.5. Στατιστική επεξεργασία .....	176
4.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	176
4.3.1. Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στο τζατζίκι στους 4° C .....	176
4.3.2. Μεταβολή του πληθυσμού των Οξυγαλακτικών Βακτηρίων στο τζατζίκι στους 4° C .....	181
4.3.3. Μεταβολή του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο τζατζίκι στους 4° C .....	186
4.3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των Ψευδομονάδων στο τζατζίκι στους 4° C .....	193
4.3.5. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων στο τζατζίκι στους 4° C .....	196
4.3.6. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντερόκοκκων στο τζατζίκι στους 4° C .....	200
4.3.7. Προσδιορισμός του pH στο τζατζίκι στους 4° C .....	201
4.3.8. Οργανοληπτική Εξέταση και προσδιορισμός του χρόνου ζωής του προϊόντος στους 4° C .....	204
4.3.9. Προσδιορισμός χρόνου ζωής τζατζικιού υπό συσκευασία κενού, διατηρημένου στους 10° C .....	212
4.4. Συμπεράσματα .....	215

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5** ..... 219
**Πορεία Ανάπτυξης/Επιβίωσης της *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*,  
*Escherihia coli* 0157: H7 και *Bacillus cereus* στο Τζατζίκι, με ή χωρίς την  
 Προσθήκη Διαλύματος CitroX, διατηρημένο στους 4° C και 10° C  
 και σε θρεπτικό ζωμό (37° C)**

5.1. Σκοπός των Πειραμάτων .....	219
5.2. Υλικά και Μέθοδοι .....	219
5.2.1. Καλλιέργειες των παθογόνων βακτηρίων .....	219
5.2.2. Προετοιμασία των δειγμάτων .....	220
5.2.3. Μικροβιολογική ανάλυση .....	227
5.2.4. Στατιστική επεξεργασία .....	227
5.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση .....	228
5.3.1. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του CitroX έναντι της Επιβίωσης παθογόνων βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης .....	228
5.3.2. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της <i>Listeria spp.</i> σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος CitroX, διατηρημένο στους 4° C και 10° C .....	229
5.3.3. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του <i>Bacillus cereus</i> σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος CitroX, διατηρημένο στους 4° C και 10° C .....	235
5.3.4. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της <i>Salmonella enterica</i> σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος CitroX, διατηρημένο στους 4° C και 10° C .....	240
5.3.5. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της <i>Escherihia coli</i> 0157:H7 σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος CitroX, συντηρημένο στους 4° C και 10° C .....	246
5.3.6. Πορεία ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος CitroX, διατηρημένο στους 4° C και 10° C .....	252
5.4. Συμπεράσματα .....	254

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6** .....257**Γενικά Συμπεράσματα και Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής**

6.1. Γενικά Συμπεράσματα .....257

6.2. Περίληψη .....259

6.2. Abstract .....262

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** .....265

# ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

- A:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- AO:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- V:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- AC:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).
- AOC:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).
- VC:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).
- AN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- AON:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- VN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- ACN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ναταμυκίνης (20 ppm).
- AOCN:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) ναταμυκίνης (20 ppm).
- VCN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ναταμυκίνης (20 ppm).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

- L1 :** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

- LC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.
- L2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- LC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.
- E1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- EC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό.
- E2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- EC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό.
- S1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- SC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.

- S2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- SC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.
- B1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- BC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.
- B2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- BC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OL1 :** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OLC1:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OL2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OLC2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.

- OE1:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli* O157:H7 συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OEC1:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό.
- OE2:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli* O157:H7 συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OEC2:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό.
- OS1:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OSC1:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OS2:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OSC2:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OB1:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OBC1:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.



**OB2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

**OBC2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**

**AT:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας).

**VT:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

**ATK:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).

**VTK:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).

**ATN:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).

**VTN:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).

**ATKN:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm) και CitroX (2ml/kg).

**VTKN:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm) και CitroX (2ml/kg).

Επίσης στο παρόν Κεφάλαιο χρησιμοποιούνται οι εξής συντομογραφίες:

**VF:** Εκτίμηση της γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

**VKF:** Εκτίμηση της γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).

**VO:** Εκτίμηση της οσμής σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

**VKO:** Εκτίμηση της οσμής σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).

**MOV:** Μέσος όρος οσμής και γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

**MOVK:** Μέσος όρος οσμής και γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX(2ml/kg).

- OV10:** Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OVK10:** Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη Citrox (2ml/kg).
- ZV10:** Ζύμες και Μύκητες σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- ZVK10:** Ζύμες και Μύκητες σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη Citrox (2ml/kg).
- MV10:** Γαλακτικά Βακτήρια σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- MVK10:** Γαλακτικά Βακτήρια σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη Citrox (2ml/kg).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

- L:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria monocytogenes*, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- LK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria monocytogenes*, με την προσθήκη Citrox (2‰ v/v).
- B:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Bacillus cereus*, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- BK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Bacillus cereus*, με την προσθήκη Citrox (2‰ v/v).
- S:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Salmonella enterica*, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- SK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Salmonella enterica*, με την προσθήκη Citrox (2‰ v/v).

- E:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Escherichia coli* O157:H7 σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Escherichia coli* O157:H7, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- EK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Escherichia coli* O157:H7 σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Escherichia coli* O157:H7, με την προσθήκη Citrox (2‰ v/v).
- L4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- LK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- L10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- LK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.
- E4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- EK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- E10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- EK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.

- S4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- SK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- S10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- SK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- B4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- BK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- B10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- BK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- OL4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- OLK4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.

- OL10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- OLK10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- OE4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- OEK4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- OE10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- OEK10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- OS4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- OSK4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- OS10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- OSK10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.

- OB4:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- OBK4:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- OB10:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- OBK10:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.
- ML4 :** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- MLK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- ML10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- MLK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *L. monocytogenes*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.
- ME4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- MEK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.

- ME10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- MEK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- MS4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- MSK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- MS10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ενοφθαλμισμένο τζατζίκι με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- MSK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2g/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- MB4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- MBK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- MB10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- MBK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:**

### **Θεωρητικό Μέρος και Σκοπός της Εργασίας**

---

#### **1.1. Εισαγωγή**

---

Η παγκόσμια παραδοχή της Μεσογειακής δίαιτας ως πρότυπου υγιεινής διατροφής, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα παραδοσιακά Ελληνικά τρόφιμα είναι ιδιαίτερα ελκυστικά από άποψη οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, δημιουργεί ευοίωνες προοπτικές για τις παραγωγικές και εξαγωγικές δραστηριότητες του εγχώριου κλάδου των τροφίμων και ποτών. Τα παραδοσιακά προϊόντα συνδέονται με την ιστορία και τα έθιμα ενός τόπου. Η προστασία και η ανάδειξη των παραδοσιακών προϊόντων συμβάλλει αφενός στην ανάπτυξη της τοπικής οικονομίας και αφετέρου στην διατήρηση της ταυτότητας της περιοχής. Παραδοσιακά Τρόφιμα είναι: τρόφιμα προστατευμένης προέλευσης ή ονομασίας, ωμά τρόφιμα (εθνικά ή τοπικά προϊόντα) ή τρόφιμα μαγειρεμένα σύμφωνα με συγκεκριμένη συνταγή (συνταγή γνωστή για πολλά χρόνια και/ή με συγκεκριμένη τεχνογνωσία). Δηλαδή τα παραδοσιακά προϊόντα ή τρόφιμα πρέπει: να παράγονται από παραδοσιακές πρώτες ύλες και να παρουσιάζουν παραδοσιακή σύσταση και παραδοσιακό τρόπο παραγωγής ή/και μεταποίησης (KAN. (ΕΚ) 2082/92). Η τυποποίηση των παραδοσιακών τροφίμων, πραγματοποιείται ώστε τα προϊόντα αυτά να παρουσιάζουν σταθερά «υψηλή» ποιότητα και να προσαρμόζονται με τις σύγχρονες αντιλήψεις περί ορθών και ασφαλών πρακτικών στην παραγωγή τροφίμων. Δηλαδή, απαιτείται συστηματική μελέτη των παραδοσιακών ελληνικών τροφίμων, με στόχο:

την ανάδειξη της διατροφικής τους αξίας και την τυποποίηση και εκβιομηχάνιση της παραγωγής τους, σύμφωνα με τις σύγχρονες νομοθετικές και καταναλωτικές απαιτήσεις (Πρακτικά Ημερίδας Ελληνικά Παραδοσιακά Τρόφιμα, 2007). Στα Ελληνικά Παραδοσιακά Τρόφιμα εντάσσεται μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων, δημοφιλή στον σύγχρονο καταναλωτή, μεταξύ των οποίων και το παραδοσιακό φύλλο για πίτα και το τζατζίκι, μια παραδοσιακή σαλάτα με βάση το γιαούρτι.

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '70, η παραγωγή των προϊόντων ζύμης γινόταν εμπειρικά, σε μικρές βιοτεχνικές μονάδες με χειροκίνητο ή ημιαυτόματο εξοπλισμό. Κατά τις αρχές της δεκαετίας του '80 εμφανίστηκαν οι πρώτες οργανωμένες βιοτεχνικές και βιομηχανικές μονάδες, με πλήρως αυτοματοποιημένες γραμμές παραγωγής και ελεγχόμενες συνθήκες επεξεργασίας. Σήμερα, ο μεγάλος όγκος της παραγωγής καλύπτεται από βιομηχανίες με υψηλό επίπεδο οργάνωσης και τεχνογνωσίας. Έτσι, το ενδιαφέρον των βιομηχανιών για τις εξελίξεις της τεχνολογίας και την ενσωμάτωση νέων στοιχείων και καινοτομιών από την εφαρμοσμένη έρευνα στην παραγωγή, εμφανίζεται σήμερα να είναι ιδιαίτερα αυξημένο (Cauvain, 2000).



(α)



(β)

**Εικόνα 1:** (α) Παραδοσιακό φύλλο για πίτα και (β) Παραδοσιακή ελληνική πίτα

Στην Ελλάδα υπάρχει παράδοση χρόνων που θέλει η μάνα να μαθαίνει την κόρη να φτιάχνει σπιτική παραδοσιακή πίτα, δηλαδή ανάμεσα από πολλές στρώσεις από παραδοσιακά φύλλα να μπαίνει η γέμιση και τελικά να προκύπτει ένα ιδιαίτερης γεύσης παραδοσιακό, γευστικό snack, με βάση το κρέας, τυρί ή χορταρικά. “Πίτα” ονομάζεται ένα ψητό φαγητό το οποίο παρασκευάζεται συνήθως από ένα ή περισσότερα φύλλα ζύμης που καλύπτουν πλήρως (εσωκλείουν) μια γλυκιά ή

αλμυρή γέμιση (<http://en.wikipedia.org/wiki/Pie>). Μάλιστα οι Vasilopoulou και Trichopoulou (2011) αναφέρουν ότι παραδοσιακά τρόφιμα, όπως οι πίτες με χόρτα, είναι ιδιαίτερα πλούσια σε φλαβονοειδή, που κάνει αυτό το συγκεκριμένο φαγητό της παραδοσιακής Ελληνικής διατροφής ένα υγιές, θρεπτικό και νόστιμο σνακ. Στην Ελλάδα από την δεκαετία του '90 άρχισε η βιομηχανοποίηση της παραγωγής πίτας και κατ' επέκταση του παραδοσιακού φύλλου για πίτα. Κυκλοφορούν στην αγορά, από διάφορες εταιρείες, κατεψυγμένα ή νωπά φύλλα για πίτα και πίτες (έτοιμες για ψήσιμο) όλων των ειδών (τυρόπιτα, σπανακόπιτα, κοτόπιτα κτλ.). Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον των βιομηχανιών τυποποίησης στράφηκε στο νωπό φύλλο για πίτα (δηλ. αυτό που συντηρείται σε θερμοκρασία ψύξης).

Ένα άλλο διαδεδομένο Ελληνικό παραδοσιακό τρόφιμο, ευρείας κατανάλωσης, είναι το τζατζίκι (μια σαλάτα με βάση το γιαούρτι). Οι πωλήσεις στις παραδοσιακές σαλάτες έχουν αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, τόσο στην Ευρώπη όσο και στις ΗΠΑ. Η παραγωγή τους βασίζεται σε μια ποικιλία συνταγών. Αποτελούνται συνήθως από μια βάση (από μαγιονέζα, άμυλο, γιαούρτι, τυρί κλπ.) και μέσα σ' αυτήν περιέχονται μικρά κομμάτια ζωικής ή φυτικής προέλευσης (π.χ. πατάτα, κρέας, ψάρι κτλ.). Η διάρκεια ζωής και η ασφάλεια των προϊόντων αυτών βασίζεται κυρίως στην υψηλή οξύτητά τους και στα χημικά συντηρητικά, τα οποία προστίθενται για να αποτρέψουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αλλοίωσης και των παθογόνων μικροοργανισμών, αν και θεωρούνται ανεπιθύμητα από τους καταναλωτές που αναζητούν τρόφιμα με λιγότερα πρόσθετα. Από άποψη μάρκετινγκ, τα προϊόντα αυτά φαίνεται να είναι πιο ελκυστικά για τους καταναλωτές όταν έχουν την εικόνα μιας «σπιτικής» σαλάτας (Tassou et al., 2009). Το τζατζίκι είναι ίσως η πιο χαρακτηριστική παραδοσιακή Ελληνική σαλάτα με υψηλή θρεπτική αξία, αφού αποτελείται από στραγγιστό γιαούρτι (συνήθως από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα) που αναμειγνύεται με αγγουράκι, σκόρδο και ελαιόλαδο. Μάλιστα στη χώρα μας είναι σύνηθες το φαινόμενο σε κάθε σπίτι να παρασκευάζει η νοικοκυρά το δικό της σπιτικό τζατζίκι, αφού υπάρχει συχνά στο τραπέζι του Έλληνα, ως ένα ιδιαίτερα θρεπτικό και γευστικό συνοδευτικό πολλών φαγητών.

Σήμερα τα τυποποιημένα τρόφιμα ή προϊόντα τροφίμων είναι συσκευασμένα. Στις μέρες μας η συσκευασία των τροφίμων παίζει καθοριστικό ρόλο στην

συντήρηση των τροφίμων. Η πρώτη συσκευασία τροφίμων ήταν το απλό κλείσιμο των τροφίμων μέσα σε σακούλες ή δοχεία (συσκευασία αέρα). Μετά το 2<sup>ο</sup> Παγκόσμιο Πόλεμο σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές στη συσκευασία τροφίμων αφού τα μικρά μαγαζιά και οι λιανοπωλητές των τροφίμων αντικαταστάθηκαν κατά μείζονα λόγο από τα σουπερμάρκετ. Η διακίνηση μεγάλων ποσοτήτων τροφίμων από τα σουπερμάρκετ σε συνδυασμό με τις διαρκώς αυξανόμενες απαιτήσεις του καταναλωτή για πιο ασφαλή και υγιεινά τρόφιμα ήταν τα κυριότερα κίνητρα για την επινόηση μεθόδων που αποσκοπούν στην παράταση της διάρκειας ζωής των φρέσκων τροφίμων ή/και προϊόντων. Στα πλαίσια αυτά προτάθηκε η εισαγωγή της συσκευασίας υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Η πρώτη μορφή συσκευασίας υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα που εφαρμόστηκε και χρησιμοποιείται ευρέως ακόμη και σήμερα σε πολλές εφαρμογές, είναι η συσκευασία υπό κενό. Αντενδείκνυται η χρήση της για μαλακά προϊόντα, αφού το κενό προκαλεί μη αναστρέψιμη παραμόρφωση του προϊόντος. Η συσκευασία υπό κενό γίνεται με χρήση μεμβράνης χαμηλής διαπερατότητας σε οξυγόνο. Κάτω από ικανοποιητικό κενό η ποσότητα του οξυγόνου ελαττώνεται σε τιμές <1% (Αρβανιτογιάννης και Μποσνέα, 2001). Αντίθετα, η ενεργός συσκευασία των τροφίμων είναι από τους πλέον δυναμικούς τομείς της συσκευασίας με αλματώδη εξέλιξη τα τελευταία χρόνια (Μπλούκας, 2004). Ένα είδος ενεργούς συσκευασίας είναι αυτή με απορροφητή οξυγόνου. Ένας απορροφητής οξυγόνου είναι ένα μικρό πακέτο υλικών που χρησιμοποιούνται για να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων. Χρησιμοποιούνται στις συσκευασίες των τροφίμων για την αποφυγή αλλαγής χρώματος των τροφίμων, του ταγγίσματος των ελαίων και λιπών του τροφίμου, καθώς επίσης και της μείωση του οξυγόνου (που χρησιμοποιούν αερόβιοι μικροοργανισμοί όπως οι μύκητες). Τα πλεονεκτήματα της ενεργούς συσκευασίας με απορροφητή οξυγόνου έναντι της συσκευασίας κενού είναι ότι τα προϊόντα δεν συμπιέζονται ή συνθλίβονται, δεδομένου ότι ορισμένα προϊόντα είναι υψηλής αξίας, εύθραυστα, και η απλότητα της χρήσης της. Η ίδια η συσκευασία τροφίμων και η σακούλα/περιέκτης είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματικότητα του απορροφητή οξυγόνου. Ένα μικρό λάθος στη συσκευασία ή διαρροή μπορεί να καταστήσει τον απορροφητή οξυγόνου άχρηστο, αφού το περιεχόμενό του θα οξειδωθεί σε πολύ λίγο χρόνο. Έτσι, χρησιμοποιούνται πάντα υλικά συσκευασίας υψηλού φραγμού στο οξυγόνο και αποτελεσματικές τεχνικές

σφράγισης σακούλας/περιέκτη. Υπάρχουν διάφορα είδη απορροφητών οξυγόνου για να ταιριάζουν με την ενεργότητα του νερού των εκάστοτε τροφίμων. Μερικά είδη απορροφητών οξυγόνου έχουν σχεδιαστεί για να χρησιμοποιηθούν σε ξηρά τρόφιμα, όπως οι ξηροί καρποί, τα αποξηραμένα δημητριακά και σε τροφές με περισσότερη υγρασία, όπως το ψωμί και τα επεξεργασμένα κρέατα. Στα περισσότερα σκευάσματα απορροφητών οξυγόνου η δραστική ουσία είναι σκόνη σιδήρου (Αρβανιτογιάννης και Μπόσνεα, 2001; Μπλούκας, 2004).

Η συσκευασία όμως δεν είναι πάντα αρκετή για την διατήρηση των τυποποιημένων προϊόντων, για το επιθυμητό χρονικό διάστημα και με τα επιθυμητά μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, από τις βιομηχανίες. Έτσι, για να αυξήσουν τον εμπορεύσιμο χρόνο ζωής προϊόντων τους χρησιμοποιούνται ευρέως συντηρητικά και πρόσθετα. Τα πρόσθετα και τα συντηρητικά τροφίμων είναι φυσικά ή συνθετικά χημικά, τα οποία προστίθενται στα τρόφιμα για να παραταθεί η διάρκεια ζωής αυτών ή να βελτιωθεί το χρώμα, η εμφάνισή τους και η ασφάλεια αυτών. Τα τελευταία χρόνια όμως, με την εμφάνιση των έτοιμων φαγητών, έχουν παρουσιαστεί πολλά νέα πρόσθετα και συντηρητικά, τα οποία δεν είναι απολύτως ασφαλή για την υγεία των καταναλωτών. Κάποια από αυτά έχουν θεωρηθεί υπεύθυνα για καρκινογενέσεις, αλλεργίες, άσθμα, ημικρανίες και πολλές ασθένειες ([http://portokalis.blogspot.com/2008/07/blog-post\\_6479.html](http://portokalis.blogspot.com/2008/07/blog-post_6479.html)). Έτσι το ενδιαφέρον των βιομηχανιών τυποποίησης τροφίμων στρέφεται ολοένα και περισσότερο προς τη χρησιμοποίηση 'φυσικών' πρόσθετων στα τρόφιμα. Μεταξύ αυτών των φυσικών προσθέτων είναι η ναταμυκίνη, η χιτοζάνη και το εκχύλισμα εσπεριδοειδών (Citrox). Η ναταμυκίνη είναι μια αντιμυκητιακή ένωση, η οποία είναι εξαιρετικά αποτελεσματική έναντι της ανάπτυξης ζυμών και μυκήτων, ενώ δεν έχει αξιόλογη δράση στα βακτήρια (Αρβανιτογιάννης και Μποσνέα, 2001). Σε αντίθεση τα διαλύματα της χιτοζάνης και το εκχύλισμα εσπεριδοειδών (Citrox) έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση (Devlieghere et al., 2004; Abadias et al., 2011).

Τόσο από την διεθνή βιβλιογραφία, όσο και από τα διαθέσιμα δεδομένα που αφορούν Ελληνικές μελέτες, προκύπτει ότι δεν υπάρχουν μελέτες που αφορούν στην επίδραση της συσκευασίας (υπό αερόβιες συνθήκες, κενό και ενεργό συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου) σε συνδυασμό με φυσικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (ναταμυκίνη και χιτοζάνη), στη συντήρηση και ασφάλεια παραδοσιακού φύλλου για

πίτα. Επίσης, ελάχιστη ή ανύπαρκτη είναι η έρευνα στη διεθνή και Ελληνική βιβλιογραφία για την επίδραση της συσκευασίας (υπό αερόβιες συνθήκες και κενό) σε συνδυασμό με φυσικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (ναταμυκίνη και Citrox), στη συντήρηση και ασφάλεια της παραδοσιακής Ελληνικής σαλάτας «Τζατζίκι». Τέλος, δεν έχει ερευνηθεί η επιβίωση παθογόνων βακτηρίων, όπως *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus* και *Escherihia coli O157:H7*, στα δύο αυτά τρόφιμα, με ή χωρίς την προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών. Συνεπώς προκύπτει από τα παραπάνω ανάγκη για περαιτέρω έρευνα.

---

## 1.2. Παραδοσιακό Φύλλο

---

Φύλλο ονομάζεται η ζύμη από την οποία παράγονται ψημένα προϊόντα. Τα φύλλο παρασκευάζεται από αλεύρι κοινού σίτου, νερό, αλάτι και μερικές φορές φυτικό λίπος (συνήθως ελαιόλαδο ή μαργαρίνη) ή αυγά ή/και ξύδι. Η ζύμη του φύλλου παράγεται λεπτή και χρησιμοποιείται ως βάση για τα ψημένα προϊόντα. Ένα καλό φύλλο είναι λείο και λεπτό, αλλά αρκετά σταθερό για να υποστηρίξει το βάρος της γέμισης. Το ζυμάρι πρέπει να ζυμώνεται τόσο ώστε να είναι αρκετά μαλακό και ελαστικό για να απλώνεται εύκολα και ομοιόμορφα. Όταν το αλεύρι σιταριού ζυμώνεται με την προσθήκη νερού σε ομαλή ζύμη τότε αναπτύσσεται το δίκτυο της γλουτένης, τα οποία είναι αυτά που κάνουν το ψωμί σκληρό και ελαστικό. Σε ένα τυπικό φύλλο, ωστόσο, αυτή η σκληρότητα είναι ανεπιθύμητη, έτσι αποφεύγεται η υπερζύμωση της ζύμης (overmixing), γιατί έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται μεγάλο δίκτυο γλουτένης, με αποτέλεσμα να παράγεται σκληρό φύλλο ή ορισμένες φορές προστίθεται λίπος ή λάδι για να επιβραδύνει την ανάπτυξη της γλουτένης. Τα φύλλα είναι συνήθως πολύ λεπτά (έχουν το πάχος ενός φύλλου χαρτιού) και πολύ τεντωμένα. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε παραδοσιακές πίτες (σπανακόπιτα, τυρόπιτα, κρεατόπιτα κ.α.) και σε γλυκά (π.χ. μπακλαβάς) και τοποθετούνται απλωμένα το ένα πάνω στο άλλο, δημιουργώντας πολλές στρώσεις φύλλων, που τελικά τυλίγονται γύρω από μία γέμιση (σπανάκι, τυρί, κρέας κ.α.). Τα φύλλα αλείφονται με βούτυρο ή ελαιόλαδο πριν μπει η επόμενη στρώση φύλλου, έτσι ώστε

να μην κολλάνε μεταξύ τους. Αυτά τα φύλλα είναι πολύ ευαίσθητα και ειδικά μετά το ψήσιμό τους μπορούν να σπάσουν εύκολα (Ματσούκας, 2003).

**Πίνακας 1 :**  
Η τελική σύσταση του ζυμαριού

Συστατικά	% Σύσταση
Αλεύρι	64
Νερό	34
Αλάτι	2

Η γραμμή παραγωγής του παραδοσιακού φύλλου (η τελική σύσταση του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 1) σε βιομηχανική κλίμακα είναι η εξής (ΧΑΒΕΛΑΣ Α.Ε., 2012):

1. Ανάμιξη συστατικών σε ζυμωτήριο με βραχίονες (25-30 min, 25 rpm). Το αλεύρι πέφτει στον κάδο αναμίξεως από δοσομετρητή των 100 kg που ξαναγεμίζει από την κυψέλη του σιλό (Εικόνα 2). Στη συνέχεια γίνεται η προσθήκη του αλατιού, ανάμιξη. Αμέσως μετά προστίθεται το νερό θερμοκρασίας 2-3 °C με δοσομετρητή. Η θερμοκρασία του βασικού ζυμαριού κατά το τέλος της ανάμιξης είναι 18-20°C.
2. Από τον αναμικτήρα μεταφέρεται το ζυμάρι στον εξωθητή με ανατροπή.
3. Από τον εξωθητή (Εικόνα 3) βγαίνει το ζυμάρι σε φύλλο. Στην έξοδο του εξωθητή υπάρχουν δύο αλευρωτήρες για ελαφρύ αλεύρωμα της επιφάνειας του φύλλου. Ακολουθεί μείωση του πάχους με διαδοχικά περάσματα από έξι ζεύγη κυλίνδρων. Ανάμεσα από δύο κυλίνδρους βρίσκεται ένας αλευρωτήρας. Οι κύλινδροι που χρησιμοποιούνται για τη φυλλοποίηση έχουν διάμετρο 84 mm με ταχύτητα περιστροφής ανάλογη με την ταχύτητα του ιμάντα τροφοδοσίας. Τα διάκενα κατά την φυλλοποίηση μπορούν να ρυθμισθούν σε ένα εύρος από 30,05 mm μέχρι 0,20 mm. Το αρχικό διάκενο συνήθως είναι 21,9 mm και το τελικό διάκενο είναι 0,7 mm. Η ταχύτητα του ιμάντα τροφοδοσίας συνήθως είναι 14,9 m/min και η ταχύτητα του ιμάντα εξόδου είναι πολύ μεγαλύτερη, συνήθως 29,2 m/min.



**Εικόνα 2:** Ζυμωτήριο με βραχίονες



**Εικόνα 3:** Μεταφέρεται το ζυμάρι στον εξωθητή με ανατροπή



**Εικόνα 4:** Η μορφοποίηση του ζυμαριού σε φύλλο





**Εικόνα 5:** Δίπλωμα φύλλου



**Εικόνα 6:** Συσκευασία φύλλου

4. Ακολουθεί κοπή του φύλλου, έτσι ώστε το πλάτος του να είναι ίσο με 40 cm και τα υπολείμματα παραλαμβάνονται σε έναν κάδο και απορρίπτονται (Εικόνα 4).
5. Τελικά το φύλλο που παράγεται έχει πλάτος 40 cm πάχος περίπου 0,7 mm και τυλίγεται σε έναν κύλινδρο με την προσθήκη στην μία επιφάνειά του μιας λεπτής μεμβράνης (συνθετικό πολυμερές).

6. Στη συνέχεια το φύλλο κόβεται χειρονακτικά σε έξι ίσα μέρη μήκους 70 cm και τυλίγεται με μια λαδόκολλα, λίγο φαρδύτερη από το πλάτος του (Εικόνα 5).
7. Τοποθέτηση σε ατομικές συσκευασίες-κλείσιμο (Εικόνα 6).
8. Συντηρείται υπό ψύξη

### **1.2.1. Το αλεύρι και τα συστατικά του**

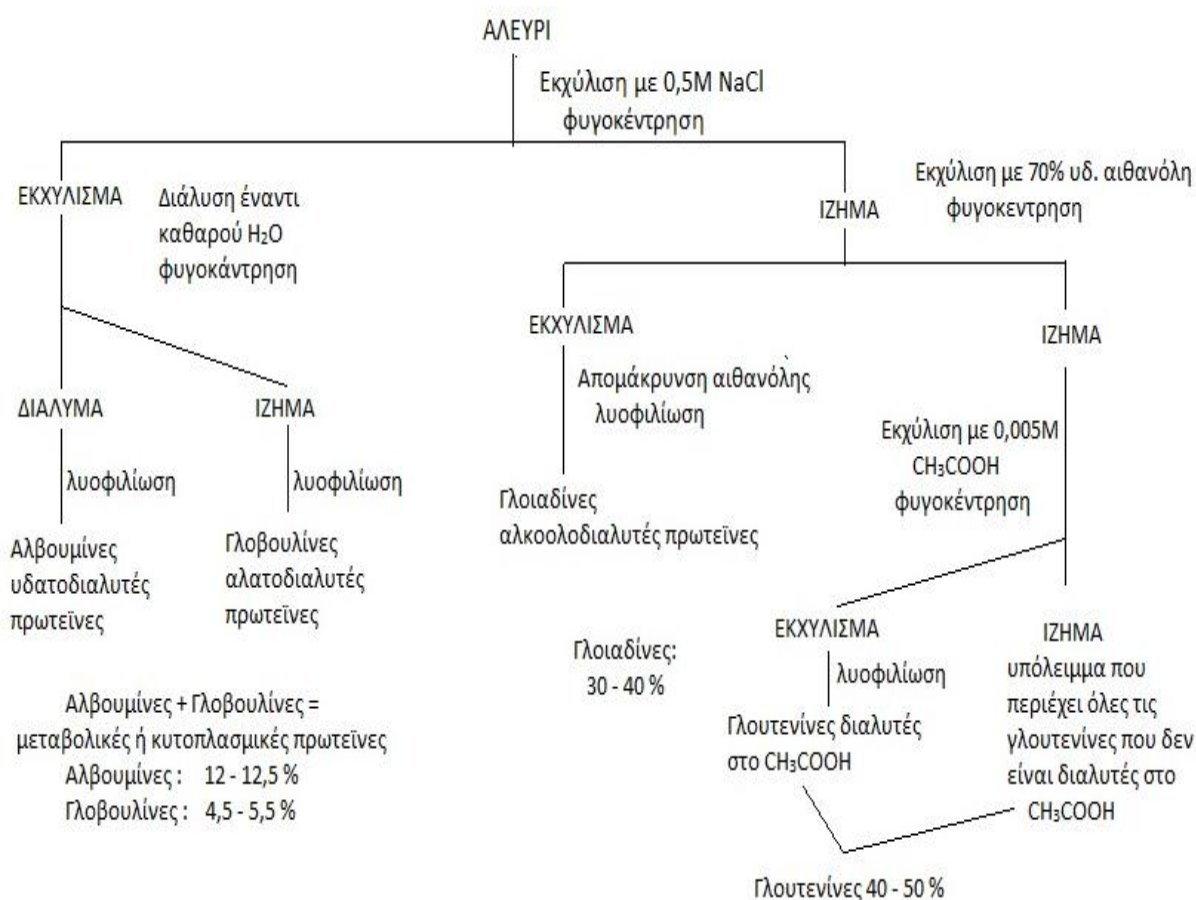
Η άλεση του κοινού σταριού στοχεύει στον αποτελεσματικό διαχωρισμό του ενδοσπερμίου από το πίτυρο που το περιβάλλει, καθώς και από το φύτρο, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η μεγαλύτερη δυνατή απόδοση σε άσπρο αλεύρι με την μικρότερη δυνατή επιμόλυνση από υλικό εκτός ενδοσπερμίου (Ματσούκας, 2003). Αλεύρι ονομάζεται το προϊόν που λαμβάνεται με την άλεση του σιταριού. Η μέση σύσταση του αλεύρου του κοινού σίτου είναι: 11-15% υγρασία, 69% υδατάνθρακες, 13% πρωτεΐνες, 2% λίπος και 0,5 - 2% ανόργανα άλατα (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009; <http://www.livopedia.gr/index.php?title=%CE%91%CE%BB%CE%B5%CF%8D%CF%81%CE%B9>).

Οι πρωτεΐνες του αλεύρου έχουν μελετηθεί συστηματικά. Κατά την πρώτη κλασμάτωση των πρωτεϊνών του αλεύρου λαμβάνονται τέσσερα κλάσματα ανάλογα με τη διαλυτότητά τους. Οι αδιάλυτες πρωτεΐνες είναι οι γλοιαδίνες και γλουτενίνες, που μαζί ονομάζονται γλουτένη, ενώ οι διαλυτές είναι οι αλβουμίνες και οι γλοβουλίνες (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009). Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η κλασμάτωση των πρωτεϊνών του αλεύρου με την τεχνική του Osborn που στηρίζεται στη διαφορετική διαλυτότητα των επί μέρους κλασμάτων σε νερό, αλατούχο διάλυμα (0,5N NaCl), 70% αιθανόλη και 0,05N οξικό οξύ. Οι μεταβολικές πρωτεΐνες (κυρίως ένζυμα) απομακρύνονται με εκχύλιση με νερό και 0,5N NaCl και αποτελούν από κοινού λιγότερο από 20% του συνόλου των πρωτεϊνών του ενδοσπερμίου. Από το στερεό υπόλειμμα που καθιζάνει εκχυλίζονται οι γλοιαδίνες με 70% αιθανόλη (30 - 40% του συνόλου των πρωτεϊνών του αλεύρου). Το στερεό υπόλειμμα που παραμένει μετά την απομάκρυνση της γλοιαδίνης είναι η γλουτενίνη (40 - 50% του συνόλου των πρωτεϊνών του αλεύρου). Το κλάσμα της γλουτενίνης διακρίνεται σε δύο επιπλέον κλάσματα με τη διαλυτότητα σε οξικό οξύ (Ματσούκας, 2003).

Το ενδοσπέρμιο του σίτου έχει περίπου 13% πρωτεΐνη, ενώ το πίτυρο και κυρίως το φύτρο περιέχει 15% και 26% πρωτεΐνη, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες του σίτου περιέχουν υψηλή αναλογία σε απαραίτητα αμινοξέα. Συγκεκριμένα η % αναλογία των απαραίτητων αμινοξέων στις πρωτεΐνες του σιταριού είναι: 4,1% βαλίνη, 5,9% λευκίνη, 3,6% ισολευκίνη, 4,1% φαινυλαλανίνη, 3,0% θρεονίνη, 1,0% μεθειονίνη, 0,8% θρυπτοφάνη και 2,5% λυσίνη (Μπόσκος, 1997). Οι αλβουμίνες είναι μία ομάδα πρωτεϊνών που αποτελεί το 6-12% της συνολικής πρωτεΐνης και έχει υψηλή περιεκτικότητα σε θρυπτοφάνη και συνεισφέρει στην αρτοποιητική ικανότητα του αλεύρου. Αφαίρεση του κλάσματος αυτού από τις πρωτεΐνες έδωσε αλεύρι με φτωχή αρτοποιητική ικανότητα. Η δράση των πρωτεϊνών αυτών είναι άγνωστη. Ίσως η θετική δράση τους να οφείλεται στις περιεχόμενες πεντοζάνες. Οι γλοβουλίνες αντιπροσωπεύουν το 5 - 12% των πρωτεϊνών του αλεύρου. Χαρακτηρίζονται από χαμηλή περιεκτικότητα σε θρυπτοφάνη και υψηλή περιεκτικότητα σε αργινίνη. Είναι διαλυτές σε αραιά διαλύματα αλάτων. Δεν συνεισφέρουν στην αρτοποιητική ικανότητα του αλεύρου. Η γλουτένη αποτελείται από γλοιαδίνες και γλουτενίνες, πρωτεΐνες που χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμίνης, ασπαραγίνης και προλίνης. Οι γλοιαδίνες που είναι προλαμίνες είναι διαλυτές σε αιθανόλη 60-70% κ.ο. οι γλουτενίνες είναι διαλυτές σε αραιά οξέα και βάσεις. Οι γλοιαδίνες διαφέρουν σημαντικά από τις γλουτενίνες ως προς το μοριακό τους βάρος. Επίσης διαφέρουν όσον αφορά τους δισουλφιδικούς δεσμούς. Στις γλοιαδίνες οι δισουλφιδικοί δεσμοί είναι ενδομοριακοί, ενώ στις γλουτενίνες είναι ενδο- και δια-μοριακοί. Το υψηλό ποσοστό των διαμοριακών δισουλφιδικών δεσμών στις γλουτενίνες έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγάλων μακρομορίων (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009).

Τα σπουδαιότερα ένζυμα των αλεύρων περιλαμβάνουν τις αμυλάσες, πρωτεϊνάσες, λιπάσες και οξειδάσες. Τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται στο διαλυτό κλάσμα της πρωτεΐνης, δηλαδή στις αλβουμίνες και γλοβουλίνες. Τα ένζυμα, αν και αποτελούν μικρό μόνο τμήμα του πρωτεϊνικού περιεχομένου, εν τούτοις επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες των αλεύρων. Η υδρόλυση του αμύλου στο σιτάρι καταλύεται από τις αμυλάσες. Η β-αμυλάση σπάει τους α-1,4 δεσμούς του αμύλου, παράγοντας μαλτόζη, ενώ η α-αμυλάση που στοχεύει επίσης στους ίδιους δεσμούς, παράγει δεξτρίνες. Οι α-αμυλάσες χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία για τη

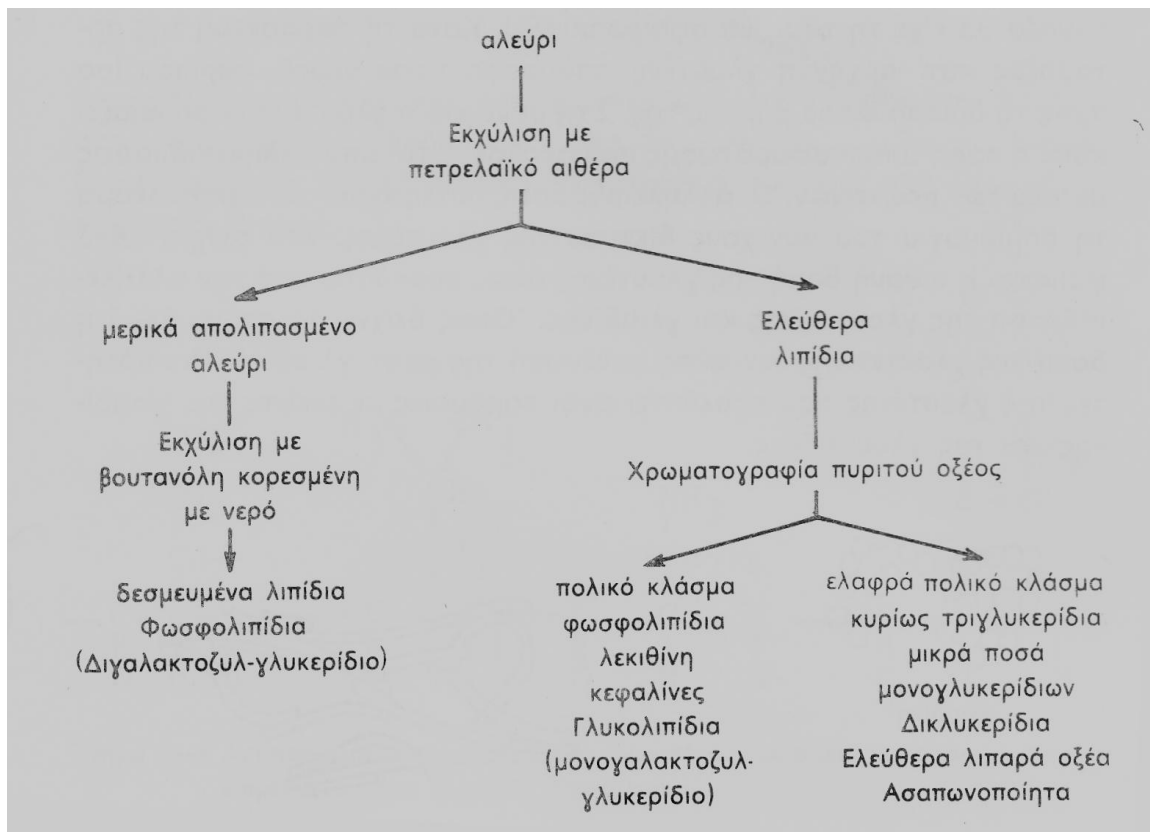
βελτίωση των ρεολογικών ιδιοτήτων της αρτομάζας. Ακόμα στο αλεύρι απαντούν σε μικρή ποσότητα και πρωτεολυτικά ένζυμα. Οι λιπάσες, που σπάνε τους εστεροδεσμούς στα γλυκερίδια, ελευθερώνοντας λιπαρά οξέα, παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την αποθήκευση του σιταριού. Η πιθανή υδρολυτική τάγγιση έχει μεγαλύτερη σημασία στο μη αλεσμένο σιτάρι απ' ό τι στο αλεύρι γιατί η δραστηριότητα της λιπάσης είναι πολύ χαμηλή στο ενδοσπέρμιο, το μέρος του σιταριού από το οποίο προκύπτει το αλεύρι. Από τις οξειδάσες, η λιποξειδάση καταλύει την υπεροξειδάση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Βουδούρης-Κοντομηνας, 2009).



**Σχήμα 1** : Κλασμάτωση πρωτεϊνών του ενδοσπερμίου του σίτου (Ματσούκας, 2003)

Οι σπουδαιότεροι υδατάνθρακες στο αλεύρι περιλαμβάνουν το άμυλο, την κυτταρίνη, τις πεντοζάνες, τα απλά σάκχαρα και τις δεξτρίνες. Το άμυλο αποτελεί το κύριο συστατικό στο αλεύρι (76-80% επί ξηρού). Το άμυλο υπάρχει με τη μορφή αμυλόκοκκων, οπότε αποτελείται από είδη κόκκων. Τους μικρούς – σφαιρικούς και τους μεγαλύτερους στενόμακρους. Οι μικροί κόκκοι έχουν διάμετρο περίπου 15 μm,

ενώ οι μεγάλοι 15-35  $\mu\text{m}$ . Και τα δύο είδη κόκκων αποτελούνται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη, πολυμερή και τα δύο της D-γλυκόζης. Το περιεχόμενο τους σε αμυλόζη είναι περίπου 25%, ενώ σε αμυλοπηκτίνη περίπου 50-55%. Η κυτταρίνη αποτελεί το κύριο συστατικό του φύτρου στον κόκκο του σιταριού. Απομακρύνεται ουσιαστικά κατά την άλεση. Η κυτταρίνη που βρίσκεται στα τοιχώματα του ενδοσπέρματος των κυττάρων δεν παίζει σημαντικό ρόλο γιατί βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση.



**Σχήμα 2:** Κλασμάτωση των λιπιδίων στο αλεύρι (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009)

Οι πεντοζάνες είναι πολυσακχαρίτες που περιέχουν πεντόζες, αραβινόζη, ξυλόζη και γλυκοπρωτεΐνες. Υπάγονται στις ημικυτταρίνες και αποτελούν το 2-3% του λευκού αλεύρου. Υπάρχουν δύο είδη πεντοζανών, οι διαλυτές στο νερό (20-25% κ.β.) και οι αδιάλυτες στο νερό (75-80% κ.β.). Οι διαλυτές είναι μικρού μοριακού βάρους και παίζουν σημαντικό ρόλο στις ρεολογικές ιδιότητες της αρτομάζας, ενώ οι αδιάλυτες είναι μεγάλου μοριακού βάρους ενώσεις. Οι δεξτρίνες αν και μοιάζουν με το άμυλο έχουν μικρότερο μοριακό βάρος και αποτελούν μόλις το 0,2% κ.β. του

αλεύρου, ενώ τα απλά σάκχαρα φτάνουν το 2% κ.β. του αλεύρου. Η μαλτόζη αποτελεί το σπουδαιότερο σάκχαρο (0,5-1,0%), ενώ σε μικρότερα ποσά απαντούν η γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009).

Τα λιπίδια αποτελούν το 1-2% του ενδοσπέρματος. Για τη λεπτομερή μελέτη των λιπιδίων του αλεύρου χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες (Σχήμα 2). Τα 'ελεύθερα' λιπίδια εκχυλίζονται εύκολα με πετρελαϊκό αιθέρα, ενώ τα 'συζευγμένα' με άμυλο ή πρωτεΐνες λιπίδια απαιτούν πολικά συστήματα διαλυτών, όπως μίγματα χλωροφορμίου/μεθανόλης/νερού. Τα λιπίδια που εκχυλίζονται με αυτόν τον τρόπο είναι κυρίως φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια. Μετά τον προκαταρκτικό διαχωρισμό ελεύθερων και συζευγμένων λιπιδίων, τα ελεύθερα λιπίδια μπορεί να κλασματωθούν σε στήλη πυριτικού οξέος. Δια μέσω της στήλης διαβιβάζονται διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας έτσι ώστε τα λιπίδια να διαχωριστούν με βάση την πολικότητά τους. Τα πιο πολικά λιπίδια είναι τα φωσφολιπίδια (λεκιθίνη, φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοσερίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) και τα γλυκολιπίδια (μονογλυκερίδιο της γαλακτόζης). Τα λιγότερο πολικά λιπίδια περιλαμβάνουν κυρίως τρι-, δι- και μονο-γλυκερίδια καθώς και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του σιταριού, η αναλογία των ελεύθερων λιπαρών οξέων αυξάνει, ενώ η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και μονο- και διγλυκεριδίων ελαττώνεται (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009).

Το ποσοστό των περιεχόμενων ανόργανων συστατικών στο ενδοσπέρμιο φτάνει μόνο το 0,3% και συνεπώς η τελική συγκέντρωση των ανόργανων συστατικών στο αλεύρι είναι χαμηλή. Τα κυριότερα στοιχεία που απαντούν είναι τα K, P, Mg, Ca και σε ίχνη τα Fe, Al και S. Από βιταμίνες το πιτυρούχο αλεύρι περιέχει σημαντική ποσότητα βιταμινών του συμπλέγματος B, ενώ το λευκό αλεύρι είναι φτωχό σε βιταμίνες. Κατόπιν εμπλουτισμού του λευκού αλεύρου η συγκέντρωση της θειαμίνης και νιασίνης φτάνουν τα αντίστοιχα επίπεδα εκείνων στο πιτυρούχο αλεύρι (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009).

### **1.2.2. Τα κύρια συστατικά του ζυμαριού**

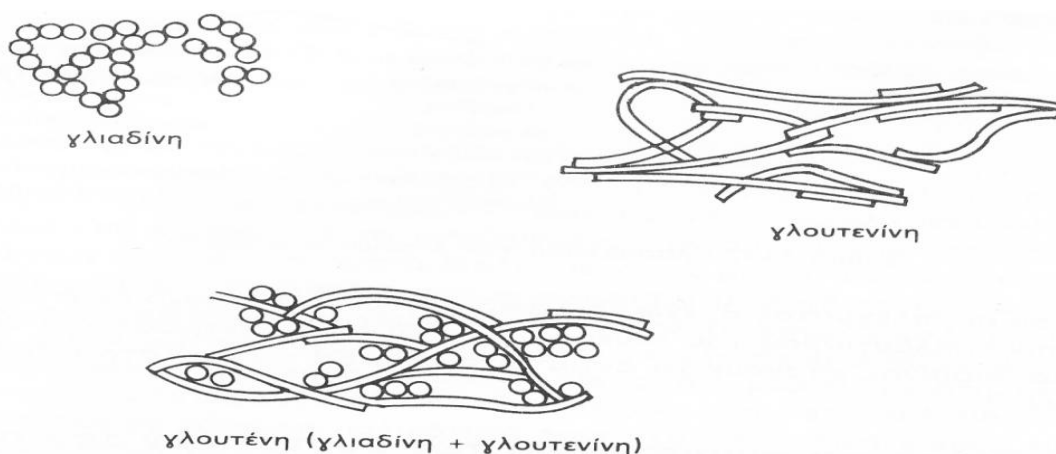
Τα κύρια συστατικά που αναμιγνύονται για την παρασκευή του ζυμαριού για το παραδοσιακό φύλλο για πίτα είναι: αλεύρι σίτου, νερό και αλάτι. Στη συνέχεια

αξιολογείται ο ρόλος των συστατικών στις ιδιότητες του ζυμαριού, και κατ' επέκταση στην παρασκευή παραδοσιακού φύλλου.

Κατά την προσθήκη νερού στο αλεύρι οι πρωτεΐνες μαζί με τις πεντοζάνες και το άμυλο, ιδιαίτερα το μηχανικώς τραυματισμένο, ενυδατώνονται ταχέως. Τόσο η ποσότητα όσο και η ποιότητα της πρωτεΐνης στο αλεύρι είναι σημαντικοί παράγοντες για τον καθορισμό του ρυθμού και της ικανότητας απορρόφησης νερού. Τα επιμέρους ενυδατωμένα τεμαχίδια του αλεύρου εξαναγκάζονται κατά την ανάμειξή τους να σχηματίσουν το συνεχές δίκτυο της γλουτένης στο ζυμάρι. Κατά την ανάμειξη του ζυμαριού τα συσσωματωμένα τεμαχίδια του αλεύρου μετατρέπονται σε ζυμάρι με τον επιθυμητό βαθμό αναπτύξης, δηλαδή με τον σωστό συνδυασμό μηχανικών ιδιοτήτων ώστε να παραχθεί το επιδιωκόμενο αρτοσκεύασμα με σωστό όγκο και υφή (Ματσούκας, 2003). Η εφυδάτωση των πρωτεϊνών γλοιαδίνης και γλουτενίνης δημιουργεί το συνεκτικό ελαστικό, τρισδιάστατο δίκτυο της γλουτένης. Η συνοχή και η ελαστικότητα του δικτύου είναι τέτοιες ώστε φυσαλίδες αερίων που δημιουργούνται, να μεγαλώνουν χωρίς να σπάζουν τη συνέχεια του ζυμαριού. Ταυτόχρονα, η απόλυτη ελαστικότητα είναι ανεπιθύμητη γιατί το ζυμάρι θα είχε την τάση να σφαιροποιηθεί. Κατά την παρασκευή της ζύμης κατ' αρχήν η γλουτένη απορροφά ποσό νερού, περίπου ίσο με το διπλάσιο του βάρους της. Στη συνέχεια η γλουτένη παρουσιάζει κάποια τάση αποσυσσωμάτωσης που ακολουθείται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του συνεχούς δικτύου της γλουτένης.

Στο Σχήμα 3 παρουσιάζεται η πιθανή δομή της γλουτένης όπως προκύπτει από την αλληλεπίδραση της γλουτενίνης και γλοιαδίνης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3 η δομή της γλουτενίνης ευνοεί τη συνένωση της με τη γλοιαδίνη. Οι ιδιότητες της γλουτένης που προκύπτει είναι παρόμοιες με εκείνες της γλοιαδίνης και της γλουτενίνης (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009). Το κλάσμα των γλοιαδινών, στο κοινό αλεύρι σίτου, έχει μεγάλη εκτατότητα και είναι κολλώδες, ενώ το κλάσμα των γλουτενινών έχει μεγάλη ελαστικότητα. Η ορθή εξισοπέπηση των ρεολογικών ιδιοτήτων των δύο αυτών κλασμάτων είναι απαραίτητη για την επιτυχή ανάπτυξη του ζυμαριού (Ματσούκας, 2003). Η μοριακή δομή της γλουτένης επιτρέπει διάφορα είδη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις συμβαίνουν μεταξύ της γλουτένης και αμινοξέων όπως γλουταμινικό οξύ, λευκίνη,

λυσίνη, κυστίνη κ.α. Οι σχηματιζόμενοι δεσμοί μπορεί να είναι δισουλφιδικοί, ομοιοπολικοί, ηλεκτροστατικοί, υδρόφοβοι ή δεσμοί υδρογόνου. Οι υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμίνης και ασπαραγίνης συμβάλλουν στην ελαστικότητα της γλουτένης γιατί οι ελεύθερες αμινομάδες συμμετέχουν σε υδρογονοδεσμούς, οι οποίοι δημιουργούν ελαστικά δίκτυα. Μη πολικές ομάδες, π.χ. η πλευρική αλυσίδα της λευκίνης, συμμετέχουν ανά δύο στη δημιουργία υδρόφοβων δεσμών. Ακόμη ιοντικοί δεσμοί δημιουργούνται μεταξύ φορτισμένων ομάδων π.χ. γλουταμινικού οξέος παρουσία λυσίνης (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009). Η ανάπτυξη του ζυμαριού στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην φύση των πρωτεϊνών του αλεύρου. Από τις μεταβολικές πρωτεΐνες η α- αμυλάση σε συνδυασμό με τη β- αμυλάση ρυθμίζουν το ρυθμό αξιοποίησης του μηχανικώς τραυματισμένου αμύλου κατά τη ζύμωση (Ματσούκας, 2003).

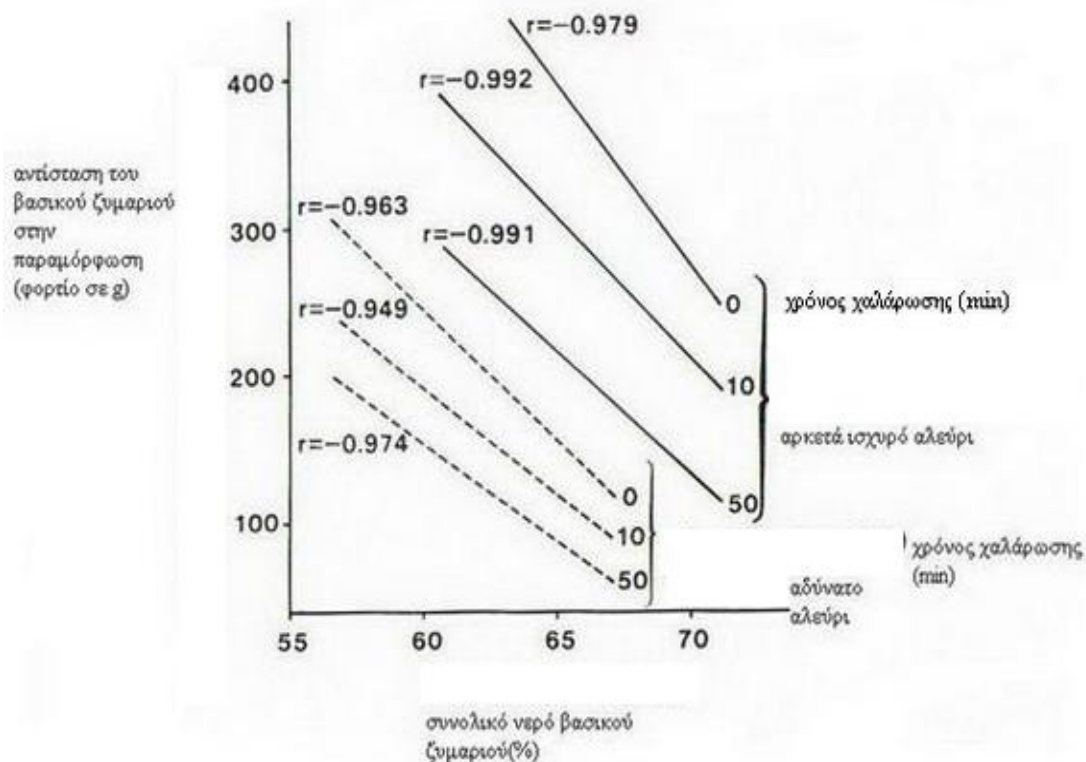


**Σχήμα 3:** Μοριακή συνένωση της γλοιαδίνης και γλουτενίνης για το σχηματισμό της γλουτένης (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009)

Εκτός από πρωτεΐνη, το δίκτυο της γλουτένης περιέχει περίπου 8% λίπος (επί ξηρού). Το υψηλό αυτό ποσοστό λίπους στη γλουτένη, σε σύγκριση με το ποσοστό λίπους στο αλεύρι, αποτελεί ένδειξη της ικανότητας της γλουτένης να δεσμεύει λίπος κατά τη διάρκεια της παρασκευής της ζύμης. Τα λιπίδια βρίσκονται καλά δεσμευμένα και στερεωμένα καλύτερα όσο περισσότερο προχωρεί η παρασκευή της ζύμης. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες τα λιποειδή υπό μορφή φωσφολιπιδίων απαρτίζουν



διπλές στιβάδες με κάθε στιβάδα ενωμένη, μέσω ιοντικών δεσμών, στην πρωτεΐνη, έτσι ώστε τελικά να σχηματίζονται στιβάδες λιποπρωτεΐνης μέσα στη μάζα της γλουτένης. Και ενώ η ελαστικότητα της ζύμης οφείλεται στα μόρια της πρωτεΐνης, η ολισθηρότητα της οφείλεται στους ασθενείς δεσμούς μεταξύ των φωσφολιπιδίων της λιποπρωτεΐνης. Από τα λιπίδια, τα πολικά φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στην αρτοποιητική ικανότητα του αλεύρου. Εκχύλιση με μείγμα βουτανόλης - νερού και απομάκρυνση των πολικών λιπιδίων δίνει σκληρή ζύμη (που δεν διογκώνεται). Τα μη πολικά λιπίδια δεν φαίνεται να παίζουν κάποιον ιδιαίτερο ρόλο στη ζύμη (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009).



**Σχήμα 4 :** Επίδραση του επιπέδου του συνολικού νερού στο ζυμάρι, στην αντίσταση του ζυμαριού στην παραμόρφωση, μετά από τους διαφορετικούς χρόνους χαλάρωσης (Telloke, 1988).

Κόκκοι αμύλου, κατά τη διάρκεια της παρασκευής της ζύμης, παγιδεύονται στο δίκτυο της γλουτένης. Στις δυνάμεις συνοχής που αναπτύσσονται μεταξύ του αμύλου και της γλουτένης, οφείλεται, κατά μεγάλο ποσοστό, η συνέχεια της

μοριακής δομής του ζυμαριού. Με την εφυδάτωση του αμύλου, οι αμυλόκοκκοι αποκτούν αρκετή ελαστικότητα και εκτείνονται μαζί με τη γλουτένη κατά την παρασκευή της ζύμης. Ο ρόλος των πεντοζανών είναι επίσης αρκετά ξεκάθαρος. Τόσο οι αδιάλυτες, όσο και οι διαλυτές πεντοζάνες είναι υδρόφιλες και συνεισφέρουν λόγω δέσμευσης νερού στην σκληρότητα της ζύμης. Οι πεντοζάνες πιθανότατα αντιδρούν με τις πρωτεΐνες μέσω δεσμών υδρογόνου (Βουδούρης-Κοντομηνάς, 2009). Η λειτουργικότητα του αμύλου στο ζυμάρι περιγράφεται ως εξής: α) αραιώνει τη γλουτένη στην κατάλληλη αναλογία για την παραγωγή της ζύμης, β) παρέχει σάκχαρα για τις ανάγκες της ζύμωσης μέσω της αμυλασικής δράσης, γ) διαθέτει επιφάνεια κατάλληλη για ισχυρή προσκόλληση της γλουτένης, δ) γίνεται εύκαμπτο το ζυμάρι (λόγω της μερικής ζελατινοποίησης του αμύλου), ε) απορροφά νερό από τη γλουτένη κατά τη διάρκεια του ψησίματος κάνοντας τη γλουτένη να μετουσιωθεί και να γίνει άκαμπτη (Ματσούκας, 2003).

Το νερό είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του ζυμαριού, όσο αυξάνονται τα επίπεδα του προστιθέμενου νερού, το ζυμάρι γίνεται μαλακότερο και η αντίσταση του στην παραμόρφωση μειώνεται (Cauvain και Young, 2000). Η μείωση της αντίστασης του ζυμαριού στην παραμόρφωση, με την αύξηση της προσθήκης νερού για δύο διαφορετικά άλευρα και τρεις χρόνους χαλάρωσης, παρουσιάζεται στην Σχήμα 4. Για έναν δεδομένο χρόνο χαλάρωσης, αυτή η σχέση είναι γραμμική και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει το απαιτούμενο επίπεδο προσθήκης νερού για κάθε συγκεκριμένο αλεύρι (Telloke, 1988). Παρά τις αλλαγές που εμφανίζονται στην αντίσταση του ζυμαριού στην παραμόρφωση, με τη διαφοροποίηση στο επίπεδο προσθήκης νερού, η μεταβολή στην ανάκτηση της ελαστικότητας του ζυμαριού είναι περιορισμένη. Ακόμη, το μαγειρικό αλάτι επηρεάζει τις ρεολογικές ιδιότητες του βασικού ζυμαριού, για παράδειγμα, αύξηση στη συγκέντρωση του NaCl αυξάνει τόσο την εκτατότητα του βασικού ζυμαριού, όσο και την αντίστασή του στο τέντωμα (Fisher et al, 1949).

### **1.2.3. Ο ρόλος της επεξεργασίας του ζυμαριού**

Τα συστατικά της ζύμης αναμιγνύονται σε σύντομο χρόνο (1min) και σε χαμηλή ταχύτητα (προσθήκη 2-5 KJ/kg, 0,55-1,375 Wh/kg). Η ανάμιξη αυτή δεν επαρκεί για την ανάπτυξη του ζυμαριού, η οποία ολοκληρώνεται κατά το άνοιγμα

του ζυμαριού σε φύλλο. Το ποσό της ενέργειας που ενσωματώνεται στο ζυμάρι είναι πολύ μικρό, 2-5 KJ/kg ζυμαριού ανάλογα με τη δύναμη του αλεύρου, δηλ. την αντίσταση του ζυμαριού στην ανάμιξη (συνεκτικότητα). Το ζυμάρι ανοίγεται σε φύλλο με μεγάλο πλάτος και μήκος. Η τελική θερμοκρασία του ζυμαριού πρέπει να είναι 18<sup>0</sup>-20<sup>0</sup> C. Αυτό επιτυγχάνεται με χρησιμοποίηση κρύου νερού στα ζυμάρι και με τη διεξαγωγή τόσο της ανάμιξης, όσο και των σταδίων της διαστρωμάτωσης και της φυλλοποίησης, σε κλιματιζόμενο χώρο ( θ 18 °C, RH 85%). Το ζυμάρι αναπαύεται επί 15 min μετά τη λήξη της ανάμιξης και πριν την φυλλοποίηση. Το στάδιο της ανάπαυσης γίνεται στον κλιματιζόμενο χώρο. Η RH του χώρου πρέπει να διατηρείται στα επιθυμητά επίπεδα για να μην ξεραθεί η επιφάνεια του ζυμαριού κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (Telloke, 1991).

Πειραματική εργασία έχει δείξει ότι αύξηση της θερμοκρασίας του ζυμαριού από τους 20° C στους 34° C, προκαλεί μικρή, αλλά ευδιάκριτη μείωση στην αντίσταση του ζυμαριού στην παραμόρφωση. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι οποιεσδήποτε σημαντικές διαφορές στη συνεκτικότητα του ζυμαριού από τέτοιες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, εξαφανίζονται γρήγορα, με τους κυλίνδρους φυλλοποίησης να συμβάλλουν στη γρήγορη διάχυση της θερμότητας από το ζυμάρι, λόγω της υψηλής θερμοαγωγιμότητάς τους. Μία άλλη μεταβολή μείζονος σημασίας που εμφανίζεται στο βασικό ζυμάρι κατά τη διάρκεια της ανάπαυσής του μετά τη λήξη της ανάμιξης, είναι μια βαθμιαία μείωση στην αποκατάστασή της ελαστικότητάς του με αυξημένο χρόνο χαλάρωσης. Τα ζυμάρια που γίνονται με πιο αδύνατα άλευρα είναι πιο ευαίσθητα σε αλλαγές στη διάρκεια του χρόνου ανάπαυσης, σε σχέση με τα ζυμάρια που γίνονται με ισχυρότερα άλευρα (Telloke, 1991).

#### **1.2.4. Μικροχλωρίδα των προϊόντων αρτοποιίας**

Η μυκητιακή αλλοίωση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στα προϊόντα αρτοποιίας. Αν και η ύπαρξη μυκήτων από την άποψη της ασφάλειας του καταναλωτή δεν είναι σημαντική, η παρουσία ορατών αποικιών στα προϊόντα αρτοποιίας μειώνει την εικόνα των εταιρειών στην συνείδηση του καταναλωτή, με αποτέλεσμα οικονομικές απώλειες. Ορισμένες εταιρείες χρησιμοποιούν τη μέτρηση της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) των τελικών προϊόντων ως δείκτη πρόβλεψης για ένδειξη

ανάπτυξης μυκήτων και απόρριψης παρτίδων (Marin et al., 2007). Έτσι λοιπόν η ανάπτυξη μούχλας θεωρείται η πιο συχνή αιτία αλλοίωσης των προϊόντων αρτοποιίας (Corsetti et al., 1998; Earle και Putt, 1984, Legan, 1993), αφού οι απώλειες λόγω αλλοίωσης από μούχλα κυμαίνεται μεταξύ 1% και 5% στα προϊόντα αρτοποιίας ανάλογα με την εποχή, τον τύπο του προϊόντος και τον τρόπο επεξεργασίας (Guinot et al., 2002). Οι μύκητες *Xerophilic* είναι η πιο κοινή μικροχλωρίδα προκαλώντας αλλοίωση της ψημένα προϊόντα αρτοποιίας προκαλώντας σημαντικές οικονομικές ζημιές (Pitt και Hocking, 1997). Οι *Eurotium*, *Aspergillus* και *Penicillium* είναι οι κύριοι μύκητες αλλοίωσης στα Ισπανικά προϊόντα αρτοποιίας (Guynot et al., 2005). Σύμφωνα με τους Samar et al. (2007) η μυκοτοξίνη δεσοξυνιβαλενόλη, η οποία παράγεται από τον μύκητα *Fusarium graminearum*, συναντάται συχνά σε επεξεργασμένα τρόφιμα με βάση τα σιτηρά, όπως τα προϊόντα αρτοποιίας.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που ελέγχουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μυκήτων στα τρόφιμα είναι η θερμοκρασία, το pH, και η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) (Gibson και Hocking, 1997). Η  $a_w$  των προϊόντων αρτοποιίας κυμαίνεται μεταξύ 0,70 και 0,88 περίπου, ενώ το pH από το 5,5 έως 8,0 (Guynot et al., 2005). Πρόσφατα, προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη διάρκεια ζωής των προϊόντων αρτοποιίας, χρησιμοποιήθηκε ψύξη (4° C) για προψημένα ή όχι προψημένα ζυμάρια (Kotsianis et al., 2002). Για να αποτραπεί ή να καθυστερήσει η αλλοίωση στα τρόφιμα αυτά εφαρμόζεται συνδυασμός παραμέτρων, οι οποίες μπορούν να δράσουν συνεργιστικά για να αναστέλλουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι πιο κοινές παράμετροι που εφαρμόζονται είναι η μείωση της  $a_w$ , μείωση του pH, η προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων, μέτρια θερμική επεξεργασία κλπ. (Chirife and Favetto, 1992; Leistner, 1992). Ασθενή οργανικά οξέα, όπως το προπιονικό, βενζοϊκό και σορβικό χρησιμοποιούνται για την καταστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και συνεπώς για την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής των προϊόντων αρτοποιίας (Legan, 1993).

Ο κύριος αντιπρόσωπος των προϊόντων αρτοποιίας είναι το ψωμί. Η ζύμωση του ψωμιού παίζει σημαντικό ρόλο στους πληθυσμούς των διαφόρων μικροβιακών ομάδων που υπάρχουν στο προϊόν πριν (άλευρα) και μετά από αυτή: η μικροβιακή χλωρίδα των ζυμών, *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Lactococci*, *Enterococci* και *Leuconostocs* αυξήθηκε, ενώ εκείνη των μυκήτων, των *Enterobacteriaceae*,

*Pseudomonadaceae*, *Staphylococci* και *Micrococci* μειώθηκε, σε σχέση με εκείνη που ανιχνεύτηκε στα άλευρα (Rocha et al., 2012). Σημειώνεται ότι η ζύμη αρτοποιίας που προστίθεται στο ζυμάρι του ψωμιού για να επιτευχθεί η ζύμωσή του αποτελείται από επιλεγμένα στελέχη του *Saccharomyces cerevisiae* (Μπλούκας, 2005).

Ακόμη, οι παραδοσιακές Μεξικάνικες πίτες tortillas καλαμποκιού αλλοιώνονται λίγο μετά την παραγωγή τους και χαλάνε από ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του προϊόντος σε υγρασία (Clubbs et al., 2008). Επίσης, τα φρέσκα ζυμαρικά είναι ένα τρόφιμο που αλλοιώνεται εύκολα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε νερό (30%). Αλλοίωση του οφείλεται τόσο στην μεταβολική δραστηριότητα μικροοργανισμών (βακτήρια, ζύμες, μύκητες) που εύκολα μπορούν να αναπτυχθούν στο προϊόν, όσο και στην ενζυμική δραστηριότητα που πραγματοποιείται στο προϊόν (Guerzoni et al, 1994; Di Fabio et al, 1995.). Το καλύτερο, όμως, υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών από όλα τα προϊόντα αρτοποιίας αποτελούν τα προϊόντα ζαχαροπλαστικής (Voysey et al., 1999). Έχει βρεθεί αξιόλογο μικροβιακό φορτίο (βακτήρια, μύκητες και ζυμομύκητες) σε πάστα αμυγδάλου (προϊόν αρτοποιίας) που παράχθηκε σε βιοτεχνία της Σικελίας. Ανιχνεύθηκαν ολικά κολοβακτηριοειδή πάνω από τα προτεινόμενα όρια και παθογόνοι μικροοργανισμοί, όπως η *Escherichia coli* και ο *Bacillus cereus*. Οι αναλύσεις έδειξαν μεγάλη ετερογένεια στο ολικό πληθυσμό βακτηρίων: συγκεκριμένα απομονώθηκαν γένη των *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* και *Bacillaceae*. Ανιχνεύτηκαν επίσης ζύμες και ο μύκητας *Aspergillus spp.* (Baiano et al., 2005).

---

### 1.3. Τζατζίκι

---

Το τζατζίκι είναι μια Ελληνική σαλάτα ή ορεκτικό (Εικόνα 7). Χρησιμοποιείται επίσης κι ως σος στην πίτα γύρο με σουβλάκι. Το τζατζίκι αποτελείται από στραγγιστό γιαούρτι (συνήθως από πρόβειο ή κατσικίσιο γάλα) που αναμειγνύεται με αγγούρι, σκόρδο, αλάτι, ελαιόλαδο, πιπέρι και μερικές φορές άνηθο, δυόσμο ή μαϊντανό. Το τζατζίκι σερβίρεται πάντα κρύο (σαν κρύα σαλάτα) ως ορεκτικό ή συνοδευτικό ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)). Το % ποσοστό των συστατικών της σαλάτας τζατζίκι που προμηθευτήκαμε από την εταιρία «Αμβροσία Ε.Π.Ε.» (Θεσσαλονίκη) για

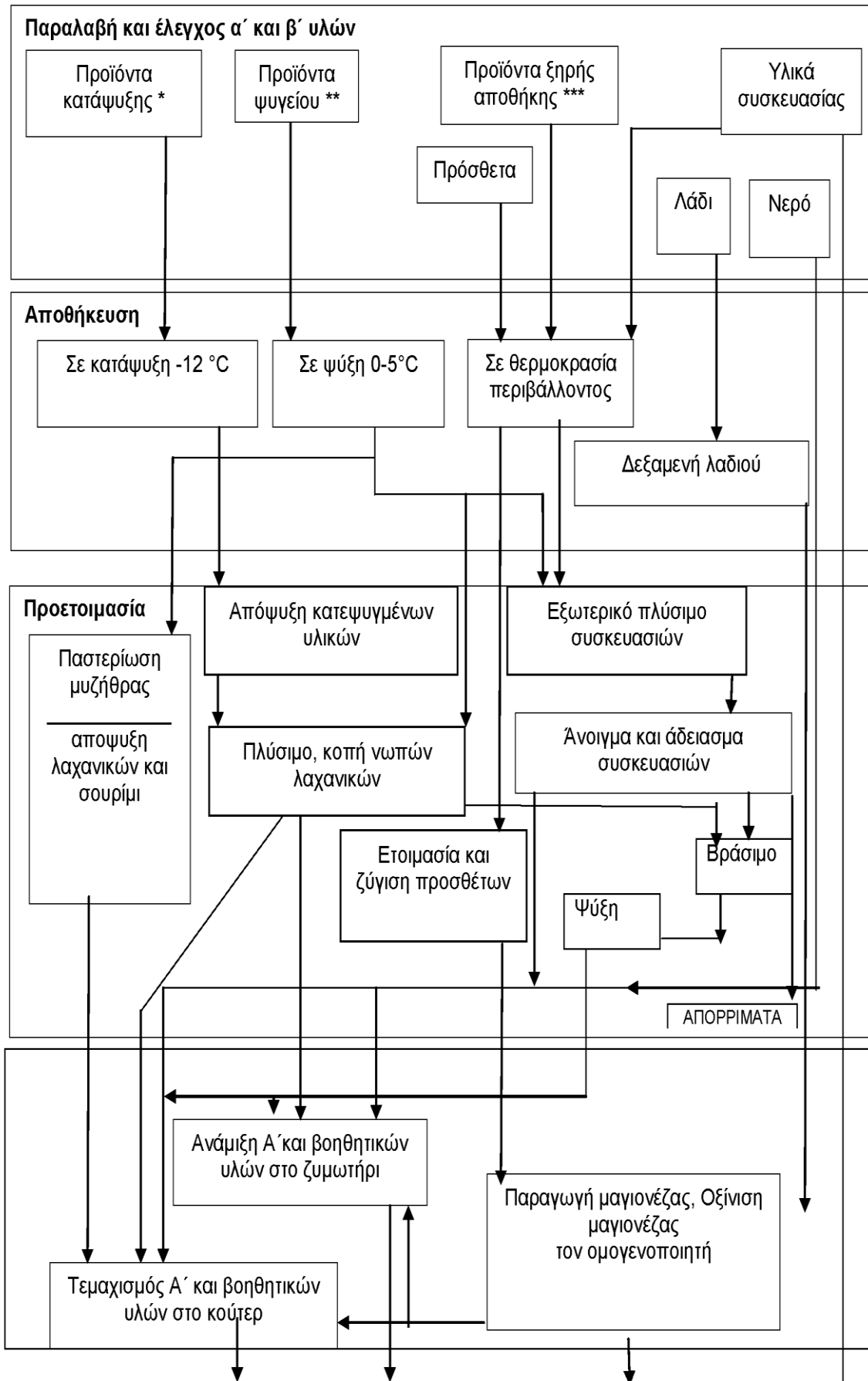
τις ανάγκες των πειραμάτων της παρούσης διατριβής ήταν: Αγγουράκι φρέσκο 30%, (γιαούρτι στραγγιστό + επιδόρπιο) 60%, φυτικό έλαιο 5%, αλάτι 1%, σκόρδο 2%, άνηθος <1%, τροποποιημένο άμυλο <1% (Αμβροσία Ε.Π.Ε.).

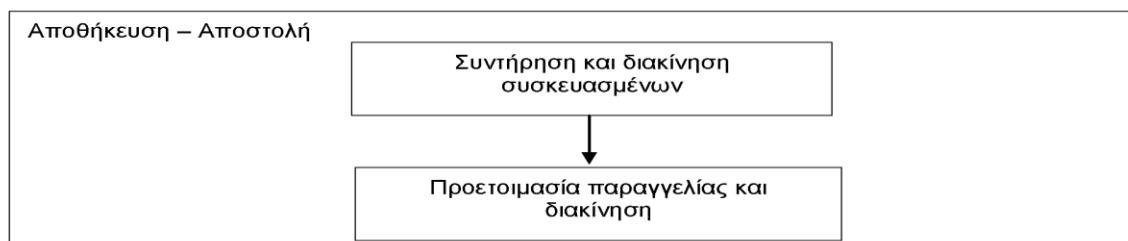
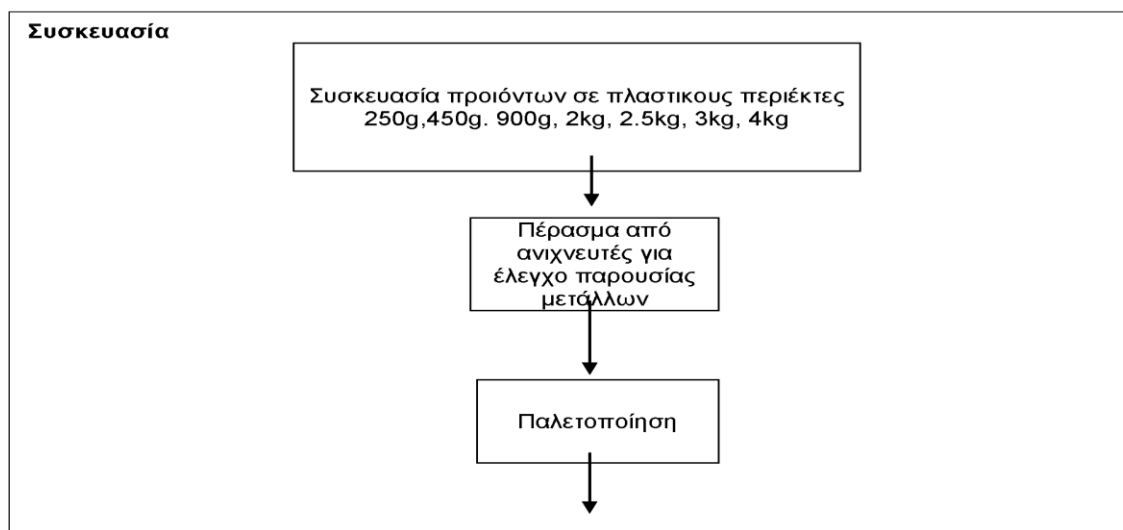


**Εικόνα 7:** Τζατζίκι (Αμβροσία Ε.Π.Ε.)

Από το διάγραμμα ροής στο Σχήμα 5 βλέπουμε ότι η γραμμή παραγωγής της παραδοσιακής σαλάτας «τζατζίκι» είναι:

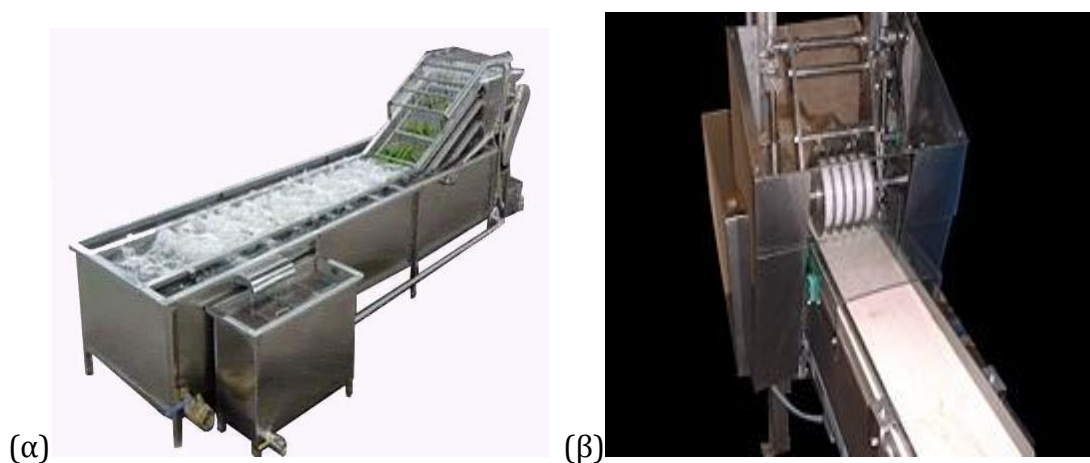
1. Παραλαβή και έλεγχος των Α΄ και Β΄ υλών (Αγγουράκι φρέσκο, γιαούρτι στραγγιστό + επιδόρπιο, λάδι, αλάτι, σκόρδο, άνηθος, τροποποιημένο άμυλο)
2. Αποθήκευση
  - Γιαούρτι, αγγουράκι, πολτός σκόρδου και άνηθος αποθηκεύονται εντός ψυγείου (0 – 5° C)
  - Τα πρόσθετα (αλάτι, τροποποιημένο άμυλο) και τα υλικά συσκευασίας αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
  - Το λάδι αποθηκεύεται σε δεξαμενή λαδιού
3. Προετοιμασία
  - Πλύσιμο και κοπή νωπών λαχανικών (Εικόνα 8)
  - Ζύγιση πρόσθετων (Εικόνα 9)
4. Ανάμειξη βασικών και βοηθητικών υλών στο ζυμωτήρι (Εικόνα 10)
5. Συσκευασία σαλάτας σε αέρα ή σε κενό





\*Προϊόντα κατάψυξης είναι: Αρακάς, πράσα, πιπεριές κόκκινες και πράσινες, γαρίδες, σουρίμι.  
\*\*Προϊόντα ψυγείου είναι: Τυριά, γιαούρτι, μυζήθρες, μελιτζανοπολτός, ταραμπολτός, αυγά βακαλάου, κρόκος αυγού, αγγουράκια φρέσκα, πιπεριές φρέσκες, πατάτες, καρότα, ψωμί, μουστάρδα άχρωμη, βραστά αλλαντικά, κότα βρασμένη, μαϊντανό, λάχανο, πολτός σκόρδου.  
\*\*\*Προϊόντα ξηρής αποθήκης είναι: Μελιτζανοπολτός, κρεμμύδια, τουρσιά (σέλινο, καρότο, αγγουράκι), κονσέρβες (πιπεριές φλωρίνης, παντζάρια, καβούρι, κρεμμυδάκι περλέ), μακαρόνια, ξύδι, φασόλια ξερά, πρόσθετα, καρυκεύματα.

**Σχήμα 5:** Διάγραμμα ροής σαλατών με ή χωρίς βάση μαγιονέζας (Αμβροσία Ε.Π.Ε.).



**Εικόνα 8:** (α) Μηχανή πλύσης λαχανικών και (β) Μηχανή κοπής λαχανικών (<http://www.balkansec.com>)





**Εικόνα 9:** Αυτόματη ζυγιστική μηχανή λαχανικών (<http://www.prepac.gr>)



**Εικόνα 10:** Μηχανή ανάμειξης βασικών και βοηθητικών υλών  
([https://www.google.gr/search?q=%CE%B6%CF%85%CE%BC%CF%89%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%B9%CE%BF&espv=210&es\\_sm=93&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=PJBzUoWVC8fUtQb88YQBw&ved=0CCwQsAQ&biw=1366&bih=667](https://www.google.gr/search?q=%CE%B6%CF%85%CE%BC%CF%89%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%B9%CE%BF&espv=210&es_sm=93&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=PJBzUoWVC8fUtQb88YQBw&ved=0CCwQsAQ&biw=1366&bih=667))

### 1.3.1. Τα κύρια συστατικά στο τζατζίκι

Το τζατζίκι είναι ένα εξαιρετικά γευστικό και θρεπτικό προϊόν, αφού αποτελείται από υψηλής αξίας, πρώτες ύλες. Το γιαούρτι περιέχει υψηλό ποσοστό πρωτεϊνών, βιταμινών, μεταλλικών αλάτων (κυρίως ψευδάργυρο) και βέβαια ασβεστίου. Περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά του γάλακτος και μπορεί να είναι

από τις πρώτες ημιστέρες τροφές που δίδονται στο βρέφος από τον 6<sup>ο</sup> μήνα γιατί είναι ελαφρύ και εύκολο στην πέψη. Προστατεύει τον βλεννογόνο του στομάχου, αποκαθιστά την ισορροπία της χλωρίδας του εντέρου και του βλεννογόνου του στόματος, καταπολεμά τις διάρροιες που προέρχονται από λοιμώξεις του γαστρεντερικού σωλήνα γιατί οι βάκιλοι εξουδετερώνουν τα μικρόβια που τις προκαλούν, καταπολεμεί την χρόνια δυσκοιλιότητα, συμβάλει στην αντιμετώπιση ορισμένων τύπων δερματοπαθειών που οφείλονται σε έλλειψη ή κακή απορρόφηση από το έντερο των συμπλέγματος Β, ενισχύει τη φυσιολογική διαδικασία ανανέωσης των κυττάρων της επιδερμίδας, καθώς επίσης ενισχύει και την ανάπτυξη των μαλλιών και των νυχιών και το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού (Ζερφυρίδης, 1998; <http://www.dietup.gr/antras/diatrofi/2598.html>). Το ελαιόλαδο περιέχει σημαντικές ποσότητες αντιοξειδωτικών ουσιών, όπως βιταμίνης Ε και β-καροτίνης (Ζερφυρίδης, 1998). Γενικά, το αγνό- παρθένο ελαιόλαδο και το σκόρδο θεωρούνται κορυφαία τρόφιμα, τα οποία περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες που εξουδετερώνουν τις βλαβερές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες σχηματίζονται ως κατάλοιπα του μεταβολισμού. Το σκόρδο μάλιστα είναι φυσικό αντιβιοτικό και επιπλέον καθαρίζει τα αγγεία. Οι θεραπευτικές ιδιότητες του σκόρδου, πιστεύεται ότι έχουν σχέση με την βελτίωση της κυκλοφορίας του αίματος, τη ρύθμιση της πίεσης και τη μικροβιοκτόνο δράση του (Ντόγρας, 2003), αφού δημιουργεί δυσμενές περιβάλλον για τα παράσιτα του εντέρου (Ζερφυρίδης, 1998).

Το αγγούρι είναι διουρητικό, αποτοξινωτικό και περιέχει ένα ένζυμο που βοηθάει την πέψη των πρωτεϊνών ([http://www.goldenmag.gr/archives/23264#.T61\\_RVLzpmQ](http://www.goldenmag.gr/archives/23264#.T61_RVLzpmQ)). Ο χυμός του αγγουριού είναι ευεργετικός για την επιδερμίδα, με πολλές - τονωτικές, αντιοξειδωτικές, μαλακτικές και ενυδατικές-ιδιότητες, χάρη στο συνδυασμό βιταμινών C και B1, ιχνοστοιχείων, σακχάρων και καροτενίων που περιέχει (<http://www.vita.gr>). Τέλος, ο άνηθος χρησιμοποιείται στη Φαρμακευτική, ενώ η δράση του θεωρείται ευεργετική κατά διαφόρων κολικών, και χρησιμοποιείται επίσης ως διουρητικό και τονωτικό (<http://aroma-herbs.com/gr/objects/view/187>; <http://el.wikipedia.org>).

Το κύριο συστατικό του τζατζικιού είναι η στραγγιστή γιαούρτη. Η γραμμή παραγωγής της στραγγιστής γιαούρτης είναι (Ζερφυρίδης, 2001): (α) Παραλαβή, καθαρισμός τυποποίηση, ψύξη ή παστερίωση, ψύξη και αποθήκευση του γάλακτος

σε δεξαμενές. (β) Το τυποποιημένο γάλα θερμαίνεται στους 95° C σε εναλλάκτη θερμότητας και φέρεται σε λέβητα συμπύκνωσης υπό κενό, απλής ενέργειας για απομάκρυνση περίπου του 20% του νερού του ή να αυξηθεί το Στερεό Υπόλειμμα του γάλακτος κατά 3% περίπου, δηλαδή από 12,5% να γίνει 15,5%. Για το πρόβειο γάλα δεν χρειάζεται ο εξοπλισμός συμπύκνωσης καθόσον έχει ΣΥ 18% φυσιολογικά, αρκετό για ικανοποιητικό ιξώδες. (γ) Από το λέβητα συμπύκνωσης το νερό που απομακρύνεται φέρεται στον εναλλάκτη θερμότητας για τη θέρμανση του εισερχόμενου γάλακτος, το δε συμπυκνωμένο γάλα θερμοκρασίας περίπου 70° C φέρεται για ομογενοποίηση σε πίεση 200 kg/ cm<sup>2</sup>. (δ) Το ομογενοποιημένο γάλα φέρεται σε ξεχωριστό τμήμα του εναλλάκτη θερμότητας για θέρμανση στους 95° C για 5 min. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα το γάλα ρέει μέσα σε σωλήνα ανάλογου μήκους. Ακολούθως το γάλα ψύχεται στον εναλλάκτη θερμότητας σε θερμοκρασία 43 – 44° C. (ε) Το γάλα στη συνέχεια μεταβιβάζεται σε δεξαμενή αναμονής απ' όπου θα διοχετευθεί για συσκευασία. (στ) Εμβολιασμός με δοσομετρική αντλία με την καλλιέργεια (η καλλιέργεια της γιαούρτης αποτελείται από τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*), η οποία έχει προετοιμαστεί και βρίσκεται σε ξεχωριστές δεξαμενές (εμβολιασμός με 3% καλλιέργεια και επώαση στους 42° C μέχρι να αναπτύξει οξύτητα 85° D, περίπου 3 ώρες επώασης). (ζ) Αμέσως μετά την πήξη της γιαούρτης σε οξύτητα 85° D γίνεται το στράγγισμα του ορού σε ειδική φυγοκεντρική μηχανή σε θερμοκρασία 20° C. (η) Συσκευασία και αποθήκευση υπό ψύξη.

Η καλλιέργεια του γιαουρτιού αποτελείται από τους μικροοργανισμούς *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*. Για την απόκτηση προϊόντος με επιθυμητά γευστικά χαρακτηριστικά, οι δύο μικροοργανισμοί πρέπει να βρίσκονται στη μικτή καλλιέργεια σε αναλογία 1:1. Επιπλέον, η καλλιέργεια γιαουρτιού θα πρέπει: (α) να έχει χαρακτηριστική γεύση και άρωμα, (β) να έχει λεία υφή, (γ) να είναι γρήγορης ανάπτυξης, (δ) να χαρακτηρίζεται από αντοχή σε αντιβιοτικά και βακτηριοφάγους, (ε) να μην περιέχει άλλους μικροοργανισμούς. Ο κύριος ρόλος του *Streptococcus thermophilus* είναι η παραγωγή οξέος, γι' αυτό η θερμοκρασία παρασκευής του γιαουρτιού θα πρέπει να είναι τέτοια, ώστε να ευνοεί την γρήγορη ανάπτυξη του, με αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου παρασκευής. Και οι δύο μικροοργανισμοί παράγουν ουσίες με τις οποίες συμβάλλουν στη γεύση και το

άρωμα του γιαουρτιού. Για το λόγο αυτό κατά την παρασκευή θα πρέπει οι συνθήκες να εξασφαλίζουν την ομαλή ανάπτυξη και των δύο. Η παρασκευή του γιαουρτιού είναι αποτέλεσμα συμβίωσης των δύο μικροοργανισμών της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη και γρηγορότερη παραγωγή οξέος, από ότι όταν ο καθένας αναπτύσσεται ξεχωριστά. Η συνέργεια αποβαίνει σε όφελος κυρίως του στρεπτόκοκκου, που αναπτύσσεται πού γρήγορα. Έτσι, μετά τον εμβολιασμό της καλλιέργειας, διεγείρεται ο λακτοβάκιλλος και απελευθερώνει αμινοξέα στο γάλα. Η βαλίνη, για ορισμένους, ή η γλυκίνη και η ιστιδίνη, σύμφωνα με τη γνώμη άλλων, που απελευθερώνονται, θεωρούνται ουσίες απαραίτητες για την ανάπτυξη του στρεπτόκοκκου. Η διεγερτική επίδραση που ασκεί ο στρεπτόκοκκος στο λακτοβάκιλλο οφείλεται στο σχηματισμό μιας ουσίας με τη μεταβολική δραστηριότητα του πρώτου, που μοιάζει με το μυρμηκικό οξύ. Έτσι, μετά την προσθήκη της καλλιέργειας στο γάλα σε ποσοστό 2-3% πολλαπλασιάζονται αρχικά κυρίως οι στρεπτόκοκκοι και μετά από μία ώρα επώαση η αναλογία κόκκοι:ράβδοι είναι 3-4:1. Με τη γρήγορη ανάπτυξη των λακτοβακίλλων από το στάδιο αυτό και μετά, στο τέλος της πήξεως η αναλογία τους επανέρχεται περίπου στο 1:1. Η πήξη του γάλακτος κατά την παρασκευή του γιαουρτιού πραγματοποιείται με το οξύ που παράγεται αρχικά από τους στρεπτόκοκκους μέχρι pH 5-5,5 και στη συνέχεια με τους λακτοβάκιλλους μέχρι pH 3,8-4,4. Στο τέλος της πήξεως το γαλακτικό οξύ φτάνει σε ποσοστό 0,9-0,95% και ο βακτηριακός πληθυσμός στους  $10^9$ /ml. Η γεύση και το άρωμα του γιαουρτιού είναι αποτέλεσμα συνυπάρξεως στο προϊόν γαλακτικού οξέος, ακεταλδεϋδης, οξικού οξέος και διακετυλίου, που σχηματίζονται από τους μικροοργανισμούς της καλλιέργειας. Οι προηγούμενες ουσίες σχηματίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στη μικτή καλλιέργεια σε σύγκριση με τις καλλιέργειες του καθενός ξεχωριστά (Λιτοπούλου- Τζανετάκη, 2003).

Το αγγουράκι είναι ένα ακόμη κύριο συστατικό της παραδοσιακής σαλάτας τζατζίκι (<http://el.wikipedia.org>). Η αγγουριά, *Cucumis sativus L*, της οικογένειας *Cucurbitaceae*, είναι ετήσιο, ποώδες φυτό, υποτροπικής προέλευσης, ευπαθές στο ψύχος, που κατάγεται πιθανότατα, από την περιοχή των Ινδιών. Το είδος αυτό ήταν γνωστό στην αρχαία Αίγυπτο και την Ελλάδα και πιστεύεται ότι η καλλιέργεια του έχει ιστορία 3000 ετών. Η αγγουριά καλλιεργείται το καλοκαίρι στην ύπαιθρο και

τον υπόλοιπο χρόνο σε θερμοκήπια, γιατί είναι ευαίσθητη στο κρύο. Η υψηλή θερμοκρασία και η υγρασία ευνοούν την ανάπτυξη της (Ντόγρας, 2004).



**Εικόνα 11:** Ο καρπός του αγγουριού (εξωτερικά και εσωτερικά)

Ο καρπός του αγγουριού (Εικόνα 11) είναι ράγα και ανάλογα με το γενότυπο διαφέρει σε μέγεθος, σχήμα και χρώμα φλοιού. Φέρει τρία καρπόφυλλα και τα σπέρματα, όταν υπάρχουν, είναι βυθισμένα σε σαρκώδη πλακούντα, ο οποίος είναι το εδώδιμο τμήμα του καρπού. Οι άσπερμες ποικιλίες ή υβρίδια έχουν καρπούς με ατροφικούς σπόρους (Ντόγρας, 2004). Το αγγούρι είναι επίμηκες, κυλινδρικό, πράσινου χρώματος εξωτερικά και ελαφρύ πράσινου έως λευκού εσωτερικά (<http://el.wikipedia.org>). Οι παλιού τύπου ποικιλίες αγγουριού έχουν καρπούς μήκους 15 – 25 cm με φλοιό ο οποίος συνήθως είναι πικρός. Αντίθετα, τα λεγόμενα «Αγγλικού» τύπου υβρίδια έχουν καρπούς μήκους 30 – 50 cm, συνήθως με έντονο πράσινο φλοιό που δεν είναι πικρός, γι' αυτό και μπορεί να καταναλώνεται ο καρπός χωρίς να ξεφλουδιστεί. Τα τελευταία χρόνια καλλιεργούνται και στη χώρα μας, κυρίως στην Κρήτη, και μικρόκαρπες ποικιλίες ή υβρίδια, με καρπό μήκους 10 – 15 cm (Ντόγρας, 2004).

Η άριστη θερμοκρασία για τη διατήρηση των καρπών αγγουριού είναι 12 – 13° C, και η άριστη σχετική υγρασία 85 – 95% για την αποφυγή αφυδάτωσης. Σε αυτές τις συνθήκες διατηρείται σε καλή κατάσταση για περίπου 10 ημέρες. Σε υψηλότερη θερμοκρασία ο φλοιός του καρπού κιτρινίζει ταχύτατα. Ο καρπός του αγγουριού είναι πολύ ευπαθής στο αιθυλένιο (κιτρινίζει μέσα σε 2 ημέρες όταν εκτεθεί σε συγκέντρωση αιθυλενίου περίπου 1 ppm) γι' αυτό δεν πρέπει να αποθηκεύεται ή να μεταφέρεται μαζί με καρπούς που εκλύουν αιθυλένιο (π.χ. τομάτες, μήλα). Το κιτρίνισμα του καρπού επιβραδύνεται σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα με 5% οξυγόνο. Για την αποφυγή αφυδάτωσης του καρπού, είτε αυτός τυλίγεται (σφιχτά) με φύλλο πολυαιθυλενίου ή με ημιπερατή μεμβράνη, είτε καλύπτεται με ειδικό κερί. Η παραπάνω συσκευασία αυξάνει την διάρκεια της μετασυλλεκτικής

ζωής, λόγω μείωσης του ρυθμού αναπνοής του καρπού. Ο καρπός του αγγουριού αφυδατώνεται ταχύτατα, γι' αυτό όταν δεν είναι συσκευασμένος κατάλληλα, πρέπει η σχετική υγρασία της αποθήκης ή του μεταφορικού μέσου να είναι υψηλή (>85%). Το αγγούρι δεν είναι τροφή πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, αφού έχει λίγες βιταμίνες, κυρίως C, B1, B2, ενώ βιταμίνη A υπάρχει στο φλοιό (<http://el.wikipedia.org>). Συγκεκριμένα, η μέση σύνθεση του καρπού του αγγουριού ανά 100 g είναι: 95 g νερό, 0,6 – 0,9 g πρωτεΐνες, 0,1 g λίπη, 2,2 – 3,5 g υδατάνθρακες, 0,03 g βιταμίνη B<sub>1</sub>, 0,02 g βιταμίνη B<sub>2</sub>, 0,3 g νιασίνη, 12 mg βιταμίνη C, 12 mg Ca, 0.3 mg Fe, 15 mg Mg και 24 mg P (Ντόγρας, 2004).

Το σκόρδο (*Allium sativum L.*), το οποίο είναι το σήμα κατατεθέν του τζατζικιού, αφού δεν νοείται τζατζίκι χωρίς σκόρδο, ανήκει στην οικογένεια *Alliaceae* και είναι μονοκοτυλήδοιο, ποώδες, ετήσιο φυτό (Εικόνα 12). Πιστεύεται ότι έχει δύο κέντρα καταγωγής, ένα στην Ασία και ένα άλλο στις παραμεσόγειες περιοχές της Ευρώπης. Το σκόρδο χρησιμοποιείται ως τροφή, αλλά χρησιμοποιείται και για θεραπευτικούς σκοπούς από τους αρχαίους Αιγύπτιους, Έλληνες και Ρωμαίους. Η περιεκτικότητα του σκόρδου σε θρεπτικές ουσίες (ανά 100 g) είναι: 59 g νερό, 33,1 g υδατάνθρακες, 0,5 g λίπη, 6,4 g πρωτεΐνες, 1,5 g ίνες, 0,2 mg θειαμίνη, 0,11 mg ριβοφλαβίνη, 0,7 mg νιασίνη, 31,2 mg βιταμίνη C, 181 mg Ca, 153 mg P, 1,7 mg Fe, 17 mg Na, 401 mg K (Ντόγρας, 2003).

Το σκόρδο είναι φυτό δροσερών εποχών του έτους και αντέχει αρκετά στον παγετό, γι' αυτό μπορεί να καλλιεργηθεί και τον χειμώνα στις περισσότερες πεδινές περιοχές της Ελλάδας, όπου η εποχή αυτή δεν είναι πολύ ψυχρή. Η ανάπτυξη του ριζικού συστήματος του φυτού, καθώς και η υπέργεια βλάστηση, είναι άριστη στους 20° C, ενώ είναι σημαντικά βραδεία στους 10° C. Για την ανάπτυξη των βολβών, η άριστη θερμοκρασία είναι 17 – 25° C, ενώ σε θερμοκρασία πάνω από 28 – 30° C η ανάπτυξή τους επιβραδύνεται ή αναστέλλεται. Εδώδιμο τμήμα του σκόρδου είναι κυρίως ο βολβός του και δευτερευόντως ολόκληρο το φυτό πριν βολβοποιήσει. Το σκόρδο έχει έντονη οσμή και καυστική γεύση, που οφείλεται σε αιθέρια έλαια, που περιέχουν θειούχο αλλύλιο (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>S<sub>5</sub>) (Ντόγρας, 2003).

Το σκόρδο είναι ποώδες φυτό που παράγει «σύνθετο» (πολυμερή) βολβό που συνήθως αποτελείται από δέκα περίπου βολβομερή. Οι περισσότερες ποικιλίες σκόρδου δεν ανθίζουν, έτσι το σκόρδο πολλαπλασιάζεται αγενώς (με τα βολβομερή).

Το βολβομερές αποτελείται από ένα βλαστικό άξονα με δύο φύλλα κι ένα βλαστοφόρο οφθαλμό, ο οποίος διατηρείται σε κατάσταση λήθαργου, μετά την ωρίμανση του βολβομερούς. Το εξωτερικό φύλλο του βολβομερούς είναι λεπτό σε μορφή «φακέλου» που περιβάλλει ολόκληρο το βολβομερές, ενώ η βάση του εσωτερικού φύλλου είναι σαρκώδης και αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του βολβομερούς, που είναι το εδώδιμο τμήμα του σκόρδου. Τα φυτά των ποικιλιών σκόρδου που καλλιεργούνται σε εύκρατες περιοχές της γης βολβοποιούν, δηλ. σχηματίζουν σύνθετο βολβό, την Άνοιξη (σε μακρά φωτοπερίοδο), αφού όμως προηγουμένως τα φυτά (ή το βολβομερές από το οποίο προήρθαν) έχουν εκτεθεί σε χαμηλή θερμοκρασία (0 – 10° C) για 4-8 εβδομάδες (Ντόγρας, 2003).



**Εικόνα 12:** Το σκόρδο και ο βολβός του

Μετά τη συγκομιδή του το σκόρδο ξηραίνεται επαρκώς και στην χώρα μας συνήθως πλέκονται τα ξερά φύλλα του φυτού μεταξύ τους και δημιουργούνται «αρμαθιές», οι οποίες αποθηκεύονται σε κοινές αποθήκες για χρονικό διάστημα ως 4 μήνες. Για μακράς διάρκειας διατήρηση (6-7 μηνών), απαιτείται θερμοκρασία περίπου 0° C και χαμηλή σχετική υγρασία αέρα (περίπου 60%) για αποφυγή σήψης των βολβών. Όταν οι βολβοί είναι επαρκώς ξηροί, μπορεί να διατηρηθούν μέχρι και 8 μήνες στους -2° C. Όταν λήξει ο λήθαργος τα βολβομερή εκβλασταίνουν σε  $\theta > 5^{\circ} \text{C}$ . Για ασφαλή μακράς διάρκειας διατήρηση των βολβών μπορεί να ψεκαστούν τα φυτά 2-3 εβδομάδες πριν από τη συγκομιδή με μηλεική υδραζίδη, η οποία εμποδίζει την εκβλάστηση των βλαστοφόρων οφθαλμών. Επίσης δοκιμάστηκε με επιτυχία η ακτινοβολία των βολβών με ακτίνες  $\gamma$  και η ελεγχόμενη ατμόσφαιρα. Σε σχετική υγρασία υψηλότερη από 70% οι βολβοί μπορεί να προσβληθούν από *Penicilium* και

να εκπτυχθούν οι ρίζες. Τέλος κατά την αποθήκευση του σκόρδου μπορεί να εμφανιστεί η κηρώδης «αποσύνθεση» λόγω ανεπαρκούς αερισμού, όπου αρχικά σχηματίζονται αβαθείς κοιλότητες υποκίτρινου χρώματος στην επιφάνεια των βολβομερών και στη συνέχεια τα βολβομερή συρρικνώνονται και κιτρινίζουν (Ντόγρας, 2003).



**Εικόνα 13:** Άνηθος

Ο άνηθος (*Anethum graveolens*), ο οποίος εμπεριέχεται στο τζατζίκι, είναι φυτό της οικογένειας των Σελινοειδών (Ariaceae) (Εικόνα 13). Είναι μονοετές φυτό των Μεσογειακών χωρών και της νότιας Ρωσίας. Το ύψος του φτάνει τα 80 εκατοστά, ο βλαστός του είναι κοίλος και γραμμωτός, η ρίζα γογγυλώδης, τα φύλλα του πτερωτά νηματοειδή. Ο άνηθος ήταν γνωστός στην Αρχαία Ελλάδα με τις ονομασίες *άνηθον* και *άνησον*. Από τα άνθη του παρασκεύαζαν άρωμα, ενώ το πρόσθεταν σε διάφορα κρασιά που είχαν την ονομασία *ανηθίτης οίνος*. Σήμερα το φυτό χρησιμοποιείται στη μαγειρική σε σαλάτες, σούπες, διάφορες σάλτσες και στο τζατζίκι προαιρετικά. Το χαρακτηριστικό του άρωμα μοιάζει με αυτό του γλυκάνισου και οι σπόροι του χρησιμοποιούνται στον αρωματισμό διαφόρων φαγητών, ενώ μπορεί να διατηρηθεί και αποξηραμένος. Καλλιεργείται σε ευρύτερη κλίμακα στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αμερική και την Ασία. Η Ινδία είναι πρώτη στον κόσμο σε παραγωγή άνηθου. Ακολουθούν η Κίνα, το Μεξικό και η Ισπανία (<http://aroma-herbs.com/gr/objects/view/187>; <http://www.glikiazoi.gr>; <http://el.wikipedia.org>).

### **1.3.2. Αντιμικροβιακές ιδιότητες των συστατικών του τζατζικιού**

Μερικά από τα συστατικά του τζατζικιού έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, είτε λόγω της φύσης τους (π.χ. χαμηλό pH και ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του γιαουρτιού), είτε εξαιτίας δραστικών ουσιών που περιέχουν έναντι ορισμένων μικροοργανισμών (π.χ. η αλλισίνη του σκόρδου). Το γεγονός αυτό καθιστά το



συγκεκριμένο προϊόν εξαιρετικά ενδιαφέρον, αφού είναι δυνατόν κάτω από ορισμένες συνθήκες να αποτελεί αφιλόξενο περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης.

Το χαμηλό pH του γιαουρτιού συντελεί, ώστε να αυτοεξυγιαίνεται σύντομα και να μην είναι επικίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου. Έτσι, ο χρόνος επιβίωσης των βρουκελλών στο γιαούρτι είναι σύντομος επειδή καταστρέφονται σύντομα σε pH χαμηλότερο από 5,5, ενώ το όξινο περιβάλλον του δεν επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό και την παραγωγή τοξίνης από τον *Bacillus cereus*. Ο χρόνος επιβίωσης της *Yersinia enterocolitica* εξαρτάται από το μέγεθος του εμβολίου και την ταχύτητα μείωσης του pH, όπως έδειξαν πειράματα σε Ελληνικό γιαούρτι. Η επιβίωση του *Staphylococcus aureus* στο γιαούρτι δεν είναι δυνατή για μεγάλο χρονικό διάστημα, εξαιτίας του χαμηλού pH και της δραστηριότητας της καλλιέργειάς του. Βρέθηκε έτσι, ότι όταν το αρχικό ενοφθάλμισμα είναι χαμηλό ( $10^2$ /ml) ο *Staphylococcus aureus* επιβιώνει για μία ημέρα στους 7° C. Όταν το εμβόλιο είναι  $10^4$ /ml επιβιώνει για 2-4 ημέρες στους 7° C. Ωστόσο επειδή ο *Staphylococcus aureus* δεν βρίσκει ευνοϊκές συνθήκες και δεν πολλαπλασιάζεται στο γιαούρτι, δεν παρατηρείται σχηματισμός τοξίνης, το προϊόν δηλαδή δεν είναι επικίνδυνο για την υγεία του ανθρώπου. Σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε Ελληνικό γιαούρτι αποδεικνύεται ότι ο χρόνος επιβίωσης της *Escherichia coli* εξαρτάται από την αρχική μόλυνση, παρόλο ότι το γιαούρτι αποτελεί δυσμενές περιβάλλον για αυτήν. Όταν ο αρχικός πληθυσμός ξεπερνά τα  $10^3$  cfu/g, το γιαούρτι δεν εξυγιαίνεται νωρίτερα από δύο ημέρες, ακόμα και σε συνθήκες χαμηλού pH και υψηλής οξύτητας (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 2003).

Επίσης γνωστή είναι η αντιβακτηριακή δράση του σκόρδου. Σε in vitro μελέτη παρατηρήθηκε ότι το σκόρδο έχει αντιβακτηριακή δράση έναντι βακτηρίων που απομονώθηκαν από περιοχές λοίμωξης, όπως τα *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* και *Pseudomonas aeruginosa*. Επιπλέον, σε μελέτη για τη δράση του σκόρδου έναντι βακτηριακών ειδών που προσβάλλουν τη στοματική κοιλότητα (περιοδοντικά παθογόνα), όπως ο *Streptococcus mutans* (προκαλεί τερηδόνα) και η *Porphyromonas gingivalis* (προκαλεί ουλίτιδα) ή έναντι ενζύμων τους, διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα σκόρδου εμποδίζει την ανάπτυξη στοματικών παθογόνων

βακτηρίων και τη δράση ορισμένων πρωτεασών των βακτηρίων και συνεπώς μπορεί να έχει θεραπευτική αξία, κυρίως για την περιοδοντίτιδα. Το σκόρδο έχει παρουσιάσει δράση και έναντι του *Helicobacter pylori*, το οποίο είναι συχνά υπεύθυνο για γαστρεντερικές λοιμώξεις στους ανθρώπους. Η αλλισίνη, βασικό συστατικό του θρυμματισμένου φρέσκου σκόρδου, έχει ποικίλες αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η αλλισίνη έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση έναντι μεγάλου εύρους βακτηρίων (Gram θετικών και Gram αρνητικών), συμπεριλαμβανομένων κάποιων ανθεκτικών σε πολλά φάρμακα εντεροτοξικών στελεχών της *Escherichia coli*, ενώ παράλληλα έχει και αντιική δράση. Αξίζει να αναφερθεί ότι εκτός της αντιβακτηριακής και αντιϊκής της δράσης, η αλλισίνη εμφανίζει αντιμυκητιασική δράση, κυρίως έναντι της *Candida albicans* και αντιπαρασιτική δράση, για παράδειγμα έναντι κάποιων ανθρώπινων εντερικών πρωτοζωικών παρασίτων, όπως τα *Entamoeba histolytica* και *Giardia lamblia*. (<http://www.douni.gr>; Leuschner et al., 2002; Eun Kim et al., 2007).

Τα βασικά συστατικά του αιθέριου ελαίου του άνηθου είναι: D-λεμονένιο, καρβόνη, διυδροκαρβόνη (Delaquis et al., 2002). Στη μελέτη των Tian et al. (2011) το αιθέριο έλαιο του άνηθου (*Anethum graveolens*) έδειξε ιδιαίτερη αντιμυκητιακή δράση κατά όλων των μυκήτων της έρευνας (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* και *Alternaria alternata*). Ακόμη τα βακτήρια *Pseudomonas fragi*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και ο σακχαρομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* αναχαιτίστηκαν από το αιθέριο έλαιο του άνηθου (Delaquis et al., 2002).

### **1.3.3. Μικροχλωρίδα της παραδοσιακής σαλάτας τζατζίκι**

Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω το κύριο συστατικό στο τζατζίκι είναι το γιαούρτι. Η αλλοίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το γιαούρτι και το τυρί, οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη των ζυμών και μυκήτων. Η ανάπτυξη των ζυμών σε γιαούρτι σχετίζεται με την ικανότητα αυτών των ειδών να αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψυγείου, να ζυμώνουν τη λακτόζη και σακχαρόζη και να παράγουν λιπολυτικά και πρωτεολυτικά ένζυμα που υδρολύουν το λίπος και την πρωτεΐνη του γάλακτος. *Candida spp.* και *Kluyveromyces spp.* είναι οι κύριες ζύμες που απομονώνονται από το γιαούρτι (Fleet, 1992). Ποσοστό 33,3% δειγμάτων

γιαουρτιού, που προέρχονται από αγορές Αθηνών και Θεσσαλονίκης, βρέθηκαν μολυσμένα με ζύμες. Τα μισά από τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν παραδοσιακά και τα υπόλοιπα τυποποιημένα με ή χωρίς φρούτο. Απομονώθηκαν σπορογόνες ζύμες των γενών *Kluyveromyces* (*Kl. bulgaricus*, *Kl. lactis*, *Kl. veronae* και *Kluyveromyces sp.*) και *Hansenula* (*H. anomala*) και άσπορες ζύμες των γενών *Candida* (*C. pseudotropicalis*, *C. langeronii*, *C. intermedia*, *Candida sp.*), *Torulopsis* (*T. sphaerica*, *T. mogii*, *T. castellii*, *Torulopsis sp.*) *Rhodotorula* (*R. rubra*, *R. pallida*). Βρέθηκε επίσης ότι το περιβάλλον των γιαουρτιών (χαμηλό pH) ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των ζυμών, με αποτέλεσμα την εκδήλωση μερικές φορές σφαλμάτων, όπως φούσκωμα, αποβολή ορού και μυρωδιά φρούτου (Λιτοπούλου- Τζανετάκη, 2003). Το τζατζίκι όμως είναι γιαούρτι με σκόρδο, αγγουράκι κι άνηθο. Τα πρόσθετα λαχανικά στο προϊόν είναι δυνατόν να ενισχύουν την ανάπτυξη των ζυμών. Οι Suriyarachchi και Fleet (1981) αναφέρουν ότι η εισαγωγή φρούτων στο γιαούρτι ενισχύει την αλλοίωση του από ζύμες, επειδή προσθέτουμε στο προϊόν επιπρόσθετη πηγή μόλυνσης (φρούτα) και ζυμώσιμα υποστρώματα για τις ζύμες. Για να καταπολεμηθούν λοιπόν οι ζύμες και μύκητες που αλλοιώνουν το γιαούρτι χρησιμοποιούνται συντηρητικά, όπως το σορβικό κάλιο. Σήμερα, όμως, οι καταναλωτές προτιμούν στα τρόφιμα φυσικά συντηρητικά αντί των συμβατικών χημικών συντηρητικών. Άλλωστε σε πολλές χώρες (π.χ. Καναδάς) δεν επιτρέπεται η χρήση συνθετικών συντηρητικών στο γιαούρτι (Penney et al., 2004).

Μόλυνση του γιαουρτιού μετά τη θερμική κατεργασία του γάλακτος από διάφορες πηγές έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία κολοβακτηριοειδών σε μεγάλο ποσοστό των δειγμάτων, όπως έδειξαν αποτελέσματα έρευνας σε γιαούρτια της αγοράς της Θεσσαλονίκης. Ποσοστό 46,5% των θετικών δειγμάτων περιείχε *Escherichia coli* I, που παρουσίαζε την μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των απομονώσεων. Κατά σειρά συχνότητας βρέθηκαν επίσης στελέχη *A. aerogenes*, *Irregular*, *Intermediate* και *Irregular I*. Το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών δειγμάτων παρατηρήθηκε το Φθινόπωρο και το Καλοκαίρι. Σε παρόμοια έρευνα σε γιαούρτια της Αθήνας βρέθηκε το 30% των δειγμάτων μολυσμένα με κολοβακτηριοειδή και 24% με *Escherichia coli* I. Πολύ μικρό ποσοστό δειγμάτων ήταν μολυσμένα με *Escherichia coli* II (4%), *Klebsiella* (3%), *Cloaca* (1%) και άτυπα στελέχη (1%) (Λιτοπούλου- Τζανετάκη, 2003). Επιπλέον, οι έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες

έχουν ενοχοποιηθεί στο παρελθόν για επιμόλυνση με παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι Gombas et al. (2003) ανέφεραν ότι το 2,36% και 4,70% των έτοιμων σαλατών (δηλαδή πατατοσαλάτα, τονοσαλάτα, σαλάτα ζυμαρικών και λαχανοσαλάτα) και σαλάτες με θαλασσινά, αντίστοιχα, ήταν μολυσμένα με *L. monocytogenes* με επίπεδα που κυμαίνονταν από 0,04 με 10 cfu/g. Στη Βελγική αγορά λιανικής, η *L. monocytogenes* απομονώθηκε από το 20,8% των σαλατών με ζαμπόν, το 26,9% των σαλατών με κοτόπουλο, και το 27,3% των σαλατών με θαλασσινά, με συνολική συχνότητα εμφάνισης 21,3% σε σαλάτες με βάση την μαγιονέζα (Uyttendaele et al. , 1999).

---

#### 1.4. Συσκευασία

---

Η συσκευασία αποτελεί βασικό τμήμα της επεξεργασίας και συντήρησης των τροφίμων καθώς η αποτελεσματικότητα των περισσότερων μεθόδων διατήρησης εξαρτάται από την καταλληλότητα της συσκευασίας. Για παράδειγμα, η κατάλληλη συσκευασία αποτρέπει την επιμόλυνση των θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων ή την πρόσληψη υγρασίας από αφυδατωμένα τρόφιμα. Επιπλέον συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της ποιότητας και στην παράταση της διάρκειας ζωής των νωπών τροφίμων όπως φρούτων, λαχανικών, αυγών, κρεάτων και ψαριών καθώς και επεξεργασμένων προϊόντων όπως ειδών αρτοποιίας, γαλακτοκομικών προϊόντων, ποτών αλκοολούχων και μη και αναψυκτικών (Αρβανιτογιάννης και Μποσνεα, 2001).

Ως Συσκευασία Τροφίμων ορίζεται το σύνολο των δραστηριοτήτων που περιλαμβάνουν το σχεδιασμό, την κατασκευή και την τοποθέτηση του προϊόντος σε κατάλληλο περιέκτη, ο οποίος: (1) περιέχει το προϊόν σε σχετικά μικρές ποσότητες, που είναι εμπορεύσιμες στη λιανική αγορά, χωρίς να αλληλεπιδρά με αυτό κατά τρόπο που να επηρεάζει αρνητικά την υγιεινή του κατάσταση και τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά, (2) προστατεύει το τρόφιμο από παράγοντες του περιβάλλοντος, εσκεμμένη νοθεία και διασφαλίζει τη γνησιότητά του, (3) προβάλλει την ιδιαιτερότητα του προϊόντος και προσελκύει την προσοχή του καταναλωτή, (4) πληροφορεί τον καταναλωτή για το προϊόν, (5) διευκολύνει την εμπορία του

προϊόντος και (6) παρέχει άνεση στον καταναλωτή και συμβάλλει στη διαχείριση των στερεών αποβλήτων με τη μικρότερη δυνατή επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Η συσκευασία τροφίμων είναι ένας πολύ δυναμικός κλάδος της κάθε βιομηχανίας ο οποίος συνεχώς εξελίσσεται. Τα υπάρχοντα υλικά συσκευασίας συνεχώς βελτιώνονται και καθημερινά νέα υλικά και μέθοδοι συσκευασίας έρχονται στην επικαιρότητα. Γενικά η συσκευασία βελτιώνει την ποιότητα και την διατηρησιμότητα του εκάστοτε τροφίμου, διευρύνει την αγορά και αυξάνει τα οικονομικά οφέλη της επιχείρησης. Σε όλη αυτή τη διαδικασία η συσκευασία αποτελεί το 'μοντέρνο ρούχο' με το οποίο η κάθε μονάδα παραγωγής επιθυμεί να προβάλλει το προϊόν της, ώστε να βρίσκεται στην επικαιρότητα (Μπλούκας, 2004).

Η ενεργός συσκευασία είναι το επίκεντρο των σύγχρονων μελετών σχετικά με τη συσκευασία τροφίμων. Οι Scannell et al. (2000) μελέτησαν την συσκευασία τυριού Cheddar με λεπτά φύλλα κυτταρίνης εμποτισμένα με νισίνη. Οι Hanusova et al. (2010) σε έρευνα που διεξήγαν, χρησιμοποίησαν πολυμερή υλικά συσκευασίας εμποτισμένα με νισίνη και ναταμυκίνη στην εσωτερική τους πλευρά, προκειμένου να συσκευάσουν διάφορα τυριά της χώρας τους. Οι Pintado et al. (2010) βρήκαν ότι υλικό συσκευασίας στο οποίο είχε ενσωματωθεί νισίνη, ναταμυκίνη και μαλικό οξύ, εμπόδισε την ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στην επιφάνεια τυριού. Επιπλέον, η λυσοζύμη είναι ένα ένζυμο που συνήθως προστίθεται στα υλικά συσκευασίας των τροφίμων ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Han, 2000; Mecitoglu et al., 2006; Park et al., 2004). Οι Quintavalla και Vicini (2002) αναφέρουν την χρήση χιτοζάνης, γαλακτικού, προπιονικού και βανζοϊκού οξέος, σορβικών, νισίνης και λυσοζύμης σε υλικά ενεργού συσκευασίας για κρέας και προϊόντα κρέατος. Τέλος, η ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε φρέσκιες φράουλες (Aday και Caner, 2012), αντίδια (Charles et al., 2008), ντομάτες (Charles et al., 2003), ψωμί (Latou et al., 2010), φιλέτα πέστροφας (Mexis et al., 2009), κοτόπουλο (Mexis et al., 2012), ταραμοσαλάτα (Mexis et al., 2009) κ.α., αυξάνοντας τον χρόνο ζωής των προϊόντων και βελτιώνοντας τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά.

#### 1.4.1. Συσκευασία υπό κενό

Η σύνθεση του αέρα είναι 78,8% άζωτο, 20,96% οξυγόνο και 0,035% διοξείδιο του άνθρακα, ενώ σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις απαντούν άλλα αέρια καθώς και υδρατμοί σε μεταβαλλόμενη συγκέντρωση. Η πλήρης απομάκρυνση του αέρα από το περιβάλλον ενός συσκευασμένου προϊόντος, χωρίς την αντικατάστασή του από άλλα αέρια, χαρακτηρίζεται ως συσκευασία υπό κενό. Κατά τη συσκευασία των τροφίμων υπό κενό επιδιώκεται η κατά το δυνατόν πλήρης απομάκρυνση του αέρα από το προϊόν. Η παρουσία του οξυγόνου επηρεάζει αρνητικά την ποιότητα και συνεπώς και την διάρκεια συντήρησης των προϊόντων (Μπλούκας, 2004). Συγκεκριμένα, η συσκευασία υπό κενό, είναι η συσκευασία στην οποία το τρόφιμο τοποθετείται σε υλικό συσκευασίας, το οποίο έχει χαμηλή διαπερατότητα στο οξυγόνο, ενώ κατά τη σφράγιση του περιέκτη με θερμοσυγκόλληση απομακρύνεται ο αέρας από το εσωτερικό της συσκευασίας, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης των αερόβιων βακτηρίων και την ελάττωση της αλλοίωσης λόγω οξείδωσης (Robertson, 1993). Σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, η αερόβια βακτηριακή αλλοίωση αναστέλλεται μερικώς ή ολικώς σε υποστρώματα με χαμηλό pH (<5,8), συνεπώς με την συσκευασία υπό κενό μπορεί να επιτευχθεί παράταση του χρόνου ζωής τροφίμων με χαμηλό pH (Gill, 1990).

**Πίνακας 2:** Πλαστικά υλικά που χρησιμοποιούνται για τη συσκευασία τροφίμων υπό κενό (Mullan και McDowell, 2003)

Υλικό	Εφαρμογή
UPVC (unplasticized PVC)/PE	Θερμομορφοποιημένο δισκίο
PET/ PE	Θερμομορφοποιημένο δισκίο
PS/ EVOH/ PE	Θερμομορφοποιημένο δισκίο
PET/ EVOH/ PE	Θερμομορφοποιημένο δισκίο
PVdC coated PP/ PE	Καλυπτικό φιλμ (lidding film)
PVdC coated PET/ PE	Καλυπτικό φιλμ (lidding film)
PA/PE	Καλυπτικό φιλμ (lidding film)
PA/PE	Φιλμ περιτυλίγματος (flow wrap film)
PA/ionomer	Φιλμ περιτυλίγματος (flow wrap film)
PA/ EVOH/ PE	Φιλμ περιτυλίγματος (flow wrap film)
PET	Προμορφοποιημένο δισκίο
PP	Προμορφοποιημένο δισκίο
UPVC/ PE	Προμορφοποιημένο δισκίο

Για την συσκευασία των τροφίμων υπό κενό, χρησιμοποιούνται εύκαμπτα και ημιεύκαμπτα πλαστικά, καθώς και πολυστρωματικά υλικά (Πίνακας 2). Τα πιο συνήθη πλαστικά που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία εύκαμπτων πλαστικών φύλλων και φαίνονται στον Πίνακα 2, είναι το πολυαιθυλένιο (PE) το οποίο δεν είναι καλός φραγμός στο O<sub>2</sub>, αλλά λόγω της υδρόφοβης φύσης του αποτελεί πολύ καλό φραγμό στους υδρατμούς, το πολυπροπυλένιο (PP) το οποίο έχει παρόμοιες ιδιότητες με το PE, το πολυστυρόλιο (PS) με χαμηλή διαπερατότητα στα αέρια, όχι όμως και στους υδρατμούς, το πολυαμίδιο (PA) που έχει χαμηλή διαπερατότητα στα αέρια, αλλά απορροφά υγρασία, ο πολυαιθυλενο-τερεφθαλικός εστέρας (PET) με πολύ χαμηλή διαπερατότητα στο O<sub>2</sub> και το CO<sub>2</sub>, η αιθυλενοβυνυλική αλκοόλη (EVOH) που αποτελεί άριστο υλικό υψηλού φραγμού στο O<sub>2</sub>, το πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) με ικανοποιητική στεγανότητα στην υγρασία και χαμηλή διαπερατότητα στο O<sub>2</sub> και το πολυβινυλιδενοχλωρίδιο (PVdC).

Η συσκευασία υπό κενό επιτυγχάνεται τοποθετώντας αρχικά τα τρόφιμα σε πλαστικές σακούλες, κατόπιν απομακρύνεται ο αέρας με ειδικό κλειστικό μηχάνημα και τελικά οι σακούλες κλείνονται με θερμοσυγκόλληση. Από μικροβιολογική άποψη, η πιο σημαντική επίδραση της επεξεργασίας αυτής είναι η μεταβολή του αέριου περιβάλλοντος του προϊόντος (Jay, 1996). Κάτω από ικανοποιητικό κενό η ποσότητα του O<sub>2</sub> ελαττώνεται σε τιμές <1% (Αρβανιτογιάννης, 2001). Παρόλο που δεν απομακρύνεται όλο το οξυγόνο πριν το σφράγισμα των περιεκτών, ποσοστό αυτού που παραμένει καταναλώνεται από την αερόβια μικροχλωρίδα και το ίδιο το προϊόν, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων του CO<sub>2</sub>, το οποίο συντελεί στην αναστολή της ανάπτυξης της μικροχλωρίδας (Robertson, 1993). Οι σχετικές αναλογίες των CO<sub>2</sub> και O<sub>2</sub> στην μήτρα του τροφίμου συσκευασμένου σε κενό ελέγχονται από τον βαθμό διαπερατότητας του υλικού συσκευασίας στα αέρια (Jay, 1996). Όταν ένα τρόφιμο συσκευάζεται σε υλικό συσκευασίας με υψηλή διαπερατότητα στα αέρια, η ανάπτυξη των *Pseudomonas spp.* αυξάνεται με την αύξηση της διαπερατότητας. Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιούνται υλικά με πολύ χαμηλή διαπερατότητα στα αέρια, ευνοείται η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, εξαιτίας των αυξημένων επιπέδων του CO<sub>2</sub> (Seideman and Durand, 1983). Αυτοί οι μικροοργανισμοί επηρεάζουν το pH και δημιουργούν ένα περιβάλλον το οποίο δεν είναι ευνοϊκό για τους παθογόνους μικροοργανισμούς και τα Gram- αρνητικά βακτήρια (Jay, 1996). Τόσο το CO<sub>2</sub>, όσο και

το χαμηλό ποσοστό O<sub>2</sub>, μειώνει την ανάπτυξη των *Pseudomonas* και των δυνητικά αναερόβιων βακτηρίων που επικρατούν: Οξυγαλακτικά Βακτήρια, *B. thermosphacta* και *Enterobacteriaceae*. Το O<sub>2</sub> στο μικρό όγκο του υπολειπόμενου αέρα στην συσκευασία υπό κενό, καταναλώνεται αμέσως κατά την αναπνοή του τροφίμου με αποτέλεσμα την πτώση της μερικής πίεσης του O<sub>2</sub> στην επιφάνειά του (Robertson, 1993).

Τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την χρήση της συσκευασίας υπό κενό είναι ότι απαιτείται λιγότερος χώρος για την μεταφορά και την αποθήκευση των συσκευασμένων προϊόντων, απαιτείται λιγότερο υλικό συσκευασίας, και εκτός του ότι συντελεί στην παράταση του χρόνου ζωής πολλών προϊόντων, βοηθά και στην διατήρηση της τρυφερότητάς τους, κυρίως των κρεάτων (Robertson, 1993).

#### **1.4.2. Ενεργός συσκευασία**

Η ενεργός συσκευασία αλληλεπιδρά με το προϊόν ή με τον ελεύθερο χώρο μεταξύ της συσκευασίας και του τροφίμου, για να βελτιώσει την ποιότητα και την ασφάλεια του εκάστοτε συσκευασμένου τροφίμου (Appendini και Hotchkiss, 2002). Μέχρι το 2004 στην Ευρώπη υπήρχε νομοθετική έλλειψη για τη χρήση αυτής της συσκευασίας, κάτι που διορθώθηκε με τις κοινωτικές οδηγίες 1935/2004/EC και 450/2009/EC κι έτσι άρχισε η ευρεία χρήση της συσκευασίας αυτής (Restuccia et al., 2010). Τα σπουδαιότερα μέχρι σήμερα συστήματα ενεργού συσκευασίας των τροφίμων φαίνονται στον Πίνακα 3.

Στην ενεργό συσκευασία τροφίμων το οξυγόνο που βρίσκεται στον περιέκτη δεσμεύεται με διάφορα συστήματα, γνωστά ως προσροφητές οξυγόνου. Οι προσροφητές οξυγόνου είναι χημικές ουσίες ή ένζυμα που απορροφούν και δεσμεύουν το οξυγόνο από το ελεύθερο διάστημα της συσκευασίας μέσω χημικών αντιδράσεων. Τα σπουδαιότερα χημικά μέσα που χρησιμοποιούνται ως προσροφητές οξυγόνου είναι η σκόνη σιδήρου, το διθειονικό νάτριο, το ασκορβικό οξύ, τα ασκορβικά άλατα και η κατεχόλη, ενώ από τα ένζυμα χρησιμοποιούνται η οξειδάση της γλυκόζης και η καταλάση (Πίνακας 3). Το ασκορβικό οξύ, τα ασκορβικά άλατα και η κατεχόλη είναι οργανικές ουσίες με ισχυρές αναγωγικές ιδιότητες που δεσμεύουν εύκολα το οξυγόνο και οξειδώνονται. Οι προσροφητές αυτοί χρησιμοποιούνται κυρίως σε υγρά προϊόντα στα οποία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί



η σκόνη σιδήρου, επειδή αν διαβραχεί χάνει την ικανότητά της να δεσμεύει οξυγόνο (Μπλούκας, 2004). Τα τρόφιμα στα οποία μπορούν να εφαρμοστούν οι προσροφητές οξυγόνου είναι το ψωμί, το κέικ, τα μπισκότα, η πίτσα, τα ζυμαρικά, διάφορα τυριά, τα προϊόντα κρέατος και ψαριών, ο καφές, τα αφυδατωμένα προϊόντα, τα αναψυκτικά και άλλα. Η επιλογή του κατάλληλου προσροφητή οξυγόνου εξαρτάται από: α) τη φύση του προϊόντος και κυρίως το μέγεθος, το σχήμα και το βάρος, β) τη ενεργότητα του νερού του τροφίμου ( $a_w$ ), γ) την ποσότητα οξυγόνου που είναι διαλυμένη στο τρόφιμο, δ) την αρχική συγκέντρωση οξυγόνου στο ελεύθερο διάστημα της συσκευασίας, ε) τη διαπερατότητα του υλικού συσκευασίας στο οξυγόνο και στ) την επιδιωκόμενη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος (Μπλούκας, 2004).

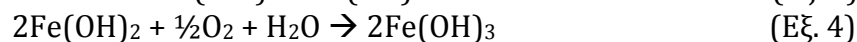
Οι προσροφητές οξυγόνου πρέπει να συνδυάζονται πάντοτε με υλικά συσκευασίας χαμηλής διαπερατότητας σε οξυγόνο προκειμένου να εξασφαλίσουν την συντήρηση του προϊόντος για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αν ο περιέκτης έχει υψηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο, τότε θα προκαλέσει τον γρήγορο κορεσμό του προσροφητή, με αποτέλεσμα να καθίσταται αναποτελεσματικός. Κατά κανόνα, οι πλαστικοί περιέκτες που χρησιμοποιούνται στην ενεργό συσκευασία τροφίμων με προσροφητές οξυγόνου αποτελούνται από πολύφυλλες μεμβράνες με πολύ χαμηλή διαπερατότητα σε οξυγόνο. Για προϊόντα τα οποία θα συντηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα οι μεμβράνες αυτές φέρουν ενδιάμεσο στρώμα από φύλλο αλουμινίου ή μεμβράνη αιθυλενο-βινυλικής αλκοόλης (EVOH) ή πολυβινυλιδενοχλωριδίου (PVDC). Για προϊόντα με μικρότερη διάρκεια συντήρησης το ενδιάμεσο στρώμα που εξασφαλίζει την απαιτούμενη στεγανότητα στο οξυγόνο είναι μεμβράνη Nylon ή πολυτεπεφθαλικού αιθυλεστερά (PET). Οι προσροφητές οξυγόνου εφαρμόζονται στα τρόφιμα με τρεις τρόπους: α) τοποθετημένοι μέσα σε πλαστικό σακουλάκι το οποίο προσαρμόζεται στο ελεύθερο διάστημα της συσκευασίας. β) ενσωματωμένοι σε ετικέτες οι οποίες προσκολλώνται στο εσωτερικό της συσκευασίας. γ) ενσωματωμένοι σε πολύφυλλες μεμβράνες που αποτελούν μέρος της συσκευασίας του προϊόντος, όπως η οξειδάση της γλυκόζης (Μπλούκας, 2004).

**Πίνακας 3:** Συστήματα ενεργού συσκευασίας τροφίμων  
(Μπλούκας, 2004; Restuccia et al., 2010)

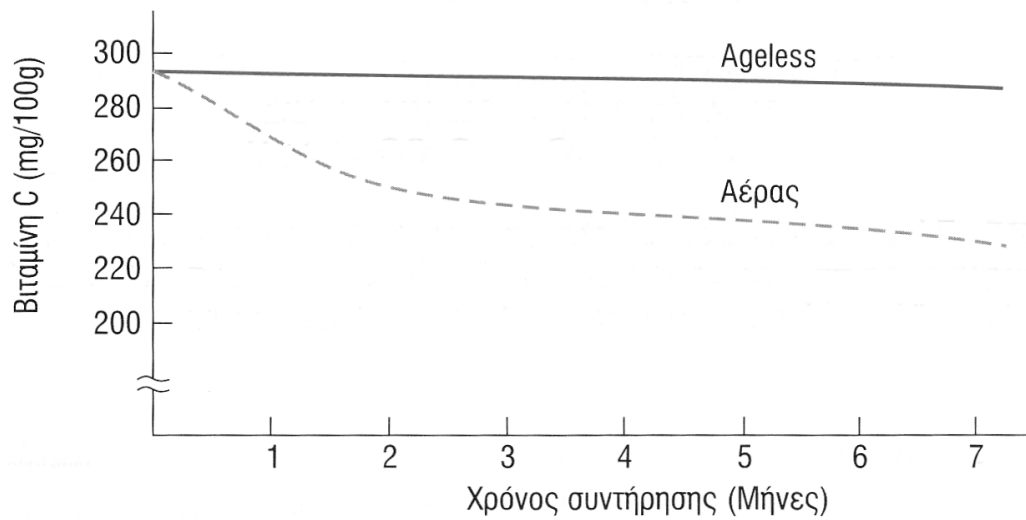
<b>ΣΥΣΤΗΜΑ / ΣΠΟΥΔΑΙΟΤΕΡΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ</b>	<b>ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ</b>
<b>Σύστημα δέσμευσης οξυγόνου</b>	
α. Σκόνη σιδήρου, διθειονικό νάτριο β. Ασκορβικό οξύ/ασκορβικά άλατα γ. Κατεχόλη δ. Οξειδάση της γλυκόζης/καταλάση	Ψωμί, κέικ, τάρτες, μπισκότα, πίτσα, ζυμαρικά, τυρί, προϊόντα κρέατος και ψαριών, καφές, τσάι, πατατάκια, σοκολάτα, καρύδια, αφυδατωμένα προϊόντα, αναψυκτικά, γάλα, μύρρα
<b>Σύστημα δέσμευσης/εκπομπής διοξειδίου του άνθρακα</b>	
α. Οξείδιο ασβεστίου β. Σκόνη σιδήρου/υδροξείδιο ασβεστίου γ. Δικαρβονικό νάτριο δ. Ανθρακικός σίδηρος/καταλύτης αλογόνου	Καφές, νωπά κρέατα και ψάρια, snack foods, αφράτο κέικ
<b>Σύστημα δέσμευσης αιθυλενίου</b>	
α. Υπερμαγγανικό κάλιο β. Ενεργός άνθρακας γ. Ορυκτά σε σκόνη (ζεόλιθος κ.α.)	Φρούτα, λαχανικά και λοιπά οπωροκηπευτικά προϊόντα
<b>Σύστημα απελευθέρωσης συντηρητικών</b>	
α. Οργανικά οξέα, αιθανόλη β. Εκχυλίσματα βοτάνων γ. Αντιοξειδωτικά BHA, BHT, Βιταμίνη E δ. Πτητικό ClO <sub>2</sub> / SO <sub>2</sub>	Δημητριακά, κρέατα, ψάρια, ψωμί, τυρί, φρούτα και λαχανικά, πρόχειρα φαγητά (snack), πίτσα, κέικ, ψωμί, μπισκότα
<b>Σύστημα απορρόφησης υγρασίας</b>	
α. Πάνες κυτταρίνης β. Γη διατομών, Πηκτή πυριτίου κ,ά, γ. Προπυλενική γλυκόλη	Ψάρια, κρέατα, πουλερικά, πρόχειρα φαγητά, δημητριακά, σάντουιτς, φρούτα και λαχανικά
<b>Σύστημα απορρόφησης ουσιών με ανεπιθύμητη οσμή και γεύση</b>	
α. Τριοξική κυτταρίνη β. Άλατα σιδήρου και οργανικών οξέων γ. Αλουμινο-πυριτικός ζεόλιθος δ. Ενεργός άνθρακας/πηλός/ζεόλιθος	Φρούτα, χυμοί φρούτων, πρόχειρα φαγητά, τηγανισμένα, ψάρια, δημητριακά, πουλερικά, προϊόντα γάλακτος
<b>Σύστημα ενζυμικής αποικοδόμησης λακτόζης και χοληστερόλης</b>	
α. Λακτάση β. Αναγωγή της χοληστερόλης	Γάλα, ρευστά προϊόντα πλούσια σε χοληστερόλη
<b>Σύστημα ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας</b>	
α. Πλαστικά με υψηλό πορώδες β. Περιέκτες PET με διπλά τοιχώματα γ. Ασβέστης/νερό δ. Νιτρικό αμμώνιο/χλωριωμένο νερό	Προϊόντα συντηρούμενα με ψύξη, Κοσέρβες αυτοθερμαινόμενες και αυτοψυχόμενες, έτοιμα γεύματα, κρέατα, ψάρια, πουλερικά, αναψυκτικά

Παρά τα συγκριτικά πλεονεκτήματα που έχει η χρήση συστημάτων προσρόφησης οξυγόνου στη συσκευασία τροφίμων, υπάρχει επιφυλακτικότητα εκ μέρους των καταναλωτών για τα συστήματα σε σκόνη μέσα σε σακουλάκι από πιθανή κακή χρήση τους. Ειδικότερα, υπάρχει ο φόβος να σκιστεί το σακουλάκι και να αναμειχθεί το περιεχόμενό του με το προϊόν με πιθανούς κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή. Επίσης, τα συστήματα που χρησιμοποιούν μεμβράνες εμποτισμένες με ένζυμα έχουν μέχρι σήμερα υψηλό κόστος το οποίο κάνει απαγορευτική την ευρεία εφαρμογή τους (Μπλούκας, 2004).

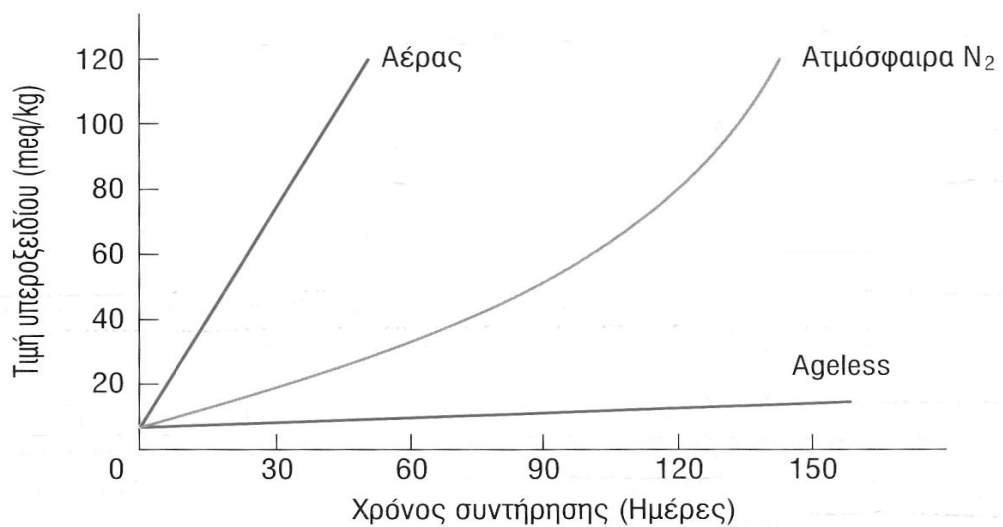
Ο προσροφητής οξυγόνου με την μεγαλύτερη εμπορική επιτυχία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στην Ιαπωνία το 1977 με το εμπορικό όνομα Ageless (Mitsubishii), αυτός είναι και ο προσροφητής οξυγόνου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων της Ιαπωνίας ως εναλλακτική λύση των συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας και κενού για τη συντήρηση των τροφίμων. Θεωρείται μη-τοξική, χωρίς να αφήνει υπολείμματα στο τρόφιμο, μέθοδος συντήρησης τροφίμων κατά των ζυμών και μυκήτων και της αερόβιας βακτηριακής ανάπτυξης (Nakamura & Hoshino, 1983; Grattan & Gilberg, 1994). Αποτελείται από σκόνη σιδήρου μέσα σε σακουλάκι και έχει την ικανότητα να μειώνει τη συγκέντρωση οξυγόνου στο ελεύθερο διάστημα της συσκευασίας σε λιγότερο από 100 ppm. Ο μηχανισμός δέσμευσης του οξυγόνου στηρίζεται στις παρακάτω αντιδράσεις (Μπλούκας, 2004):



Αν είναι γνωστός ο ρυθμός οξειδωσης των συστατικών του τροφίμου και η διαπερατότητα του περιέκτη σε οξυγόνο, τότε μπορεί να υπολογιστεί η ποσότητα της σκόνης σιδήρου η οποία πρέπει να τοποθετηθεί μέσα στο σακουλάκι, ώστε να μειώσει τη συγκέντρωση του οξυγόνου στον περιέκτη στα επιθυμητά επίπεδα και να πετύχει τη συντήρηση του προϊόντος για το καθορισμένο χρονικό διάστημα. Η αποτελεσματικότητα του συστήματος Ageless στη δέσμευση οξυγόνου φαίνεται παραστατικά στα Σχήματα 6 και 7 (Μπλούκας, 2004).



**Σχήμα 6:** Επίδραση του συστήματος Ageless στην περιεκτικότητα βιταμίνης C σε πράσινο τσάι συσκευασμένο σε πλαστικό περιέκτη από πολύφυλλη μεμβράνη προσανατολισμένου Νylon/φύλλου αλουμινίου/ πολυαιθυλενίου και διατηρημένο στους 25°C (Μπλούκας, 2004)



**Σχήμα 7:** Επίδραση του συστήματος Ageless στην τιμή υπεροξειδίου τηγανισμένου κέικ ρυζιού σε σχέση με τη διατήρηση του ίδιου προϊόντος στον αέρα και σε ατμόσφαιρα αζώτου (Μπλούκας, 2004)

---

## 1.5. Ψύξη

---

Ως ψύξη εννοούμε τη διατήρηση των τροφίμων σε περιβάλλον με θερμοκρασίας χαμηλότερες από 15° C και υψηλότερες από το σημείο πήξης του κάθε τροφίμου. Η αρχή στην οποία στηρίζεται η ψύξη ως μέθοδος συντήρησης είναι η επιβράδυνση την οποία επιφέρει στη δράση όλων των παραγόντων που προκαλούν την αλλοίωση στα τρόφιμα. Ειδικότερα η ψύξη επιβραδύνει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών και το ρυθμό των μεταβολικών διεργασιών στους φυτικούς ιστούς, των μεταθανάτιων μεταβολών στους ζωικούς ιστούς, των χημικών αντιδράσεων και των φυσικών μεταβολών, όπως η αφυδάτωση των νωπών προϊόντων. Κατά συνέπεια η ψύξη επιμηκύνει το χρονικό διάστημα που τα τρόφιμα είναι διαθέσιμα για κατανάλωση, δηλαδή το χρόνο συντήρησής τους. Ο χρόνος αυτός εξαρτάται από τη φύση του τροφίμου και τις συνθήκες συντήρησης με ψύξη (Μπλούκας, 2001).

Η ψύξη θεωρείται η κύρια μέθοδος διατήρησης των ευαλλοιώτων προϊόντων και τροφίμων που διατίθενται στον καταναλωτή ως νωπά, π.χ. λαχανικά, φρούτα, κρέας, γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρια. Με την ψύξη επιτυγχάνεται: α) η παράταση του χρόνου συντήρησης των προϊόντων αυτών, β) η διάθεσή τους στην αγορά σε περιόδους που επιτυγχάνονται καλύτερες τιμές για τον παραγωγό ή τον έμπορο, και γ) η μεταφορά τους σε μακρινές περιοχές με αποτέλεσμα τον εφοδιασμό των μεγαλουπόλεων με νωπά προϊόντα. Επίσης η ψύξη αποτελεί α) την κύρια μέθοδο συντήρησης των πρώτων υλών πολλών βιομηχανιών, γεγονός που συνεπάγεται την παράταση του χρόνου λειτουργίας του εργοστασίου με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγικότητας και τη μείωση του κόστους παραγωγής των προϊόντων, β) επικουρική μέθοδο συντήρησης πολλών μεταποιημένων τροφίμων, όπως το παστεριωμένο γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα κ.α., και γ) ενδιάμεσο στάδιο επεξεργασίας πολλών τροφίμων, όπως η παλαίωση του κρασιού. Τέλος, πολλά συσκευασμένα τρόφιμα συντηρούνται με ψύξη μετά το άνοιγμα της συσκευασίας και μέχρι την κατανάλωσή τους, όπως το περιεχόμενο των κονσερβών (Μπλούκας, 2001).

Βακτήρια αρνητικά κατά Gram	Σπουδαιότητα*	Βακτήρια θετικά κατά Gram	Σπουδαιότητα*
<i>Acinetobacter</i>	XX	<i>Bacillus</i>	XX
<i>Aeromonas</i>	XX	<i>Brochothrix</i>	XXX
<i>Alcaligenes</i>	X	<i>Carnobacterium</i>	XXX
<i>Alteromonas</i>	XX	<i>Clostridium</i>	XX
<i>Citrobacter</i>	X	<i>Corynebacterium</i>	X
<i>Enterobacter</i>	XX	<i>Deinococcus</i>	X
<i>Erwinia</i>	XX	<i>Enterococcus</i>	XXX
<i>Escherichia</i>	X	<i>Lactococcus</i>	XX
<i>Flavobacterium</i>	XX	<i>Lactobacillus</i>	XX
<i>Hafnia</i>	XX	<i>Leuconostoc</i>	X
<i>Klebsiella</i>	X	<i>Listeria</i>	XX
<i>Moraxella</i>	XX	<i>Micrococcus</i>	XX
<i>Pantoea</i>	XX	<i>Pediococcus</i>	X
<i>Proteus</i>	X	<i>Propionibacterium</i>	X
<i>Pseudomonas</i>	XXX	<i>Vagococcus</i>	XX
<i>Psychrobacter</i>	XX		
<i>Salmonella</i>	X		
<i>Serratia</i>	XX		
<i>Shewanella</i>	XXX		
<i>Vibrio</i>	XXX		
<i>Yersinia</i>	XX		

**Πίνακας 4:**

Γένη βακτηρίων που περιλαμβάνουν είδη ή στελέχη που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες  $\leq 7^{\circ}\text{C}$  (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2000)

\* Σπουδαιότητα σε ψυχρότροφα βακτήρια:  
 X = μικρή,  
 XX = μεσαία,  
 XXX = πολύ μεγάλη

Η συντήρηση των τροφίμων με ψύξη πρέπει να είναι συνεχής από τη στιγμή της συλλογής ή παραγωγής του προϊόντος μέχρι την χρησιμοποίησή του από τον καταναλωτή. Στην πράξη η συντήρηση πολλών τροφίμων με ψύξη και ιδιαίτερα των επεξεργασμένων τροφίμων περιλαμβάνει τη συντήρησή τους στους ψυκτικούς

θαλάμους παραγωγής, τη μεταφορά τους με μεταφορικό μέσο – ψυγείο, τη διατήρηση με ψύξη στα ψυγεία – βιτρίνες των καταστημάτων πώλησης και τέλος τη διατήρηση με ψύξη στο οικιακό ψυγείο μέχρι την κατανάλωσή τους. Η διάρκεια συντήρησης των προϊόντων με ψύξη θα είναι η μέγιστη δυνατή αν σε όλα τα παραπάνω στάδια της ψυκτικής αλυσίδας το προϊόν διατηρείται κάτω από άριστες συνθήκες (Μπλούκας, 2001).

**Πίνακας 5:** Ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών και των μικροοργανισμών δεικτών (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000)

<b>Μικροοργανισμοί</b>	<b>Θερμοκρασία</b>
<b>Παθογόνοι μικροοργανισμοί</b>	
<i>Bacillus cereus</i>	7
Ψυχρότροφα στελέχη <i>B. cereus</i>	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,7
<i>S. aureus</i> , παραγωγή εντεροτοξίνης	10
Εντεροπαθογόνα στελέχη <i>E. coli</i>	8 έως 10
<i>Clostridium botulinum</i> τύπου A και B	10
<i>Salmonella sp.</i>	5,3
<i>Clostridium perfringens</i>	6,5
<i>Clostridium botulinum</i> τύπου E και ορισμένα στελέχη των τύπων B και F	3,3
<i>Vibrio paraharmolyticus</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	1 έως 3
<b>Μικροοργανισμοί δείκτες</b>	
<i>E. coli</i>	8 έως 10
<i>Klebsiella sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i>	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν αισθητά τη διάρκεια συντήρησης των τροφίμων με ψύξη είναι: α) η θερμοκρασία, β) η σχετική υγρασία, γ) η κυκλοφορία του αέρα, και δ) η σύνθεση της ατμόσφαιρας του ψυκτικού χώρου. Η θερμοκρασία αποτελεί το σπουδαιότερο παράγοντα συντήρησης των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων με ψύξη γιατί επιβραδύνει το ρυθμό όλων των μικροβιολογικών, βιοχημικών, χημικών και φυσικών μεταβολών που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα οι ευνοϊκές επιδράσεις της θερμοκρασίας ψύξης είναι: 1) επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, 2) επιβράδυνση της δραστηριότητας των ενδογενών ενζύμων, 3) επιβράδυνση των απωλειών σε θρεπτικά στοιχεία, 4) επιβράδυνση της οξείδωσης του λίπους, 5) επιβράδυνση των απωλειών σε υγρασία (Μπλούκας, 2001).

Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη και τη δράση των μικροοργανισμών. Όσο μειώνεται η θερμοκρασία μειώνεται ο ρυθμός των βιοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν στα κύτταρα των μικροοργανισμών και με τη συνεχή μείωση της θερμοκρασίας μειώνεται βαθμιαία η δράση των μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται καλά σε χαμηλές θερμοκρασίες ονομάζονται ψυχρόφιλοι. Ψυχρόφιλοι θεωρούνται οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε ένα εύρος θερμοκρασιών από μικρότερες του μηδενός μέχρι 20° C και η άριστη θερμοκρασία τους κυμαίνεται από 12 – 15° C. Ενώ ψυχρότροφοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 0 και 7° C και παράγουν ορατές αποικίες εντός 7- 10 ημερών. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται γένη βακτηρίων που περιλαμβάνουν είδη ή στελέχη που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες  $\leq 7^{\circ}\text{C}$  (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2000). Οι μικροοργανισμοί που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα σε θερμοκρασίες από 0 έως 5° C είναι κυρίως ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί. Τα γένη των βακτηρίων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 περιλαμβάνουν ψυχρότροφα είδη ή στελέχη. Ψυχρότροφα στελέχη μυκήτων ανήκουν στα γένη *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Botrytis* και *Geotrichum*, ενώ από τις ζύμες σε χαμηλές θερμοκρασίες αναπτύσσονται είδη και στελέχη των γενών *Debaryomyces*, *Candida* και *Rhodotorula* (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2000).

Η επίδραση της ψύξης στη μικροχλωρίδα ενός τροφίμου εξαρτάται από το εύρος των θερμοκρασιών ανάπτυξης των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο



τρόφιμο, από τη θερμοκρασία και τη χρονική διάρκεια διατήρησης του τροφίμου. Όσο μειώνεται η θερμοκρασία από την βέλτιστη, μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού και σε ορισμένες περιπτώσεις αναστέλλεται. Σε θερμοκρασίες που πλησιάζουν την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, αυξάνει η περίοδος προσαρμογής του μικροοργανισμού και όσο μειώνεται η θερμοκρασία η διάρκεια της περιόδου προσαρμογής πλησιάζει το άπειρο. Ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών επηρεάζεται πολύ από τη θερμοκρασία. Όσο η θερμοκρασία μειώνεται από την βέλτιστη μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000). Η θερμοκρασία επηρεάζει το είδος των μικροοργανισμών που μολύνουν ένα τρόφιμο και επιφέρει μεταβολές στη μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται στη διάρκεια της επεξεργασίας ή της αποθήκευσης ενός τροφίμου π.χ. σε νωπό γάλα που διατηρείται στους 10° C η μικροχλωρίδα αποτελείται κυρίως από γαλακτικά βακτήρια, ενώ όταν διατηρείται στους 0° C κυριαρχούν τα αρνητικά κατά Gram ψυχρότροφα βακτήρια (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000).

Η ταχεία ψύξη μιας καλλιέργειας μεσόφιλων βακτηρίων από τις συνήθειες θερμοκρασίες ανάπτυξής τους στους 0° C, μπορεί να προκαλέσει καταστροφή ή τραυματισμό ενός ποσοστού των κυττάρων της καλλιέργειας. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και μεταξύ αυτών τα είδη *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella spp.* και *Enterobacter aerogenes* είναι περισσότερο ευαίσθητα στην ψύξη από τους θετικούς κατά Gram μικροοργανισμούς, αν και έχει παρατηρηθεί τραυματισμός των κυττάρων ορισμένων θετικών κατά Gram μικροοργανισμών, όπως του *Bacillus subtilis* και του *Clostridium perfringens* κατά τη διάρκεια της ταχείας ψύξης τους. Οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί είναι λιγότερο ευαίσθητοι στην ψύξη (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000).

Η καταστροφή των κυττάρων των μικροοργανισμών στη διάρκεια της ψύξης εξαρτάται από το υπόστρωμα στο οποίο έχει αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός (παρατηρήθηκε ότι όσο περισσότερα θρεπτικά συστατικά περιέχει το τρόφιμο τόσο πιο ανθεκτικά είναι τα κύτταρα του μικροοργανισμού στην επίδραση της ψύξης), τη φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα του μικροοργανισμού, τον χρόνο παραμονής των κυττάρων του μικροοργανισμού σε χαμηλές θερμοκρασίες, τη συγκέντρωση των κυττάρων του μικροοργανισμού. Κατά την ψύξη των τροφίμων μπορεί να τραυματιστούν τα κύτταρα των ευαίσθητων στην ψύξη μικροοργανισμών

π.χ. *E. coli* και *Salmonella*, σε βαθμό που να μην μπορούν να επαναδραστηριοποιηθούν όταν βρεθούν σε κατάλληλο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000).

Οι περισσότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι μεσόφιλοι και εκτός από ορισμένες εξαιρέσεις αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες ψύξης. Οι ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης των μικροοργανισμών που αναφέρονται στον Πίνακα 5 ισχύουν μόνο όταν οι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών έχουν την άριστη τιμή τους, επειδή μικρή μείωση, από την βέλτιστη τιμή, της ενεργότητας νερού ή του pH συνεπάγεται σημαντική αύξηση της θερμοκρασίας στην οποία παρατηρείται ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Οι ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης που αναφέρονται στον Πίνακα 5 είναι πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν με βέλτιστες πειραματικές συνθήκες. Στα τρόφιμα οι ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης των παθογόνων και των δεικτών μικροοργανισμών είναι ψηλότερες (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000).

---

## 1.6. Συντηρητικές Ουσίες Τροφίμων

---

Ως συντηρητικές ουσίες τροφίμων ή απλά συντηρητικά χαρακτηρίζονται οι ουσίες εκείνες οι οποίες μπορούν να επιβραδύνουν, να αναστείλουν ή να εμποδίσουν την πορεία μιας ζύμωσης, οξύνισης ή άλλης μικροβιακής αλλοίωσης των τροφίμων. Διακρίνονται σε: α) χημικά συντηρητικά και β) φυσικά ή εδώδιμα συντηρητικά (π.χ. χλωριούχο νάτριο, ξύδι κ.α.). Με την προσθήκη ενός ή παραπάνω συντηρητικών στο τρόφιμο, πέραν της βελτίωσης της ικανότητας του για συντήρηση, συνεπάγεται και βελτίωση της γεύσης, της οσμής, της υφής καθώς επίσης και της εμφάνισής του. Τα χημικά συντηρητικά ανήκουν σε μία μεγάλη τάξη ουσιών, την τάξη των προσθέτων τροφίμων ή χημικών προσθέτων. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρεμπόδιση της αλλοίωσης των τροφίμων από τη δράση των μικροοργανισμών. Λόγω ενδοιασμών ως προς την τοξικότητα των συντηρητικών στην υγεία των ανθρώπων, ακόμα και αν αυτά συμπεριλαμβάνονται στον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, προτιμώνται οι υπόλοιπες μέθοδοι συντήρησης (π.χ. ψύξη, συσκευασία κ.α.). Πολλές φορές όμως καθίσταται επιβεβλημένη η χρησιμοποίηση αυτών, σε συνδυασμό με

άλλες μεθόδους συντήρησης, δεδομένου ότι η αποτελεσματικότητα πολλών από αυτές δεν είναι πλήρης, αλλά μερική. Ένα ιδανικό συντηρητικό οφείλει να ικανοποιεί τις παρακάτω προϋποθέσεις: α) να παρατείνει ουσιωδώς τη μέση ζωή του τροφίμου στο οποίο προστίθεται, β) να είναι απολύτως ασφαλές για τους καταναλωτές και όταν χρησιμοποιείται για μεγάλες χρονικές περιόδους σε ποσότητες ικανές να διατηρήσουν το τρόφιμο, γ) να μην προσδίδει ανεπιθύμητη οσμή, χρώση, γεύση ή υφή στο τρόφιμο, δ) να μην υποβοηθά την εξαπάτηση των καταναλωτών ως προς την ποιότητα του τροφίμου, ε) να αποτελεί ένα οικονομικό μέσον συντήρηση των τροφίμων, στ) να μπορεί να ανιχνευτεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά με την ανάλυση του τροφίμου, ζ) να είναι δραστικό σε μικρές συγκεντρώσεις και η) να είναι σταθερό ώστε να μη διασπάται από τον οργανισμό σε άλλα σώματα μεγαλύτερης ενδεχομένως τοξικότητας (Κοντομηνάς και Ρηγανάκος, 2007).

Τα φυσικής προέλευσης “συντηρητικά” περιλαμβάνουν τα αιθέρια έλαια φυτών, το ένζυμο λακτοπεροξυδάση του γάλακτος, την αντιμικροβιακή ουσία αλλισίνη (που βρίσκεται στα σκόρδα και τα κρεμμύδια), τις βακτηριοσίνες (λυσοζύμη, νισίνη κ.α), τους σαπωνίνες και τα φλαβονοειδή (βότανα και μπαχαρικά) και τη χιτοζάνη. Μάλιστα η χρήση των παραπάνω αντιμικροβιακών παραγόντων έχει ενισχυθεί τα τελευταία χρόνια χάρη στην αποτελεσματικότητά τους έναντι των μικροοργανισμών. Τα περισσότερα χημικής μορφής συντηρητικά έχουν χαρακτηριστεί διεθνώς από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ ως «εν γένει αναγνωρισμένα ασφαλή συστατικά» και τυγχάνουν ευρείας χρήσης στη Βιομηχανία Τροφίμων. Ωστόσο κάποια από αυτά όπως τα νιτρώδη άλατα (πρόδρομες ουσίες καρκινογόνων παραγόντων), τα οξείδια του αιθυλενίου και του προπυλενίου (μεταλλαξιγόνα) έχουν δημιουργήσει ανησυχίες, διότι υπάρχουν ενδείξεις ότι οι συγκεκριμένες χημικές ενώσεις είναι επιβλαβείς για την ανθρώπινη υγεία. Έτσι, τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτές δείχνουν συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για προϊόντα τροφίμων στα οποία έχουν προστεθεί αντιμικροβιακοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως φυσικοί, σε αντίθεση με τα χημικά συντηρητικά και πρόσθετα που χρησιμοποιούν οι βιομηχανίες τροφίμων (Rybka-Rodgers, 2001). Ωστόσο, οι φυσικοί αντιμικροβιακοί έχουν περιορισμένο φάσμα δράσης και είναι ιδιαίτερα δραστικοί όταν προστεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις, για το λόγο αυτό είναι αποτελεσματικότεροι όταν χρησιμοποιούνται

σε συνδυασμούς (Sofos *et al.*, 1998). Βέβαια πριν την εφαρμογή των αντιμικροβιακών παραγόντων θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανή μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων στα οποία προστίθενται καθώς και η αλληλεπίδραση τους με συστατικά του τροφίμου η οποία δύναται να μειώσει την αποτελεσματικότητά τους (Devlieghere *et al.*, 2004).

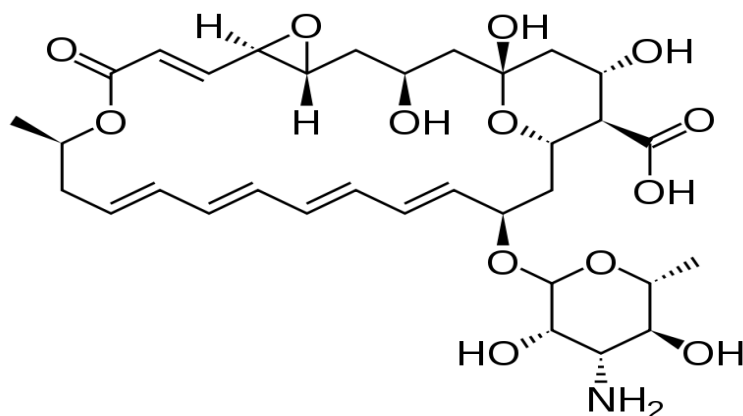
Στην βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές έρευνες τα τελευταία χρόνια που αναφέρουν την χρήση 'φυσικών' αντιμικροβιακών ουσιών (όπως η νισίνη, τα αιθέρια έλαια, η λυσοζύμη, η χιτοζάνη, η ναταμυκίνη, το εκχύλισμα εσπεριδοειδών - Citrox κ.α.) στα τρόφιμα. Η χρήση της νισίνης σε τρόφιμα (π.χ. γάλα, τυρί, προϊόντα αρτοποιίας, κέτσαπ, κονσερβοποιημένα λαχανικά και φρούτα καθώς και σε χυμούς αυτών, σε σούπες, ελιές, παστεριωμένα υγρά αυγά και κρέατα) απέδειξε τη δράση της έναντι των βακτηρίων *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus cereus* και *Bacillus subtilis* (Roberts *et al.*, 1992; Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000; Schillinger *et al.*, 2001; Kuwano *et al.*, 2005; Moosavy *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008). Τα αιθέρια έλαια όταν εφαρμόστηκαν σε τρόφιμα (κόκκινο κρέας, κοτόπουλο, συκώτι, ψάρι, γιαούρτι, τυρί κ.α.) έδειξαν δραστηριότητα έναντι των βακτηρίων *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Cambylobacter jejuni*, *Vibrio parahaeomolyticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* και *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* καθώς και σε ζύμες/μύκητες όπως π.χ. *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* (Tassou *et al.*, 1995; Hao *et al.*, 1998; Tsigarida *et al.*, 2000; Mejlholm και Dalgaard, 2002; Smith- Palmer *et al.*, 2001; Burt 2004; Benchaar *et al.*, 2008; Tsiraki και Savvaidis, 2011; Papazoglou *et al.*, 2012). Το ένζυμο λυσοζύμη χρησιμοποιείται ως συντηρητικό στα τυριά, τα θαλασσινά, τα φρούτα και τα λαχανικά, τη μπύρα και τα κρασιά (Losso *et al.*, 2000) και είναι δραστική έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων και ιδιαίτερα των θερμόφιλων βακτηρίων τα οποία σχηματίζουν σπορογόνες μορφές (James and Simpson, 1996), ενώ τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι ανθεκτικά στη δράση της λυσοζύμης (Mecitoglu *et al.*, 2006). Η χρήση των ναταμυκίνης, χιτοζάνης και του

εκχυλίσματος εσπεριδοειδών- Citrox στα τρόφιμα, καθώς και η αντιμικροβιακή τους δράση, αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω.

### 1.6.1. Ναταμυκίνη

Η ναταμυκίνη ή πυμαρισίνη ή πιμαρακίνη (Εικόνα 14), είναι μυκητοκτόνο που παράγεται από τον *Streptomyces natalensis* που χρησιμοποιείται συνήθως σε τρόφιμα για τον έλεγχο της αλλοίωσης τους από μύκητες (Reps et al., 2002). Στο εμπόριο πωλείται ως σκόνη με λευκό- υπόλευκο χρώμα (Thomas et al., 2003). Κατατάσσεται στις αντιμικροβιακές ουσίες και πιο συγκεκριμένα στις ουσίες που δρουν ενάντια στις ζύμες - μύκητες, και αντιστοιχεί στον κωδικό E235. Η παραγωγή της ναταμυκίνης γίνεται με αερόβια ζύμωση του βακτηρίου για αρκετές ημέρες και το αντιβιοτικό απομονώνεται είτε από τον ζωμό ζυμώσεως, είτε με απόσταξη του μικκυλίου. Ο χημικός της τύπος είναι  $C_{33}H_{47}O_{13}N$  και έχει μοριακό βάρος 665,725 g/mol. Η σταθερότητα της επηρεάζεται από την έκθεση της στην υπεριώδη ακτινοβολία, στις ακραίες τιμές pH, υπεροξειδία, οξειδωτικά μέσα, χλωρίνη και βαρέα μέταλλα. Έχει πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό καθώς και στους περισσότερους από τους οργανικούς διαλύτες, εξαιτίας της αμφιφιλικής φύσης του μορίου της. Τα ουδέτερα υδατικά εναιωρήματα της είναι σχετικά θερμοανθεκτικά (50–100 °C). Δρα σε pH μεταξύ 3 και 9, εμφανίζοντας άριστη δράση σε pH 5-7. Είναι αποτελεσματική ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις, ενώ ενδεικτικό είναι ότι συγκεντρώσεις <10 ppm είναι αρκετές να αναχαιτίσουν την ανάπτυξη των περισσότερων ζυμών και μυκήτων ([www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com); [www.danisco.com](http://www.danisco.com); Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2008).

Η ανάπτυξη ορισμένων ζυμών - μυκήτων δε μπορεί πάντα να ελεγχθεί με τη χρήση κοινών αντιμικροβιακών ουσιών όπως είναι τα σορβικά. Για παράδειγμα, μερικά είδη του γένους *Penicillium* τα οποία έχουν απομονωθεί από τυριά, είναι ικανά να αναπτυχθούν παρουσία σορβικού καλίου σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 7100 μg /ml (Marth et al., 1996) και 12,000 μg /ml (Finol et al., 1982). Η ναταμυκίνη εμφανίζεται στη βιβλιογραφία πιο αποτελεσματική απ' ότι το σορβικό κάλιο όσον αφορά τον έλεγχο του σχηματισμού μυκήτων στα τυριά (De Ruig & Van den Berg, 1985; Pugazhenti et al., 1999).



**Εικόνα 14:** Χημική δομή ναταμυκίνης ([www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com))

Γενικά, ποσότητες μεταξύ 5 και 20 ppm εμποδίζουν την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων. Σε γενικές γραμμές η ναταμυκίνη μπορεί να θεωρηθεί ως «φυσική» αντιμικροβιακή ουσία, μυκητοστατική και μυκητοκτόνος, χωρίς δράση επί των βακτηρίων, η οποία δεν μεταφέρεται στη μάζα του προϊόντος, άοσμη, άγευστη και τέλος, αποτελεσματική σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1-40 ppm). Αντιθέτως, τα σορβικά θεωρούνται χημικά πρόσθετα, μυκητοστατικά, βακτηριοκτόνα, τα οποία εισχωρούν στη μάζα του τροφίμου προσδίδοντας του πικρή γεύση. Επιπλέον, τα σορβικά είναι αποτελεσματικά σε μεγάλες συγκεντρώσεις (1000-2000 ppm) ([www.danisco.com](http://www.danisco.com)). Ειδικά η ναταμυκίνη παρουσιάζει βασικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα σορβικά, δεδομένου ότι εξακολουθεί να εντοπίζεται στην επιφάνεια των προϊόντων που εφαρμόζονται, δεν εξαρτάται από χαμηλό pH για τη δραστηριότητά του, και τελικά δεν έχει καμία επίδραση στην βακτηριακή μικροχλωρίδα σημαντική για την ζύμωση και την ωρίμανση των εν λόγω προϊόντων (Adams και Moss, 2008). Τα πλεονεκτήματα της χρήσης ναταμυκίνης έναντι άλλων ουσιών είναι: (α) η ευρείας κλίμακας αντιμυκητιακή της δράση, (β) δραστική σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1 - 40 ppm) και σε ευρύ φάσμα pH (  $3 < \text{pH} < 9$  ), (γ) δραστική για μεγάλο χρονικό διάστημα, (δ) χημικά σταθερή, (ε) οι μικροοργανισμοί δεν αναπτύσσουν ανθεκτικότητα σε αυτήν, (στ) δεν προκαλεί αλλοιώσεις στη γεύση, άρωμα ή την εικόνα του προϊόντος όπου προστίθεται, (ζ) εφαρμόζεται στο τρόφιμο εύκολα και (η) είναι ασφαλής για τον καταναλωτή ([www.danisco.com](http://www.danisco.com)). Το ανώτατο όριο καθημερινής λήψης για τον άνθρωπο είναι έως 0,3mg/Kg σωματικού βάρους. Η ναταμυκίνη μεταβολίζεται από τον ανθρώπινο οργανισμό στο συκώτι και εκκρίνεται.

Δεν έχουν βρεθεί παρενέργειες στις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιείται, ενώ δεν υπάρχουν διατροφικοί περιορισμοί που να την αφορούν (Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, 2008). Η δραστηριότητα της ναταμυκίνης επηρεάζεται από: (α) τις συνθήκες διατήρησης της (απαιτείται αποθήκευσή της σε δροσερό μέρος), (β) τα χαρακτηριστικά του τροφίμου, π.χ. την περιεκτικότητα του σε υγρασία, (γ) τα επίπεδα ζυμών και μυκήτων που απαντούν στο τρόφιμο όπου εφαρμόζεται και (δ) τα υλικά συσκευασίας. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ναταμυκίνη συνεχίζει να προστατεύει το τρόφιμο ακόμα και όταν η συσκευασία ανοιχθεί ή προκληθεί ρήγμα ([www.danisco.com](http://www.danisco.com)).

Η ναταμυκίνη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δρα ενάντια ενός μεγάλου εύρους ζυμών και μυκήτων. Δεν έχουν αναφερθεί ζύμες ή μύκητες ανθεκτικοί στη δράση της ναταμυκίνης, εκτός από ορισμένα δερματόφυτα. Αντιθέτως, έρευνες έδειξαν ότι δεν είναι δραστική έναντι βακτηρίων και ακτινομυκήτων, ιών και άλλων μικροοργανισμών. Ακόμη και λίγα ανθεκτικά στελέχη ζυμών στη ναταμυκίνη, βρέθηκε πως με την προσθήκη της ναταμυκίνης έχουν μειωμένη παθογόνο ικανότητα (Athar και Winner, 1971). Η δράση της ναταμυκίνης ενάντια στις ζύμες - μύκητες οφείλεται στο γεγονός ότι συνδέεται μη αναστρέψιμα με τις στερόλες της κυτταρικής μεμβράνης, και κατά κύριο λόγο με την εργοστερόλη, δηλαδή τη βασική στερόλη των μεμβρανών των ζυμομυκήτων. Συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη των μυκήτων καταστρέφει την ακεραιότητα της μεμβράνης και αυξάνει την διαπερατότητα της, με αποτέλεσμα να εξέρχονται βασικά συστατικά του κυττάρου, να μειώνεται το ενδοκυτταρικό pH και τελικά επέρχεται λύση του κυττάρου. Έτσι θεωρείται μια μυκητοκτόνος ουσία (Hondrodimou et al., 2011). Οι ζύμες - μύκητες οι οποίοι αναχαιτίζονται από την ναταμυκίνη είναι: *Absidia*, *Alternaria*, *Aspergillus chevalieri*, *A.clavatus*, *Aspergillus carbonarius*, *A.flavus*, *A.idulans*, *A.niger*, *A.ochraceus*, *A.oryzae*, *A.penicilloides*, *A.roquefortii*, *A.versicolor*, *Botrytis cinerea*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Byssochlamys nivea*, *Candida albicans*, *C.guilliermondii*, *C.vini*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium*, *Gloeosporium album*, *Hansenula polymorpha*, *Kloeckera apliculata*, *Mucor mucedo*, *M.racemosus*, *Penicillium camemberti*, *P.chrysogenum*, *Penicillium commune*, *P.digitatum*, *P.expansum*, *P.glabrum*, *P.islandicum*, *P.otatum*, *P.roqueforti var.puctatum*, *Penicillium verrucosum*, *Rhizopus oryzae*, *Rhodotorula gracilis*, *Saccharomyces bailii*, *S.bayanus*, *S.cerevisiae*, *S.exiguus*,

*S.ludwigii*, *S.rouxii*, *S.sake*, *Sclerotia fructicola*, *Scopulariopsis asperula*, *Torulopsis candida*, *T.lactis var.co densi*, *Zygosaccharomyces barkeri*. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι ο *Saccharomyces cerevisiae* αναχαιτίζεται με 0,15 ppm ναταμυκίνη, ο *Aspergillus niger* με 1,0 –1,8 ppm, ο *Saccharomyces bailii* με 1,0 ppm, η *Candida albicans* με 1,0 –2,5 ppm, ο *Saccharomyces rouxii* με 5,0 ppm και ο *Rhizopus oryzae* με 10,0 ppm (Thomas et al., 2003; Stark, 2004; Medina et al., 2007). Επίσης η ναταμυκίνη είναι δραστική και ενάντια στην αφλατοξίνη που παράγεται από τον *Aspergillus flavus* (Rusul and Marth, 1988).

**Πίνακας 6:** Παραδείγματα προτεινόμενων (επιτρεπτών) δόσεων ναταμυκίνης σε τρόφιμα (ανάλογα με τη μέθοδο χρήσης της ναταμυκίνης) ([www.danisco.com](http://www.danisco.com))

Τρόφιμα	Δόση Ναταμυκίνης
<b>Σκληρά τυριά</b>	
Ψεκασμός (επιφάνεια τυριών, τριμμένο τυρί)	1000 - 1800 ppm
Εμβάπτιση (επιφάνεια τυριών)	1000 - 1250 ppm
Άλμη (άμεση προσθήκη)	10 - 25 ppm
Περιβλήματα	250 - 1000 ppm
<b>Αλλαντικά</b>	
Ψεκασμός (επιφάνειες κρέατος, θήκες αλλαντικών)	2000 ppm
<b>Γιαούρτι</b>	
Απευθείας προσθήκη στο γάλα πριν την παστερίωση	10 - 20 ppm
<b>Κρασί</b>	
Απευθείας προσθήκη για να σταματήσει η ζύμωση	60 - 80 mg / lt
Προστίθενται μετά την εισαγωγή στο δοχείο/μπουκάλι για την προστασία από ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων	6 - 20 mg / lt

Η ναταμυκίνη, λοιπόν, έχει κυρίως μυκητοστατική και μυκητοκτόνο δράση και αναστέλλει την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες. Έτσι, χρησιμοποιείται στην Ιατρική και στην Κτηνιατρική για την θεραπεία μυκητιάσεων στον άνθρωπο και στα ζώα αντίστοιχα, καθώς και στη βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 1993; [www.danisco.com](http://www.danisco.com)). Η ναταμυκίνη χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων από περίπου 64 χώρες σε όλο τον κόσμο, μεταξύ των οποίων Ελλάδα, Ιταλία, Γερμανία, Γαλλία, Νορβηγία, Ηνωμένο Βασίλειο, Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, Μεξικό, Κίνα, Αυστραλία κ.α. Με βάση την Οδηγία



95/2/EK της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τα πρόσθετα τροφίμων πλην των χρωστικών και των γλυκαντικών υλών, η χρήση της ναταμυκίνης (E235), επιτρέπεται για την επεξεργασία της επιφάνειας των σκληρών, ημίσκληρων και ημιμαλακών τυριών και αποξηραμένων, αλίπαστων αλλαντικών (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, 2010; [www.efet.gr](http://www.efet.gr)).

Πρόσφατα, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EAAT) έχει εκδώσει θετική επιστημονική γνώμη σχετικά με τη χρήση της ναταμυκίνης ως πρόσθετο τροφίμων (EFSA, 2009). Πρόσθετες επιστημονικές αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα της ναταμυκίνης για άλλες εφαρμογές εκτός από την επιφανειακή επεξεργασία και άλλα προϊόντα, όπως επιτραπέζιες ελιές, μπορεί να επεκτείνει τη χρήση της ως πρόσθετο τροφίμων για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μυκήτων (Hondrodimitou et al., 2011). Σήμερα με βάση τους κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, τα επιτρεπόμενα επίπεδα ναταμυκίνης είναι <1 mg ανά dm<sup>2</sup>, όσον αφορά την επιφανειακή επεξεργασία τυριών και αλλαντικών, έχοντας όριο εισχώρησης 5 mm, ενώ για τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, όσον αφορά την επιφανειακή επεξεργασία τυριών σε κομμάτια ή φέτες, 400-600 ppm Natamax™ όταν χρησιμοποιείται σε υδατικό διάλυμα για εμβάπτιση ή ψεκασμό, ή 40 ppm Natamax™ όταν χρησιμοποιείται σε ξηρό μίγμα με κατάλληλο αντι-συσσωματικό παράγοντα όπως πχ η κυτταρίνη. Γενικά οι προτεινόμενη δόση κυμαίνεται μεταξύ 5 και 50 ppm εξαρτώμενη από τη φύση του προϊόντος ([www.danisco.com](http://www.danisco.com)) (Πίνακας 6).

Η κυριότερη εφαρμογή της ναταμυκίνης όσον αφορά τα τρόφιμα, είναι η επικάλυψη τυριών με επιδερμίδα ή υλικών συσκευασίας των ημίσκληρων και σκληρών τυριών (Thomas και Delves- Broughton, 2003; Ανυφαντάκης, 2004; Var et al., 2006; Fajardo et al., 2010; Pintando et al., 2010). Αυτό γίνεται με ψεκασμό ή εμβάπτιση των μαλακών ή σκληρών τυριών σε διάλυμα 500 ppm ναταμυκίνης, όπου μέχρι σήμερα, αποδεικνύεται δυναμικά αποτελεσματική στην προστασία τους από ζυμομύκητες και σαπροφυτικούς μύκητες. Η ναταμυκίνη προστατεύει την επιφάνεια, ενώ δεν διεισδύει στο εσωτερικό του τυριού, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό και τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Η ναταμυκίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε τυριά που συσκευάζονται σε πλαστικές μεμβράνες. Αν η ναταμυκίνη εφαρμοσθεί αφού αναπτυχθεί το μυκήλιο του μύκητα χάνει τη

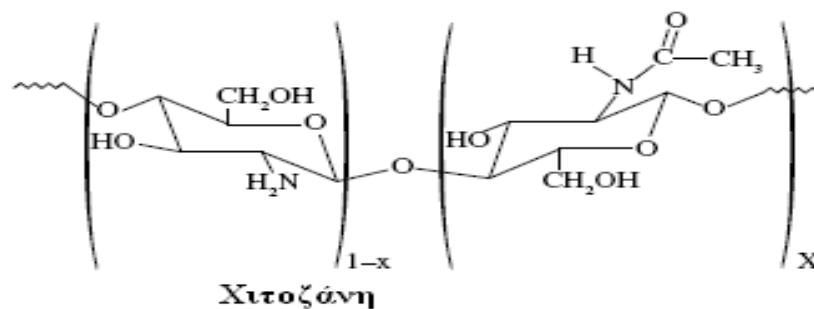
συντηρητική της ικανότητα. Ορισμένοι μύκητες (π.χ. *Aspergillus flavus*) παράγουν ένζυμα που αδρανοποιούν τη ναταμυκίνη (Κοτζεκίδου - Ρουκά, 1993). Η χρήση της ναταμυκίνης επιτρέπει στους κατασκευαστές να παρασκευάζουν τυρί αποδεκτό στις αισθητικές απαιτήσεις των καταναλωτών (χωρίς αλλοιώσεις στο χρώμα και τη γεύση), εμποδίζοντας την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων που παρατηρείται κατά την ωρίμανση και αποθήκευση του τυριού. Στα δευτερεύοντα οφέλη περιλαμβάνονται η μείωση του ρίσκου ανάπτυξης μυκοτοξινών και η επέκταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Απαιτείται συγκέντρωση ναταμυκίνης < 1-20 ppm για την αναχαίτιση μυκήτων και ~2-40 ppm για την αναχαίτιση ζυμών (www.danisco.com). Σε τυριά που ωριμάζουν με μύκητες ή βακτήρια που αναπτύσσονται στην επιφάνειά τους δεν πρέπει να χρησιμοποιείται. Σε ότι αφορά στο επίπεδο της ναταμυκίνης στην επιφάνεια των τυριών, αυτή δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 5mm. Η ναταμυκίνη είναι ασταθής στο φως, γι' αυτό και συνιστάται η χρησιμοποίησή της μαζί με πλαστικές ουσίες επικάλυψης των τυριών, οπότε η αποικοδόμησή της περιορίζεται. Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωσή της στις ουσίες αυτές είναι 0,05% (Ανυφαντάκης, 2004). Η ναταμυκίνη χρησιμοποιείται επίσης για την αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων στα αλλαντικά, όπου είτε προστίθεται στην άλμη σε συγκέντρωση 1000 ppm ή εμβαπτίζονται ή ψεκάζονται οι θήκες των αλλαντικών, οπότε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού στην επιφάνεια είναι 2 ppm /cm<sup>2</sup>. Άλλες χρήσεις της είναι στο κρέας και στα προϊόντα κρέατος (π.χ. λουκάνικα), στα προψημένα τρόφιμα, στο κρασί, στα φρούτα, στις μαρμελάδες, στις tortillas, στις ζελατίνες, στην άλμη μαύρων ελιών, στα μαριναρισμένα τρόφιμα, στα ψάρια, στα κοτόπουλα, στο βούτυρο, στους χυμούς φρούτων, στο γιαούρτι καθώς και στα κονσερβοποιημένα τρόφιμα. Γενικά οι μέθοδοι χρήσης της ναταμυκίνης είναι με ψεκασμό, με εμβάπτιση, σε περίβλημα με υδατικό εναιώρημα ή σε ειδικό περίβλημα (π.χ. παραφίνης) (Thomas και Delves-Broughton, 2003; www.danisco.com; McNamee et al., 2010; Hondrodinou et al., 2011).

### **1.6.2. Χιτοζάνη**

Η χιτοζάνη είναι ένα “φυσικό” πολυμερές, παράγωγο της χιτίνης. Η χιτίνη είναι το δεύτερο σε αφθονία βιοπολυμερές στη φύση, μετά την κυτταρίνη, και αποτελεί το κυριότερο συστατικό: του κελύφους θαλάσσιων οστρακόδερμων

(αστακός, καβούρια, γαρίδες, καραβίδες), του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων και των ζυμών, του εξωσκελετού των εντόμων (σκορπιοί, αράχνες, σκαθάρια, μυρμήγκια), των πρωτόζωων, των αλγών (Mathur, 1990).

Η χιτοζάνη είναι το παράγωγο της χιτίνης μετά τη (μερική) αποακετυλίωσή της σε στερεή κατάσταση, κάτω από αλκαλικές συνθήκες (συμπυκνωμένο NaOH) ή με ενζυματική υδρόλυση. Η χιτοζάνη (Εικόνα 15) είναι πολυσακχαρίτης, αποτελούμενος από ολιγομερή των γλυκοζαμινών (αμινοσακχάρων): 2-δέοξυ-2-άμινο-D-γλυκοκυρανόζης και, σε μικρότερο βαθμό, 2-δέοξυ-2-ακετάμιδο-γλυκοκυρανόζης (Fernandes et al., 2008; Fernandez-Saiz et al., 2010). Τα (όμοια) ολιγομερή συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς (βιοπολυμερές). Η χιτοζάνη φέρει στη στερεοχημική της δομή τρεις διαφορετικούς τύπους ενεργών ομάδων: μια αμινομάδα -NH<sub>2</sub> στην θέση C-2, και τρεις υδροξυλομάδες στις θέσεις C-3 και C-6, αντίστοιχα (Goy et al., 2009).



**Εικόνα 15:** Στερεοχημική δομή χιτοζάνης (Goy et al., 2009)

Η χιτοζάνη παρουσιάζει αξιόλογη αντιμικροβιολογική δραστηριότητα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την δραστικότητα της χιτοζάνης έναντι των μικροοργανισμών είναι: (α) η πηγή προέλευσής της (θαλάσσια οστρακοειδή, μύκητες, κλ.), (β) ο βαθμό αποακετυλίωσης (DD) της χιτοζάνης, (γ) το Μοριακό Βάρος (MB) της χιτοζάνης, (δ) το pH του υποστρώματος, (ε) το είδος του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των διαλυμάτων χιτοζάνης και (στ) το είδος του μικροοργανισμού που εξετάζεται κάθε φορά και (ζ) η φάση ανάπτυξης του εκάστοτε μικροοργανισμού καθώς επίσης και ο αρχικός του πληθυσμός (Chhabra et al., 2006).

Οι περισσότερες από τις έρευνες (Aider et al., 2010, Vishu Kumar et al., 2007) που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα αναφέρουν ότι η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης ενισχύεται σημαντικά με την αύξηση του βαθμού αποακετυλίωσης, λόγω των περισσότερων διαθέσιμων ελεύθερων δραστικών αμινομάδων και της μεγαλύτερης διαλυτότητάς της. Ακόμη, το MB της χιτοζάνης έχει αναφερθεί να επηρεάζει σημαντικά την δραστηριότητα της. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι ανάλογα με το μικροοργανισμό-στόχο η χιτοζάνη μικρού (LMW), μεγάλου (HMW) ή μεσαίου (MMW) MB παρουσιάζει διαφορετική δραστηριότητα κάθε φορά (Lin & Chao, 2001; Liu et al., 2001; Devlieghere et al., 2004; Tsai et al., 2006; Dutta et al., 2009; Fernandes et al., 2008). Επίσης, η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης αυξάνεται, όσο το pH του υποστρώματος μειώνεται, λόγω του γεγονότος ότι όσο αυξάνει η οξύτητα του υποστρώματος, τόσο αυξάνει ο αριθμός των θετικά φορτισμένων (protonated) ελεύθερων αμινομάδων της χιτοζάνης ( $\text{NH}_3^+$ ). Οι “πρωτονιωμένες” αμινομάδες της χιτοζάνης αλληλεπιδρούν με την ηλεκτροαρνητική επιφάνεια των βακτηρίων (λιποπολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, τειχοϊκά οξέα, λιπίδια), με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής τους μεμβράνης και την απώλεια ενδοκυτταρικών συστατικών που οδηγεί τελικά στο θάνατό τους (Devlieghere et al., 2004). Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης είναι η βακτηριακή φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών-στόχων και συγκεκριμένα, βακτηριακά κύτταρα τα οποία βρίσκονταν στα τελευταία στάδια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, φάνηκαν να είναι πιο ευαίσθητα στην επίδραση της χιτοζάνης σε σχέση με εκείνα που βρίσκονταν στη στατική φάση (Tsai et al., 2006). Ευνόητο είναι ότι εξίσου σημαντική στην αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης είναι και η αρχική συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού των μικροοργανισμών-στόχων, π.χ. η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης ενάντια στο βακτήριο *E. coli*, μειώθηκε σημαντικά όταν η συγκέντρωση του ενοφθαλμίσματος αυξήθηκε από  $10^3$  σε  $10^5$  ή  $10^7$  CFU/mL (Fernandes et al., 2008). Τέλος, η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης μπορεί να επηρεαστεί από τα συστατικά του εκάστοτε τροφίμου που προστίθεται. Οι Devlieghere et al. (2004) αναφέρουν ότι η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης μπορεί να περιοριστεί όσο αυξάνει η περιεκτικότητα των τροφίμων σε χλωριούχο νάτριο και άμυλο, αλλά δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τη λιποπεριεκτικότητα του τροφίμου. Ωστόσο, οι Chung et al. (2003) αναφέρουν ότι

αύξηση της περιεκτικότητας σε άλας αυξάνει την αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης, λόγω φαινομένων ιονισμού. Οι Ausar et al. (2002) αναφέρουν ότι η αντιβακτηριακή δράση της χιτοζάνης έναντι της ανάπτυξης γαλακτικών βακτηρίων ζύμωσης περιορίστηκε όταν η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε γάλα αντί σε μοντέλο αυτού.

Η χιτοζάνη έχει βρεθεί ότι είναι δραστική έναντι των βακτηρίων: *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacter aeromonas*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Photobacterium phosphoreum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, και των ζυμών και μυκήτων, όπως *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lambica*, *Rhodotorula glutensi*, *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* (Shahidi et al., 1999; Helander et al., 2001; Devlieghere et al., 2004; Inatsu et al., 2005, Marques et al., 2008; Fernandes et al., 2008; Chung & Chen 2008). Οι έρευνες που έγιναν επάνω στην δράση της χιτοζάνης δεν έχουν καταλήξει σε ένα ασφαλές συμπέρασμα σχετικά με τον αν η χιτοζάνη είναι πιο δραστική ενάντια στα Gram-θετικά από ότι στα Gram-αρνητικά βακτήρια (Goy et al., 2009).

Ο μηχανισμός της αντιβακτηριακής δράσης της χιτοζάνης, δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος. Ωστόσο, έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες: α) Ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των ενεργών μορίων της χιτοζάνης (αμινομάδων  $-NH_3^+$ ) με αρνητικά φορτισμένα μόρια της επιφάνειας της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. β) Η χιτοζάνη στερεί από τα βακτηριακά κύτταρα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό τους, όπως ιχνοστοιχεία, μέταλλα, κ.α., μέσω σχηματισμού σταθερών χηλικών συμπλόκων με αυτά (Wang et al., 2005). γ) Τα μόρια της χιτοζάνης σχηματίζουν πολυμερικό στρώμα που επικαλύπτει τα βακτηριακά κύτταρα με αποτέλεσμα την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών από την επιφάνεια τους, αλλά και την παρεμπόδιση εισροής νέων θρεπτικών ουσιών στο εσωτερικό του κυττάρου. δ) Τα oligομερή της χιτοζάνης μπορούν να διεισδύσουν στο εσωτερικό του κυττάρου (λόγω μικρότερης μοριακής αλυσίδας, σε σχέση με την "native" χιτοζάνη) και να παρεμποδίσουν την σύνθεση RNA και ε) Η χιτοζάνη έχει

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

Η χιτοζάνη, λόγω του ότι είναι ελάχιστα τοξική, βιοδιασπώμενη, αδρανής στο γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα εύρος εφαρμογών σε διάφορους επιστημονικούς τομείς, όπως τη βιοϊατρική (επούλωση πληγών και εγκαυμάτων), τη συντήρηση και τεχνολογία τροφίμων, την τεχνολογία πολυμερών (δημιουργία βιοαποικοδομήσεων υλικών συσκευασίας), την αντιρρύπανση (επεξεργασία υγρών αποβλήτων, καθαρισμός ύδατος), τη φαρμακευτική (σε συστήματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμακευτικών ουσιών) και άλλα. Η χιτοζάνη είναι μια διαιτητική ίνα, που μειώνει την απορρόφηση λίπους από τον οργανισμό, γι' αυτό και τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για την παρασκευή συμπληρωμάτων διατροφής (ενηλίκων και νεογνών) και για την εκτροφή ζώων και ιχθύων (εμπλουτισμός της διατροφής των). Επίσης θεωρείται ότι έχει δράση έναντι της γαστρίτιδας. Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως παράγοντας αντιρρύπανσης σε βιομηχανίες τροφίμων (απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων, παρασιτοκτόνων, φαινολών και χρωστικών από τα υγρά απόβλητα) ή για την ακινητοποίηση ενζύμων (Shahidi et al., 1999).

Η χιτοζάνη έχει εγκριθεί ως πρόσθετο τροφίμων στην Κορέα και την Ιαπωνία από το 1995 και το 1983, αντίστοιχα. Η χιτοζάνη εφαρμόζεται κυρίως ως πρόσθετο τροφίμων ή 'φυσικό' συντηρητικό ή ως συστατικό του υλικού συσκευασίας του τροφίμου (Kong et al., 2010). Ακόμη, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται στην βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο για τη διαύγαση χυμών, ως ενισχυτικό γεύσης, ως γαλακτοματοποιητής, ως σταθεροποιητής και ως αντιμικροβιακός παράγοντας για την αντιβακτηριακή και αντιμυκητιασική του δράση (όπως αναφέρθηκε παραπάνω). Η χιτοζάνη μπορεί να προστεθεί στα τρόφιμα ως "φυσικό" συντηρητικό, είτε απευθείας στο τρόφιμο σε στερεή μορφή, δηλ. σαν σκόνη να διαλυθεί στη μάζα του τροφίμου και να ομογενοποιηθεί (Georgantelis, 2007, Georgantelis, 2008, Soutos et al., 2008), είτε σε μορφή διαλύματος, δηλαδή να εμβαπτίσουμε το τρόφιμο μέσα σε ένα διάλυμα οργανικού οξέος και χιτοζάνης (κυρίως χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό αραιό διάλυμα οξικού οξέος) ή να ψεκάσουμε το τρόφιμο με αυτό το διάλυμα (Sagoo et al., 2002, Inatsu et al., 2005; Yingyuad et al., 2006). Η χιτοζάνη έχει επεκτείνει τη διάρκεια ζωής προϊόντων κρέατος, ιδίως όταν χρησιμοποιηθεί

επιτυχώς ως επικάλυψη. Επιπλέον, η χιτοζάνη χρησιμοποιείται σαν ένα προστατευτικό εμπόδιο για την απώλεια της υγρασίας από τα τρόφιμα, όπως το ψωμί και τα αυγά. Η αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης προστατεύει τα τρόφιμα από οξείδωση, όπως ψωμί, φρούτα, θαλασσινά και κρέας. Επιπλέον, η χιτοζάνη δρα ως γαλακτωματοποιητής σε προϊόντα όπως τα λουκάνικα και η μαγιονέζα. Οι πιο ενδιαφέρουσες εφαρμογές της χιτοζάνης σε φρούτα και λαχανικά είναι ότι ενεργεί ως αναστολέας μαυρίσματος, καθώς και ως διαυγαστικό και ρυθμιστής οξύτητας σε χυμούς φρούτων (Kos και Ozkan, 2011). Επίσης, η χιτοζάνη έχει προστεθεί στο παρελθόν σε νωπές χιλοπίτες και μείωσε σημαντικά το σκούρο χρώμα από τις αντιδράσεις Mallard, που παράγεται κατά τη θέρμανση του προϊόντος, και αύξησε τον χρόνο ζωής του προϊόντος (Huang et al., 2007). Οι Fernandes et al. (2008) συμπέραναν στην μελέτη τους ότι η χρήση της χιτοζάνης (ανεξαρτήτως MB) θα πρέπει να περιορίζεται σε τρόφιμα που έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, όπως το φύλλο για πίτα, για να διατηρεί την δραστηριότητα της έναντι των μικροοργανισμών.

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων έχει αρχίσει να στρέφεται στη χρήση εδώδιμων ή μη φιλμ από χιτοζάνη για την επέκταση του χρόνου ζωής τροφίμων ζωϊκής προέλευσης, φρούτων και λαχανικών, επειδή είναι φιλικά προς το περιβάλλον και βιοαποικοδομήσιμα. Οι εξωτερικές επιστρώσεις και τα φιλμ από χιτοζάνη παρέχουν στα τρόφιμα προστασία από τη μικροβιολογική, φυσικοχημική και οργανοληπτική αλλοίωση. Οι Η.Π.Α. και ο Καναδάς, έχουν εγκρίνει την χρήση φιλμ από N,O,-καρβόξυ-μεθυλ-χιτίνη για τη συσκευασία φρούτων, από το 1989. Η χιτοζάνη διαθέτει την ικανότητα να σχηματίζει ημι-διαπερατά φιλμ, τα οποία περιορίζουν την μικροβιολογική ή ενζυμική αλλοίωση φρούτων, λαχανικών και άλλων τροφίμων (Shahidi et al., 1999).

### **1.6.3. Εκχύλισμα Εσπεριδοειδών (Citrox)**

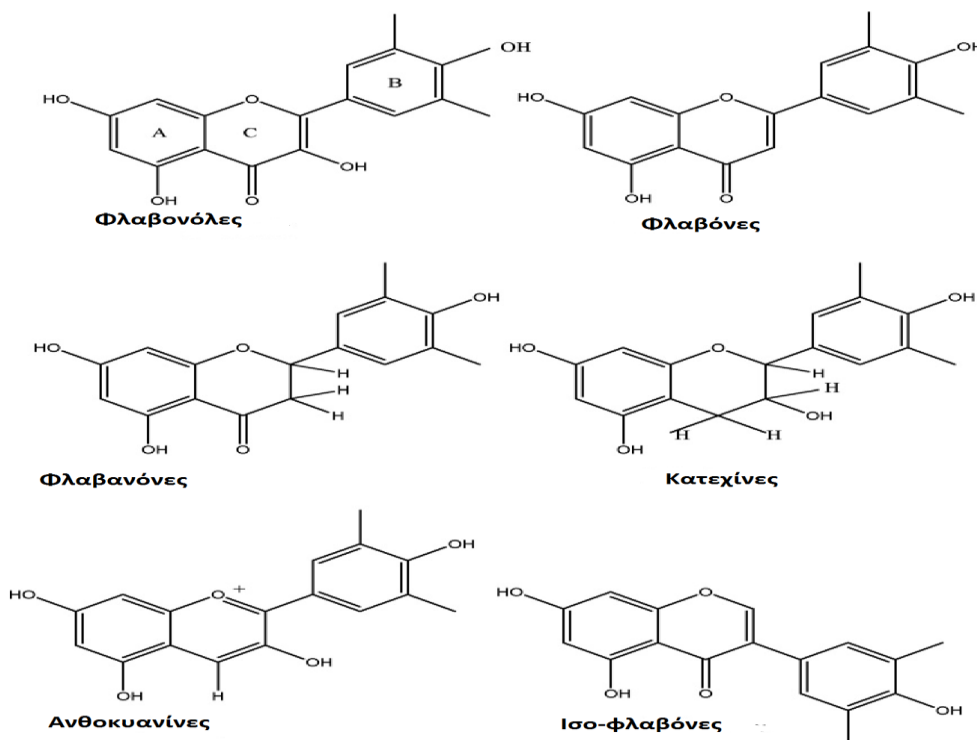
Η τεχνολογία Citrox αναπτύχθηκε μεταξύ 1995 και 2003, και βασίζεται στη δημιουργία σκευασμάτων με συνεργιστική δράση εκχυλισμάτων βοτάνων και φυσικών οξέων φρούτων. Η τεχνολογία αυτή προσφέρει εξαιρετικά αντιμικροβιακά, αντιμυκητιακά και αντιακά αποτελέσματα. Για παράδειγμα, υδατοδιαλυτά φλαβονοειδή που προέρχονται από εσπεριδοειδή μπορούν να ενεργοποιηθούν από

οργανικά οξέα και τα προκύπτοντα μείγματα χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων και την απολύμανση σκληρών επιφανειών. Τα προϊόντα CitroX είναι μη τοξικά, μη διαβρωτικά, υποαλλεργικά, αντιμικροβιακά, αντιμυκητιακά και προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές (δηλ. είναι οικολογικά). Αποτελούν ένα παράδειγμα 'Πράσινης Χημείας' και μας θυμίζουν ότι η φύση μας προσφέρει φυσικές λύσεις για σχεδόν κάθε πρόβλημα που συναντάμε στην καθημερινή ζωή, αφού είναι εξαιρετες απολυμαντικές και αντιμικροβιακές ουσίες φιλικές προς το περιβάλλον (<http://www.citrox.net>). Το CitroX χρησιμοποιείται σε εργασίες καθαρισμού και απολύμανσης στον τομέα της Γεωργίας, στα ζώα (έλεγχος της μαστίτιδας στη γαλακτοκομική βιομηχανία, απολύμανση των υπόστεγων των πουλερικών), στις καλλιέργειες (μουριές, μηλιές, αμπελώνες, ξηρούς καρπούς, τσάι, μαρούλι, ντομάτες, ξηρούς καρπούς, τσάι, φασόλια), στην επεξεργασία του νερού, ως συντηρητικό τροφίμων και τελευταία βρίσκει εφαρμογές ακόμη και στην Ιατρική και σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας (οδοντόκρεμα, καλλυντικά). Συγκεκριμένα, το υγρό μίγμα γεύσης CitroX με την ονομασία ProGarda™ 14WPlus είναι ένα μη τοξικό, υποαλλεργικό και φυσικό πρόσθετο για τη βιομηχανία τροφίμων (για χρήση σε τρόφιμα και ποτά) το οποίο είναι σύμφωνο με την Οδηγία της ΕΕ 88/388/ΕΟΚ και του κανονισμού 2092/91 για χρήση σε προϊόντα διατροφής. Το υγρό μίγμα γεύσης CitroX με την ονομασία ProGarda™ 14WPlus αποτελείται από ένα σύνθετο μίγμα βιοφλαβονοειδών, κιτρικό οξύ και νερό και είναι χημικά σταθερό υγρό. Είναι ένα φαιοκίτρινο (κεχριμπαρτί) έως καφέ υγρό, με pH 2,7 – 3,7 στους 20° C, πυκνότητα 1,027 – 1,04 στους 20° C, διαλυτό στο νερό και την αλκοόλη και είναι κατά 98% βιοδιασπώμενο (<http://www.polypan.gr/products.cfm?catID=102>). Μπορεί να εφαρμοστεί στο τρόφιμο απευθείας, με εμβάπτιση ή με ψεκασμό. Το ProGarda™ 14WPlus είναι ειδικά σχεδιασμένο για χρήση σε τρόφιμα και ποτά, όπως σε προϊόντα αρτοποιίας, λουκάνικα, σάλτσες, σαλάτες, αναψυκτικά κλ. (<http://www.polypan.gr/products.cfm?catID=102>).

Η σύνθεση του CitroX έχει ως βάση την ανάμειξη φυσικών οργανικών οξέων (όπως ασκορβικό, κιτρικό, γαλακτικό, κλπ.) με φυσικά φλαβονοειδή ενεργά συστατικά από εκχυλίσματα από εσπεριδοειδή (<http://www.vortechsys.com/citrox.php>). Σύμφωνα με τις μοριακές δομές τους, τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών χωρίζονται σε έξι κατηγορίες (Εικόνα 16): φλαβόνες, φλαβανόνες,



φλαβονόλες, ισο-φλαβόνες, ανθοκυανίνες και φλαβονόλες (ή κατεχίνες). Τα φλαβονοειδή των εσπεριδοειδών έχουν ευεργετικές ιδιότητες στον ανθρώπινο οργανισμό, αφού έχουν αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιική και αντιμικροβιακή δράση. Επίσης έχει βρεθεί ότι βοηθούν στην πρόληψη της αθηροσκλήρωσης και του καρκίνου (Tripoli et al., 2007). Οι πολυφαινόλες στο Citrox διευκολύνουν τη διαλυτότητα του προϊόντος στο νερό και τα βιοφλαβονοειδή (του Citrox) δρουν έναντι των βακτηρίων και των ιών. Η αντιβακτηριακή δράση του Citrox οφείλεται στην σύνδεση των βιοφλαβονοειδών με το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, με τις εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και με τις διαλυτές πρωτεΐνες του μικροοργανισμού και αδρανοποιούν, τα ένζυμα και τις πρωτεΐνες των κυττάρων. Ο ρόλος των οργανικών οξέων στο Citrox είναι η απομάκρυνση ιόντων  $Ca^{+2}$  για την προώθηση της αποτελεσματικότητας των βιοφλαβονοειδών, ενώνονται με διαλυτές ενώσεις που αδρανοποιούν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών, ελέγχοντας το pH στο 3,5-5,0 (<http://www.phytoinnovative.co.uk/?p=12>).



**Εικόνα 16:** Μοριακές δομές των φλαβονοειδών των εσπεριδοειδών (Tripoli et al., 2007)

Το προϊόν CitroX έχει τα εξής πλεονεκτήματα έναντι άλλων συντηρητικών στα τρόφιμα: (α) παρασκευάζεται με φυσικά συστατικά, (β) έχει πολύ καλή αντιμικροβιακή δράση, (γ) δεν αλλάζει τη γεύση ή το χρώμα του προϊόντος, (δ) δεν περιέχει τοξικές χημικές ουσίες και είναι απόλυτα ασφαλές στη χρήση, (ε) έχει μεγάλη υπολειμματική δράση, αποτρέποντας την εκ νέου μόλυνση για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και μειώνει τη χρήση νερού σε περίπτωση χρήσης του για πλύσιμο φρούτων και λαχανικών. Εργαστηριακές δοκιμές σε παθογόνα με πληθυσμό  $10^7$  cfu/gr ή ml έδειξαν ότι η προσθήκη του CitroX μείωσε τον πληθυσμό των παθογόνων κατά πέντε περίπου λογαριθμικές μονάδες. Όταν το φορτίο των παθογόνων είναι αρκετά χαμηλότερο από  $10^7$  cfu/gr ή ml η εργαστηριακή δοκιμή δείχνει ότι ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού είναι μικρότερος από  $10^2$  cfu/gr ή ml (<http://www.citrox.net>).

Το CitroX είναι δραστικό έναντι των εξής μικροοργανισμών: (α) Βακτήρια: *Campylobacter jejuni*, *Diploidea natalensis*, *Escherichia coli*, *Geotrichia coli*, *Klebsiella pentoaceticus*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium fortuitum*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella cholerasuis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, (β) Ζύμες και Μύκητες: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Chaetium globosum*, *Cladosporium*, *Collectotricum sp.*, *Fusarium sp.*, *Geotrichum candidum*, *Mucor sp.*, *Penicillium sp.*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium italicum*, *Penicillium roqueforti*, *Phomopsis orl*, *Pullularia pullulans*, *Pythium sp.*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton mentagrophytes* (γ) Ιοί : *Human Rhinovirus – Retroscreen Virology*, *Influenza A – Retroscreen Virology*, *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*, *African swine fever*, *Avian influenza*, *Foot & mouth disease*, *Gumboro virus*, *Herpes virus type 1 & type 2*, *Herpes zoster*, *Hepatitis A & B*, *Newcastle disease*, *Severe Acute Respiratory Syndroms (SARS)* και (δ) Πρωτόζωα: *Histomonas meleagridis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis hominis* (<http://www.phytoinnovative.co.uk/?p=12>; [http://www.nature.com/bdj/journal/v210/n1/fig\\_tab/sj.bdj.2010.1224\\_T3.html](http://www.nature.com/bdj/journal/v210/n1/fig_tab/sj.bdj.2010.1224_T3.html); <http://www.biokimkimya.com/content.asp?id=14&v=c&d=p&pid=1119&l=EN>; Fisher και Phillips, 2008; Allende et al., 2008; Abadias et al., 2011; Galvin et al., 2012).

Το Citrox με εμπορική ονομασία ProGarda™ (14WPlus) σχεδιάστηκε ειδικά το 1995 για να χρησιμοποιείται για το πλύσιμο – απολύμανση φρούτων και λαχανικών μέσω εμβάπτισης ή ψεκασμού (<http://www.vortechsys.com/citrox.php>). Το Citrox ProGarda™ (14WPlus) είναι ένα εμπορικό απολυμαντικό με δραστικές ενώσεις τα φλαβονοειδή που προέρχονται από τα εσπεριδοειδή σε συνδυασμό με μια σειρά από φυσικά οξέα (που προέρχονται από φρούτα και λαχανικά) (Abadias et al., 2011). Σήμερα το μεγαλύτερο μέρος των βιολογικών λαχανικών για φρέσκια σαλάτα (που παρέχονται σε μεγάλα σούπερ μάρκετ και fast food) πλένονται με Citrox ProGarda™ (14WPlus) σε αρκετές χώρες (Αγγλία, Ελλάδα, Ινδία, Νέα Ζηλανδία). Αντίστοιχα το Citrox χρησιμοποιείται και για το πλύσιμο φρούτων και λαχανικών μετά τη συγκομιδή. Ακόμη, το Citrox έχει βρει εφαρμογή ως συντηρητικό σε ένα μεγάλο εύρος τροφίμων, συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον τομέα των γαλακτοκομικών προϊόντων (άλμη, τυρί, γιαούρτι, κ.λπ.), σε φρέσκιες πράσινες σαλάτες, σε έτοιμες προς κατανάλωση σάλτσες (όπως το τζατζίκι), στα μεταποιημένα τρόφιμα (κρέας), στα αρτοσκευάσματα, στους χυμούς, κλπ. (<http://www.citrox.org/references.htm>).

---

## 1.7. Παθογόνοι Μικροοργανισμοί

---

Σε μία παρασιτική σχέση δύο οργανισμών ο οργανισμός που ωφελείται λέγεται παράσιτο, ενώ ο οργανισμός που βλάπτεται λέγεται ξενιστής. Τα παράσιτα που προκαλούν βλάβη στον ξενιστή λέγονται παθογόνα. Κατά κανόνα όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι παράσιτα και όλα τα παράσιτα είναι δυνατόν με ορισμένες συνθήκες να γίνουν παθογόνα (δυσνητικά παθογόνα). Η δυνατότητα ενός μικροοργανισμού να παρουσιάζει παθογόνο δράση δεν εξαρτάται μόνο από τις ιδιότητες του ίδιου αλλά και από τους παράγοντες αντίστασης του ξενιστή. Είναι δυνατόν ορισμένα είδη που θεωρούνται επικίνδυνα παθογόνα, όπως το κορυνοβακτηρίδιο της διφθεριτιδας, να φιλοξενούνται από ένα ξενιστή (άνθρωπο) χωρίς να του προκαλούν καμία βλάβη. Ο ξενιστής σ' αυτήν την περίπτωση είναι απλώς ένας φορέας του μικροοργανισμού. Επίσης ορισμένοι σαπρόφυτοι μικροοργανισμοί γίνονται παθογόνοι όταν μειωθεί η άμυνα του ξενιστή. Έτσι πολλοί

μικροοργανισμοί του εντέρου εισέρχονται στο κυκλοφοριακό σύστημα και προκαλούν βλάβη σε διαφόρους ιστούς (Καλογρίδου- Βασιλειάδου, 1995).

Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να προκαλέσει μια ασθένεια είδαμε ότι λέγεται παθογόνος δύναμη του μικροοργανισμού. Η ιδιότητα αυτή περιορίζεται στο είδος του μικροοργανισμού και είναι δυνατόν ορισμένα στελέχη του ίδιου είδους να παρουσιάζουν διαφορετικού βαθμού παθογένεια. Υπάρχουν λοιπόν στελέχη ορισμένων ειδών τα οποία σε μικρότερο αριθμό προκαλούν μεγαλύτερη βλάβη στον ξενιστή. Ο βαθμός της παθογένειας του μικροοργανισμού εκφράζεται με τον όρο λοιμώδη δύναμη του μικροοργανισμού. Οι παράγοντες που επιδρούν στην παθογόνο δύναμη του μικροοργανισμού είναι α) η δύναμη εισβολής και β) η δύναμη τοξινογένεσης του μικροοργανισμού (Καλογρίδου- Βασιλειάδου, 1995).

Δύναμη εισβολής ονομάζεται η ικανότητα του μικροοργανισμού να εισέρχεται και να πολλαπλασιάζεται μέσα στον ξενιστή εξουδετερώνοντας την άμυνα του. Ο ξενιστής εμποδίζει την είσοδο του μικροοργανισμού με τα ίδια μέσα άμυνας που είναι ο επιφανειακός φραγμός, οι διάφορες αντιμικροβιακές ουσίες και τα φαγοκύτταρα. Πολλά στελέχη παθογόνων μικροοργανισμών κατά στρέφονται με αυτούς τους μηχανισμούς, όχι όμως όλα. Η ικανότητα ενός μικροοργανισμού να εισδύει στον ξενιστή εξαρτάται από την παρουσία ελύτρου (που τον προστατεύει από την φαγοκυττάρωση) και την παραγωγή διάφορων εξωκυτταρικών ουσιών, όπως η υαλουρονιδάση, η ινωδολυσίνη, η πηκτάση και οι λευκοτοξίνες. Τέλος, ορισμένοι μικροοργανισμοί έχουν την ιδιότητα να παράγουν τοξικές ουσίες οι οποίες καταστρέφουν τα κύτταρα του ξενιστή και λέγονται τοξίνες. Οι τοξίνες διακρίνονται σε εξωτοξίνες, οι οποίες διαχέονται έξω από το κύτταρο του μικροοργανισμού που τις παρήγαγε, και σε ενδοτοξίνες, οι οποίες είναι συστατικά του κυτταρικού σώματος και ελευθερώνονται μόνο μετά τη λύση του βακτηριακού κυττάρου. Οι εξωτοξίνες είναι απλές πρωτεΐνες, ενώ οι ενδοτοξίνες είναι μοριακά σύμπλοκα που περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια και πολυσακχαρίτες. Οι σπουδαιότεροι μικροοργανισμοί που παράγουν εξωτοξίνες είναι *Clostridium botulinum* (νευροτοξίνη-αλλαντίαση), *Clostridium perfringens* (α-τοξίνη-αεριογόνος γάγγραινα), *Staphylococcus aureus* (εντεροτοξίνη- τροφοδηλητηρίαση), *Shigella dysenteriae* (εντεροτοξίνη- δυσεντερία) και *Vibrio cholera* (εντεροτοξίνη – χολέρα). Ενδοτοξίνες έχουν απομονωθεί από όλα τα Gram αρνητικά βακτήρια και κυρίως από τα γένη *Salmonella*, *Shigella* και

*Escherichia*. Οι ενδοτοξίνες αυτών των μικροοργανισμών παρουσιάζουν δύο διαφορετικές δράσεις: παραγωγή πυρετού και τοξικότητα (Καλογρίδου-Βασιλειάδου, 1995).

Κάποιοι από τους παθογόνους μικροοργανισμούς είναι δυνατόν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό από τα τρόφιμα κι έτσι να προκληθεί τροφική δηλητηρίαση στο άτομο που κατανάλωσε το μολυσμένο τρόφιμο. Οι τροφικές δηλητηριάσεις διακρίνονται σε τροφοτοξινώσεις και τροφολοιμώξεις. Τροφοτοξίνωση είναι η τροφική δηλητηρίαση που προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν τοξικές ουσίες, οι οποίες εκούσια ή ακούσια προστέθηκαν στα τρόφιμα, ή είναι προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Οι τροφοτοξινώσεις που προκαλούνται από τους μικροοργανισμούς είναι: α) η σταφυλοκοκκική γαστρεντερίτιδα που προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μία ή περισσότερες εντεροτοξίνες που παράγονται από ορισμένα είδη και στελέχη του γένους *Staphylococcus* και κυρίως από τον *Staphylococcus aureus*, β) ο βοτυλισμός ή αλλιώς αλλαντίαση που προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν νευροτοξίνες που παράγονται από ορισμένα στελέχη του *Clostridium botulinum* και γ) οι μυκοτοξινώσεις που προκαλούνται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μυκοτοξίνες που παράγονται από διάφορα είδη μυκήτων. Τροφολοιμώξη είναι η τροφική δηλητηρίαση που προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμων που φέρουν μικροοργανισμούς οι οποίοι προσβάλλουν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Τέτοια παθογόνα βακτήρια είναι: *Clostridium perfringen*, *Bacillus cereus*, είδη του γένους *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, είδη του γένους *Salmonella* και διάφοροι ορολογικοί τύποι της *Escherichia coli* (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000).

### **1.7.1. *Salmonella enterica***

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και αποτελείται από Gram-αρνητικά βακτήρια, αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, μη-σπορογόνα, και έχουν ραβδόμορφο σχήμα. Είναι θετικά στην καταλάση, αρνητικά στην οξειδάση, κινούνται μέσω βλεφαρίδων και παρουσιάζουν μικρή θερμοανθεκτικότητα (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα

εύρος θερμοκρασίας από 5-45 ° C με τη βέλτιστη θερμοκρασία των 35-37 ° C. Είναι σε θέση να αναπτυχθεί σε χαμηλό pH και είναι γενικά ευαίσθητα σε αυξημένες συγκεντρώσεις αλατιού (Doyle, 1991). Συγκεκριμένα οι σαλμονέλλες αναπτύσσονται σε pH που κυμαίνεται από 4 έως 9 (με άριστο pH=6,6-8,2) και η μέγιστη συγκέντρωση NaCl στην οποία μπορούν να αναπτυχτούν είναι 7-8% (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Η ελάχιστη τιμή  $a_w$  για την ανάπτυξή της είναι 0,93 και η βέλτιστη 0,99 (Cox, 1999). Ωστόσο έχει αναφερθεί η ικανότητα επιβίωσής της σε σοκολάτα με  $a_w = 0,3-0,5$  (Jasson, 2011). Η *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και μπορεί να επιβιώσει αλλά όχι να αναπτυχθεί σε συσκευασία τροφίμων με μεγάλη συγκέντρωση CO<sub>2</sub>. Αναπτύσσεται με γρήγορο ρυθμό σε MAP με 20-50% CO<sub>2</sub> (Lund et al., 2000) ή σε συσκευασία κενού (Gill et al., 1991). Υπάρχουν 2.463 ορότυποι σαλμονέλλας, οι οποίοι τώρα έχουν υπαχθεί σε δύο είδη: *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*. Η *Salmonella enterica* (Εικόνα 17) περιέχει 2.443 ορότυπους και η *Salmonella bongori* περιέχει 20 ορότυπους. Η *Salmonella enterica* έχει τώρα έξι υποείδη, τα οποία ορίζονται από ρωμαϊκούς αριθμούς: I (*enterica*), II (*salamae*), IIIa (*arizonae*), IIIb (*diarizonae*), IV (*houtenae*), and VI (*indica*) (Doyle, 1991).

Σαλμονέλλωση προκαλείται μετά την κατανάλωση τροφίμου που φέρει  $10^7 - 10^9$  cfu/g. Έχουν αναφερθεί όμως και τροφικές δηλητηριάσεις οι οποίες προκλήθηκαν από λίγα κύτταρα σαλμονελλών π.χ. σαλμονέλλωση από σοκολάτα με 1 cfu/g. Τα συμπτώματα της τροφολοίμωξης από σαλμονέλλες εμφανίζονται 10-14 ώρες μετά την λήψη της τροφής (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Οι Σαλμονέλλες (Πίνακας 7) προκαλούν τρεις μορφές της νόσου: τυφοειδής πυρετός, γαστρεντερίτιδα, και βακτηριαμία. Η *Salmonella enterica* ορότυπος *Typhi* είναι η προκαλεί τυφοειδή πυρετό και φορείς μπορεί να είναι μόνο άνθρωποι. Η *S. enterica* ορότυπου *Paratyphi* προκαλεί τυφοειδή- λοίμωξη στον άνθρωπο. Η *Salmonella enterica* ορότυπος *Typhimurium* και *Enteritidis*, είναι τα συνήθως υπεύθυνα για λοιμώξεις του ανθρώπου, συγκεκριμένα είναι αιτία γαστρεντερίτιδας ή εντεροκολίτιδας στον άνθρωπο, η οποία εντοπίζεται κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η *Salmonella enterica* ορότυπος *Typhimurium* είναι υπεύθυνη για την πρόκληση τροφοδηλητηριάσεων σε παγκόσμια κλίμακα και η *Salmonella enterica* ορότυπος *Enteritidis* είναι η πιο κοινή αιτία πρόκλησης τροφοδηλητηριάσεων σε παγκόσμια κλίμακα και συνήθως προσβάλλει τα πουλερικά και εξαπλώνεται στον

άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης των προϊόντων αυτών. Η *Salmonella enterica* ορότυπος *Choleraesuis* προκαλεί σηψαιμία (παράτυφο) σε χοίρους. Η *Salmonella enterica* ορότυπος *Dublin* προκαλεί βακτηριαίμια, φλεγμονή του πεπτικού σωλήνα και την άμβλωση σε αγελάδες. Τέλος, οι *Salmonella enterica* ορότυπος *pullorum* και *gallinarum* είναι αιτία μόλυνσης των πουλερικών (Doyle, 1991; [http://fsrio.nal.usda.gov/document\\_fsheetsheet.php?product\\_id=223](http://fsrio.nal.usda.gov/document_fsheetsheet.php?product_id=223)).



**Εικόνα 17:** Απεικόνιση *Salmonella enterica* από μικροσκόπιο  
(<https://www.google.gr>)

Όπως αναφέραμε παραπάνω η σαλμονέλωση μπορεί να εκδηλωθεί με την μορφή τριών διαφορετικών συνδρόμων, ανάλογα με το είδος του ορότυπου που την προκάλεσε (Doyle, 1991; Cox, 1999; Hawley et al., 2004): (α) Γαστρεντερίτιδα/Εντεροκολίτιδα: τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό, πυρετό (συνήθως διαρκεί μόνο 48 ώρες), πονοκέφαλο, μυαλγία, κοιλιακούς πόνους και διάρροια (περιστασιακά αιματώδης, διαρκεί 3-7 ημέρες). Ο χρόνος επώασης είναι 6-48 ώρες και η δόση που μπορεί να την προκαλέσει είναι συνήθως μεγάλη ( $>10^5$  κύτταρα) λόγω της ευαισθησίας που παρουσιάζει στο όξινο περιβάλλον του στομάχου. Ωστόσο η δόση μπορεί να ποικίλει ανάλογα με την κατάσταση της υγείας και την ηλικία του ατόμου, τον σερότυπο/στέλεχος του βακτηρίου, ενώ έχουν αναφερθεί περιστατικά μετά την κατανάλωση 4-45 κυττάρων του βακτηρίου. (β) Βακτηριαίμια: Εμφανίζεται κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και εκδηλώνεται όταν η *Salmonella* περάσει στο αίμα τους. Τα πιο κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν επίμονο πυρετό, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, λοιμώξεις των οφθαλμών. (γ) Τυφοειδής

πυρετός. Η πιο σοβαρή μορφή της ασθένειας προκαλείται μόνο από την *S. typhi* (η *S. paratyphi* είναι υπεύθυνη για ηπιότερη μορφή της ασθένειας που λέγεται παρατυφοειδής πυρετός). Ο χρόνος επώασης είναι 5-21 ημέρες και η ασθένεια προκαλείται από την κατανάλωση επιμολυσμένου νερού με το βακτήριο ή από επαφή με άλλα άτομα που νοσούν. Τα συμπτώματα διαρκούν 4-6 εβδομάδες και περιλαμβάνουν υψηλό πυρετό (πιθανόν με εμφάνιση κόκκινων κηλίδων, βραδυκαρδία), πονοκέφαλο, ανορεξία, αδυναμία, πνευματική σύγχυση, κοιλιακούς πόνους, δυσκοιλιότητα.

**Πίνακας 7 :** Ορότυποι Σαλμονέλλας και οι ξενιστές τους (Doyle, 1991).

<b><i>Salmonella</i></b>	<b>Ξενιστής</b>
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi	Άνθρωποι
<i>S. enterica</i> serovar Paratyphi	Άνθρωποι
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium	Άνθρωποι
<i>S. enterica</i> serovar Enteritidis	Άνθρωποι
<i>S. enterica</i> serovar Choleraesuis	Χοίροι
<i>S. enterica</i> serovar Dublin	Βοοειδή
<i>S. enterica</i> serovar Pullorum	Κοτόπουλο
<i>S. enterica</i> serovar Gallinarum	Κοτόπουλο

Πηγή των σαλμονελλών είναι το πεπτικό σύστημα των θερμόαιμων και ψυχρόαιμων ζώων. Με τα κόπρανα μεταδίδονται οι σαλμονέλλες στο νερό και στα τρόφιμα. Επίσης με επαφή (από άτομο ή ζώα που πάσχουν από σαλμονέλλωση ή είναι φορείς των σαλμονελλών) μεταδίδονται οι σαλμονέλλες στα τρόφιμα. Τα τρωκτικά και οι μύγες έχουν ιδιαίτερη σημασία για την μετάδοση σαλμονελλών στα τρόφιμα % (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Παρόλο που η *Salmonella* τυπικά σχετίζεται με νωπό ή ατελώς ψημένο κρέας κοτόπουλου, ο παθογόνος αυτός μικροοργανισμός έχει βρεθεί σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων όπως νωπό μοσχαρίσιο κρέας, αλλαντικά, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρια και γαρίδες, σάλτσες για σαλάτες, μίγματα για κέικ, κακάο, ζύμη αρτοποιίας, καρύδες, σοκολάτες και ζωοτροφές ([www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov); [http://fsrio.nal.usda.gov/document\\_fsheets.php?product\\_id=223](http://fsrio.nal.usda.gov/document_fsheets.php?product_id=223)).



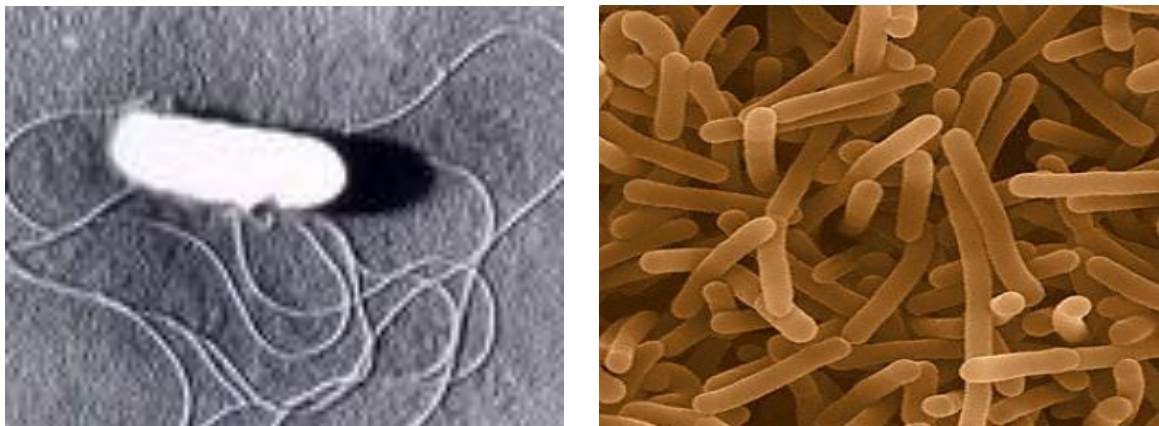
### 1.7.2. *Listeria spp.*

Το γένος της *Listeria* (Εικόνα 18) έλαβε το σημερινό του όνομα από τον Λίστερ το 1940 και περιλαμβάνει επτά είδη (<http://en.wikipedia.org/wiki/Listeria>): α) *L. monocytogenes*, β) *L. seligeri*, γ) *L. ivanovii*, δ) *L. innocua*, ε) *L. welshmeri*, στ) *L. grayi* και ζ) *L. murrayi*. Από αυτά, παθογόνα για τον άνθρωπο είναι η *Listeria monocytogenes* και η *L. ivanovii* ([http://www.news-medical.net/health/Listeria-What-is-Listeria-\(Greek\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Listeria-What-is-Listeria-(Greek).aspx)). Τα είδη που ανήκουν στο γένος *Listeria* είναι Gram-θετικά βακτήρια, τα οποία σε θερμοκρασία περιβάλλοντος παρουσιάζουν χαρακτηριστική στροβιλώδη κίνηση, δεν σχηματίζουν σπόρους και έχουν σχήμα ράβδου. Επιπλέον, πρόκειται για βακτήρια τα οποία είναι θετικά στην αντίδραση της καταλάσης και αρνητικά στην αντίδραση της οξειδάσης, ενώ μεταβολίζουν τη γλυκόζη παράγοντας οξύ και όχι αέριο (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 1993).

Η *Listeria monocytogenes* δεν σχηματίζει σπόρια. Η διαπίστωση ότι η *Listeria monocytogenes* είναι παθογόνος μικροοργανισμός για τον άνθρωπο έγινε στις αρχές της δεκαετίας του 1980. Η *Listeria monocytogenes* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 1° έως 45° C. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται από 30 έως 37° C. Το άριστο pH για την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* κυμαίνεται από 6 – 8. Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη του βακτηρίου εξαρτάται από τη θερμοκρασία επώασης του μικροοργανισμού, τη σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος την τιμή ενεργότητας νερού και τη συγκέντρωση του NaCl και άλλων αλάτων ή ανασταλτικών ουσιών. Οι τιμές pH στις οποίες παρατηρείται ανάπτυξη του μικροοργανισμού κυμαίνονται μεταξύ 4,1 και 9,6 (Κοντζεκίδου – Ρουκά, 2000). Οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης είναι μεταξύ 30 °C και 37 °C (FSAI, 2007). Η *L. monocytogenes* είναι ψυχρότροφο όσο και μεσόφιλο βακτήριο, δεδομένου ότι αναπτύσσεται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Ως κατώτερο θερμοκρασιακό όριο ανάπτυξης του βακτηρίου έχουν αναφερθεί οι εξής τιμές: -1,5 °C (<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>) ενώ ως ανώτερο έχει αναφερθεί η τιμή των 44-45 °C (Lungu et al, 2009).

Η *L. monocytogenes* παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα τρόφιμα που διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες και επιβιώνει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε τιμές pH που πλησιάζουν το 7 ο μικροοργανισμός παρουσιάζει τη μεγαλύτερη θερμοανθεκτικότητα, ενώ σε όξινο περιβάλλον καταστρέφεται ευκολότερα

(Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, αλλά η ανάπτυξη του είναι βέλτιστη υπό μικροαερόφιλες συνθήκες. Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε συνθήκες χαμηλής ή μηδενικής περιεκτικότητας σε οξυγόνο (Lungu et al., 2009). Η χρήση συσκευασίας υπό κενό μπορεί να ευνοήσει σημαντικά την ανάπτυξη του βακτηρίου λόγω του μικροαερόφιλου χαρακτήρα της (Buchanan και Klawitter, 1990; Buchanan και Phillips, 1990).



**Εικόνα 18:** Απεικόνιση της *Listeria monocytogenes* από μικροσκόπιο (<http://www.ciriscience.org>; <http://www.picsearch.com/pictures/science/bacteria%20h/listeria%20bacteria.html>)

Η λιστερίωση δεν εμφανίζεται συχνά στον άνθρωπο. Από στοιχεία που προέρχονται από τις ΗΠΑ, η συχνότητα εμφάνισης της ασθένειας είναι 8 άτομα ανά ένα εκατομμύριο πληθυσμού. Από αυτούς το 1/3 είναι νεογέννητα και τα 2/3 ηλικιωμένοι και άτομα που βρίσκονται σε αναστολή. Τρόφιμα που έχει αναφερθεί ότι προκάλεσαν λιστερίωση είναι κυρίως μαλακά τυριά, νωπό και παστεριωμένο γάλα και σπανιότερα νωπά λαχανικά και πουλερικά. Τα συμπτώματα της λιστερίωσης είναι παρόμοια με της μηνιγγίτιδας και σε ορισμένες περιπτώσεις συνοδεύονται από εμετό, κοιλιακούς πόνους και διάρροια. Τα συμπτώματα της λιστερίωσης δεν παρουσιάζουν ομοιομορφία σε ρόλους τους ανθρώπους επειδή η πορεία της ασθένειας εξαρτάται από τη γενική κατάσταση του ξενιστή. Υγιή άτομα (εκτός από τα νεογέννητα) που δεν έχουν υποβληθεί σε ανοσοκαταστολή είναι πολύ ανθεκτικά σε μολύνσεις από *L. monocytogenes* και δεν υπάρχουν πληροφορίες ότι

τέτοια άτομα έχουν νοσήσει από λιστερίωση. Άτομα όμως που έχουν υποβληθεί σε ανοσοκαταστολή, άτομα που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με κορτικοστεροειδή, αλκοολικοί, διαβητικοί, καρδιοπαθείς, άτομα που πάσχουν από AIDS, άτομα που έχουν υποβληθεί σε μεταμοσχεύσεις, ηλικιωμένοι και νεογέννητα μπορεί να προσβληθούν από *L. monocytogenes* ακόμη κι αν καταναλώσουν τρόφιμα που μπορεί να φέρουν 1 κύτταρο του μικροοργανισμού/g. (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Για να αποφύγει την λιστερίωση ο μέσος καταναλωτής (υγιείς ενήλικες και παιδιά) πρέπει να ψήνει τα νωπά προϊόντα ζωικής προέλευσης (μοσχάρι, κοτόπουλο, χοιρινό) σε (εσωτερική)  $\theta > 70 \text{ }^\circ\text{C}$ , να πλένει τα φρέσκα λαχανικά, να αποφεύγει την κατανάλωση προϊόντων από μη παστεριωμένο γάλα, να πλένει τα χέρια του πριν από κάθε γεύμα και να καταναλώνει το έτοιμο φαγητό το συντομότερο μετά το άνοιγμα της συσκευασίας. Τα μέτρα πρόληψης για καταναλωτές που ανήκουν σε ομάδα υψηλού κινδύνου (εγκυμονούσες, ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς) είναι η αποφυγή κατανάλωσης hot dogs, luncheon meats, deli meats, μαλακών τυριών όπως φέτα, Brie, blue cheese και τυριών μεξικανικού τύπου (queso blanco, queso fresco, Panela) εκτός αν στην συσκευασία αναγράφεται ότι προέρχονται από παστεριωμένο γάλα, όχι κατανάλωση pâté (ή ανάλογων αλειμμάτων) και καπνιστών ψαριών (<http://www.cdc.gov>).

Η *Listeria monocytogenes* βρίσκεται στο έδαφος, νερό, αποχέτευση, στα φυτά, και στον εντερικό σωλήνα των κατοικίδιων ζώων (πρόβατα, βοοειδή, αίγες, κλπ.). Το κρέας, τα λαχανικά, τα ψάρια και τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν πιθανή πηγή για την μετάδοση. Ακόμη τα έτοιμα προς κατανάλωση ή τα ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα όπως τα χοτ ντογκ, τα κονσερβοποιημένα κρέατα, τα καπνιστά ψάρια, ήταν υπεύθυνα για περιστατικά λιστερίωσης στο παρελθόν. Έχουν κατηγορηθεί επίσης για τον ίδιο λόγο και σαλάτα ρύζι, καλαμπόκι και κρύα σαλάτα τόνου, corned beef και ζαμπόν, κρύο καπνιστή πέστροφα και το τυρί (Doyle, 1991). Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα παθογόνο βακτήριο το οποίο απασχολεί ιδιαίτερα τους παραγωγούς των ημι-μαγειρεμένων και έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων που διατηρούνται υπό ψύξη, επειδή απαντάται παντού στο περιβάλλον και έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης αλλά και σε χαμηλά επίπεδα  $\text{O}_2$  που χρησιμοποιούνται με σκοπό την επιμήκυνση του χρόνου ζωής των παραπάνω προϊόντων (Szabo *et al.*, 2003). Από μελέτες που έγιναν σε 14 χώρες για την

παρουσία της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα διαπιστώθηκε ότι ο μικροοργανισμός υπάρχει στο 45 % των δειγμάτων του νωπού γάλακτος, στο 95 % δειγμάτων χοιρινού κρέατος, 60 % δειγμάτων πουλερικών, στο 79 % των δειγμάτων κιμά και στο 30 % των δειγμάτων ορισμένων λαχανικών (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 1993). Το νωπό γάλα αποτελεί μία από τις κύριες πηγές λιστερίωσης για τον άνθρωπο (Meyer-Brosseta et al., 2003). Από το γάλα το παθογόνο μπορεί να μεταδοθεί σε όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα, όπου μπορεί να επιβιώσει της επεξεργασίας και αποθήκευσης και να προκαλέσει λοίμωξη (McLauchlin et al., 1990; De Buyser et al., 2001), κυρίως τα μαλακά τυριά εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα επιβίωσης/ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (Genigeorgis et al., 1991; Farber et al., 1991; Back et al., 1993; Loncarevic et al., 1995; Rasmaman et al., 1998; Rudolf et al., 2001).

Η *Listeria innocua* βρίσκεται στο νερό, το έδαφος, τη βλάστηση, τα οικόσιτα ζώα και στον άνθρωπο. Μπορεί να επιβιώσει σε ακραίες τιμές pH (4,4-9,8) και θερμοκρασίας και σε υψηλή συγκέντρωση άλατος. Είναι ένα μη-σπορογόνο βακτήριο. Είναι μεσόφιλο βακτήριο, με βέλτιστη περιοχή θερμοκρασιών τους 30-37° C. Η *Listeria innocua* είναι σημαντική επειδή είναι παρόμοια με το τροφιμογενές παθογόνο *L. monocytogenes* ([http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria\\_innocua](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria_innocua)). Γενικά η *Listeria innocua*, στα τρόφιμα, είναι το πλησιέστερο είδος προς τη *L. monocytogenes*, αλλά δεν ασκεί παθογόνο δράση ([http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria/Listeria\\_innocua.html](http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria/Listeria_innocua.html)). Η *L. innocua* δεν μολύνει ανθρώπους ή ζώα. Η *Listeria innocua*, όπως και άλλα μέλη του γένους τους, είναι προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, πράγμα που σημαίνει ότι μπορούν να μεταβολίζουν τη γλυκόζη (και άλλα απλά σάκχαρα) τόσο σε αερόβιες, όσο και σε αναερόβιες συνθήκες. Σύμφωνα με την αερόβιο μεταβολισμό γλυκόζης, η *L. innocua* σχηματίζει γαλακτικό οξύ και οξικό οξύ. Ωστόσο, κάτω από αναερόβιες συνθήκες, ο μεταβολισμός γλυκόζης αποδίδει μόνο γαλακτικό οξύ.

Η *Listeria innocua*, όπως υποδηλώνει το όνομά του, είναι ακίνδυνο για άλλους οργανισμούς. Στερείται το 10-kb ορότυπο μολυσματικότητας που απαιτείται για παθογένεια. Αντίθετα είναι δυνατόν να λειτουργεί ανασταλτικά για την *L. monocytogenes*. Πρόσφατα, οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι η *Listeria innocua* παράγει ανασταλτικές ουσίες έναντι της *L. monocytogenes*). Αποκαλύφθηκε ότι το πλασμίδιο της *L. innocua* παρήγαγε δύο ενώσεις: μία βακτηριοσίνη και μια πρωτεΐνη (που

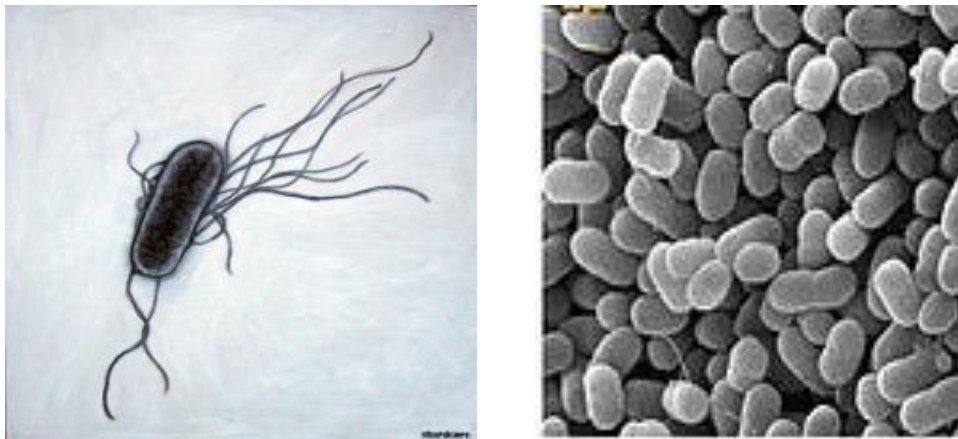
εμπλέκονται στην ανοσία απέναντι σε άλλες βακτηριοσίνες). Αυτή η ανακάλυψη έχει ευεργετικές συνέπειες για τον έλεγχο της *Listeria monocytogenes*, αφού οι βακτηριοσίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αναστείλουν την ανάπτυξη της ([http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria\\_innocua](http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Listeria_innocua)).

### 1.7.3. *Escherichia coli* (O157:H7)

Η *Escherichia coli* O157:H7 (Εικόνα 19) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως παθογόνο το 1982. Είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και έχει μικρά, αρνητικά κατά Gram ραβδόμορφα κύτταρα (Doyle, 1991). Η *E. coli* συνήθως βρίσκεται στο έντερο ενδόθερμων ζώων. Συνήθως τα στελέχη αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του εντέρου όντας αβλαβή και μπορούν να ωφελήσουν τους ξενιστές τους παράγοντας βιταμίνη K<sub>2</sub> και εμποδίζοντας την εγκατάσταση άλλων παθογόνων βακτηρίων μέσα στο έντερο. Απαντώνται στα κόπρανα των ζώων και των ανθρώπων (<http://el.wikipedia.org/wiki>). Το βακτήριο *Escherichia coli* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και μπορεί να επιμολύνει τα προϊόντα κρέατος και πουλερικών, κατά τη διάρκεια της σφαγής και άλλων σταδίων της επεξεργασίας τους (Juneja and Marmar, 1999). Έχει απομονωθεί από χάμπουργκερ, μπιφτέκια, ροσμπίφ, κεφτεδάκια, ρολά γαλοπούλας, γαλακτοκομικά προϊόντα, φρέσκα φρούτα και λαχανικά (Meng και Doyle, 1998; Juneja και Marmar, 1999). Αναπτύσσεται άριστα στους 30-42 ° C, αναπτύσσεται ελάχιστα στους 44-45 ° C, ενώ δεν αναπτύσσεται σε 10 ° C ή χαμηλότερη. Σε αντίθεση με άλλα στελέχη συμβιωτικών, η *E. coli* O157: H7 δεν ζυμώνει τη σορβιτόλη (Bhounia, 2008). Η *E. coli* O157: H7 έχει μεγάλη αντοχή σε χαμηλό pH (όξινο περιβάλλον), οπότε μπορεί να επιβιώσει σε όξινα τρόφιμα (Conner και Kotrola, 1995; Lin et al., 1996).

Ορισμένα στελέχη της *E. coli* προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις και κατατάσσονται σε πέντε ομάδες: εντεροπαθογόνα (EPEC), εντεροτοξιγεμορραγικά (ETEC), εντεροεισβάλλοντα (EIEC) εντεροαιμορραγικά (EHEC), και προαιρετικά εντεροπαθογόνα (FEEC). Τα EPEC είναι στελέχη που δεν παράγουν εντεροτοξίνες αν και προκαλούν διάρροια. Τα ETEC είναι στελέχη που παράγουν δύο εντεροτοξίνες, μια ευαίσθητη στη θέρμανση και μια ανθεκτική στη θέρμανση. Τα EIEC στελέχη δεν παράγουν εντεροτοξίνες και προκαλούν παρόμοιες τροφικές δηλητηριάσεις με τις σιγγέλες. Τα EHEC στελέχη που αντιπροσωπεύονται από την *E. coli* O157:H7

παράγουν δύο τοξίνες την SLT-I και την SLT-II. Οι εντεροτοξίνες παράγονται στη φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης και η μέγιστη ποσότητα παράγεται σε 7-24h. Η παραγωγή των εντεροτοξινών ευνοείται σε pH 7,5 έως 8,5 (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Η *E. coli* O157: H7 έχει μεγάλη αντοχή σε χαμηλό pH (όξινο περιβάλλον), οπότε μπορεί να επιβιώσει σε όξινα τρόφιμα (Conner και Kotrola, 1995; Lin et al., 1996).



**Εικόνα 19:** Αποικίες του *E. coli* O157: H7 που έχουν αναπτυχθεί σε άγαρ για 48 ώρες στους 28 ° C (<http://en.wikipedia.org>)

Η ασθένεια που προκαλείται από βακτήριο *E. coli* O157: H7 είναι συνήθως αρκετά σοβαρή και μπορεί να εκφραστεί ως τρεις διαφορετικές εκδηλώσεις: αιμορραγική κολίτιδα, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο ή θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα. Τα συμπτώματα της αιμορραγικής κολίτιδας ξεκινούν με αιφνίδια έναρξη έντονου κοιλιακού πόνου που ακολουθούνται εντός 24 ωρών από διάρροια που αργότερα γίνεται έντονα αιματηρή. Συνήθως έχει ελάχιστο ή καθόλου πυρετό και η διάρκεια της νόσου είναι 2 έως 9 ημέρες. Τα συμπτώματα της δεύτερης ασθένειας, που είναι η κύρια αιτία της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας στα παιδιά, συνήθως αρχίζουν μετά την αιμορραγική κολίτιδα. Οι ασθενείς της ομάδας αυτής έχουν συνήθως: μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, θρομβοκυτταροπενία και οξεία νεφροπάθεια, γι' αυτό συχνά τα άτομα αυτά χρειάζονται αιμοκάθαρση και μεταγγίσεις αίματος. Ασθενείς με θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα παρουσιάζουν κλινικά και παθολογικά χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνων που πάσχουν από αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, αλλά με συχνή προσβολή και του κεντρικού νευρικού συστήματος (επιληπτικές κρίσεις) (Doyle, 1991).

Γαστρεντερίτιδα από *E. coli* προκαλείται από κατανάλωση τροφίμων που φέρουν  $10^6 - 10^{10}$  ζώντα κύτταρα/g. Τα κύτταρα του μικροοργανισμού προσβάλλουν το επιθήλιο του εντέρου και παράγουν εντεροτοξίνες. Τροφικές δηλητηριάσεις από *E. coli* έχουν προκληθεί από μαλακά τυριά, κρέμες, πατάτες πουρέ και κρεατοσκευάσματα. Τα στελέχη EHEC προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα. Είναι πιο ευαίσθητα στη θέρμανση από τις σαλμονέλλες (η D-τιμή στους  $60^\circ\text{C}$  σε κιμά είναι 45 sec), αλλά επιζούν σε κιμά που διατηρείται στους  $-20^\circ\text{C}$  για 9 μήνες χωρίς να μειωθεί ο αριθμός τους. Για την πρόληψη των τροφικών δηλητηριάσεων από στελέχη της *E. coli* προτείνεται επαρκής θερμική επεξεργασία των τροφίμων, ψύξη των τροφίμων μετά τη θερμική επεξεργασία και επεξεργασία των τροφίμων υπό υγιεινές συνθήκες και χλωρίωση του νερού (Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2000). Μια ποικιλία τροφίμων έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση επιδημιών από *E. coli*, όπως μη παστεριωμένο κατσικίσιο γάλα και τυρί (Bielaszewska et al., 1997; Deschenes et al., 1996), κρέας ελαφιού (Keene et al., 1997), σάντουιτς με βάση το κρέας (McDonnell et al., 1997) και μαρούλι (Mermin et al., 1997). Επίσης έχει βρεθεί ότι επιβιώνει σε τρόφιμα με χαμηλό pH, όπως μηλίτης (Miller και Kaspar, 1994), μαγιονέζα (Zhao και Doyle, 1994), μουστάρδα και κέτσαπ (Tsai και Ingham, 1997). Ακόμη, γαλακτοκομικά προϊόντα με όξινο pH, όπως το γιαούρτι και τα τυριά που έχουν υποστεί ζύμωση, έχουν συσχετιστεί με την *E. coli* O157: H7 (Morgan et al., 1993; Alterkruse et al., 1998; De Buyser et al., 2001). Τέλος οι Dontorou et al. (2003) εξέτασαν την παρουσία της *Escherichia coli* O157: H7 σε εξακόσια δείγματα διαφόρων ελληνικών τροφίμων (παστεριωμένο αγελαδινό, πρόβειο και κατσικίσιο γάλα, κιμά, άβραστα κατεψυγμένα μπιφτέκια από βοδινό κρέας, σάντουιτς με ζαμπόν ή γαλοπούλα, ανάμεικτη σαλάτα λαχανικών με μαγιονέζα και μαρούλι, φρέσκα παραδοσιακά ελληνικά χοιρινά λουκάνικα και έντερα των χοίρων κατάλληλα για κοκορέτσι. Το παθογόνο ανιχνεύτηκε σε 1 από τα 100 (1,0%) δείγματα πρόβειου γάλακτος, σε 1 από τα 75 (1,3%) στα νωπά λουκάνικα και το 1 από 50 (2,0%) στα έντερα χοίρων που προοριζόταν για κοκορέτσι.

Για να αποφευχθεί η πρόκληση τροφολοίμωξης από το βακτήριο αυτό θα πρέπει να επιλέγουμε τρόφιμα από ασφαλείς πηγές, να διατηρούμε τα ευαλλοίωτα τρόφιμα υπό συνθήκες ψύξης ή κατάψυξης, να πλένουμε πολύ καλά τα φρούτα και λαχανικά και να μην καταναλώνουμε όσα έχουν κατεστραμμένους ιστούς. Επιπλέον,

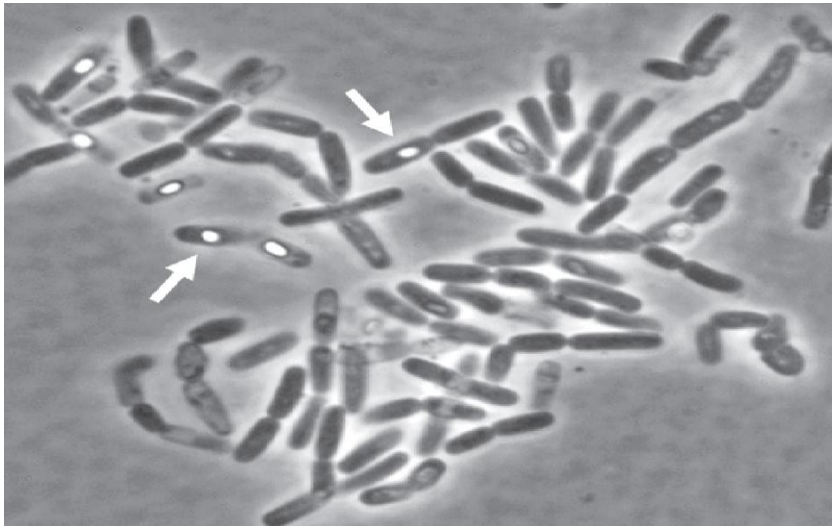
τα τρόφιμα τα οποία έχουν μαγειρευτεί και δεν καταναλωθούν άμεσα θα πρέπει να ψυχθούν γρήγορα στους 5 °C. Για να θεωρηθεί το κρέας ασφαλές, είτε είναι κόκκινο είτε λευκό, για κατανάλωση θα πρέπει να μαγειρευτεί τουλάχιστον στους 74 °C (Doyle et al., 1987).

#### **1.7.4. *Bacillus cereus***

Ο *Bacillus cereus* (Εικόνα 20) είναι ένα Gram-θετικό ραβδόμορφο σπορογόνο βακτήριο, παρουσιάζει κινητικότητα, σχηματίζει ελλειψοειδή ή κυλινδρικά σπόρια στο άκρο του ραβδίου (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Υπό συνθήκες μειωμένης διαθεσιμότητας σε θρεπτικά συστατικά, τα βλαστικά κύτταρα του *B. cereus* προβαίνουν στην διαδικασία της σπορογονίας. Η σπορογονία είναι μια αντιστρεπτή διαδικασία, εφόσον κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και αυξημένης θρεπτικής διαθεσιμότητας, οι σπόροι μπορούν να επιστρέψουν στην αρχική μορφή βλαστικού κυττάρου (Hawley et al., 2004). Ακριβώς η ικανότητα του *Bacillus cereus* να σχηματίζει σπόρους, του επιτρέπει να επιβιώνουν κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων (Iurlina et al., 2006).

Ο *Bacillus cereus* ανήκει στο γένος *Bacillus* spp. (Whyte et al., 2004). Το βακτήριο αυτό παράγει τουλάχιστον πέντε διαφορετικές εντεροτοξίνες (HBL, Nhe, CytK, BceT και FM) και μια εμετική τοξίνη. Οι εντεροτοξίνες HBL, Nhe και CytK είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες στην πρόκληση της διαρροϊκής νόσου. Οι εντεροτοξίνες είναι ευαίσθητες στη θερμική επεξεργασία (αδρανοποιούνται με θέρμανση στους 56° C για 5 min), είναι ευαίσθητες σε χαμηλές τιμές pH, στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων και αδρανοποιούνται στο όξινο περιβάλλον του στομάχου. Έχει διαπιστωθεί σε in vitro μελέτες ότι η εμετική τοξίνη του *B. cereus* παραμένει σταθερή ακόμη και μετά από θέρμανση στους 121° C για 2 h, ενώ είναι ιδιαίτερα ανθεκτική σε χαμηλές τιμές pH (μέχρι 2) και στην πρωτεόλυση. Συνεπώς, μπορεί να παραμείνει δραστική στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και στην επίδραση της πρωτεολυτικής δράσης των ενζύμων του εντερικού σωλήνα (<http://www.hvms.gr/el/journal/volume-history/issues2010/1110-bacillus-cereus-ena-simantiko-trofimogenes-pathogono.html?catid=135%3Avolume61-issue2>).





**Εικόνα 20:** Απεικόνιση του *Bacillus cereus* και των σπορίων του από μικροσκόπιο (1000 x μεγέθυνση) (Bhouinia, 2008).

Ο *Bacillus cereus* είναι μεσόφιλος μικροοργανισμός και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 4° - 50° C, ενώ έχει άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 30° - 37° C (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000). Αξίζει να σημειωθεί ότι ψυχρότροφα στελέχη του μικροοργανισμού που έχουν απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα εμφανίζουν ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 0-2 °C (Zwietering et al., 1996). Αναπτύσσεται σε pH 4,9 - 9,3, με άριστο pH ανάπτυξης το 7,2. Η ανάπτυξη του αναστέλλεται σε συγκέντρωση NaCl μεγαλύτερη από 8% (Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2000). Ο *Bacillus cereus* αναπτύσσεται σε  $\alpha_w > 0.912-0.950$ . Οι σπόροι του *B. cereus* επιβιώνουν και αναπτύσσονται σε πολύ χαμηλές τιμές ενεργότητας ύδατος (Whyte et al., 2004). Η ανθεκτικότητα του βακτηρίου στο NaCl μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος (Mahakarnchanakul et al., 1999). Τα βλαστικά κύτταρα του *Bacillus cereus* είναι πολύ ευαίσθητα στη θέρμανση. Τα σπόρια του *Bacillus cereus* έχουν D-τιμή στους 100° C σε αποβουτηρωμένο γάλα 2,7 - 3,1 min (Κοτζεκίδου - Ρουκά, 2000). Το παθογόνο βακτήριο *B. cereus* παρουσιάζει βέλτιστη (άριστη) ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες, αλλά διαθέτει την ικανότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται απουσία οξυγόνου, δηλαδή υπό αναερόβιες συνθήκες. Ωστόσο, η παραγωγή τοξίνης και η ανάπτυξη του βακτηρίου γίνεται με μικρότερο ρυθμό από το βακτήριο του *B. cereus* σε αναερόβιο περιβάλλον (Whyte και Wong, 2004).

Ο *B. cereus* προκαλεί μια διαρροϊκή και μια εμετική μορφή τροφιμογενούς νόσου. Η πρώτη μορφή προκαλείται από τις εντεροτοξίνες του *B. cereus* που

παράγονται στον εντερικό σωλήνα μετά τη βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη των βλαστικών μορφών του βακτηρίου, με κύρια συμπτώματα τα υδαρή κόπρανα και το κοιλιακό άλγος. Η δεύτερη μορφή προκαλείται από την πρόσληψη της προσχηματισμένης στα τρόφιμα τοξίνης. Τα συμπτώματα είναι ναυτία και έμετος που περιστασιακά συνοδεύονται από κοιλιακό άλγος ή διάρροια. Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις που προκλήθηκαν από τον *B. cereus* έχουν συσχετιστεί με διάφορα είδη τροφίμων. Η εμετική μορφή συχνότερα έχει συσχετιστεί με την κατανάλωση ρυζιού, ζυμαρικών και άλλων αμυλούχων τροφίμων, ενώ η διαρροϊκή με την κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, λαχανικών και κρέατος. Τα τρόφιμα που συχνότερα εμπλέκονται στην πρόκληση νόσου από το *B. cereus* είναι το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Μεταξύ των τροφιμογενών λοιμώξεων που έχουν αναφερθεί στη Βόρεια Αμερική, στην Ευρώπη και την Ιαπωνία, οι περιπτώσεις που αποδόθηκαν στον *B. cereus* αποτελούσαν το 1% έως 22%. Όμως, τα περισσότερα κρούσματα τροφιμογενούς νόσου από τον *B. cereus* έχουν συσχετιστεί με την κατανάλωση μαγειρεμένων τροφίμων που ψύχθηκαν αργά και διατηρήθηκαν σε ακατάλληλες συνθήκες ψύξης. Οι τροφιμογενείς νόσοι από τον *B. cereus* αποτελούν σημαντικό πρόβλημα σε εστιατόρια και επιχειρήσεις τροφοδοσίας (<http://www.hvms.gr/el/journal/volume-history/issues2010/1110-bacillus-cereus-ena-simantiko>). Τα συμπτώματα της τροφικής δηλητηρίασης από την εμετική τοξίνη του *B. cereus* εμφανίζονται σε 1 – 6 h από τη λήψη της τροφής και για να προκληθεί τροφική δηλητηρίαση το τρόφιμο πρέπει να περιέχει περισσότερα από  $2 \times 10^9$  cfu/g. Τα συμπτώματα της τροφικής δηλητηρίασης από την διαρροϊκή τοξίνη του *B. cereus* είναι πιο ήπια και εμφανίζονται σε 8 – 16 h από τη λήψη της τροφής και για να προκληθεί τροφική δηλητηρίαση το τρόφιμο πρέπει να φέρει  $10^7 - 10^8$  cfu/g (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000).

Τα τρόφιμα που σχετίζονται με τροφικές δηλητηριάσεις από *Bacillus cereus* είναι δημητριακά, πουτίγκα και σούπες. Το εμετικό σύνδρομο συνδέεται γενικά με ζυμαρικά, ρύζι, το βόειο κρέας, πουλερικά, γάλα πουτίγκα, σάλτσα βανίλιας και τα παρασκευάσματα για βρέφη. Ενώ το διαρροϊκό σύνδρομο σχετίζεται κυρίως με κρέας, ψάρια, σούπες, λαχανικά (καλαμπόκι, καλαμποκάλευρο και πουρές) και τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να έχουν μολυνθεί με τον *Bacillus*, γεγονός που επιδεινώνει κακή ποιότητα του γάλακτος

(Doyle, 1991). Για να αποφύγουμε μόλυνση από το παθογόνο βακτήριο *B. cereus* χρειάζεται ψήσιμο όλων των τροφίμων σε τελική- εσωτερική θερμοκρασία μεγαλύτερη από 75 °C. Ωστόσο οι σπόροι είναι θερμοαανθεκτικοί. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζονται τα μαγειρεμένα τρόφιμα τα οποία πρέπει να συντηρούνται, αμέσως μετά τη θερμική τους επεξεργασία, υπό ψύξη ( $\theta \leq 5$  °C) ή να διατηρούνται σε θερμοκρασία μεγαλύτερη από 65 °C. (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000; FSAI, 2007).

---

## 1.8. Οργανοληπτική Εξέταση Τροφίμων

---

Η οργανοληπτική εξέταση αποτελεί μία υποκειμενική μέθοδο ποιοτικού ελέγχου ενός τροφίμου, γιατί βασίζεται στην προσωπική εκτίμηση. Είναι αποτέλεσμα φυσιολογικών αντιδράσεων (αισθήσεων) και εξαρτώνται από την εκπαίδευση, την εμπειρία, τις προσωπικές εκτιμήσεις, τη δύναμη της αντίληψης καθώς και την φυσιολογική ευαισθησία του ατόμου. Επειδή βασίζεται στα όργανα αισθήσεων ονομάζονται οργανοληπτικές μέθοδοι. Για παράδειγμα αναφέρονται οι μέθοδοι αξιολόγησης των τροφίμων με βάση την όραση, την αφή, την όσφρηση, τη γεύση κτλ. Επειδή ακριβώς η αξιολόγηση στηρίζεται στο υποκειμενικό στοιχείο οφείλει να γίνεται από εκπαιδευμένο ή έμπειρο προσωπικό (panel) κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με συγκεκριμένες τεχνικές αξιολόγησης επεξεργάζονται στατιστικά ούτως ώστε να εξουδετερώνεται κατά το δυνατόν ο υποκειμενικός παράγοντας εκτίμησης (Τασιούλα και Κοντομηνάς, 2003). Οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων περιλαμβάνουν: (α) την εμφάνιση (χρώμα, μέγεθος, σχήμα, παρουσία ή απουσία ελαττωμάτων), (β) τη μηχανική αίσθηση στο στόμα (δομή, συνεκτικότητα, ιξώδες) και (γ) τη γεύση και οσμή (Πολυχρονιαδου – Αληχανίδου, 1996).

Η δομή και η συνεκτικότητα των διάφορων στερεών τροφίμων και το ιξώδες των υγρών είναι στενά συνδεδεμένα με τη χημική σύσταση και τη νωπότητα των τροφίμων. Το χρώμα είναι σημαντικός παράγοντας εκτίμησης ενός τροφίμου. Αλλοιωμένο χρώμα ή μερικός αποχρωματισμός επηρεάζει αρνητικά τους καταναλωτές γιατί συνοδεύεται συχνά από ανεπιθύμητες μεταβολές στην υφή, την οσμή και τη γεύση (Πολυχρονιαδου – Αληχανίδου, 1996). Το χρώμα των τροφίμων

είναι αποτέλεσμα της παρουσίας σ' αυτά φυσικών ή συνθετικών χρωστικών. Οι δεύτερες προστίθενται στα κατεργασμένα κυρίως τρόφιμα για αρκετούς λόγους: (α) το φυσικό χρώμα καταστρέφεται κατά την παρασκευή ή την αποθήκευση των τροφίμων, οπότε η χρωστική δίνει ελκυστική εμφάνιση αντικαθιστώντας το φυσικό χρώμα, (β) χρωματίζονται κάποια τρόφιμα – παγωτά καραμέλες, τα οποία αρχικά έχουν λίγο έως καθόλου χρώμα, (γ) ενισχύεται το ήδη υπάρχον χρώμα (Τασιούλα-Μάργαρη και Κοντομηνάς, 2003).

Οι δύο παραπάνω κατηγορίες χρωστικών είναι οργανικές ενώσεις. Στις φυσικές χρωστικές μπορούν να υπαχθούν και οι χρωστικές εκείνες που αναπτύσσονται κατά τις διάφορες κατεργασίες των τροφίμων π.χ. καραμελοποίηση των σακχάρων κοκ. Οι φυσικές χρωστικές βιοσυντίθενται στους διάφορους φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και προσδίδουν σε αυτούς διάφορα χρώματα. Οι χλωροφύλλες και οι μυογλοβίνες δίνουν στα οπωροκηπευτικά και τα κρέατα το χαρακτηριστικό πράσινο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα, τα καροτενοειδή που απαντούν στα ψάρια, τα οστρακοειδή, τα αυγά, τα φρούτα, τα δημητριακά και γαλακτοκομικά προϊόντα είναι υπεύθυνα για το κίτρινο και κόκκινο χρώμα αυτών. Τέλος, οι μελανοΐδινες και το καραμελόχρωμα, χρωστικές σκούρου χρώματος, απαντούν σε σιρόπια, κομπόστες, μαρμελάδες και δημητριακά προϊόντα και είναι αποτέλεσμα της θερμικής επεξεργασίας αυτών. Το μαύρο χρώμα και η στυφή γεύση των φρούτων οφείλεται στις ταννίνες. Οι ταννίνες περιλαμβάνουν διάφορα πολυμερή των πολυφαινολικών ενώσεων κατεχινών, των λευκοανθοκυανινών και ορισμένων υδροξυοξέων (Τασιούλα- Μάργαρη και Κοντομηνάς, 2003).

Η γεύση και η οσμή αλληλοσυμπληρώνονται και αλληλοεπηρεάζονται κατά τη διάρκεια της μάσησης, οι Αγγλοσάξονες χρησιμοποιούν έναν άλλο όρο, το flavor για να αποδώσουν την συνδυασμένη αυτή αίσθηση κατά την κατανάλωση ενός προϊόντος. Το flavor σπάνια μπορεί να αποδοθεί με αντικειμενικές μεθόδους, έτσι ο σωστότερος τρόπος ελέγχου του είναι η εξέταση από ομάδα δοκιμαστών (Πολυχρονιαδου – Αληχανίδου, 1996). Οι ενώσεις που υπάρχουν στο τρόφιμο δίνουν σε αυτό τις χαρακτηριστικές του οργανοληπτικές ιδιότητες και κατόπιν αλληλεπίδρασής τους με τα αισθητήρια όργανα του ανθρώπου, προκαλούν ένα σήμα, το οποίο μεταφέρεται μέσω του νευρικού συστήματος στον εγκέφαλο και έτσι

δημιουργείται η συγκεκριμένη εντύπωση της γεύσης και της οσμής (Βουδούρης και Κοντομηνάς, 2009).

Όσον αφορά τη γεύση τα κύρια γευστικά ερεθίσματα είναι τέσσερα: το γλυκό, το πικρό, το όξινο και το αλμυρό. Η αίσθηση της γεύσης γίνεται αντιληπτή με τη βοήθεια των γευστικών καλύκων που υπάρχουν στη γλώσσα. Εκτός από τα τέσσερα κύρια γευστικά ερεθίσματα υπάρχουν και άλλα δευτερεύοντα που συντελούν στη γεύση. Τα σπουδαιότερα από αυτά είναι: (α) το αλκαλικό ερέθισμα που αποδίδεται στην παρουσία του  $-OH$ , (β) το στυφό ερέθισμα που οφείλεται στις ταννίνες, π.χ. τσάι, (γ) το δροσιστικό ερέθισμα που είναι χαρακτηριστικό της μενθόλης, (δ) το καυστικό ερέθισμα που είναι χαρακτηριστικό των μπαχαρικών, πιπεριού, πιπεριάς κλπ., (ε) το μεταλλικό ερέθισμα που αποδίδεται στα άλατα των μετάλλων, όπως του Hg, Ag, Fe, Zn, και (στ) κατά την ανάμιξη διαφόρων γευστικών ουσιών προκύπτει η σύνθετη γεύση που είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γλυκού και του ξινού (αναλογία σακχάρων/οξέων) στα φρούτα (Βουδούρης και Κοντομηνάς, 2009).

Ο μηχανισμός της όσφρησης είναι πολύ πιο πολύπλοκος από εκείνον της γεύσης. Υπάρχουν χιλιάδες οσμές και η ευαισθησία του οργάνου όσφρησης είναι κατά 100.000 φορές μεγαλύτερη από την ευαισθησία του οργάνου της γεύσης. Όταν μια οσμηρή ένωση φτάσει στο όργανο της όσφρησης (μύτη) συμβαίνει αντίδραση μεταξύ του οσμηρού μορίου και του δέκτη της όσφρησης που οδηγεί στη δημιουργία ηλεκτρικού σήματος. Το ηλεκτρικό αυτό σήμα, μέσω του νευρικού συστήματος φτάνει στον εγκέφαλο, όπου γίνεται και η ταυτοποίηση της συγκεκριμένης οσμής. Ο αριθμός των δεκτών της όσφρησης στη μύτη είναι της τάξης των  $10^8$ . Το άρωμα ενός τροφίμου είναι συνήθως συνισταμένη μεγάλου αριθμού ενώσεων. Για να χαρακτηριστεί λοιπόν το τρόφιμο ως προς το άρωμά του πρέπει να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν οι ενώσεις που είναι υπεύθυνες με τις μεθόδους που αναφέρθηκαν στην ενότητα για την ανάλυση των πτητικών συστατικών των τροφίμων. Αυτός είναι ο αντικειμενικός τρόπος προσδιορισμού του αρώματος ενός τροφίμου. Όμως πρέπει να σημειωθεί ότι για το σκοπό αυτό και ιδιαίτερα για το χαρακτηρισμό της γεύσης πρέπει να διεξαχθεί και οργανοληπτικός έλεγχος (Βουδούρης και Κοντομηνάς, 2009).

---

## 1.9. Σκοπός της Εργασίας

---

Σκοπός της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν: α) ο προσδιορισμός ή/και η επιμήκυνση του χρόνου ζωής δύο παραδοσιακών Ελληνικών προϊόντων-τροφίμων, του παραδοσιακού φύλλου για πίτα και της παραδοσιακής Ελληνικής σαλάτας 'τζατζίκι', με τη χρήση συσκευασίας και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων και β) η διερεύνηση της μικροβιολογικής ασφάλειας (πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης παθογόνων βακτηρίων) των υπό εξέταση προϊόντων. Οι λόγοι που επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα παραδοσιακά Ελληνικά τρόφιμα για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν οι εξής: α) δεν έχει γίνει στο παρελθόν κάποια παρόμοια μελέτη για τα συγκεκριμένα προϊόντα (τουλάχιστον όσον αφορά τη γνώση μας από την δική μας έρευνα στην διεθνή βιβλιογραφία) και β) αποτέλεσε ενδιαφέρουσα πρόκληση η διεξαγωγή πειραμάτων σε δύο τόσο διαφορετικά τρόφιμα, αφού το φύλλο είναι ένα φτωχό σε θρεπτικά συστατικά υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς και χωρίς σημαντική μικροχλωρίδα, σε αντίθεση με το τζατζίκι που είναι ένα σύνθετο τρόφιμο (με συστατικά όπως π.χ. το σκόρδο που μπορεί να έχει και αντιμικροβιακές ιδιότητες), πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και με υψηλή αρχική καλλιέργεια γαλακτικών βακτηρίων (που λειτουργεί ανταγωνιστικά για άλλες ομάδες μικροοργανισμών). Το πειραματικό μέρος (αποτελέσματα) της παρούσης διδακτορικής διατριβής διαχωρίστηκε σε τέσσερα Κεφάλαια, καθαρά για ταξινομικούς λόγους και ευκολίας του αναγνώστη. Έτσι προέκυψαν τέσσερα Κεφάλαια. Τα δύο πρώτα Κεφάλαια (2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο) αφορούν πειράματα που διεξήχθησαν στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα και τα επόμενα Κεφάλαια (4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup> Κεφάλαιο) αναφέρονται σε πειράματα που έγιναν με υπόστρωμα το τζατζίκι, μια παραδοσιακή Ελληνική σαλάτα, που ανήκει στα γεύματα, έτοιμα προς κατανάλωση.

Το 2<sup>ο</sup> και 3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο της παρούσης διατριβής αφορούν πειράματα που έγιναν σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα. Ο σκοπός των πειραμάτων του δεύτερου Κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβιας, ενεργής συσκευασίας με απορροφητή οξυγόνου και συσκευασία κενού) και της επιμέρους ή /και της συνδυαστικής επίδρασης των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, χιτοζάνης και ναταμυκίνης, στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής ενός Ελληνικού παραδοσιακού

προϊόντος, το χωριάτικο φύλλο για πίτα, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 °C). Ο σκοπός των πειραμάτων του τρίτου Κεφαλαίου ήταν η μελέτη της ανάπτυξης/επιβίωσης τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* και *Bacillus cereus*) σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς παθογόνων ( $10^3$  και  $10^5$  cfu/g), ενοφθμισμένων στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα συντηρημένο υπό ψύξη και η επίδραση της χιτοζάνης ως αντιμικροβιακός παράγοντας, έναντι των παθογόνων παραπάνω βακτηρίων.

Τα δύο επόμενα Κεφάλαια (4<sup>ο</sup> και 5<sup>ο</sup>) παρουσιάζουν τα αποτελέσματα πειραμάτων στην παραδοσιακή Ελληνική σαλάτα 'τζατζίκι'. Ο σκοπός των πειραμάτων του τρίτου κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβιας και συσκευασίας κενού) και της επιμέρους ή/και της συνδυαστικής επίδρασης των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, CitroX και ναταμυκίνης, στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής του δημοφιλούς παραδοσιακού προϊόντος, τζατζίκι, κατά την συντήρηση του υπό ψύξη (4 °C). Ο σκοπός των πειραμάτων στο πέμπτο κεφάλαιο ήταν η μελέτη της ανάπτυξης/επιβίωσης τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* και *Bacillus cereus*), σε πληθυσμό  $10^6$  cfu/g προϊόντος, και η επίδραση της φυσικής αντιμικροβιακής ουσίας CitroX στους παθογόνους μικροοργανισμούς ενοφθμισμένων στο προϊόν, διατηρούμενου υπό θερμοκρασίες 4° C και 10° C.





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:**

### **Μελέτη της Επίδρασης της Συσκευασίας και Φυσικών Αντιμικροβιακών Παραγόντων στα Ποιοτικά Χαρακτηριστικά του Χωριάτικου-Παραδοσιακού Φύλλου για Πίτα υπό Ψύξη**

---

#### **2.1. Σκοπός των Πειραμάτων**

---

Ο σκοπός των πειραμάτων του συγκεκριμένου Κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβιας, ενεργής συσκευασίας με απορροφητή οξυγόνου και συσκευασίας κενού) και της επιμέρους, ή/και της συνδυαστικής επίδρασης, των φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων, χιτοζάνης και ναταμυκίνης, στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής ενός Ελληνικού παραδοσιακού προϊόντος, συγκεκριμένα χωριάτικο φύλλο για πίτα, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 °C). Η ολική ποιότητα του προϊόντος αξιολογήθηκε μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και οργανοληπτικά.

---

#### **2.2. Υλικά και Μέθοδοι**

---

##### **2.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων**

Η παραγωγή του παραδοσιακού χωριάτικου φύλλου (φρέσκου) για πίτα έγινε από την εταιρία παραγωγής προϊόντων ζύμης « ΖΑΓΟΡΙΣΙΟ », της οποίας το εργαστήριο βρίσκεται στο Κουτσελιό - Ιωαννίνων. Τα φύλλα μεταφέρθηκαν

συσκευασμένα άμεσα στο εργαστήριο (την ίδια μέρα που παράχθηκαν) εντός φορητού ψυγείου με πάγο. Τα φύλλα ήταν συσκευασμένα, σε αδιαφανή συσκευασία, ανά έξι με ένα φύλλο λεπτής μεμβράνης ανάμεσά τους, έτσι ώστε να μην κολλήσουν μεταξύ τους.

Για την παρασκευή του διαλύματος χιτοζάνης, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

- Χιτοζάνη χαμηλού Μοριακού Βάρους σε μορφή σκόνης (Low Molecular Weight Chitosan, CAS number 9012-76-4, Aldrich, Αθήνα) με τα εξής χαρακτηριστικά (στοιχεία κατασκευαστή: <http://www.sigmaaldrich.com>): i) 20-200 cP ιξώδες, σε 1% οξικό οξύ, ii) 50-190 KDa Μοριακό Βάρος (με βάση το ιξώδες), iii) διαλυτή σε υδατικά διαλύματα ασθενών οργανικών οξέων 1%, iv) υγρασία < 10% και v) βαθμός από-ακετυλίωσης 75-85 %. Επιλέχθηκε χιτοζάνη χαμηλού Μοριακού Βάρους γιατί έχει μεγαλύτερη διαλυτότητα σε σχέση με τη χιτοζάνη υψηλού Μοριακού Βάρους.
- Διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v. Για την παρασκευή του διαλύματος οξικού οξέος 1% (w/v), χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ (glacial acetic acid, CAS number 64-19-7, Aldrich) και απεσταγμένο νερό, το οποίο προηγουμένως είχε αποστειρωθεί προκειμένου να εξασφαλιστεί η στειρότητα του διαλύματος χιτοζάνης που θα προκύψει. Τα χαρακτηριστικά του οξικού οξέος ήταν τα εξής: πυκνότητα 1,049 g/mL στους 25 °C, σημείο βρασμού 117-118 °C και συγκέντρωση (molarity) 17,4 M.

Διάλυμα 2% w/v χιτοζάνης παρασκευάστηκε με διάλυση ποσότητας 10 g χιτοζάνης σε μορφή σκόνης, σε 500 ml του υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 1% v/v. Ακολούθησε θέρμανση (θερμοκρασία μικρότερη από 50 °C) υπό ανάδευση με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα, μέχρι διάλυσης της ουσίας.

Για την παρασκευή του διαλύματος ναταμυκίνης, χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια:

- Διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v (του οποίου η παρασκευή περιγράφεται παραπάνω)
- Ναταμυκίνη (DANISCO, Beste, Αθήνα) σε μορφή σκόνης (λευκή έως υποκίτρινη), με τα εξής χαρακτηριστικά ([www.penglaichem.com](http://www.penglaichem.com)): i) 665,725 g/mol μοριακό βάρος, ii) σημείο τήξεως 280° C, iii) είναι διαλυτή σε υδατικά διαλύματα ασθενών

οργανικών οξέων 1%. Σημειώνεται ότι η ναταμυκίνη έχει χαμηλή διαλυτότητα σε νερό, ενώ η μέγιστη δράση της αποδίδεται μεταξύ pH 4-7.

Σε 1 L υδατικού διαλύματος οξικού οξέος 1% v/v προστέθηκαν 0,2 g ναταμυκίνης και ακολούθησε θέρμανση (θερμοκρασία μικρότερη από 50 °C) υπό ανάδευση με τη χρήση μαγνητικού αναδευτήρα. Παρασκευάστηκε διάλυμα ναταμυκίνης συγκέντρωσης 200 ppm, και από το διάλυμα αυτό, υπό μορφή ψεκασμού, προστέθηκε τελική ποσότητα ναταμυκίνης περίπου 20 ppm πάνω στο φύλλο.

Τα δείγματα χωρίστηκαν και συσκευάστηκαν στις εξής ομάδες:

- A:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- AO:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- V:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- AC:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).
- AOC:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).
- VC:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).
- AN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- AON:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- VN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- ACN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ναταμυκίνης (20 ppm).
- AOCN:** Χωριάτικο φύλλο σε ενεργή συσκευασία με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) ναταμυκίνης (20 ppm).
- VCN:** Χωριάτικο φύλλο σε συσκευασία υπό κενό με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ναταμυκίνης (20 ppm).

Στις μεταχειρίσεις χωρίς την προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών τοποθετήθηκαν 100 g παραδοσιακού φύλλου, υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα στη σακούλα συσκευασίας και στη συνέχεια συσκευάστηκε σε αέρα, σε ενεργό

συσκευασία και σε κενό, για τις μεταχειρίσεις A, AO και V, αντίστοιχα. Στην περίπτωση ενεργής συσκευασίας χρησιμοποιήθηκε απορροφητής οξυγόνου Ageless (Mitsubishi). Στις μεταχειρίσεις με την προσθήκη ενός ή συνδυασμού φυσικών αντιμικροβιακών τα 100 g παραδοσιακού φύλλου ψεκαζόταν με κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε διαλύματος, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση επί του προϊόντος να είναι 1,5% v/w χιτοζάνη και 20 ppm ναταμυκίνη. Η τελική ποσότητα της χιτοζάνης ανά 100 g προϊόντος, υπολογίστηκε ίση με 0,03% gr/gr ή 0,03% w/w. Έτσι τα δείγματα AC, AOC και VC περιέχουν 1,5% v/w (ή 0,03% w/w) χιτοζάνη, τα δείγματα AN, AON και VN περιέχουν τελικά 20 ppm ναταμυκίνη και τα δείγματα ACN, AOCN και VCN περιέχουν 1,5% v/w (ή 0,03% w/w) χιτοζάνη και 20 ppm ναταμυκίνη. Στις μεταχειρίσεις με συνδυασμό αντιμικροβιακών ουσιών η πορεία εφαρμογής των διαλυμάτων ήταν η εξής: πρώτα εφαρμόστηκα με ψεκασμό το διάλυμα της χιτοζάνης και στη συνέχεια εφαρμόστηκε με τον ίδιο τρόπο το διάλυμα της ναταμυκίνης. Σημειώνεται ότι η προσθήκη των διαλυμάτων έγινε κάτω από ασηπτικές συνθήκες (χρήση αποστειρωμένων γαντιών, ύπαρξη λύχνου Bunsen, αποστειρωμένα σκεύη ψεκασμού, αποστειρωμένο νερό για την παρασκευή διαλυμάτων) προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις των δειγμάτων.

Η σακούλα υλικού συσκευασίας αποτελείται από πολυστρωματικό υλικό συσκευασίας LDPE/PA/LDPE (χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο/πολυαμίδιο/χαμηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο) πάχους 75  $\mu\text{m}$ . Η διαπερατότητα του υλικού συσκευασίας στο οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα ήταν 52,2  $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{day}/\text{atm}$  και 191  $\text{cm}^3/\text{m}^2/\text{day}/\text{atm}$ , αντίστοιχα σε συνθήκες σχετικής υγρασίας 75% και θερμοκρασία 25  $^{\circ}\text{C}$ , ενώ η περιεκτικότητα σε υδρατμούς υπολογίστηκε περίπου ίση με 2,4  $\text{g}/\text{m}^2/\text{day}$ , με σχετική υγρασία 100% και θερμοκρασία 25  $^{\circ}\text{C}$ . Επιλέχθηκε αυτό το υλικό γιατί διαθέτει χαμηλή διαπερατότητα σε αέρια και υγρασία, οπότε είναι κατάλληλο για την ενεργό συσκευασία και την συσκευασία υπό κενό.

Τα δείγματα συσκευάστηκαν χρησιμοποιώντας μηχανή συσκευασίας Minipack-Torre, μοντέλο MV31 (Minipack-torre S.p.A./ Dalmine-Italy). Όλα τα συσκευασμένα δείγματα διατηρήθηκαν εντός ψυγείου ( $4 \pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$ ) και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις εξής ημέρες: α) 0,2,4,6,9 για τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε αέρα, β) 0,2,4,6,9,12,15 για τα δείγματα που συσκευάστηκαν

σε ενεργό συσκευασία και γ) 0,2,4,6,9,12, 15, 18 για τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε κενό.

### **2.2.2. Μικροβιολογική ανάλυση**

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε βάσει των επισήμων μεθόδων ανάλυσης της American Public Health Association (APHA, 1984). Μελετήθηκαν τα ακόλουθα είδη μικροοργανισμών αλλοίωσης: α) Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.), β) Εντεροβακτήρια, γ) Κολοβακτηριοειδή, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια, ε) Ζύμες και Μύκητες, στ) Εντερόκοκκοι και ζ) Ψυχρότροφα βακτήρια.

Ποσότητα δείγματος 10 g από το φύλλο μεταφέρθηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher (Seward Medical, London, UK) που περιείχε 90 mL αποστειρωμένο πεπτονούχο διάλυμα 0,1% w/v (BPW, Merck, Darmstadt, Germany) και στη συνέχεια το δείγμα ομογενοποιήθηκε για 60 sec με τη βοήθεια Lab Blender 400 Stomacher (Seward Medical, London, UK). Για τη μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος του ομογενοποιημένου φύλλου σε πεπτονούχο διάλυμα 0,1% w/v.

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.) προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης, όπου 0,1 mL του δείγματος επιστρώθηκε με αποστειρωμένη ράβδο σε θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (PCA). Μετρήθηκαν όλες οι αποικίες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υλικό μετά από επώαση των τρυβλίων για 48 h στους 30 °C. Οι Ζύμες και Μύκητες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της επίστρωσης (κατά τον ίδιο τρόπο όπως ακριβώς η OMX). Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC), και πραγματοποιήθηκε επώαση στους 25 °C για 120 h, ενώ καταμετρήθηκαν οι αποικίες που ήταν ρόδινες με λευκό στεφάνι. Οι Εντερόκοκκοι προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της επίστρωσης (κατά τον ίδιο τρόπο όπως ακριβώς η OMX). Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Kanamycin Esculine Azide Agar (KEA), με επώαση στους 37 °C για 48 h. Μετά την επώαση καταμετρήθηκαν οι αποικίες που ήταν χρώματος σκούρο πράσινο έως μαύρο με δακτύλιο. Τα Ψυχρότροφα βακτήρια προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υλικό Plate Count Agar (PCA) και η επώαση έγινε για 10 μέρες στους 7 °C. Μετρήθηκαν όλες οι

αποικίες των βακτηρίων που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υλικό. Τα Εντεροβακτήρια προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA), όπου 1 mL δείγματος ενσωματώθηκε σε 10 - 12 mL ρευστού υλικού (45 °C), ενώ στη συνέχεια πάνω στο πρώτο στρώμα (αφού αυτό στερεοποιήθηκε) προστέθηκε ποσότητα περίπου 10 mL ρευστού υλικού ώστε να εξασφαλιστούν αναερόβιες συνθήκες. Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 37 °C για 24 h. Μετρήθηκαν οι κοκκινωπές αποικίες που περιβάλλονταν από δακτύλιο. Τα Κολοβακτηριοειδή προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης (ακριβώς όπως τα Εντεροβακτήρια) σε θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Agar (VRBA). Η επώαση των τρυβλίων έγινε στους 37 °C για 24 h και μετρήθηκαν οι κοκκινωπές αποικίες που περιβάλλονταν από κόκκινη άλω. Τα Οξυγαλακτικά βακτήρια προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης (αναερόβιες συνθήκες) και χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό de Man Rogosa Sharpe Agar (MRS), ενώ τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 72 h. Καταμετρήθηκαν οι αποικίες που είχαν σχήμα ραβδοειδές.

Όλες οι μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (n=2). Όλα τα θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν με βάση τις οδηγίες που αναγράφονταν στη συσκευασία τους και αποστειρώθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121 °C για 15 min, πλην των VRBGA και VRBA. Τα δύο αυτά θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν σε αποστειρωμένο νερό και υπό ασηπτικές συνθήκες, αφού δεν χρειάζεται αποστείρωση και αποστειρώθηκαν με βρασμό. Όλα τα υποστρώματα διατηρήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $48 \pm 1^\circ\text{C}$ , πριν τη χρήση τους.

### **2.2.3. Προσδιορισμός του pH**

Η μέτρηση του pH έγινε με τη χρήση πεχάμετρου (Inolab, USA) ως εξής: 10 gr δείγμα ομογενοποιήθηκε με 90 ml πεπτονόχο διάλυμα 0.1% w/v, ακολούθησε εμφύσηση του ηλεκτροδίου και προσδιορισμός του pH. Οι ημέρες μέτρησης του pH είναι ίδιες με αυτές των μικροβιολογικών αναλύσεων (όπως αναφέρθηκαν παραπάνω) για κάθε μεταχείριση.

### **2.2.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση**

Εκπαιδευμένη ομάδα πέντε μελών (αποτελούμενη από μέλη ΔΕΠ και μεταπτυχιακούς φοιτητές) του Εργαστηρίου Χημείας και Μικροβιολογίας Τροφίμων

αξιολόγησε το προϊόν (φύλλο) ως προς το χρώμα, την οσμή και τη γεύση. Η πενταμελής ειδικά εκπαιδευμένη ομάδα είχε προηγουμένως συμμετάσχει σε προκαταρκτικές δοκιμές, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν για διάστημα 6-8 εβδομάδων, έτσι ώστε τα μέλη της να εξοικιωθούν με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση προϊόντος. Η οργανοληπτική εκτίμηση των δειγμάτων έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, έτσι ώστε να μην επηρεάζονται μεταξύ τους οι κριτές, και υπό σταθερές συνθήκες φωτός και θερμοκρασίας (18° C). Η ομάδα των κριτών αξιολόγησε το χρώμα, την οσμή και τη γεύση των παραδοσιακών φύλλων για πίτα χρησιμοποιώντας κλίμακα βαθμολογίας 1 έως 8. Βαθμολογία ίση με 8 ισούται με άριστα και βαθμολογία μικρότερη του 4 συνεπάγεται με μη αποδεκτό προϊόν. Η κλίμακα επιλέχθηκε με βάση την μελέτη των Gutierrez et al. (2009) σχετική με προϊόντα αρτοποιίας, εφόσον δεν υπάρχει διαθέσιμη κλίμακα βαθμολογίας για φύλλο. Το χρώμα και η οσμή του παραδοσιακού φύλλου για πίτα αξιολογήθηκαν σε άψητο φύλλο, ενώ η γεύση του αξιολογήθηκε σε φύλλο ψημένο σε φούρνο μικροκυμάτων για 5 λεπτά (800 W). Το φύλλο ψήθηκε εφόσον αυτή είναι η συνήθης πρακτική που ακολουθείται για την παρασκευή των παραδοσιακών τοπικών εδεσμάτων (πίτες, γλυκά κτλ). Μεταξύ των δοκιμών καταναλώθηκε νερό και ψωμί προκειμένου να υπάρχει ξεκάθαρη διάκριση των γεύσεων.

#### **2.2.5. Στατιστική επεξεργασία**

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν δυο φορές χρησιμοποιώντας 2 διαφορετικά δείγματα προϊόντος από την κάθε μεταχείριση την ημέρα της δειγματοληψίας (2x2=4). Σημειώνεται ότι για κάθε ανάλυση (микροβιολογική, χημική οργανοληπτική) έγινε χρήση νέου (ξεχωριστού) δείγματος του υπό εξέταση προϊόντος. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων μετατράπηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους του πληθυσμού των βακτηρίων ως cfu/g (colony forming units - μονάδες σχηματιζόμενων αποικιών). Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MINITAB 16 for Windows. Εφαρμόστηκε η ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (two-way ANOVA) για τη σύγκριση των μέσων όρων των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν. Βάσει του ελέγχου διακύμανσης διαπιστώθηκε αν η τιμή  $p$  είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη του 0,05. Στην περίπτωση που  $p > 0,05$  ισχύει η μηδενική υπόθεση, δηλαδή οι μέσοι όροι

είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους και κατά συνέπεια δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ενώ στην περίπτωση που  $p < 0,05$  ισχύει η εναλλακτική υπόθεση, δηλαδή οι μέσοι όροι για τον συγκεκριμένο παράγοντα δεν είναι όλοι ίσοι μεταξύ τους και κατά συνέπεια υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Τέλος η διαπίστωση σημαντικών επιδράσεων ( $p < 0,05$ ) μεταξύ των επιπέδων των εξεταζόμενων παραγόντων έγινε με την εφαρμογή ελέγχου πολλαπλού εύρους σύγκρισης των μέσων όρων Student-Newman-Keuls (SNK) μέσω του λογισμικού MultiComp. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μέσος όρος  $\pm$  τυπικό σφάλμα (S.E. = Standard Error).

---

## 2.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

---

### 2.3.1. Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στο φύλλο στους 4° C

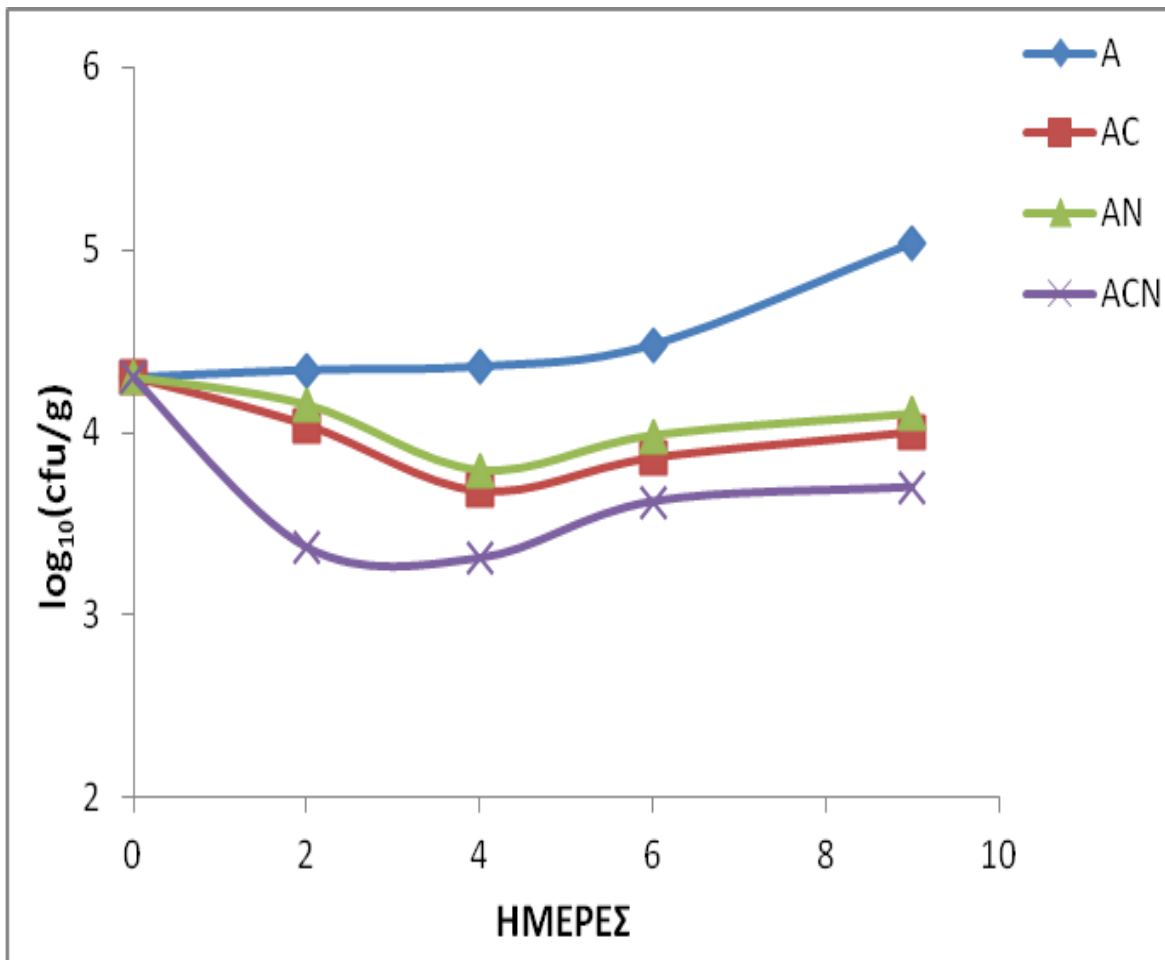
Τα φρέσκα προϊόντα αρτοποιίας, όπως είναι η ζύμη, το φύλλο και τα φρέσκα ζυμαρικά, προσφέρονται για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, λόγω της υψηλής ενεργότητας νερού ( $>0,88$ ) και του υψηλού pH (5,7-6,5). Για το λόγο αυτό τα συγκεκριμένα προϊόντα επιβάλλεται να συντηρούνται υπό ψύξη. Οι Trovatelli et al. (1988) και Li et al. (2012) αναφέρουν ότι εάν οι συνθήκες συντήρησης των φρέσκων ζυμαρικών είναι ανεπαρκείς, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών μπορεί να ενισχυθεί, αφού η  $a_w$  και το pH σε αυτά τα προϊόντα είναι συνήθως γύρω στο 0,93-0,95, 5,5, αντίστοιχα. Επιπλέον, το pH και η  $a_w$  της ζύμης είναι 5,7 και 0,88, αντίστοιχα (Jespersen et al., 1994; Silveira et al., 2007). Η  $a_w$  του φύλλου για πίτα είναι ίση με 0,93 και το pH ίσο με 6,4. Συνεπώς αυτά τα προϊόντα αποτελούν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, οπότε απαιτείται κατάλληλη συσκευασία και χαμηλή θερμοκρασία ψύξης ( $<4^\circ \text{C}$ ). Την ίδια παρατήρηση κάνει και ο Fu (2008), ο οποίος τονίζει ότι η διάρκεια ζωής των νωπών noodles κυμαίνεται από μία ημέρα έως αρκετές ημέρες, ανάλογα με τη συσκευασία και τις συνθήκες αποθήκευσης τους. Αντίστοιχα οι Li et al. (2011), αναφέρουν ότι η διάρκεια ζωής των νωπών noodles είναι πολύ μικρή, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας νερού και θρεπτικών ουσιών



του προϊόντος, ενώ η ποιότητά τους επιδεινώνεται γρήγορα αν δεν διατηρούνται υπό ψύξη. Οι πιο κοινοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης των φρέσκων noodles είναι τα βακτήρια και αμέσως μετά οι ζύμες και μύκητες. Αν δεν ακολουθηθούν καλές πρακτικές παραγωγής, η μόλυνση της νωπής ζύμης μπορεί να προέρχεται από τα υλικά της πρώτης ύλης, από τον εξοπλισμό, το περιβάλλον επεξεργασίας και από το προσωπικό (Silveira et al., 2007).

Ο αρχικός πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (O.M.X.) ήταν ίσος με  $4,3 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Γραφήματα 1, 2 και 3). Ο πληθυσμός αυτός συμφωνεί με εκείνον που έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία για ρύζι (ολική μεσόφιλη χλωρίδα ίση με  $4,35 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) (Lee et al., 2007). Επίσης, οι Silveira et al. (2007) αναφέρουν αρχική OMX σε νωπή ζύμη χωρίς συντηρητικά ίση με  $1,1 \times 10^3 \text{ cfu/g}$ . Οι Trovatelli et al. (1988) παραθέτουν στατιστικά αποτελέσματα σχετικά με τον βακτηριακό πληθυσμό φρέσκων ζυμαρικών, συγκεκριμένα το 19%, 65,6% και 15,4% των φρέσκων σπιτικών ζυμαρικών που εξετάστηκαν βρέθηκαν να έχουν OMX ίση με  $10^4 - 10^5$ ,  $10^5 - 10^6$  και  $>10^6 \text{ cfu/g}$ , ενώ το 45,7% των βιομηχανοποιημένων φρέσκων ζυμαρικών είχε  $<10^4 \text{ cfu/g}$  OMX, το 29,5% είχε  $10^4 - 10^5 \text{ cfu/g}$  και το 24,8% είχε  $10^5 - 10^6 \text{ cfu/g}$ , ενώ δεν βρέθηκε κανένα δείγμα με OMX  $>10^6 \text{ cfu/g}$ .

Οι διαφοροποιήσεις στην αρχική OMX νωπών προϊόντων σίτου πιθανώς να οφείλονται στην διαφορετική μικροχλωρίδα του εκάστοτε αλεύρου που χρησιμοποιείται. Οι Li et al. (2012) άλλωστε τονίζουν ότι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που οδηγεί στην γρήγορη αλλοίωση των νωπών noodles είναι το υψηλό επίπεδο μικροοργανισμών που υπάρχει στο αλεύρι σίτου, το οποίο αποτελεί βασική πρώτη ύλη για την παρασκευή τους. Στην έρευνα τους παρήχθησαν φρέσκα noodles με αρχική OMX  $1,05 \times 10^4$ ,  $5,75 \times 10^3$  και  $5,25 \times 10^3$  από αλεύρι με 8525, 4300, 4025 cfu/g, αντίστοιχα. Όσο υψηλότερη ήταν η μικροχλωρίδα του αλεύρου, τόσο πιο υψηλή ήταν η αρχική OMX των noodles που παρήχθησαν από αυτό. Ο μέσος πληθυσμός της OMX σε σιτάρι και αλεύρι σίτου της Αυστραλίας ήταν ίσος με  $10^5$  και  $10^2 \text{ cfu/g}$ , αντίστοιχα, ενώ σε αλεύρι των ΗΠΑ ήταν  $10^3-10^4 \text{ cfu/g}$ , ανάλογα με τον τύπο του σίτου, και σε Γερμανικό, Ιταλικό και Γαλλικό αλεύρι βρέθηκε ότι ήταν περίπου ίσος με  $10^4 \text{ cfu/g}$  (Berghofer et al., 2003).



**Γράφημα 1 :** Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X.) στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα.

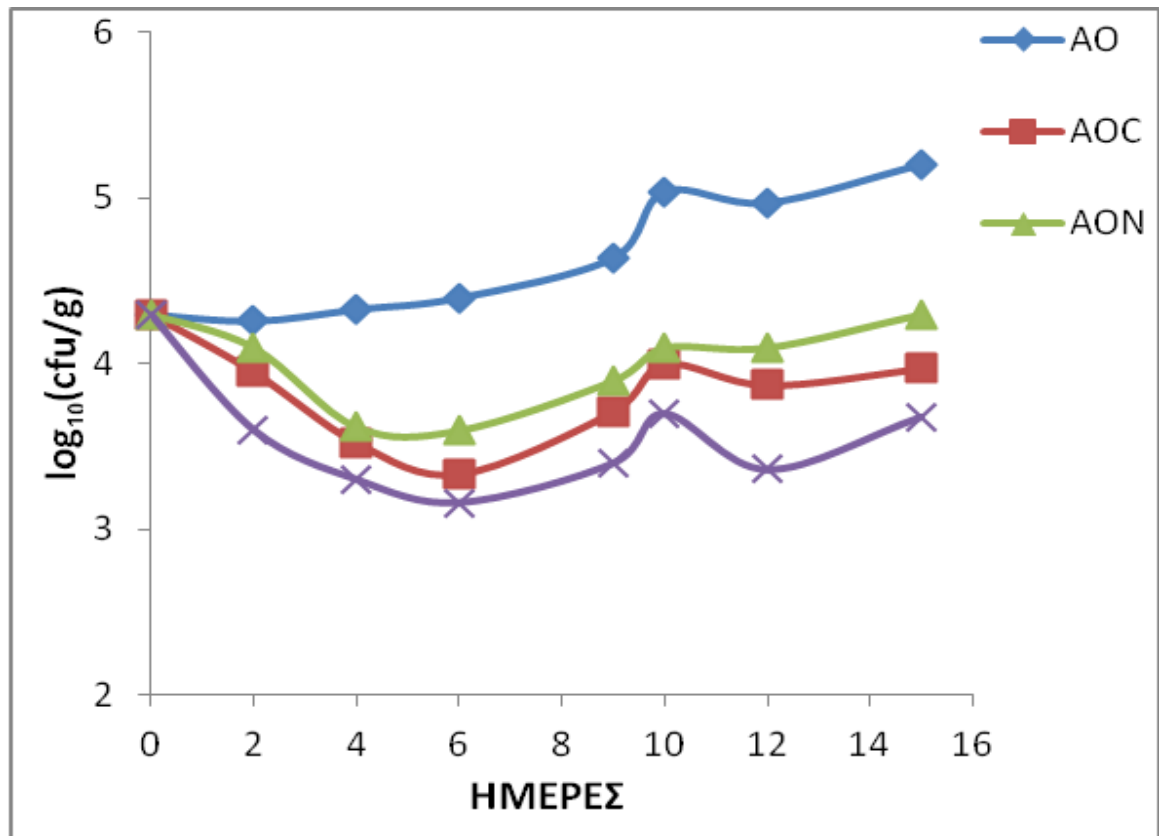
Ο πληθυσμός της OMX των A, AO και V (με αρχικό πληθυσμό ίσο με 4,3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  και  $a_w=0,93$ ) αυξήθηκε σταδιακά σε συνάρτηση με το χρόνο και έδωσαν τελικούς πληθυσμούς 5, 5,2 και 5,14  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  την 9<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup> και 18<sup>η</sup> ημέρα, αντίστοιχα (Γραφήματα 1, 2 και 3). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με εκείνα των Li et al. (2011), όπου σε φρέσκα poodles στους 37° C υπό αερόβιες συνθήκες ( $a_w=0,9$ ) μετρήθηκε πληθυσμός OMX ίσος με  $10^5$  cfu/g μετά από 10 ημέρες. Ο πληθυσμός της OMX σε ζύμη ζαχαροπλαστικής χωρίς συντηρητικά στους 8° C για 13 ημέρες ήταν 4  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  (Silveira et al., 2007). Ακόμη, ο αρχικός πληθυσμός OMX σε κέικ ρυζιού ( $a_w=0,92$  και  $\text{pH}=6,7$ ) αρχικά ήταν  $<10$  cfu/g και αυξήθηκε σε  $6 \times 10^6$  cfu/g μετά από πέντε ημέρες αποθηκείσεως (υπό αερόβιες συνθήκες) στους 25° C. Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι η υψηλή τιμή ενεργότητας νερού έπαιξε

σημαντικό ρόλο στην ταχεία αύξηση της μικροχλωρίδας στο προϊόν (Ji et al., 2007). Επίσης, οι Hesseltine et al. (1969) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός της OMX σε αλλοιωμένη (κονσερβοποιημένη) ζύμη για πίτσα ήταν  $68 \times 10^4$  cfu/g.

Ο πληθυσμός του μάρτυρα χωρίς φυσικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (A) την 9<sup>η</sup> ημέρα έχει περίπου  $1 \log(\text{cfu/g})$  υψηλότερο μικροβιολογικό φορτίο (OMX) από τα AC και AN και 1,3 από το ACN ( $P < 0,05$ , Γράφημα 1). Τα δείγματα AC και AN δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $P > 0,05$ ) όσον αφορά τον πληθυσμό της OMX, αν και παρατηρήθηκε ελαφρώς υψηλότερος πληθυσμός μικροοργανισμών στο δείγμα με την προσθήκη 20 ppm ναταμυκίνης (AN), έναντι του δείγματος με την προσθήκη 1,5% χιτοζάνης (AC), καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τους Del Nobile et al. (2009) οι οποίοι κατάφεραν να αυξήσουν το χρόνο ζωής σε φρέσκα ζυμαρικά, που συσκευάστηκαν σε αέρα σε υλικό συσκευασίας υψηλού φραγμού σε υγρασία και αέρια, με τη χρήση χιτοζάνης, η οποία επιβράδυνε την ανάπτυξη της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας.

Όσον αφορά το φύλλο συσκευασμένο σε ενεργό συσκευασία (Γράφημα 2) φαίνεται ότι την 15<sup>η</sup> ημέρα το μεγαλύτερο μικροβιολογικό φορτίο είχε το AO ( $5,2 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ), ακολουθεί το AON ( $4,3 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ), έπειτα το AOC ( $3,97 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ), ενώ το μικρότερο φορτίο έχει το AOCN ( $3,68 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ). Τόσο η ναταμυκίνη, όσο και η χιτοζάνη, ή ο συνδυασμός αυτών μείωσαν σημαντικά ( $P < 0,05$ ) την OMX, σε σχέση με το φύλλο σε ενεργό συσκευασία χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών (AO). Συγκεκριμένα, το AON είχε συνεχώς  $0,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  μικρότερη μικροχλωρίδα σε σχέση με το AO, το AOC είχε μικρότερο πληθυσμό κατά  $1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$  από το OA και τέλος η μικροχλωρίδα του AOCN ήταν μακρότερη κατά περίπου  $1,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με εκείνη του AO.

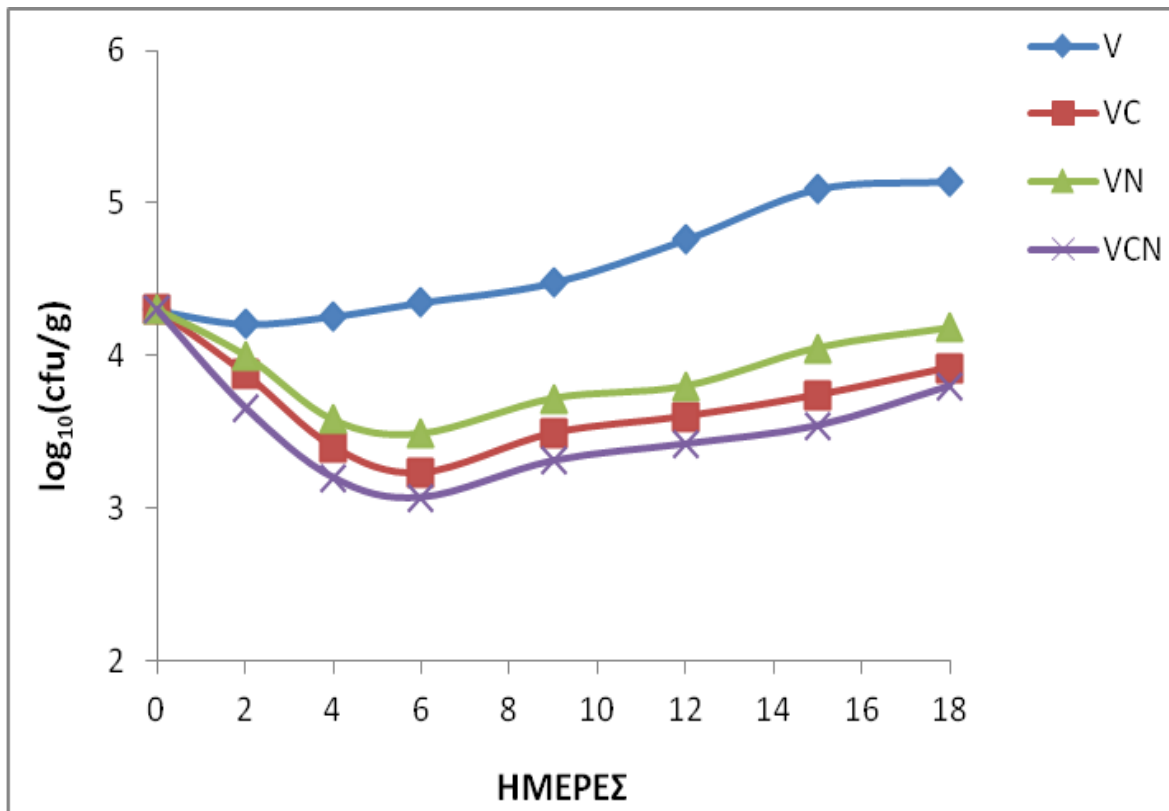
Από τα Γραφήματα 1 και 2 φαίνεται ότι η ενεργός συσκευασία AO μείωσε κατά περίπου  $0,35 \log_{10}(\text{cfu/g})$  τον πληθυσμό της OMX στο φύλλο, σε σχέση με την αερόβια συσκευασία A. Κατά παρόμοιο ποσοστό ήταν μειωμένος και ο πληθυσμός της OMX των AON, AOC και AOCN σε σχέση με τα AN, AC και ACN, αντίστοιχα. Η ενεργός συσκευασία σε ζύμη έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν από τους Silveira et al. (2007) οι οποίοι τύλιξαν τη ζύμη σε πλαστική μεμβράνη εμποτισμένη με σορβικό οξύ.



**Γράφημα 2 :** Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου.

Ενεργή συσκευασία με προσροφητή οξυγόνου έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία (αυξάνοντας τον χρόνο ζωής των προϊόντων) σε αλεσμένο καφέ, τσάι, ψημένους ξηρούς καρπούς, πατατάκια, σοκολάτα, γάλα σε σκόνη, τортίγια, πίτσα, βάση για πίτσα, φρέσκα ζυμαρικά που συντηρούνται υπό ψύξη, τάρτες φρούτων, κέικ, μπισκότα, μπίρα, αλλαντικά, καπνιστά και παστά κρέατα, ψάρι και τυρί (Restuccia et al., 2010). Στις περιπτώσεις αυτές οι αναερόβιες συνθήκες που δημιουργούνται στην ενεργό συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου επιβραδύνουν την ανάπτυξη των αερόβιων μικροοργανισμών στα διάφορα προϊόντα (Kotsianis et al., 2002). Επίσης, οι Latou et al. (2010) αναφέρουν ότι με τη χρήση ενεργού συσκευασίας (με εκροφητή αιθανόλης και απορροφητή οξυγόνου) μειώθηκε αισθητά η ολική μεσόφιλη χλωρίδα του λευκού ψωμιού, ενώ το δείγμα σε αέρα την 8<sup>η</sup> ημέρα είχε 10<sup>7</sup> cfu/g ολική μεσόφιλη χλωρίδα, το δείγμα σε ενεργή συσκευασία δεν έπιασε ποτέ αυτό το όριο κατά τη διάρκεια 30 ημερών. Ακόμη, την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης

κοτόπουλου στους 4° C η OMX του προϊόντος μειώθηκε κατά 1,0 log cfu/g (P <0,05) με απορροφητή O<sub>2</sub> σε σύγκριση με τον μάρτυρα (δείγμα συσκευασμένο σε αέρα) (Mexis et al., 2012).



**Γράφημα 3 :** Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X.) στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού.

Απότο Γράφημα 3 φαίνεται ότι στη συσκευασία κενού το δείγμα V είχε υψηλότερο μικροβιολογικό φορτίο κατά 0,7 log<sub>10</sub>(cfu/g) σε σχέση με το VN, 1,0 log<sub>10</sub>(cfu/g) με το VC και κατά περίπου 1,2 log<sub>10</sub>(cfu/g) με το VCN. Ευνόητο είναι λοιπόν ότι από όλες τις συσκευασίες καλύτερα μικροβιολογικά αποτελέσματα δίνει η συσκευασία κενού και μάλιστα η μεταχείριση VCN, δηλαδή το χωριάτικο φύλλο συσκευασμένο σε κενό με την προσθήκη του συνδυασμού των δύο φυσικών αντιμικροβιακών, ναταμυκίνης και χιτοζάνης. Επίσης, το συνολικό μικροβιολογικό φορτίο του (OMX) V είναι σαφώς μικρότερο κατά 0,5 log<sub>10</sub>(cfu/g) σε σχέση με το A (Γραφήματα 1 και 3). Σε αντίστοιχα ποσοστά κυμαίνεται και η μείωση των

υπόλοιπων μεταχειρίσεων του φύλλου όταν συσκευάστηκε υπό κενό (VN, VC, VCN) σε σύγκριση με την αντίστοιχη συσκευασία του σε αέρα (AN, AC, ACN) (Γραφήματα 1 και 3). Συγκρίνοντας τα δείγματα V και AO (Γραφήματα 2 και 3), φαίνεται ότι το V έχει ελαφρώς μειωμένο φορτίο μικροοργανισμών σε σχέση με το AO μέχρι την 9<sup>η</sup> ημέρα, ενώ μετά η διαφορά είναι περίπου  $0,3 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , κι αυτό πιθανώς να οφείλεται στην εξασθένηση της δράσης του απορροφητή οξυγόνου, λόγω κορεσμού του με οξυγόνο. Κατά το ίδιο περίπου ποσοστό είναι μειωμένη η OMX των VN, VC και VCN σε σχέση με τα AON, AOC AOCN, αντίστοιχα (Γραφήματα 2 και 3).

Η ναταμυκίνη εκτός από την αξιολογη δράση της έναντι των ζυμών (Stark, 2004) έδειξε μια μικρή, αλλά σημαντική ανασταλτική δράση επί του αριθμού των αποικιών των βακτηρίων που απομονώθηκαν από τρία διαφορετικά εδάφη, σε μελέτη που έγινε σε ζυμό (Mohamed et al., 2005). Επίσης σε πρόσφατη μελέτη των Fajardo et al. (2010) σε ημίσκληρο τυρί Saloio, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε υλικό συσκευασίας επικαλυμμένο με χιτοζάνη και με συνδυασμό χιτοζάνης και ναταμυκίνης ο πληθυσμός της OMX ήταν  $7.51$ ,  $7.12$  και  $6.837 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στον μάρτυρα, το δείγμα με χιτοζάνη και το δείγμα με τον συνδυασμό ναταμυκίνης και χιτοζάνης, αντίστοιχα.

Έχουν αναφερθεί πολλά παραδείγματα όπου η εφαρμογή της χιτοζάνης σε τρόφιμα βελτίωσε την ποιότητα και παράτεινε τη διάρκεια ζωής τους (No et al., 2007). Για παράδειγμα, η προσθήκη  $0,1\%$  χιτοζάνης σε ψωμί μείωσε την μικροχλωρίδα κατά  $10^3 \text{ cfu/g}$ , σε σχέση με το ψωμί χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακής ουσίας, μετά από 8 μέρες συντήρησης σε θερμοκρασία δωματίου (Lee et al., 2002). Η χιτοζάνη έχει επίσης δοκιμαστεί σε κέικ ρυζιού (Lee et al, 2000), σε βλαστούς soybean (Lee και Rhee, 1999), σε ζελέ από άμυλο (Moon et al., 1997; Lee και No, 2001) και σε noodles (No et al., 2007) μειώνοντας το μικροβιολογικό φορτίο των τροφίμων. Επιπλέον, η χιτοζάνη καθυστέρησε αποτελεσματικά την ανάπτυξη των μεσόφιλων βακτηρίων σε δείγματα φρέσκων ζυμαρικών που συσκευάστηκαν στον αέρα (Del Nobile et al., 2009). Οι Lee et al. (2000) απέδειξαν την αποτελεσματικότητα της χιτοζάνης σε νωπές χυλοπίτες, διαπιστώνοντας ότι τα υγρά ζυμαρικά που περιέχουν χιτοζάνη ( $M_w = 37 \text{ kDa}$ ,  $0,1\%$  ή  $0,5\%$  διαλυμένη σε  $1\%$  γαλακτικό οξύ) μπορούν να αποθηκευτούν πάνω από 80 ημέρες σε σύγκριση με τις 7 ημέρες χρόνου ζωής του μάρτυρα. Ακόμη, οι Lee και No (2002) έδειξαν ότι η χιτοζάνη

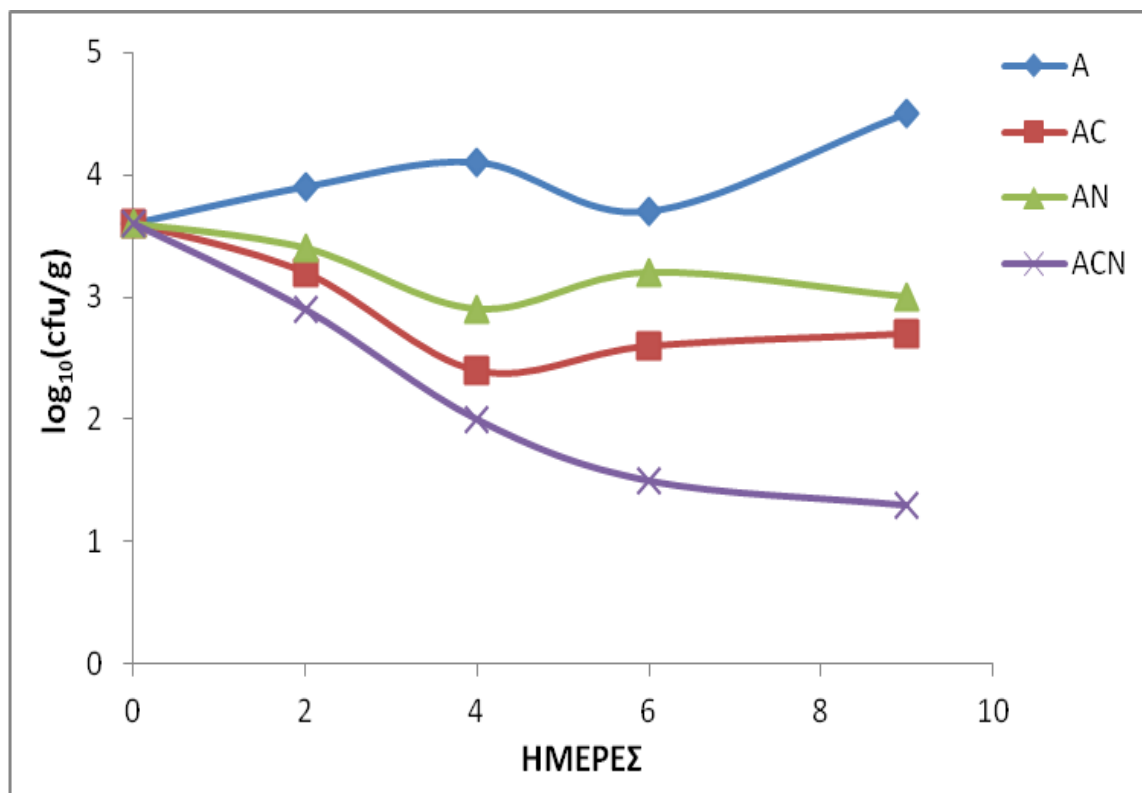
(Mw = 37 kDa διαλυμένη σε 1% οξικού οξέος) όταν προστίθεται στο αλεύρι σίτου σε συγκεντρώσεις 0,35%, 0,52% και 0,7% είναι αποτελεσματική στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής σε χυλοπίτες. Ειδικότερα, η διάρκεια ζωής του προϊόντος που περιείχε 0,17%, 0,35%, 0,52% και 0,70% χιτοζάνη παρατάθηκε κατά 1, 2 και 3 ημέρες, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Ακόμη, σύμφωνα με τους Moreira et al. (2011) η επικάλυψη μπρόκολου με χιτοζάνη (μεσαίου MB) έδωσε μια σημαντική ( $P < 0,05$ ) μείωση κατά περίπου 1,5 έως 2,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  της OMX, σε σχέση με τον μάρτυρα (μπρόκολο χωρίς επίστρωση χιτοζάνης). Αυτή η διαφορά διατηρήθηκε μέχρι το τέλος της αποθήκευσης (20 ημέρες) του προϊόντος στους 5° C. Τέλος, η εμφάνιση καρότων σε διάλυμα αμύλου (4% w/w)- γλυκερόλης (2%w/w)- χιτοζάνης (1,5% w/w) μείωσε τον πληθυσμό της OMX κατά 1,34  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , σε σύγκριση με τον μάρτυρα, μετά από 15 ημέρες στους 10° C (Durango et al., 2006).

### **2.3.2. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων στο φύλλο στους 4° C**

Τα Εντεροβακτήρια (βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*) είναι αρνητικά κατά Gram, αερόβιοι ή/και προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί σε σχήμα ράβδου. Τα Εντεροβακτήρια είναι εντερικής προέλευσης μικροοργανισμοί και τα σπουδαιότερα γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* είναι: *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Yersinia* κλπ. (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 1993; Καλογρίδου-Βασιλειάδου, 1995). Εντεροβακτήρια έχουν απομονωθεί στο παρελθόν από άλευρα και νερό. Σύμφωνα με τους Rocha και Malcata (2012) εντοπίστηκε αριθμός εντεροβακτηρίων ίσος με 5.7, 6.03 και 6.04  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε αλεύρι καλαμποκιού, σίκαλης και σίτου, αντίστοιχα. Οι Gavini et al. (1985) αναφέρουν ότι έχουν απομονωθεί 1017 στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* από πόσιμο νερό. Συνεπώς προκύπτει η ανάγκη εξέτασης του φύλλου για Εντεροβακτήρια, αφού το αλεύρι και το νερό αποτελούν τις βασικές πρώτες ύλες για την παρασκευή του. Σημειώνεται ότι τα Εντεροβακτήρια συνήθως καταστρέφονται με ήπια θερμική επεξεργασία (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 1993).

Ο αρχικός πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων ήταν 3,6  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Ο πληθυσμός Εντεροβακτηρίων σε όξινη ζύμη με pH=4,15 μετρήθηκε ίσος με 1,41

$\log_{10}(\text{cfu/g})$  (Rocha και Malcata, 2012). Η διαφοροποίηση αυτή πιθανώς οφείλεται στο υψηλότερο pH του φύλλου (6,5), που ευνοεί την ανάπτυξη των Εντεροβακτηρίων.

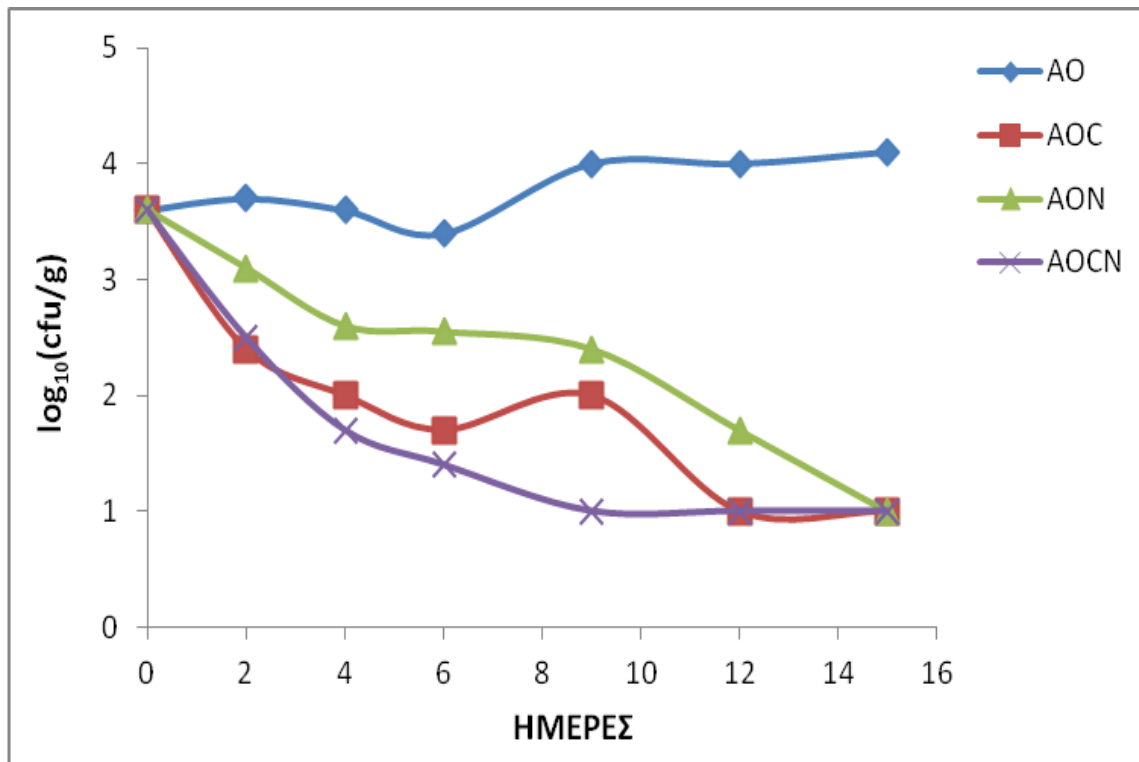


**Γράφημα 4:** Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα.

Ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων αυξήθηκε σταδιακά στα δείγματα A, A0 και V, ώστε ο τελικός πληθυσμός τους την 9<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup> και 18<sup>η</sup> ημέρα ήταν ίσος με 4.5, 4.1 και 3.6  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , αντίστοιχα (Γραφήματα 4, 5 και 6). Για τα υπό εξέταση δείγματα η πορεία των Εντεροβακτηρίων ήταν πτωτική, με τελικούς πληθυσμούς των AN, AC, ACN, AON, AOC, AOCN, VN, VC και VCN ίσους με 3.0, 2.7, 1.3, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0 και 1.0, αντίστοιχα (Γραφήματα 4, 5 και 6). Την 9<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων του A είναι υψηλότερος κατά 1.5, 1.8 και 3.2  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  από τα δείγματα AN, AC και ACN, αντίστοιχα (Γράφημα 4). Η προσθήκη χιτοζάνης, τόσο μόνη της, όσο και σε συνδυασμό με ναταμυκίνη, μειώνει στατιστικά ( $P < 0.05$ ) σημαντικά τον πληθυσμό των Εντεροβακτηρίων του προϊόντος. Αντίστοιχα και στην



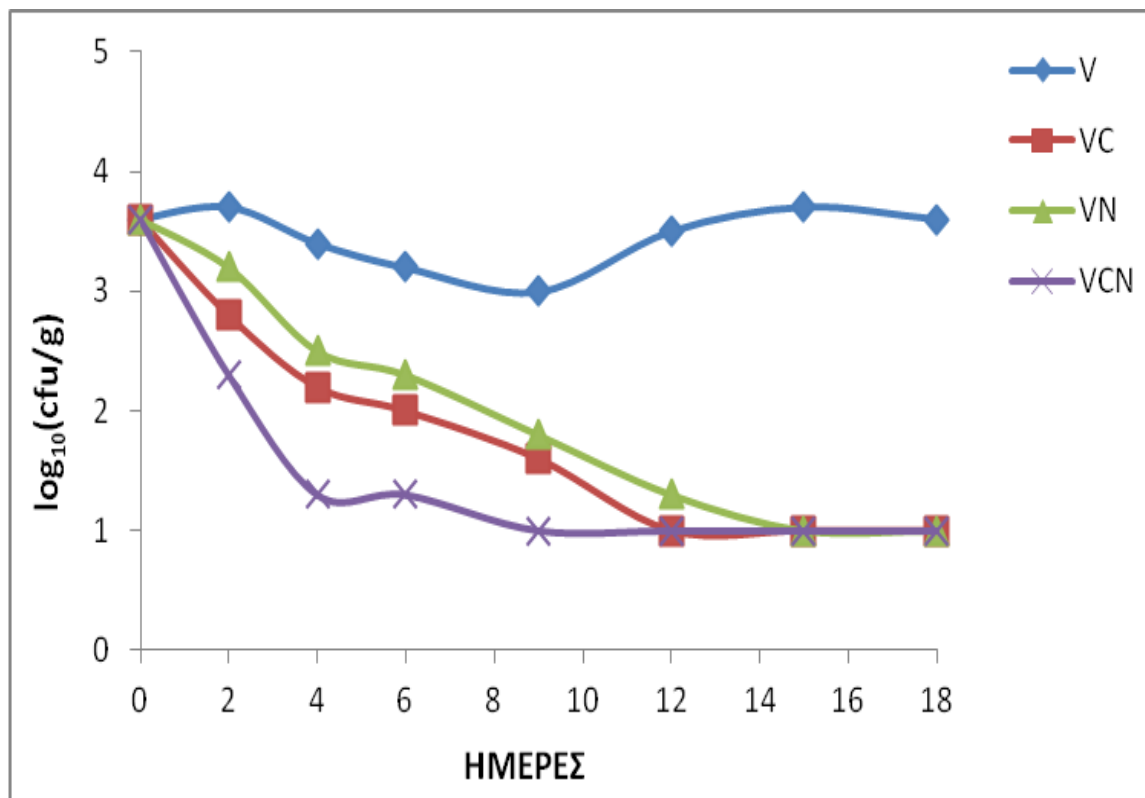
μελέτη των Giatrakou et al. (2010) η προσθήκη 1.5% v/w χιτοζάνης σε σουβλάκι κοτόπουλου με πιπεριά, σε αερόβια συσκευασία στους 4° C, μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των Εντεροβακτηρίων.



**Γράφημα 5 :** Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου.

Την 15<sup>η</sup> ημέρα (Γράφημα 5) το δείγμα AO έχει υψηλότερο αριθμό εντεροβακτηρίων κατά 4,0 log<sub>10</sub>(cfu/g) σε σχέση με τα AON, AOC και AOCN, καθότι ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων στις μεταχειρίσεις αυτές ήταν μικρότερος από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (10 cfu/g). Επιπλέον, από τα Γραφήματα 4 και 5 φαίνεται ότι η ενεργός συσκευασία έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από την συσκευασία αέρα. Συγκεκριμένα, την 9<sup>η</sup> ημέρα το δείγμα A έχει υψηλότερο πληθυσμό Εντεροβακτηρίων κατά 0,5 log<sub>10</sub>(cfu/g) σε σχέση με το AO, το δείγμα AN έχει υψηλότερο πληθυσμό Εντεροβακτηρίων κατά 0,6 log<sub>10</sub>(cfu/g) σε σχέση με το AON, το δείγμα AC έχει υψηλότερο πληθυσμό Εντεροβακτηρίων κατά 0,7 log<sub>10</sub>(cfu/g) σε σχέση με το AOC και το δείγμα ACN έχει υψηλότερο πληθυσμό Εντεροβακτηρίων

κατά  $0,3 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το AOCN. Αντίστοιχα στην μελέτη των Mexis et al. (2009) σε φιλέτα πέστροφας η ενεργός συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου μείωσε τον πληθυσμό των *Enterobacteriaceae* κατά  $2,9 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με την συσκευασία αέρα στους  $4^{\circ} \text{C}$ .



**Γράφημα 6 :** Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ} \text{C}$ ) σε συσκευασία κενού.

Ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ( $10 \text{ cfu/g}$ ) την  $9^{\text{η}}$ ,  $12^{\text{η}}$  και  $15^{\text{η}}$  στα δείγματα VCN, VC και VN, αντίστοιχα, δίνοντας σταθερά στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ) διαφορά όλων των μεταχειρίσεων που συσκευάστηκαν υπό κενό σε σχέση με το V (Γράφημα 6). Συγκεκριμένα την  $18^{\text{η}}$  ημέρα το V έχει υψηλότερο πληθυσμό Εντεροβακτηρίων κατά  $2.6 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με τα VCN, VC και VN. Ακόμη ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων στο δείγμα V την  $9^{\text{η}}$  ημέρα ήταν μειωμένος κατά 1 και  $1.5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σύγκριση με τα AO και A, αντίστοιχα (Γραφήματα 4, 5 και 6). Συνεπώς, η συσκευασία κενού είναι η πιο αποτελεσματική από όλες τις μεταχειρίσεις και ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και προσθήκης χιτοζάνης και ναταμυκίνης είναι ο καλύτερος αντιμικροβιακός

συνδυασμός, αφού ελαττώνει σε σύγκριση με τις άλλες μεταχειρίσεις περισσότερο τον πληθυσμό των εντεροβακτηρίων από την 9<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος. Αντίστοιχα, στην μελέτη των Tsiligianni et al. (2012) η προσθήκη 1 % χιτοζάνης μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηρίων σε ξιφία τόσο σε συσκευασία αέρα, όσο και σε συσκευασία κενού. Η συσκευασία κενού μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηρίων του προϊόντος σε σχέση με την αερόβια συσκευασία, ενώ τον χαμηλότερο πληθυσμό Εντεροβακτηρίων στον ξιφία έδωσε ο συνδυασμός 1,5% χιτοζάνης και συσκευασίας κενού.

Η μείωση του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων του φύλλου, με την προσθήκη της χιτοζάνης (τόσο μόνη της, όσο και σε συνδυασμό με ναταμυκίνη) είναι σημαντική σε όλες τις συσκευασίες. Αναμενόμενο αποτέλεσμα, εφόσον η χιτοζάνη έχει αποδειχτεί στο παρελθόν ότι αναστέλλει την ανάπτυξη της συγκεκριμένης ομάδας (Wang, 1992; Darmadji και Izumimoto, 1994; Simpson et al., 1997; Ouattara et al., 2000). Σε 'in vitro' έρευνα των Devlieghere et al. (2004) παρατηρήθηκε ότι η χιτοζάνη αναχαίτισε τον *Enterobacter aeromonas*. Επίσης, η προσθήκη 1% w/w χιτοζάνης σε λουκάνικα που συντηρήθηκαν στους 4° C μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηρίων κατά 1,8 log<sub>10</sub>(cfu/g) (Soultos et al., 2008). Οι López-Caballero et al. (2005) αναφέρουν ότι τα Εντεροβακτήρια σε μπακαλιάρο μετά την προσθήκη 1,5% χιτοζάνης μειώθηκαν κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες σε σχέση με τον μάρτυρα στους 2° C.

### **2.3.3. Μεταβολή του πληθυσμού των Κολοβακτηριοειδών στο φύλλο στους 4° C**

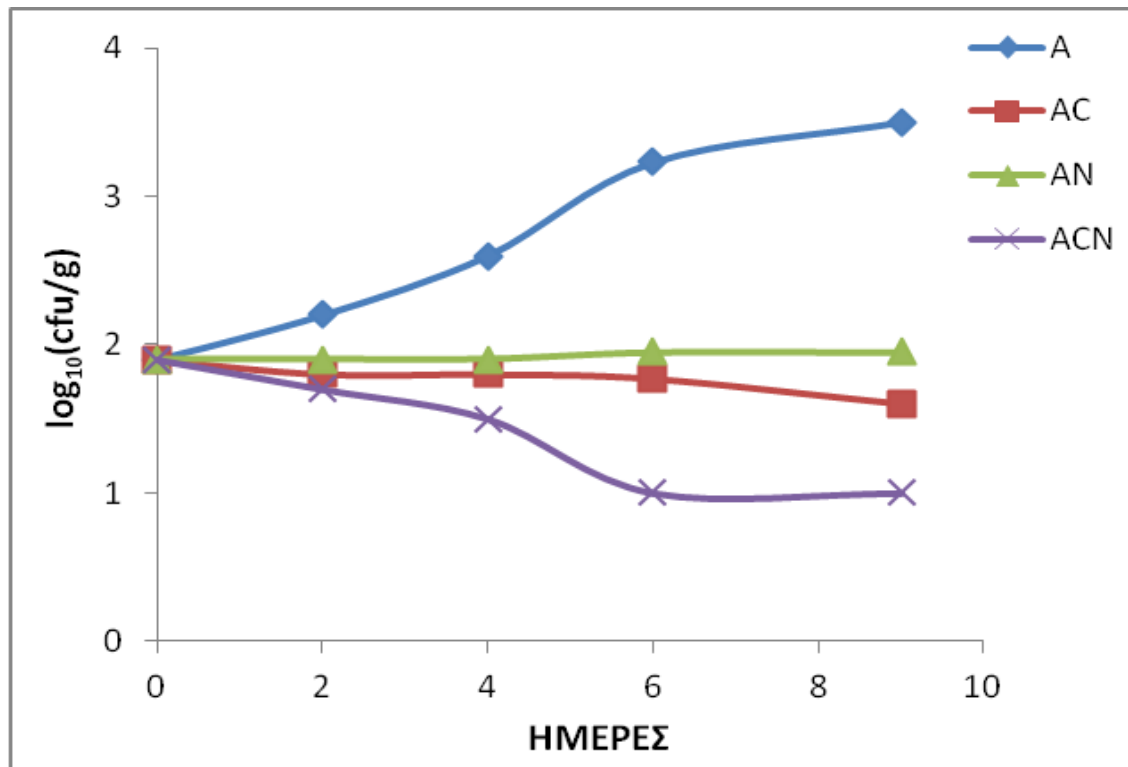
Τα κολοβακτηριοειδή είναι βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Περιλαμβάνουν αερόβια και αναερόβια, αρνητικά κατά Gram, μη σπορογόνα, μικρού μήκους, ραβδόμορφα μικρόβια. Ζυμώνουν τη λακτόζη με ταυτόχρονη παραγωγή οξέος και αερίου. Στα κολοβακτηριοειδή περιλαμβάνονται τα γένη *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* και *Klebsiella*. Τα κολοβακτηριοειδή αναπτύσσονται σε πολλά τρόφιμα εφ' όσον οι συνθήκες για την ανάπτυξη τους είναι ευνοϊκές. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 3° C έως 50° C και σε pH= 4,4-9,0 και έχουν χαμηλές απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000; Λιτοπούλου-

Τζανετάκη, 2003). Τα κολοβακτηριοειδή είναι δείκτες των υγιεινών συνθηκών που επικρατούν στη διάρκεια της επεξεργασίας ενός προϊόντος (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 1993).

Σε σιτάρι και αλεύρι σίτου (στην Αυστραλία) έχουν βρεθεί κολοβακτηριοειδή σε πληθυσμό 10 και 1 MPN/g και σε Γερμανικό και Ιταλικό αλεύρι  $10^2$  cfu/g (Berghofer et al., 2003). Επίσης, έχουν επανειλημμένα εντοπιστεί κολοβακτηρίδια (κυρίως είδη *Citrobacter*) σε δείγματα νερού από συστήματα διανομής πόσιμου νερού (Kilb et al., 2003). Εξαιτίας του γεγονότος ότι το νερό και το αλεύρι σίτου αποτελούν τα δύο βασικά συστατικά του φύλλου θεωρήθηκε σωστό να εξεταστεί το συγκεκριμένο προϊόν για κολοβακτηριοειδή. Στα περισσότερα τρόφιμα επιτρέπεται η παρουσία χαμηλού πληθυσμού κολοβακτηριοειδών που κυμαίνεται από 1 έως 100/g (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000). Ο αριθμός των κολοβακτηριδίων πρέπει να είναι μικρότερος από <100 cfu/g σε αλεύρι ή noodles (<http://foodquality.wfp.org/FoodSafetyandHygiene/TestingCommodities/MicrobiologicalTests/tabid/316/Default.aspx?PageContentMode=1>). Οι Silveira et al. (2007) αναφέρουν ότι τα όρια για την παρουσία κολοβακτηριοειδών σε νωπή ζύμη είναι  $10^2$  MPN/g (στους 45 °C).

Ο αρχικός πληθυσμός των Κολοβακτηριοειδών ήταν  $1,9 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Γραφήματα 7, 8 και 9). Σε συμφωνία με τα δικά μας αποτελέσματα είναι κι εκείνα των Peterkin et al. (1989) που αναφέρουν πληθυσμό κολοβακτηριοειδών 1,33 έως  $2,11 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε ζύμη για πίτα και των Lee et al. (2007) που εντόπισαν ρύζι με αριθμό κολοβακτηριοειδών ίσο με  $1,8 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Επίσης, κολοβακτηριοειδή έχουν βρεθεί και σε ζυμαρικά. Οι Trovatelli et al. (1988) αναφέρουν ότι το 38,4% των σπιτικών ζυμαρικών που εξετάστηκαν βρέθηκαν να έχουν κολοβακτηριοειδή περισσότερα από  $10^2$  cfu/g, ενώ για τα ζυμαρικά που παράχθηκαν βιομηχανικά το ποσοστό αυτό άγγιξε το 21,4%. Η παρουσία των κολοβακτηριοειδών στα τρόφιμα δεν σημαίνει απαραίτητα ύπαρξη κοπρανώδους μόλυνσης. Τα κολοβακτηριοειδή έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και σε υπολείμματα τροφίμων που έχουν απομείνει στα μηχανήματα επεξεργασίας (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 1993). Άρα η παρουσία κολοβακτηριοειδών στο εξετασθέν προϊόν πιθανόν να οφείλεται σε όχι καλή υγιεινή κατάσταση των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με το τρόφιμο (Jackson et al., 2007). Η παρουσία των βακτηρίων αυτών στις επιφάνειες επαφής με

το τρόφιμο αυξάνει τον κίνδυνο διασταυρούμενης μόλυνσης στα τρόφιμα, που έρχονται σε επαφή με αυτές τις επιφάνειες (Zhao et al., 1998; Chen et al., 2001; Montville et al., 2001).

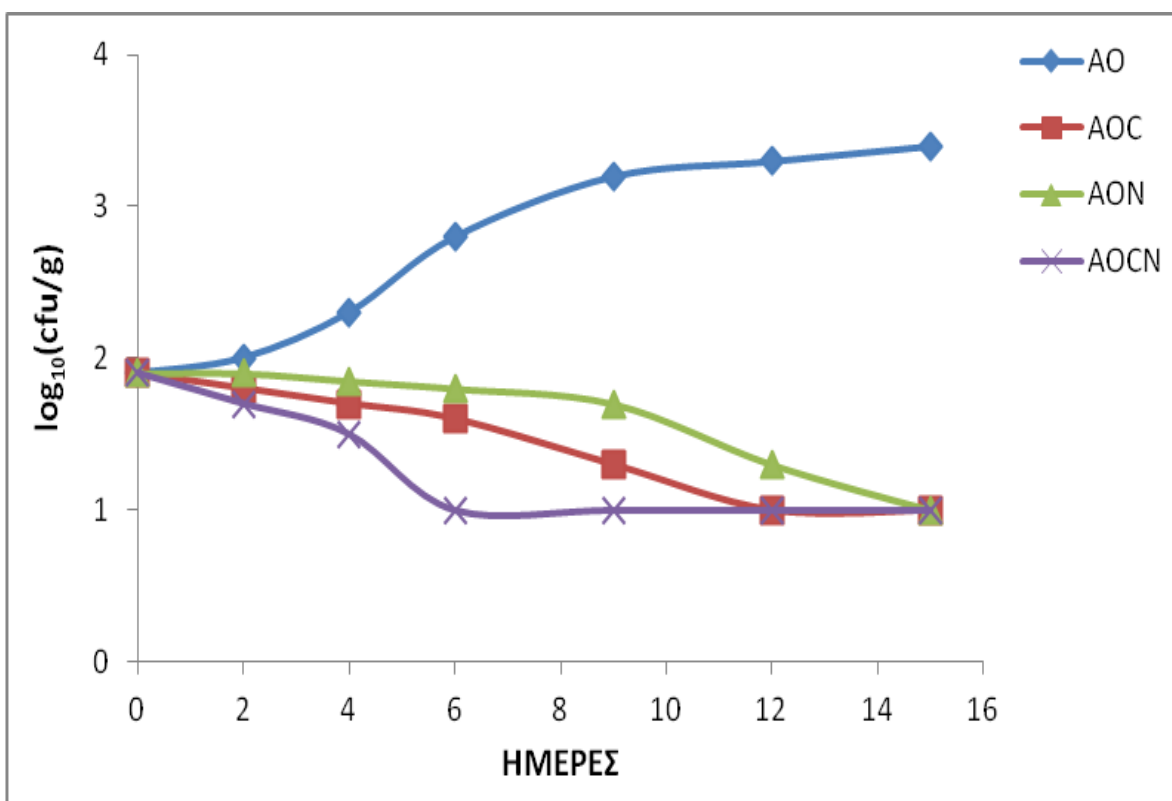


**Γράφημα 7 :** Μεταβολή του πληθυσμού των κολοβακτηριοειδών στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα.

Ο πληθυσμός των Κολοβακτηριοειδών στο δείγμα A αυξήθηκε κατά περίπου 1,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , με τελικό πληθυσμό την 9<sup>η</sup> ημέρα ίσο με 3.5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  (Γράφημα 7). Την 9<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των Κολοβακτηριοειδών στο A ήταν υψηλότερος κατά 0.5, 1.9 και 2.5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με τα AN, AC και ACN, αντίστοιχα (Γράφημα 7). Είναι φανερό ότι η προσθήκη χιτοζάνης (με ή χωρίς την ναταμυκίνη) μειώνει τον πληθυσμό των κολοβακτηριοειδών στο προϊόν. Η προσθήκη χιτοζάνης, άλλωστε, έχει μειώσει σημαντικά τον πληθυσμό των κολοβακτηριοειδών σε φρέσκα ζυμαρικά συσκευασμένα σε αέρα (Nobile et al., 2009).

Η ενεργός συσκευασία (AO) δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά ( $P>0,05$ ) τον πληθυσμό των κολοβακτηριοειδών στο φύλλο, σε σχέση με την (A) αερόβια συσκευασία (Γραφήματα 7 και 8). Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα της ενεργού

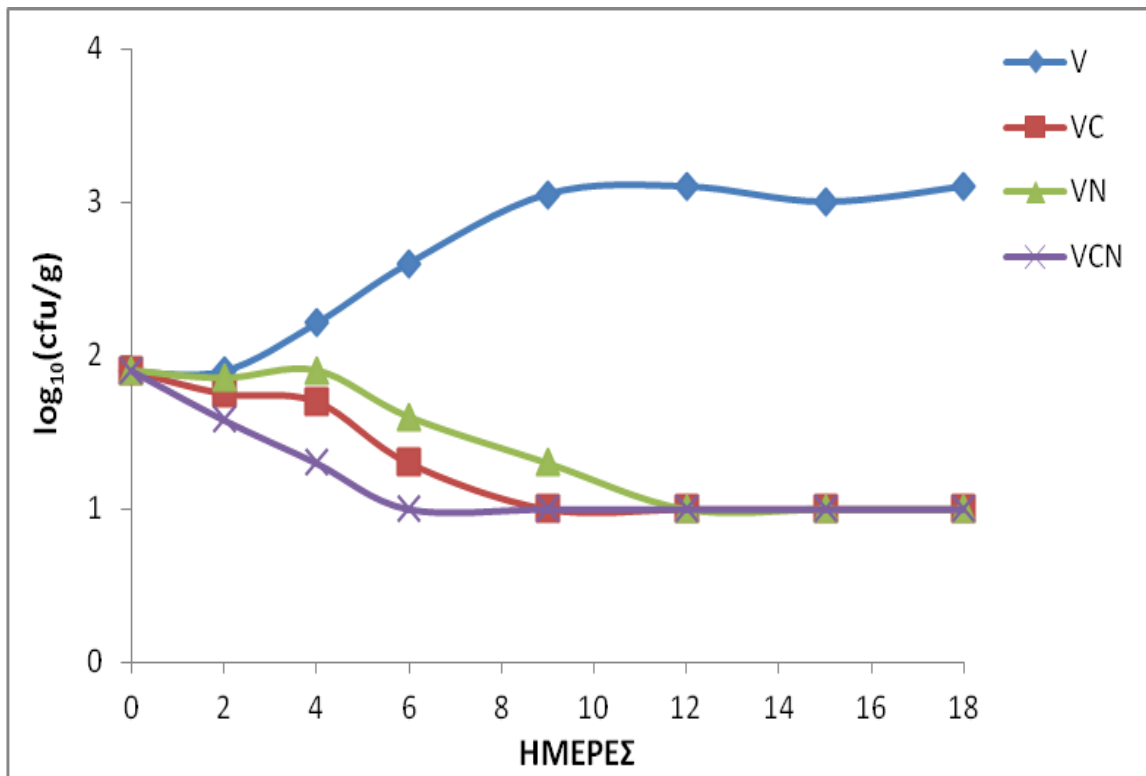
συσκευασίας ο πληθυσμός των Κολοβακτηριοειδών μειώνεται σημαντικά με το χρόνο ( $P < 0,05$ ) κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ( $10 \text{ cfu/g}$ ) την 6<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup> και 15<sup>η</sup> ημέρα, για τα δείγματα AOCN, AOC και AON, αντίστοιχα (Γράφημα 8). Την 15<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των Κολοβακτηριοειδών στο AO είναι υψηλότερος κατά  $2,4 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με τα AON, AOC και AOCN (Γράφημα 8).



**Γράφημα 8 :** Μεταβολή του πληθυσμού των Κολοβακτηριοειδών στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ} \text{ C}$ ) σε ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου.

Παρόμοιο προφίλ ανάπτυξης των κολοβακτηριοειδών παρατηρείται στο Γράφημα 9 και για τα δείγματα που συσκευάστηκαν υπό κενό. Παρατηρείται ότι αυξάνεται κατά μία λογαριθμική μονάδα ο πληθυσμός των κολοβακτηριοειδών στο δείγμα V (τελικός πληθυσμός  $3,1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  την 18<sup>η</sup> ημέρα), ενώ παράλληλα μειώνεται στα δείγματα VN, VC και VCN, σε σχέση με το V ( $P < 0,05$ ). Ο αριθμός των κολοβακτηριοειδών μειώνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ( $10 \text{ cfu/g}$ ) την 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ημέρα στα δείγματα VCN, VC και VN, αντίστοιχα. Την 18<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των Κολοβακτηριοειδών του V είναι υψηλότερος κατά  $2,1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με τα VN, VC και VCN (Γράφημα 9). Η καλύτερη συσκευασία, από τις τρεις που

εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, αποδείχτηκε η συσκευασία κενού, όσον αφορά την συγκεκριμένη ομάδα μικροοργανισμών, αφού το V είχε μειωμένο πληθυσμό κολοβακτηριοειδών κατά 0.5 και 0.3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , σε σχέση με τα A και A0, αντίστοιχα (Γραφήματα 7,8,9).



**Γράφημα 9 :** Μεταβολή του πληθυσμού των Κολοβακτηριοειδών στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού.

Παρατηρείται ότι η προσθήκη ναταμυκίνης και χιτοζάνης στο φύλλο μειώνει τον πληθυσμό των κολοβακτηριοειδών, κυρίως στην ενεργό συσκευασία και στην συσκευασία κενού. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με στοιχεία της βιβλιογραφίας που αφορούν την αποτελεσματικότητα της χιτοζάνης σε κολοβακτηρίδια (Darmadji και Izumimoto, 1994). Επίσης, η χιτοζάνη ανέστειλε την ανάπτυξη των κολοβακτηρίων σε τυρί Μοσαρέλα στους 4° C (Altieri et al., 2005). Η επικάλυψη μπρόκολου με χιτοζάνη (μεσαίου MB) ανέστειλε την ανάπτυξη του συνόλου των κολοβακτηρίων καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης υπό ψύξη (5–7 °C) για 20 ημέρες, συγκεκριμένα ο πληθυσμός ήταν μειωμένος κατά 1,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , σε σχέση με τον μάρτυρα (Moreira et al., 2011). Σύμφωνα με τους Durango et al.

(2006) η παρουσία χιτοζάνης 1,5% στο διάλυμα εμφάνισης καρότων είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των κολοβακτηριοειδών στο προϊόν, μετά από 15 ημέρες στους 10° C.

Ο υψηλός πληθυσμός ( $3 - 3,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) των κολοβακτηρίων στα δείγματα χωρίς την προσθήκη φυσικών συντηρητικών ουσιών (A, AO και V) δεν αποτελεί απειλή για την υγεία του καταναλωτή, γιατί το φύλλο είναι ένα προϊόν που τρώγεται πάντα ψημένο (σε πίτες), στους 180° C για μία ώρα, οπότε δεν επιβιώνουν τα συγκεκριμένα βακτήρια μετά από θερμική επεξεργασία. Οι Thorsen et al. (2011) αναφέρουν ότι βρέθηκε ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* να είναι αρκετά υψηλός σε ζύμη ενός παραδοσιακού σνακ ψωμιού (Gergoush) στο Σουδάν. Συγκεκριμένα ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου ήταν παρόμοιος ανάμεσα στους 4 τύπους σνακ που εξετάστηκαν (από ρεβίθια, φάβα, φακή και λευκά φασόλια) και ανάμεσα από 6,1 και 7,7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Οι ερευνητές σημειώνουν ότι μετά το ψήσιμο της ζύμης για 30 min δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου παθογόνα βακτήρια. Εφόσον λοιπόν καταστράφηκαν τα βακτήρια του γένους *Bacillus* (θερμοανθεκτικά) με λιγότερη ώρα ψήσιματος είναι βέβαιο ότι καταστρέφονται με ψήσιμο και τα κολοβακτηρίδια, τα οποία είναι πιο ευαίσθητα στην θερμική επεξεργασία. Η Κοζεκίδου- Ρουκά (2000) αναφέρει ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια (π.χ. Βάκιλλοι) είναι περισσότερο θερμοανθεκτικά από τα αρνητικά κατά Gram (π.χ. κολοβακτήρια). Το βακτήριο *E. coli* χρειάζεται 20-30 λεπτά στους 57,3° C για να καταστραφεί. Σημειώνεται ότι δεν ανιχνεύτηκε *E. coli* σε κανένα από τα δείγματα παραδοσιακού φύλλου.

#### **2.3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντερόκοκκων στο φύλλο στους 4° C**

Οι Εντερόκοκκοι βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου, θηλαστικών και πτηνών, επίσης στα ερπετά, έντομα, φυτά, το έδαφος και το νερό. Θεωρούνται παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο και συνδέονται συχνά με νοσοκομειακή λοίμωξη (Koluman et al., 2009). Οι Εντερόκοκκοι ανήκουν στο γένος *Enterococcus*, το οποίο περιλαμβάνει 16 είδη. Ιδιαίτερη σημασία για τα τρόφιμα έχουν ο *Enterococcus faecalis* και ο *Enterococcus faecium*. Είναι βακτήρια προαιρετικά αναερόβια, θετικά κατά Gram. Έχουν μορφή κόκκου (συνήθως απαιτούνται ενωμένοι ανά δύο ή σχηματίζουν αλυσίδα) και δεν παράγουν καταλάση. Οι



περισσότεροι Εντερόκοκκοι αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 10 έως 45° C (ενώ τα είδη *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium* αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 0 έως 50° C) και σε μεγάλο εύρος τιμών pH από 3,3 έως 9,6. Χρησιμοποιούνται σαν δείκτες της υγιεινής κατάστασης των τροφίμων (Κοτζεκίδου, 1993; Κοτζεκίδου- Ρουκά, 2000). Στο παρελθόν έχουν εντοπιστεί εντερόκοκκοι σε ρύζι (Lee et al., 2007).

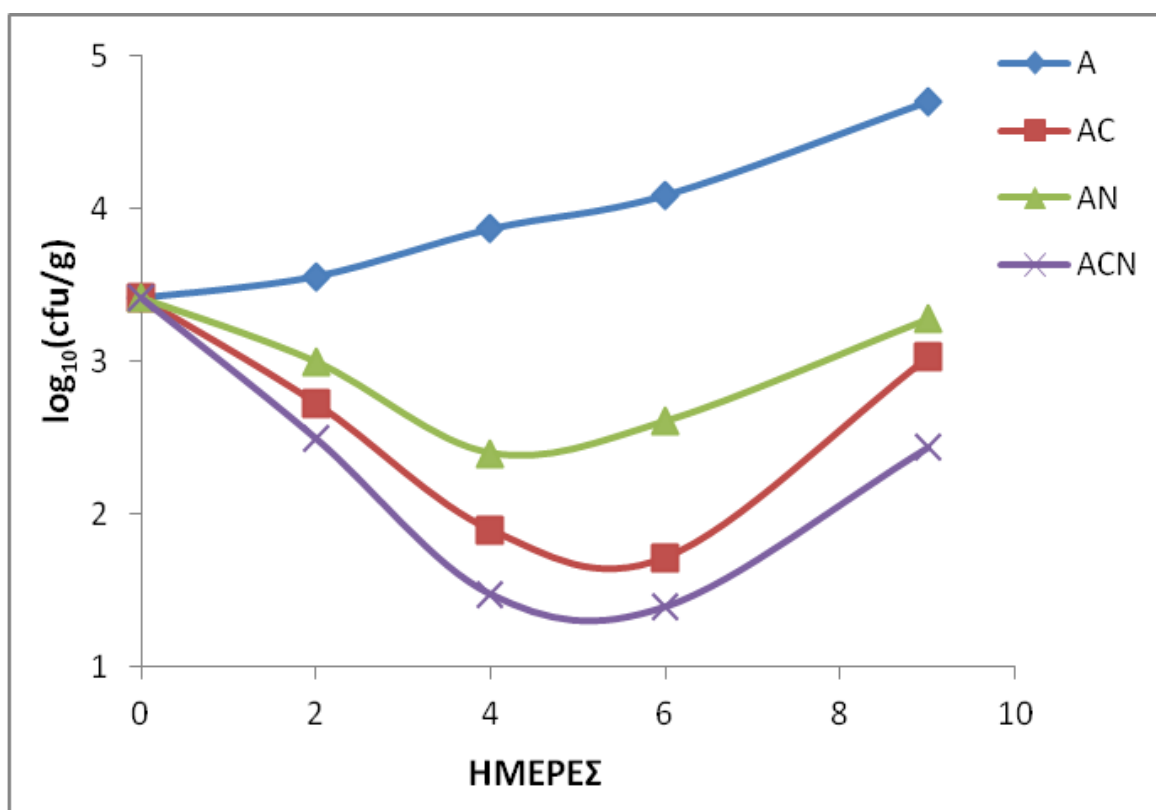
Στην παρούσα μελέτη δεν ανιχνεύτηκαν Εντερόκοκκοι σε καμία από τις μεταχειρίσεις, καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων γεγονός που δείχνει ότι το προϊόν ήταν αποδεκτό από αρχικής υγιεινής κατάστασης. Αντίστοιχα και οι Rocha και Malcata (2012) δεν ανίχνευσαν Εντερόκοκκους σε αλεύρι σίτου. Επίσης, οι Sekwati-Monang και Ganzle (2011) δεν ανίχνευσαν *Enterococcus spp.* σε Ting είναι (ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης σόργου της Μποτσουάνα).

### **2.3.5. Μεταβολή του πληθυσμού των Οξυγαλακτικών Βακτηρίων στο φύλλο στους 4° C**

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν την γλυκόζη παράγοντας, είτε αποκλειστικά γαλακτικό οξύ (ομοζυγωτικά), είτε κυρίως γαλακτικό οξύ και άλλα παράγωγα (ετεροζυγωτικά). Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια και δίνουν αρνητική αντίδραση στην καταλάση (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1987). Με το θρεπτικό υπόστρωμα MRS προσδιορίζονται κυρίως τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και δευτερευόντως των γενών, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 1993). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια στη ζύμη πρέπει να είναι  $<10^5$  cfu/g ([http://www.ils-limited.co.uk/clientfiles/File/Microbiological %20criteria.pdf](http://www.ils-limited.co.uk/clientfiles/File/Microbiological%20criteria.pdf)).

Ο αρχικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν  $3,4 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Αντίστοιχα, οι Rocha και Malcata (2012) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αλεύρι σίτου ήταν ίσος με  $2,98 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Από τα Γραφήματα 10, 11 και 12 φαίνεται ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξάνεται στα δείγματα A, AO και V, ενώ παραμένει πρακτικά σταθερός ή μειώνεται για τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις με την προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών στο προϊόν. Στην αερόβια συσκευασία του φύλλου την 9<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των

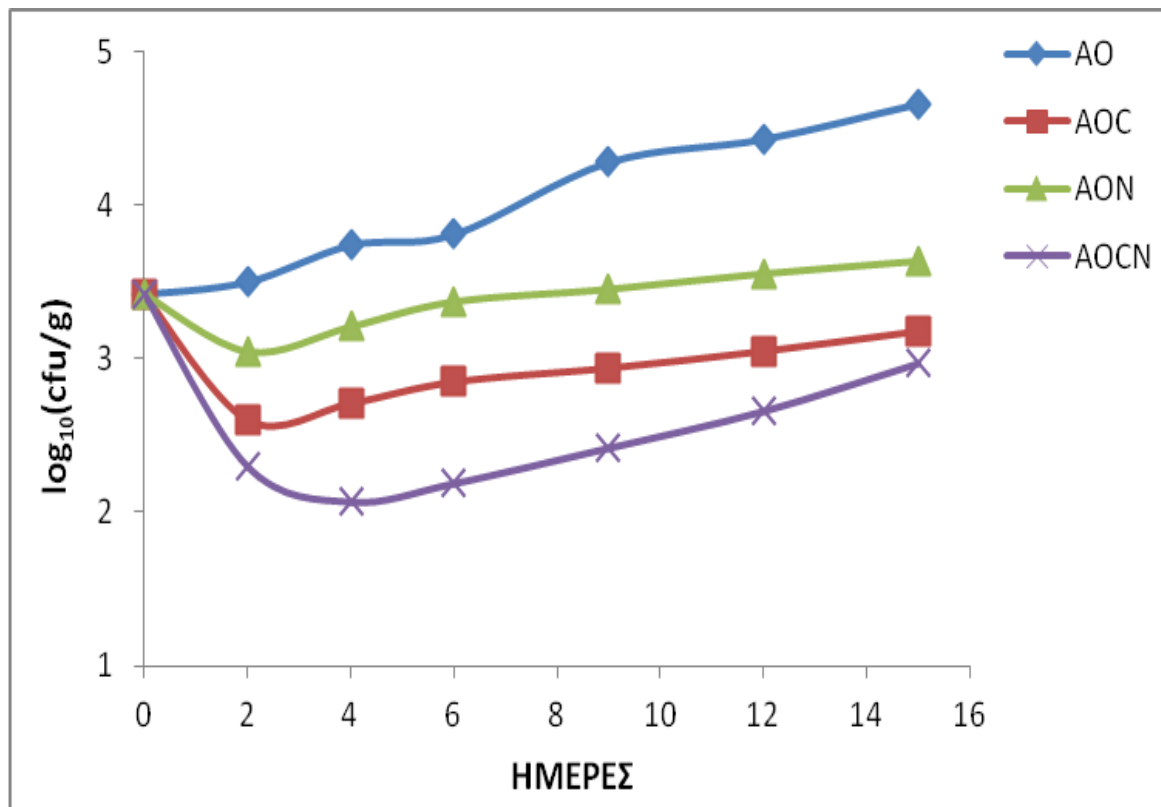
δειγμάτων A, AN, AC και ACN ήταν ίσος με 4.7, 3.28, 3.03, και 2.44  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , αντίστοιχα (Γράφημα 10). Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στον μάρτυρα A την 9<sup>η</sup> ημέρα ήταν σημαντικά υψηλότερος ( $P < 0,05$ ) κατά 1.4, 1.7 και 2.2, σε σχέση με τα AN, AC και ACN, αντίστοιχα. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης είναι κι εκείνα των Hesseltine et al. (1969) που αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αλλοιωμένη ζύμη για πίτσα ήταν  $71 \times 10^4 \text{ cfu/g}$ .



**Γράφημα 10 :** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ} \text{C}$ ) σε συσκευασία αέρα.

Όσον αφορά το φύλλο σε ενεργό συσκευασία (Γράφημα 11) ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο δείγμα A0 την 15<sup>η</sup> ημέρα είναι υψηλότερος κατά 1, 1.5 και 1.65  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με τα AON, AOC και AOCN, αντίστοιχα. Στη συσκευασία κενού, σύμφωνα με το Γράφημα 12, την 18<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων του δείγματος V είναι υψηλότερος κατά 1.3 λογαριθμική μονάδα σε σχέση με το δείγμα VN και 2,0 λογαριθμικές μονάδες σε σχέση με τα VC

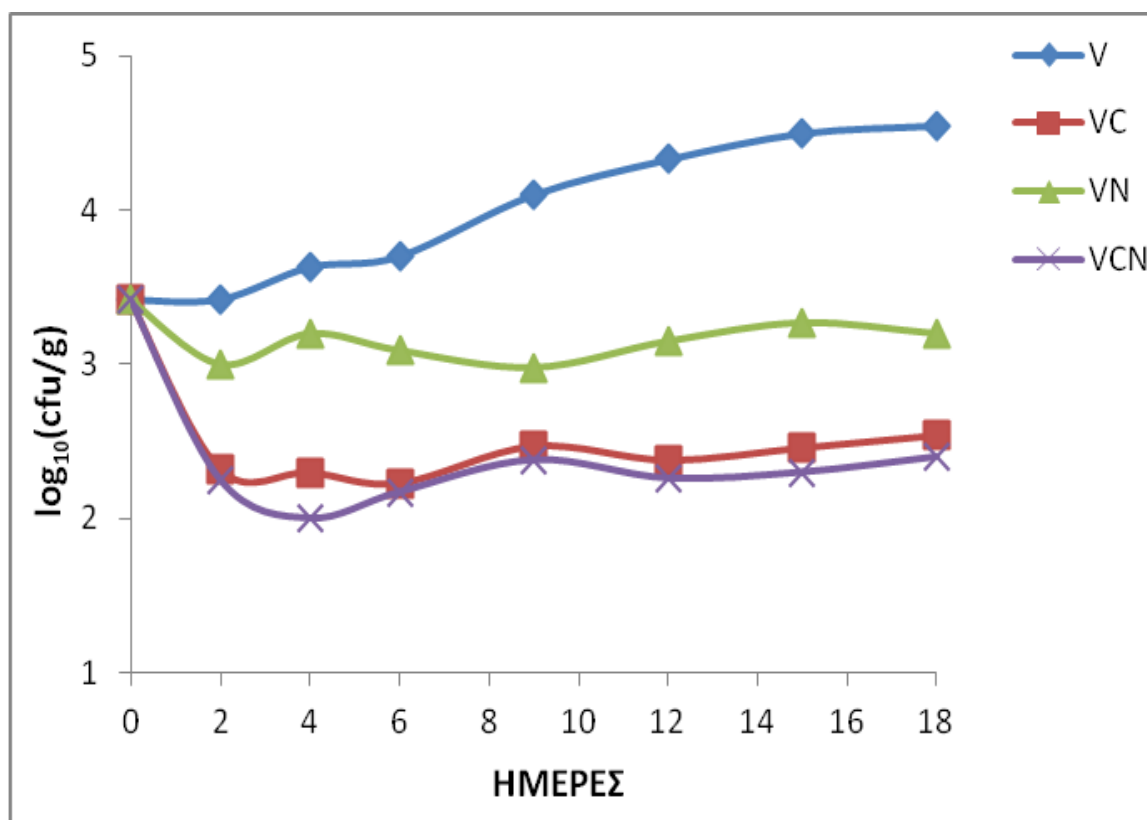
και VCN (ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων των οποίων δεν διαφοροποιείται ιδιαίτερα μεταξύ τους). Μεταξύ των διαφορετικών συσκευασιών του φύλλου (A, AO, V) δεν παρατηρείται κάποια σημαντική αύξηση ή μείωση ( $P>0.05$ ) του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων του προϊόντος. Το γεγονός αυτό εξηγείται εφόσον είναι γνωστό ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια αναπτύσσονται τόσο παρουσία, όσο και απουσία οξυγόνου (Mexis et al., 2012).



**Γράφημα 11:** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου.

Οι Hesseltine et al. (1969) παρατήρησαν ότι το 92% των βακτηρίων που απομονώθηκαν από αλλοιωμένα προϊόντα αρτοποιίας ανήκαν στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Στελέχη των *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. fermentum*, *L. harbinensis*, *L. parabuchneri*, *L. plantarum*, και *L. reuteri* απομονώθηκαν από Ting, ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης σόργου της Μποτσουάνα. Τα είδη *L. fermentum*, *L. plantarum* και *L. reuteri* κυριαρχούν στη βιομηχανική παρασκευή ζυμούμενων- όξινων ζυμών σίτου και σίκαλης (Sekwati-Monang και Ganzle, 2011). Πιθανόν και στο παραδοσιακό

φύλλο για πίτα να ισχύει το ίδιο. Σημειώνεται ότι δεν έγινε ταυτοποίηση των στελεχών των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην παρούσα μελέτη.



**Γράφημα 12:** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού.

Στην συγκεκριμένη μελέτη η προσθήκη ναταμυκίνης και χιτοζάνης (μόνα ή σε συνδυασμό) μειώνουν τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων ( $P < 0,05$ ) σε όλες τις υπό εξέταση συσκευασίες. Αντίστοιχα η προσθήκη ναταμυκίνης ως συντηρητική ουσία σε Γαλοτύρι μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων (γαλακτοβάκιλλοι και γαλακτόκοκοι) του προϊόντος (Καλλιντέρη, 2011). Σε 'in vitro' έρευνα των Devlieghere et al. (2004) παρατηρήθηκε ότι η χιτοζάνη αναχαίτισε τα οξυγαλακτικά βακτήρια: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*. Επίσης, έχει παρατηρηθεί μείωση στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε χωριάτικα λουκάνικα με προσθήκη χιτοζάνης 1.5% w/w (Georgantelis et al., 2007). Ακόμη, η προσθήκη 1% w/w χιτοζάνης σε λουκάνικα που συντηρήθηκαν στους 4° C μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά 1,65  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  (Soultos et al., 2008). Στην μελέτη των Giatrakou et

al. (2010) η χιτοζάνη έδειξε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα η προσθήκη χιτοζάνης 1,5% v/w σε σουβλάκι κοτόπουλο με πιπεριά (υπό αερόβια συσκευασία στους 4° C) μείωσε 3 λογαριθμικές μονάδες τον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων του προϊόντος. Στην μελέτη των Tsiligianni et al. (2012) η προσθήκη χιτοζάνης 1% v/w μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε φιλέτα ξιφία τόσο σε συσκευασία αέρα, όσο και σε συσκευασία κενού.

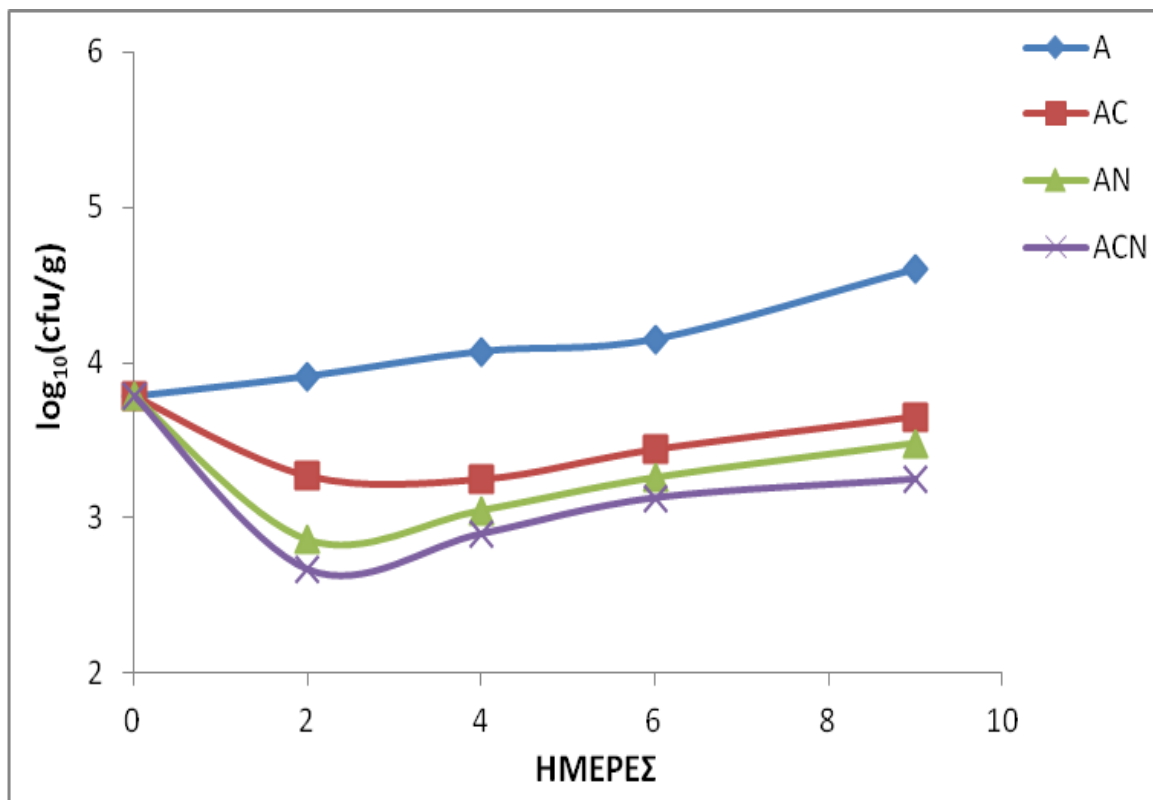
### **2.3.6. Μεταβολή του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο φύλλο στους 4° C**

Οι Μύκητες και οι Ζύμες ανήκουν στους αυστηρά αερόβιους μικροοργανισμούς. Οι Μύκητες παρουσιάζουν χαρακτηριστική υφή γνωστή σαν μικκύλιο. Οι Ζύμες είναι μία ομάδα μονοκύτταρων μυκήτων που δεν σχηματίζουν μικκύλιο. Υπάρχουν ψυχρότροφα στελέχη και στα δύο αυτά είδη οργανισμών (Μύκητες και Ζύμες) (Καλογρίδου-Βασιλειάδου, 1995). Σε μελέτη των Berghofer et al. (2003) αναφέρεται ότι ο μέσος πληθυσμός Ζυμών και Μυκήτων που ανιχνεύτηκαν σε σιτάρι κι αλεύρι σίτου της Αυστραλίας ήταν  $10^3$  και  $10^2$  cfu/g, αντίστοιχα.

Ο αρχικός αριθμός των Ζυμών και Μυκήτων στο χωριάτικο φύλλο ήταν 3,8  $\log_{10}$ (cfu/g) (Γραφήματα 13, 14 και 15). Αντίστοιχα, οι Lee et al. (2007) αναφέρουν πληθυσμό Ζυμών και Μυκήτων σε ρύζι ίσο με 3.56  $\log_{10}$ (cfu/g). Στο Γράφημα 13 φαίνεται ότι ο αριθμός των Ζυμών και μυκήτων του δείγματος A έχει φτάσει 4  $\log_{10}$ (cfu/g) την 4<sup>η</sup> ημέρα και την 9<sup>η</sup> ημέρα έφτασε 4,5  $\log_{10}$ (cfu/g). Τα δείγματα AC, AN και ACN την 9<sup>η</sup> ημέρα έχουν μικρότερο αριθμό Ζυμών και Μυκήτων σε σχέση με το A κατά 0,9  $\log_{10}$ (cfu/g), 1,1  $\log_{10}$ (cfu/g) και περίπου 1,3  $\log_{10}$ (cfu/g), αντίστοιχα.

Ο πληθυσμός των Ζυμών-Μυκήτων στο δείγμα στο ΑΟ (Γράφημα 14) αυξήθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο, καταλήγοντας την 15<sup>η</sup> ημέρα ίσος με 4,7  $\log_{10}$ (cfu/g). Την ίδια ημέρα (15<sup>η</sup> ημέρα) τα δείγματα AOC, AON και AOCN είχαν περίπου 1.0, 1.15 και 1.4  $\log_{10}$ (cfu/g) λιγότερες Ζύμες-Μύκητες από το ΑΟ, αντίστοιχα (Γράφημα 14). Οι Latou et al. (2010) αναφέρουν ότι οι τιμές των Ζυμών και Μυκήτων ήταν 5.1 για τα δείγματα ψωμιού χωρίς συντηρητικά. Στην ίδια μελέτη Latou et al. (2010) η χρήση ενεργού συσκευασίας μείωσε αισθητά τον πληθυσμό της υπό εξέταση ομάδας μικροοργανισμών. Αντίστοιχα και ο πληθυσμός Ζυμών και

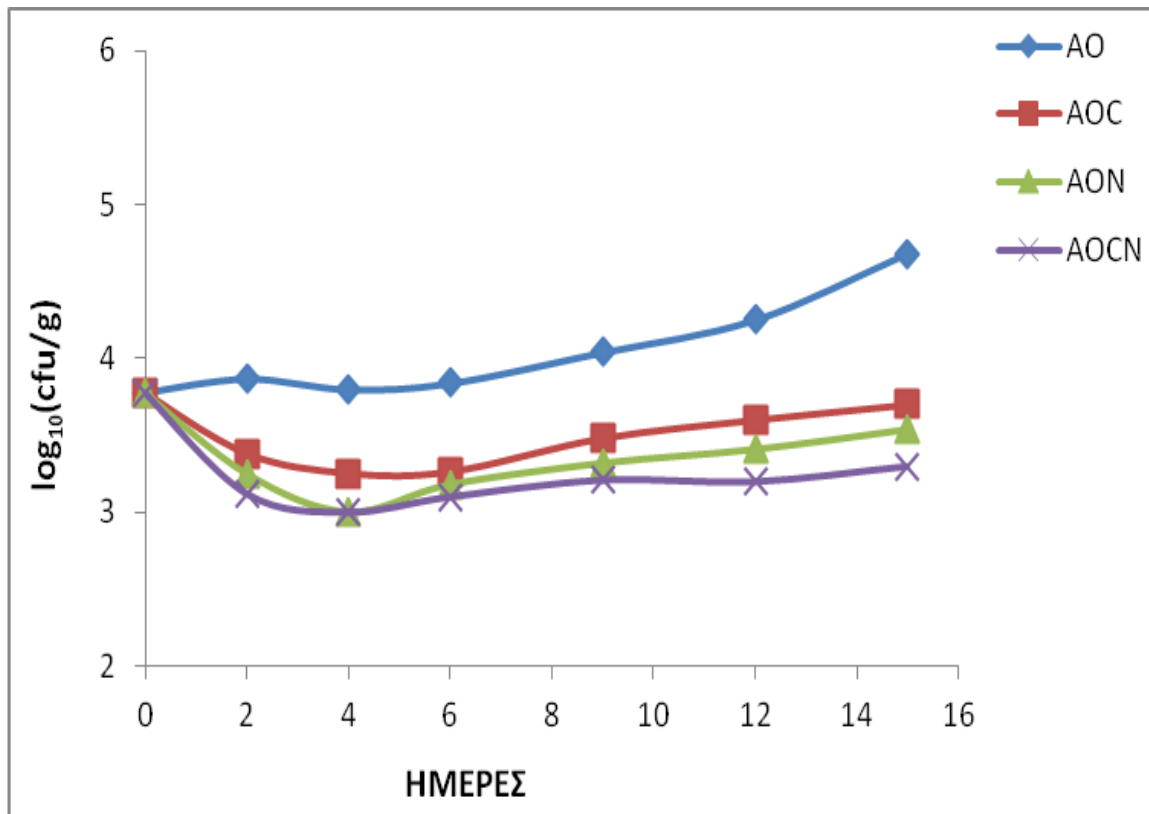
Μυκήτων στο δείγμα V (Γράφημα 15) αυξήθηκε σε συνάρτηση με το χρόνο, ενώ μειώθηκε στα VC, VN και VCN. Την 18<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των VC, VN και VCN ήταν μειωμένος κατά 1,3, 1,4 και 1,45 σε σχέση το V, αντίστοιχα (Γράφημα 15).



**Γράφημα 13 :** Μεταβολή του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα.

Ο αριθμός των Ζυμών και Μυκήτων του δείγματος AO την 9<sup>η</sup> ημέρα είναι 4,0  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , ενώ εκείνος του A την ίδια ημέρα ήταν 4,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  (Γραφήματα 13 και 14). Συνεπώς η ενεργός συσκευασία μείωσε τον πληθυσμό των Ζυμών-Μυκήτων κατά περίπου 0,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , εφόσον είναι γνωστό ότι ο απορροφητής οξυγόνου απορροφά ένα μεγάλο ποσοστό του οξυγόνου της συσκευασίας, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη των μυκήτων. Στο Γράφημα 15 φαίνεται ότι ο αριθμός των ζυμών και μυκήτων του δείγματος V την 9<sup>η</sup> ημέρα είναι ~ 3.8  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , ενώ του AO είναι 4,0  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  και του A την ίδια μέρα ήταν 4,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Συνεπώς η χρήση της συσκευασίας κενού μειώνει σημαντικά τον πληθυσμό των Ζυμών/Μυκήτων στο φύλλο σε σχέση με την συσκευασία αέρα και ελάχιστα σε σχέση με την ενεργό

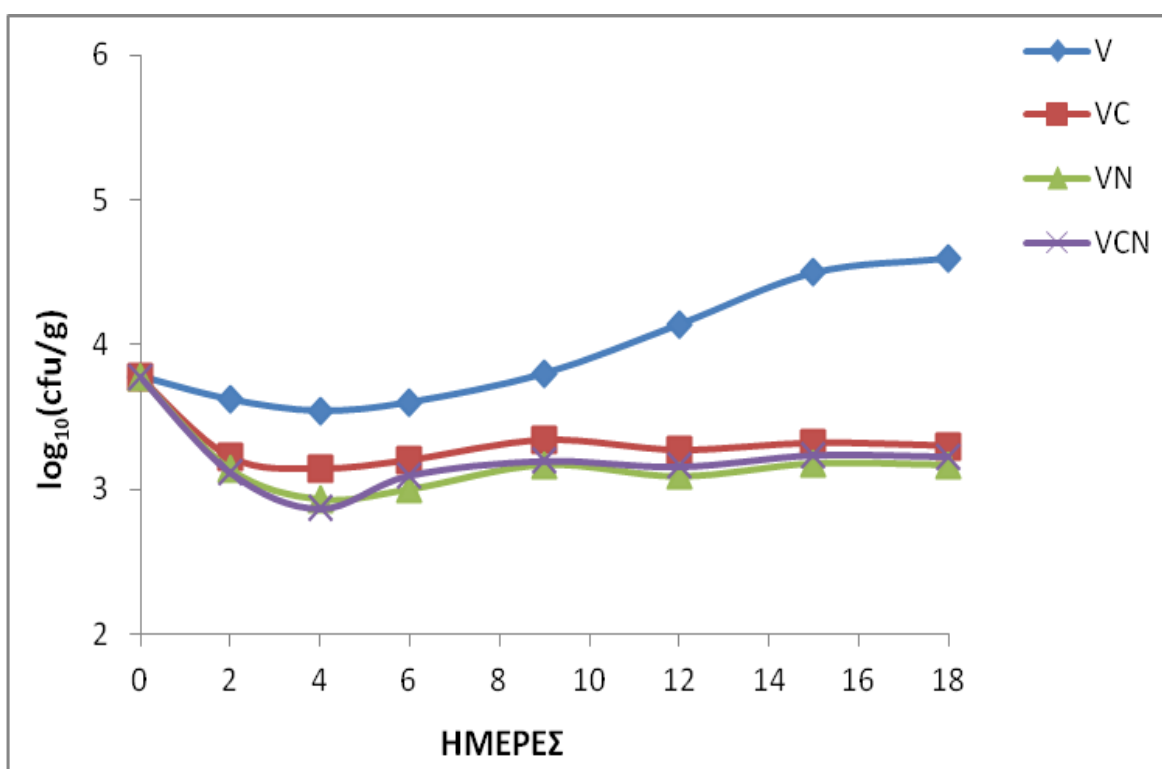
συσκευασία απορροφητή οξυγόνου. Αυτό συμβαίνει γιατί η συσκευασία κενού μειώνει σημαντικά το περιεχόμενο οξυγόνο της συσκευασίας σε σχέση με την αερόβια συσκευασία, ενώ ελάχιστα σε σχέση με την ενεργό συσκευασία.



**Γράφημα 14 :** Μεταβολή του πληθυσμού Ζυμών και Μυκήτων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου.

Επίσης, από το Γράφημα 15 διαπιστώνεται ότι καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος ο πληθυσμός των Ζυμών και Μυκήτων στα δείγματα VC, VN και VCN παραμένει κάτω από 3,3 log<sub>10</sub>(cfu/g), γεγονός που δείχνει ότι ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και φυσικών αντιμικροβιακών είναι ο αποτελεσματικότερος έναντι της ανάπτυξης των Ζυμών και Μυκήτων. Αξίζει να αναφερθεί ότι η προσθήκη των δύο φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, και ο συνδυασμός αυτών, έδωσαν στατιστικά σημαντική μείωση (P<0,05) του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο φύλλο τόσο στην ενεργό συσκευασία, όσο και στην συσκευασία κενού. Στη συσκευασία αέρα η πλέον αποτελεσματική μεταχείριση είναι ο συνδυασμός των αντιμικροβιακών ουσιών, ο οποίος έδωσε στατιστικά σημαντική μείωση, κάτι που

πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι οι Μύκητες παρουσία οξυγόνου είναι ιδιαίτερα ανθεκτικοί μικροοργανισμοί (ως αυστηρά αερόβιοι), με αποτέλεσμα να απαιτείται για την αντιμετώπιση τους ο συνδυασμός των αντιμικροβιακών ουσιών (ισχυρό εμπόδιο). Τέλος, σε καμία μεταχείριση ο πληθυσμός των Ζυμών και Μυκήτων δεν ξεπέρασε τους  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των Sekwati-Monang και Ganzle (2011) που αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των Ζυμών και Μυκήτων ήταν μικρότερος από  $10^5 \text{ cfu/g}$  σε Ting (ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης σόργου της Μποτσουάνα).



**Γράφημα 15 :** Μεταβολή του πληθυσμού Ζυμών και Μυκήτων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ} \text{C}$ ) σε συσκευασία κενού.

Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε σε όλα τα δείγματα ότι στον πληθυσμό Ζυμών - Μυκήτων επικράτησαν οι μύκητες, ενώ το ποσοστό της εμφάνισης ζυμών ήταν πολύ μικρό. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η ανάπτυξη μούχλας θεωρείται η πιο συχνή αιτία της αλλοίωσης των προϊόντων αρτοποιίας (Corsetti et al., 1998; Earle and Putt, 1984, Legan, 1993). Μάλιστα το αλεύρι σίτου και κατ' επέκταση τα προϊόντα αρτοποιίας είναι επιρρεπή και μπορεί να μολυνθούν με



δεσοξυνιβαλενόλη, μια μυκοτοξίνη που παράγεται από τον μύκητα *Fusarium graminearum* (Samar et al., 2007). Σε Ιταλικό και Γερμανικό αλεύρι καταμετρήθηκε σχετικά υψηλός πληθυσμός μυκήτων  $10^3$  cfu/g (Berghofer et al., 2003) και τα κύρια γένη των Μυκήτων που ανιχνεύτηκαν ήταν: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* και *Eurotium spp.* Επίσης, οι Fields et al. (1981) διαπίστωσαν την παρουσία μυκήτων σε ζύμη αραβοσίτου και οι Jespersen et al. (1994) σε φρέσκια ζύμη αραβοσίτου προσδιόρισαν  $10^5$  cfu/g αριθμό Μυκήτων, κυρίως τα γένη *Penicillium*, *Aspergillus* και *Fusarium*, και μικρότερο αριθμό ζυμών ( $<10^3$  cfu /g), από τα γένη *Candida*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Kluyveromyces* και *Debaryomyces*. Τέλος, οι Kuehn και Gunderson (1962) απομόνωσαν ψυχρόφιλους μύκητες από προϊόντα αρτοποιίας με βατόμουρο και κεράσι. Συγκεκριμένα τα εξής είδη: *Aureobasidium pullulans*, *Botryotrichum sp.*, *Cephalosporium acremonium*, *Cephalosporium sp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Cladosporium sp.*, *Mucor ramannianus*, *M. fragilis section*, *M. Plumbeus*, *M. hiemalis*, *Penicillium chrysogenum*, *P. cyclopium*, *P. frequentans*, *P. martensii*, *P. Janthinellum*, *P. jenseni*, *P. olivino-viride*, *P. palitans*, *P. puberulum*, *P. purpurescens*, *P. restrictum*, *P. thomii*, *P. velutinum*, *P. waksmani*, *P. urticae*, *Penicillium spp.*, *Phoma glomerata*, *Phoma spp.*, *Sphaeropsidaceae sp. K-351*, *Tuber culariaceae sp.K-212*.

Οι αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για την δραστικότητα της ναταμυκίνης έναντι των Ζυμών και Μυκήτων είναι πολλές (Stark, 2004; Thomas and Delves, 2003). Η ναταμυκίνη μόνη της ή/και σε συνδυασμό με μικρή συγκέντρωση σορβικού καλίου περιόρισε την ανάπτυξη των μυκήτων *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium roqueforti*, *Paecilomyces variotii*, *Aspergillus niger* και *Cephalosporium fragrans*, σύμφωνα με έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε άγαρ με pH 5,5 (Mann και Beuchat, 2008). Ακόμη, οι Var et al. (2006) αναφέρουν ότι η κοινή χρήση συσκευασίας κενού και ναταμυκίνης είναι αποτελεσματική στην πρόληψη της εμφάνισης Μυκήτων επί δύο μήνες στο τυρί Kashar.

Επίσης, πολλές είναι οι μελέτες που δείχνουν ότι η χιτοζάνη είναι δραστική έναντι ζυμών και μυκήτων. Σε 'in vitro' έρευνα των Devlieghere et al. (2004) παρατηρήθηκε ότι η χιτοζάνη αναχαίτισε τις ζύμες: *Candida lambica* και *Cryptococcus humiculus*. Στην μελέτη των Giatrakou et al. (2010) η προσθήκη χιτοζάνης 1.5% v/w σε σουβλάκι κοτόπουλου με πιπεριά, υπό αερόβια συσκευασία στους 4° C, μείωσε

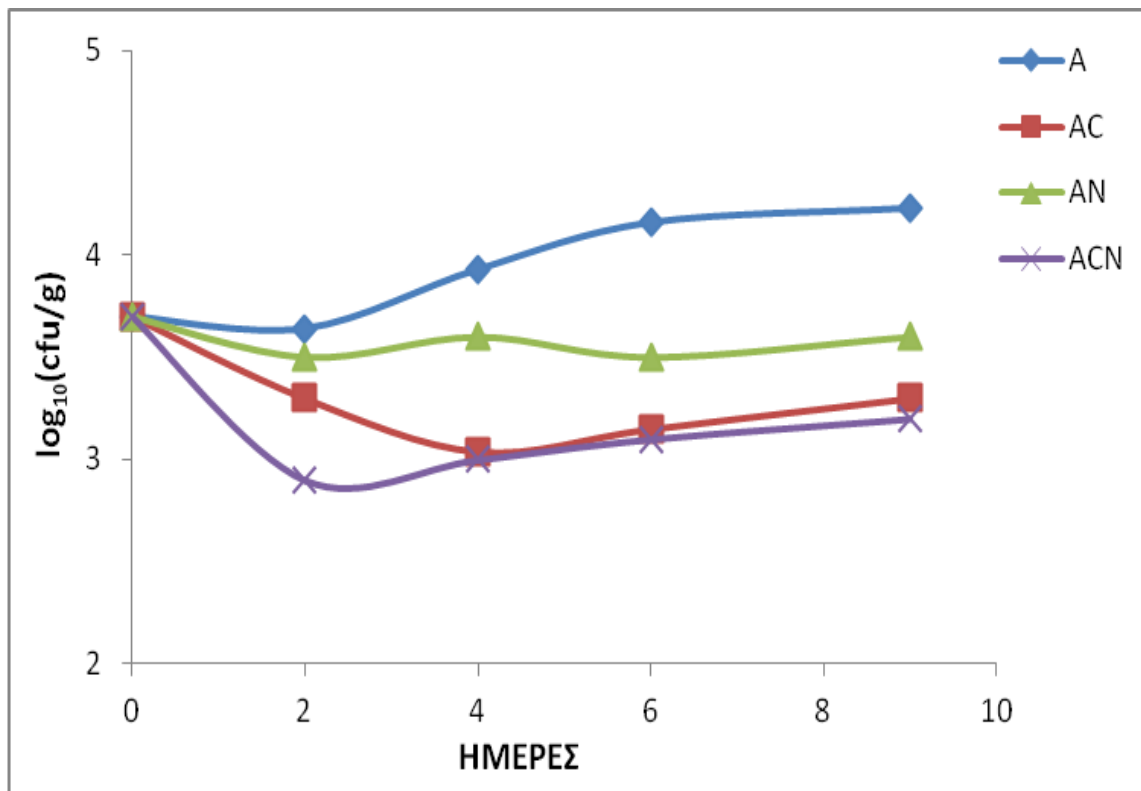
κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες τον πληθυσμό των ζυμών και μυκήτων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της δράσης της χιτοζάνης, μόνη της ή σε συνδυασμό με ναταμυκίνη, είναι η πρόσφατη μελέτη των Fajardo et al. (2010) σε ημίσκληρο τυρί Saloio, στο οποίο χρησιμοποιήθηκε υλικό συσκευασίας επικαλυμμένο με χιτοζάνη ή/και με χιτοζάνη και ναταμυκίνη. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα δείγματα με χιτοζάνη εμφάνισαν μείωση του ολικού πληθυσμού Ζυμών και Μυκήτων κατά 0,3 λογαριθμική μονάδα και εκείνα με συνδυασμό ναταμυκίνης και χιτοζάνης μείωση κατά 1,1 λογαριθμικές μονάδες, συγκρινόμενα με τον μάρτυρα, μετά από 27 ημέρες συντήρησης. Οι Park et al. (2005) παρατήρησαν σημαντική επίδραση της χιτοζάνης στην καθυστέρηση μυκητιακής ανάπτυξης σε φρέσκες φράουλες. Η επικάλυψη πεπονιού με κηρό από πολυαιθυλένιο με χιτοζάνη και ναταμυκίνη οδήγησε στη δραστική μείωση των Μυκήτων *A. alternate* και *F. semitectum* σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 30 ° C (Cong et al., 2007). Επιπρόσθετα, η επικάλυψη μπρόκολου με χιτοζάνη οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων κατά 0.8-1.0 log<sub>10</sub>(cfu/g), σε σύγκριση με το μπρόκολο χωρίς την επικάλυψη χιτοζάνης (Moreira et al., 2011). Η εμφάνιση καρότων σε διάλυμα αμύλου (4% w/w)- γλυκερόλης (2%w/w)- χιτοζάνης (1,5% w/w) μείωσε τον πληθυσμό Ζυμών και Μυκήτων κατά 2,5 log<sub>10</sub>(cfu/g), σε σύγκριση με τον μάρτυρα, μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης στους 10° C (Durango et al., 2006).

### **2.3.7. Μεταβολή του πληθυσμού των Ψυχρότροφων Βακτηρίων στο φύλλο στους 4° C**

Στα τρόφιμα που συντηρούνται με ψύξη (0 – 10 °C) είναι σημαντική η καταμέτρηση των Ψυχρότροφων βακτηρίων, επειδή είναι καθοριστική για τον προσδιορισμό της διάρκειας συντήρησης του τροφίμου. Υψηλός αριθμός Ψυχρότροφων βακτηρίων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ανεπιθύμητων οσμών και την αλλοίωση του τροφίμου (Κοτζεκίδου, 1993).

Ο αρχικός αριθμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο ήταν 3,7 log<sub>10</sub>(cfu/g) (Γραφήματα 16, 17 και 18). Παρόμοιο πληθυσμό βρήκαν και οι Silveira et al. (2007) σε ζύμη χωρίς συντηρητικά, που είχε αρχικό πληθυσμό Ψυχρότροφων βακτηρίων ίσο με 3,1 log<sub>10</sub>(cfu/g). Στο Γράφημα 16 η ανάπτυξη των

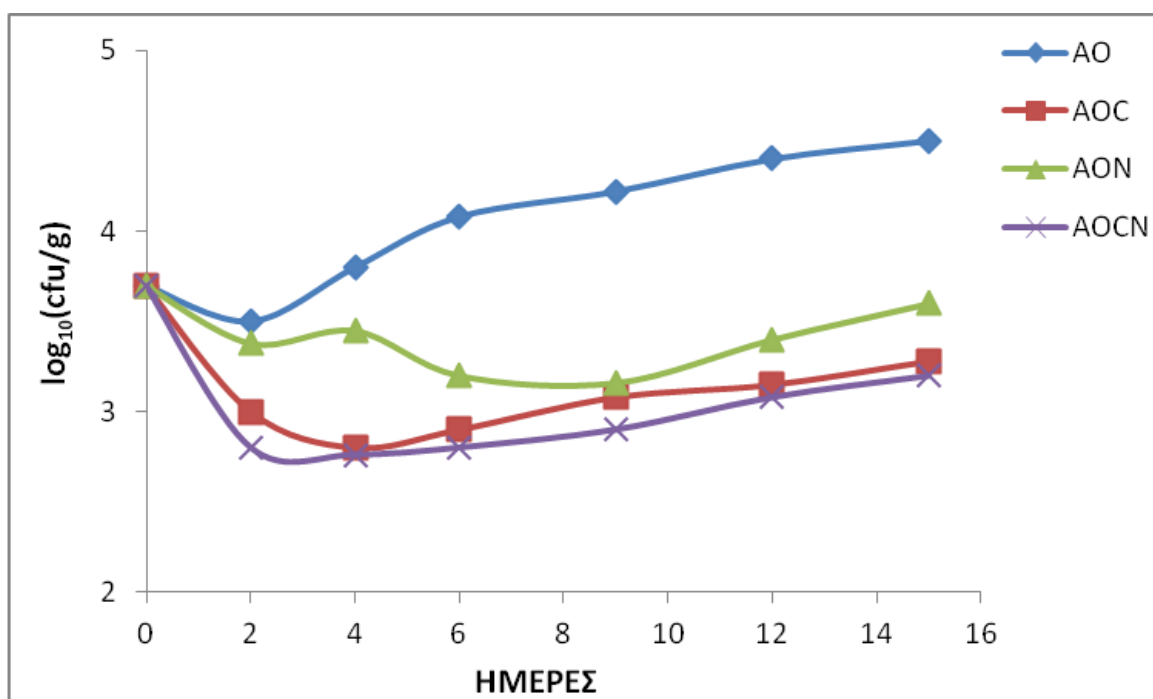
Ψυχρότροφων βακτηρίων στο φύλλο σε αέρα (A) είχε αυξητική πορεία και ο πληθυσμός τους την 9<sup>η</sup> ημέρα ήταν ίσος με 4,2  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων στο δείγμα AN παραμένει πρακτικά σταθερός, ενώ στα δείγματα AC και ACN μειώνεται. Την 9<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων των AN, AC και ACN είναι μειωμένος κατά 0,6, 0,9 και 1,0  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το A, αντίστοιχα (Γράφημα 16).



**Γράφημα 16 :** Μεταβολή του πληθυσμού των Ψυχρότροφων βακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα.

Στο Γράφημα 17 φαίνεται ότι ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων αυξάνεται στο δείγμα AO και τελικά φτάνει στην τιμή 4,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων στα δείγματα AON, AOC και AOCN αρχικά μειώνεται, αλλά από την 6<sup>η</sup> ημέρα αυξάνεται σταδιακά, μέχρι τελικού πληθυσμού (την 15<sup>η</sup> ημέρα) ίσου με 3,6, 3,3 και 3,2  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί των υπό εξέταση μικροοργανισμών για τα δείγματα AON, AOC και AOCN είναι μικρότεροι από εκείνον του AO κατά 0,9, 1,2 και 1,3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , αντίστοιχα. Στη συσκευασία κενού τα Ψυχρότροφα βακτήρια αυξήθηκαν στο δείγμα V, ενώ μειώθηκαν σε όλες τις άλλες

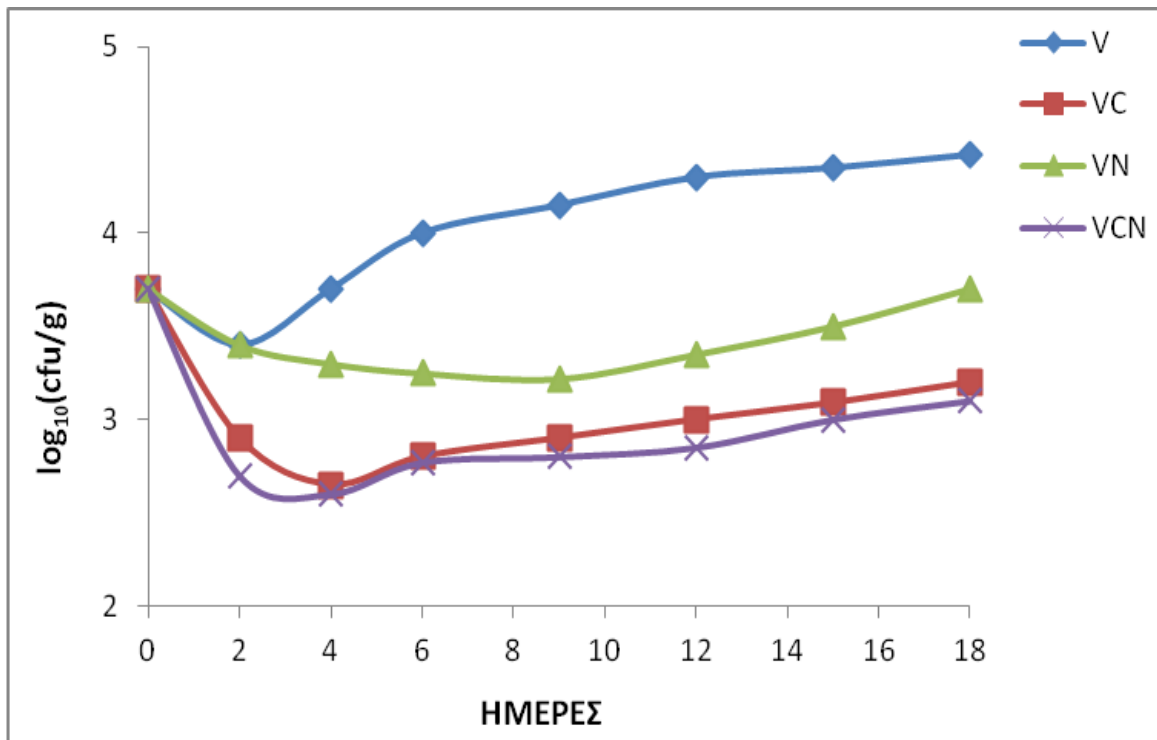
μεταχειρίσεις (Γράφημα 18). Την 18<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων στο δείγμα V είναι υψηλότερος κατά 0,7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το δείγμα VN, 1,2  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το VC και 1,3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το VCN (Γράφημα 18). Δεν παρατηρούνται αξιοσημείωτες διαφορές ( $P>0,05$ ) όσον αφορά τον πληθυσμό των Ψυχρότροφων βακτηρίων μεταξύ των υπό εξέταση συσκευασιών του φύλλου (A, AO, V). Επιπλέον από τα Γραφήματα 16, 17 και 18 φαίνεται ότι η προσθήκη χιτοζάνης (με ή χωρίς ναταμυκίνη) στο φύλλο μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των ψυχρότροφων βακτηρίων ( $P<0,05$ ) σε όλες τις συσκευασίες.



**Γράφημα 17:** Μεταβολή του πληθυσμού των Ψυχρότροφων βακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}\text{C}$ ) σε ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα των Hesseltine et al. (1969) που αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων σε χαλασμένη ζύμη για πίτσα ήταν  $28 \times 10^4$  cfu/g. Ακόμη, ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων σε ζύμη ζαχαροπλαστικής χωρίς συντηρητικά στους  $8^{\circ}\text{C}$  για 13 ημέρες ήταν περίπου ίσος με 4  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  (Silveira et al., 2007). Επιπλέον, στην διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται δράση των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών της παρούσης εργασίας

(χιτοζάνη και ναταμυκίνη) έναντι ψυχρότροφων βακτηρίων. Οι Var et al. (2006) αναφέρουν ότι η χρήση ναταμυκίνης σε τυρί Kashar μείωσε τον αριθμό των Ψυχρότροφων βακτηρίων στο προϊόν, ειδικά σε συνδυασμό με την συσκευασία κενού.



**Γράφημα 18:** Μεταβολή του πληθυσμού των Ψυχρότροφων βακτηρίων στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού.

Επίσης, σε 'in vitro' έρευνα των Devlieghere et al. (2004) παρατηρήθηκε ότι η χιτοζάνη αναχαίτισε το βακτήριο *Pseudomonas fluorescens*. Στην μελέτη των Tsiligianni et al. (2012) η προσθήκη χιτοζάνης 1 % v/w μείωσε τον πληθυσμό των *Pseudomonas spp.* σε ξιφία τόσο σε συσκευασία αέρα, όσο και σε συσκευασία κενού. Η προσθήκη χιτοζάνης μείωσε κατά περίπου δύο λογαριθμικές μονάδες την ανάπτυξη των Ψυχρότροφων βακτηρίων σε φρέσκα ζυμαρικά συσκευασμένα σε αέρα (Nobile et al., 2009). Στην μελέτη των Soutos et al. (2008) η προσθήκη χιτοζάνης 1% w/w σε λουκάνικα που συντηρήθηκαν στους 4° C μείωσε τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά 1 log<sub>10</sub>(cfu/g). Η προσθήκη χιτοζάνης 1.5% v/w σε σουβλάκι κοτόπουλο με πιπεριά, υπό αερόβια συσκευασία στους 4° C, μείωσε

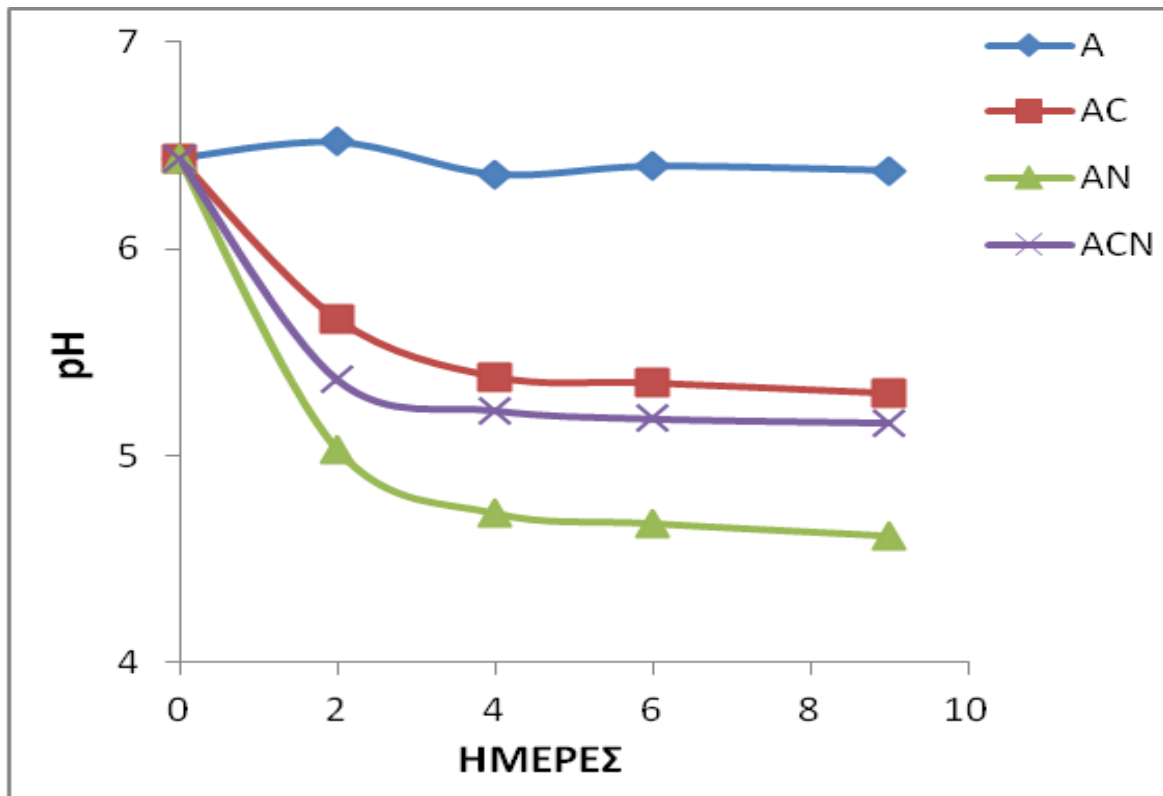
κατά περίπου 2,5 λογαριθμικές μονάδες τον πληθυσμό του *Pseudomonas spp.* (Giatrakou et al., 2010). Ο πληθυσμός των Ψυχρότροφων βακτηρίων σε μπρόκολο επικαλυμμένο με χιτοζάνη ήταν μικρότερος κατά 1.2–1.5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , συγκρινόμενο με το μπρόκολο χωρίς επικάλυψη χιτοζάνης, μετά από 20 ημέρες αποθήκευσης του προϊόντος υπό ψύξη (5-7° C) (Moreira et al., 2011). Η εμβάπτιση καρότων σε διάλυμα αμύλου (4% w/w)- γλυκερόλης (2%w/w)- χιτοζάνης (1,5% w/w) μείωσαν τον πληθυσμό των Ψυχρότροφων βακτηρίων κατά 1,3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , σε σύγκριση με τον μάρτυρα, μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης στους 10° C (Durango et al., 2006).

### 2.3.8. Προσδιορισμός του pH στο φύλλο στους 4° C

Από τα Γραφήματα 19, 20 και 21 το pH των δειγμάτων A, A0 και V παρέμεινε πρακτικά σταθερά (~6,5). Το αρχικό pH φρέσκων noodles ήταν 6,48 (Li et al., 2011) και ξηρών δημητριακών ρυζιού ήταν 6,75 (Deng et al., 1998). Επίσης, οι Rocha και Malcata (2012) αναφέρουν ότι το pH σε αλεύρι σίτου ήταν 6,35 και οι Jespersen et al. (1994) αναφέρουν ότι η φρέσκια ζύμη είχε pH περίπου ίσο με 5,7. Επιπλέον οι Latou et al. (2010) αναφέρουν ότι το pH λευκού ψωμιού σε φέτες ήταν 6,3-6,4, ενώ οι Quilez et al. (2006) ανέφεραν αρχικές τιμές pH που κυμαίνονταν μεταξύ 5,6 έως 6,3 για δείγματα σταρένιου ψωμιού τύπου μπαγκέτα. Οι Rosenkvist και Hansen (1995) ανέφεραν τιμές pH 5,7 και 5,6 για λευκό και ολικής αλέσεως ψωμί, αντίστοιχα.

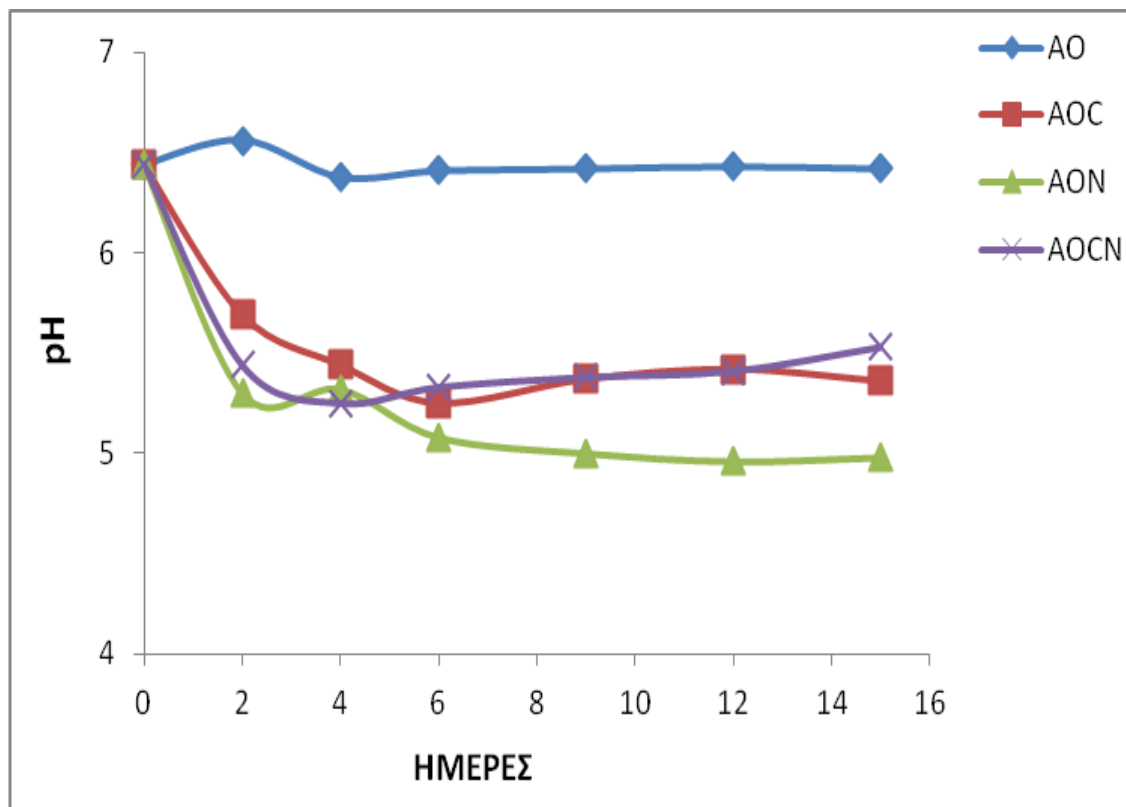
**Πίνακας 8:** Το pH των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για τον ψεκασμό του παραδοσιακού φύλλου για πίτα

Διάλυμα	pH
Ναταμυκίνης	3,03
Χιτοζάνης	4,43



**Γράφημα 19:** Μεταβολή του pH στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα.

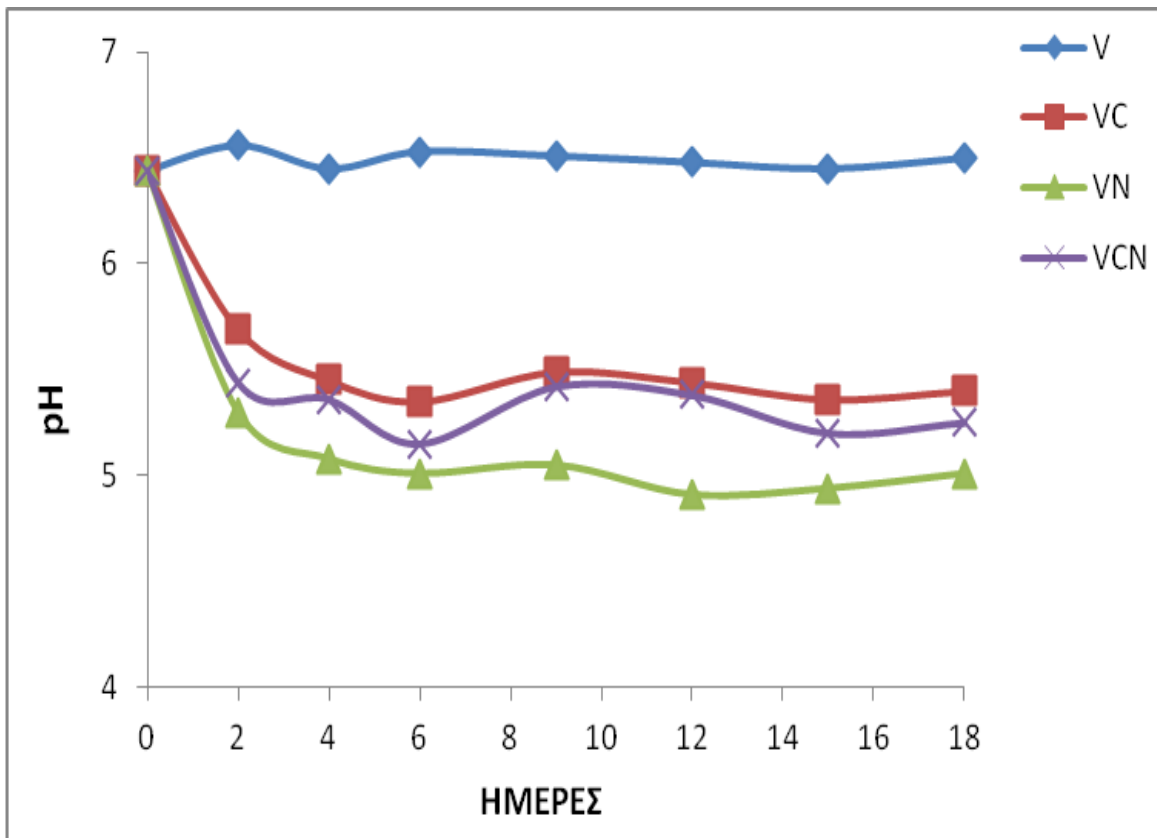
Το pH των δειγμάτων που προστέθηκε το διάλυμα ναταμυκίνης (AN, AON και VN), χιτοζάνης (AC, AOC και VC) και ο συνδυασμός αυτών (ACN, ACN και VCN), παρατηρούμε ότι μειώνεται αισθητά μέχρι την 2<sup>η</sup> ημέρα και ύστερα παραμένει πρακτικά σταθερό για κάθε δείγμα και έδωσε τιμές: ~5,35, ~4,65, ~5,20, ~5,40, ~5,00, ~5,37, ~5,44, ~5,00 και ~5,30 στα δείγματα AC, AN, ACN, AOC, AON, AOCN, VC, VN και VCN, αντίστοιχα (Γραφήματα 19, 20 και 21). Ανάλογες τιμές pH, 6,3 έως 5,8, μετρήθηκαν σε νωπά ζυμαρικά και από τους Del Nobile et al. (2009a), ενώ το pH Ισπανικών προϊόντων αρτοποιίας κυμάνθηκε από 5,5 (κρουασάν) με 8,0 (παντεσπάνι) (Guinot et al., 2005). Σύμφωνα με τους Del Nobile et al. (2009b) το pH φρέσκων ζυμαρικών με την προσθήκη χιτοζάνης (συσκευασμένα σε αέρα) κυμάνθηκε μεταξύ 6,5 έως 5,6. Επιπρόσθετα το pH σε ζύμη από ρεβίθια, φάβα, φακή και λευκά φασόλια σε αγορά του Σουδάν ήταν 4.9, 4.8, 4.8, 5.0, αντίστοιχα (Thorsen et al., 2011).



**Γράφημα 20:** Μεταβολή του pH στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε ενεργή συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου.

Στην παρούσα μελέτη η μείωση του pH στα δείγματα AC, AN, ACN, AOC, AON, AOCN, VC, VN σε σχέση με τα A, AO και V, προφανώς οφείλεται στο χαμηλό pH των διαλυμάτων χιτοζάνης και ναταμυκίνης, που χρησιμοποιήθηκαν για τον ψεκασμό του παραδοσιακού φύλλου (Πίνακας 8) ή πιθανώς και στην παραγωγή γαλακτικού οξέος από τα οξυγαλακτικά βακτήρια του προϊόντος. Οι Li et al. (2011) αναφέρουν ότι η μείωση στο pH των νωπών poodles που παρατηρήθηκε κατά την διάρκεια των πειραμάτων τους οφείλεται στην δραστηριότητα των μικροοργανισμών, αφού σε τρόφιμα πλούσια σε υδατάνθρακες, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούν συνήθως τους υδατάνθρακες και παράγουν οξέα, με αποτέλεσμα την μείωση του pH του προϊόντος. Άλλωστε, σύμφωνα με τους Silveira et al. (2007) το pH της ζύμης ζαχαροπλαστικής ήταν 5.9 την αρχική ημέρα και μειώθηκε έως 5,0 μετά από 40 ημέρες στους 8° C. Επίσης, οι Halm et al. (1993) αναφέρουν ότι το pH της ζύμης από καλαμποκάλευρο μειώθηκε από 5,9 σε 5,3.





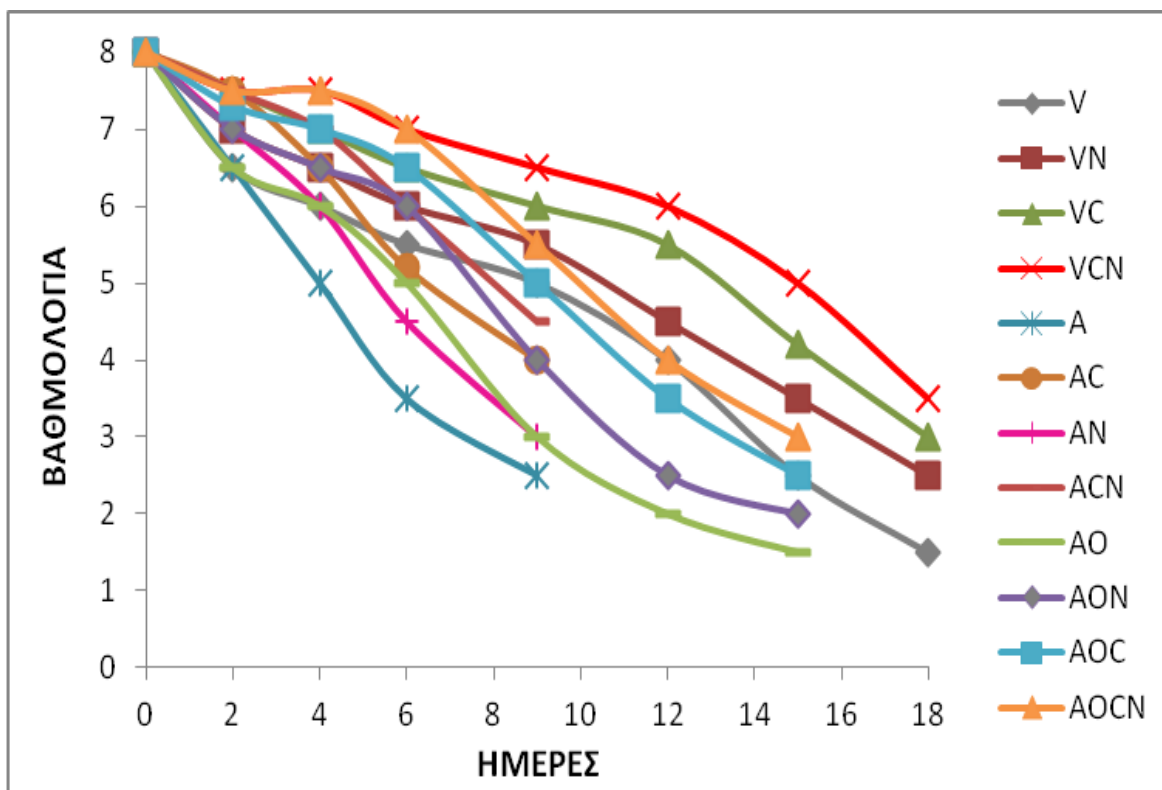
**Γράφημα 21:** Μεταβολή του pH στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού.

### 2.3.9. Οργανοληπτική εξέταση και χρόνος ζωής του φύλλου στους 4° C

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στα τρόφιμα προκαλεί αλλοίωση αυτών και अपαράδεκτες αλλαγές στη γεύση, την οσμή, την εμφάνιση, το χρώμα και την υφή τους (Jensen et al., 2004). Στην παρούσα μελέτη κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση του παραδοσιακού φύλλου για πίτα εξετάστηκαν το χρώμα, η οσμή και η γεύση του φύλλου για πίτα. Εκτιμήθηκε από τους κριτές ότι η γεύση του (ψημένου) φύλλου δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων ( $P > 0,05$ ) κι έτσι δεν θεωρήθηκε παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τον χρόνο ζωής του. Οι δοκιμαστές παρατήρησαν δοκιμάζοντας τα δείγματα ότι η προσθήκη ναταμυκίνης δίνει μια ουδέτερη γεύση στο φύλλο κατά το μάζημα, ενώ η χιτοζάνη δίνει μια ευχάριστη ελαφρώς λεμονάτη γεύση στο φύλλο. Όταν στο προϊόν εφαρμόστηκαν ταυτόχρονα και τα δύο αντιμικροβιακά το φύλλο

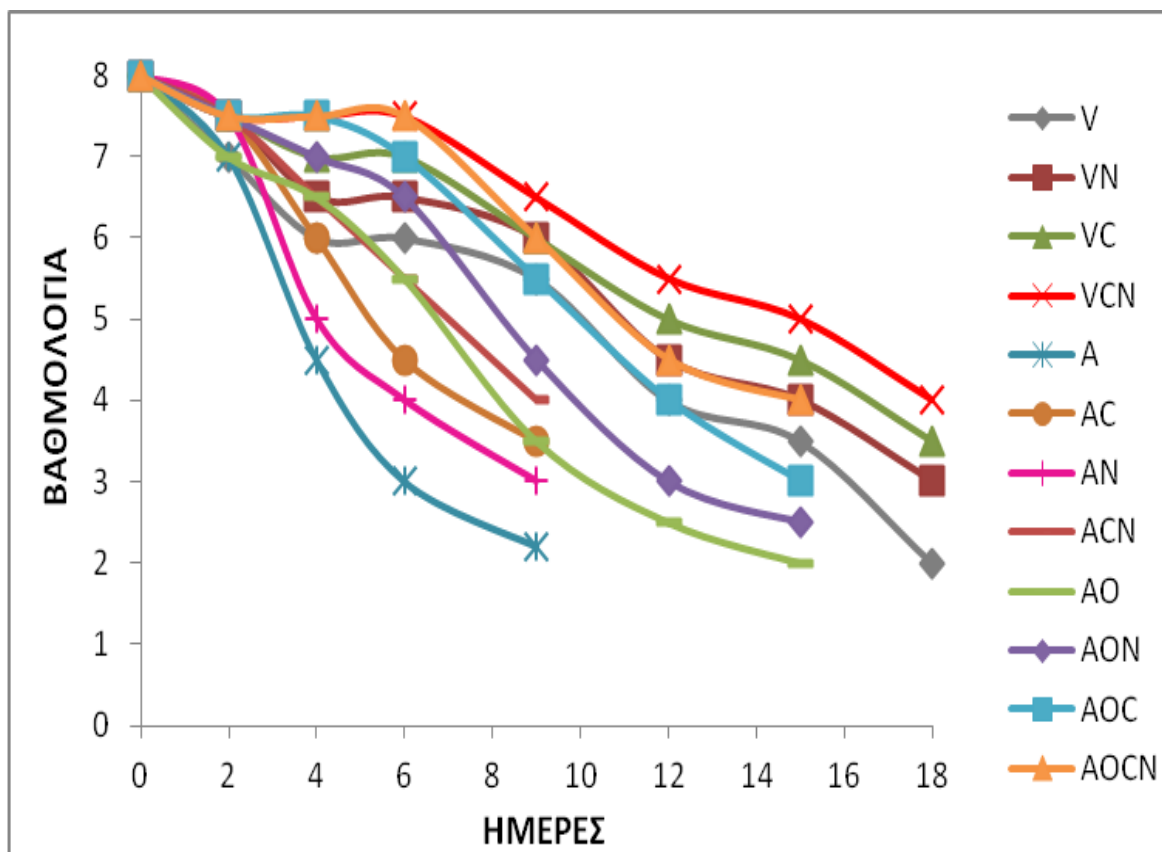
είχε μια ωραία γεύση φρεσκάδας. Τελικά η οργανοληπτική αξιολόγηση του φύλλου έγινε με βάση την αξιολόγηση του χρώματος και της οσμής. Το χρώμα και η οσμή του προϊόντος εκτιμήθηκαν σε άψητο φύλλο.

Στα Γραφήματα του χρώματος (22) και της οσμής (23) είναι φανερό ότι η βαθμολογία και των δύο παραμέτρων μειώνεται με το χρόνο ( $P < 0,05$ ) και ότι η βαθμολογία της οσμής είναι υψηλότερη σε σχέση με εκείνη του χρώματος για όλα τα δείγματα ( $P < 0,05$ ). Αυτό συμβαίνει γιατί με το πέρασμα των ημερών το χρώμα του παραδοσιακού φύλλου σκουραίνει και επίσης αποκτά κατά τόπους λευκές - αποχρωματισμένες περιοχές, ενώ ταυτόχρονα αλλοιώνεται η φρέσκια οσμή του, γεγονός που ίσως κάνει μη αποδεκτό το προϊόν από τον καταναλωτή. Οι δοκιμαστές σημείωσαν κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο του φύλλου ότι η αλλαγή στην οσμή του παραδοσιακού φύλλου με την πάροδο των ημερών δεν ήταν ιδιαίτερα έντονη, ωστόσο διαπιστώθηκε η παρουσία μιας σταδιακά αυξανόμενης `λεπτής` - υπόξινης δυσάρεστης μυρωδιά, η οποία θα μπορούσε να επηρεάζει αρνητικά τον καταναλωτή και την ποιότητα του προϊόντος.



**Γράφημα 22:** Μεταβολή του χρώματος του χωριάτικου φύλλου κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε συσκευασία αέρα, ενεργή συσκευασία και συσκευασία κενού.

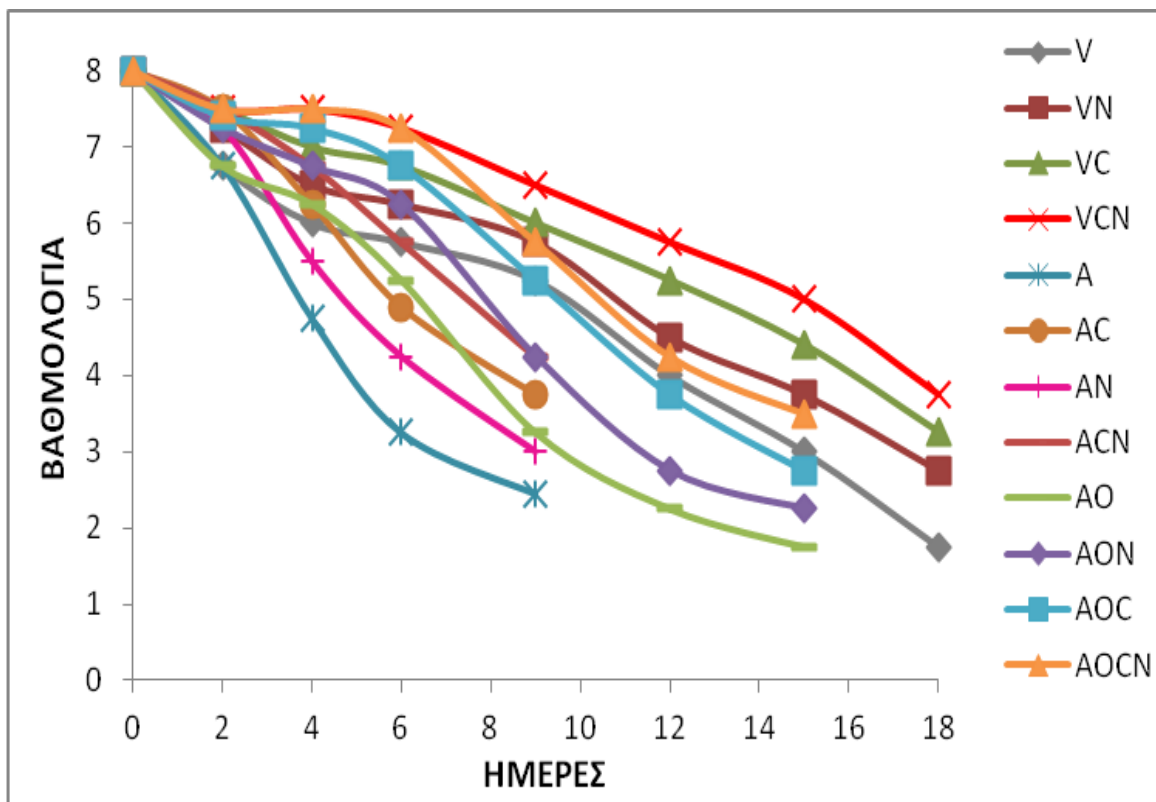
Ο καθοριστικός παράγοντας που ελήφθη υπόψη στην αξιολόγηση της οργανοληπτικής ποιότητας του παραδοσιακού φύλλου ήταν το χρώμα, το οποίο με την πάροδο του χρόνου μεταβάλλεται από κίτρινο- εκρού σε κίτρινο-καφετί. Όπως λέει ο λαός το φύλλο «μαυρίζει» όταν μένει πολύ καιρό στο ψυγείο. Επιπλέον, όταν «μαυρίζει» παρουσιάζονται στην επιφάνεια του ορισμένες λευκές - αποχρωματισμένες περιοχές που καθιστούν το προϊόν μη αποδεκτό και εμπορεύσιμο (Εικόνα 20). Στην παρούσα μελέτη θεωρήθηκε ότι το φύλλο σταματά να είναι εμπορεύσιμο όταν σκουραίνει το χρώμα του, δηλαδή όταν σχεδόν εμφανιστούν μύκητες στην επιφάνεια του.



**Γράφημα 23:** Μεταβολή της οσμής του χωριάτικου φύλλου κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα, ενεργή συσκευασία και συσκευασία κενού.

Το χρώμα, άλλωστε, θεωρείται ως καθοριστικός παράγοντας για την εμπορευσιμότητα των poodles (καθαρό, φωτεινό προϊόν). Για τα poodles η καθαρή και ανοιχτόχρωμη εμφάνιση είναι επιθυμητή, ενώ το σκούρο χρώμα είναι αρνητικό χαρακτηριστικό (Li et al., 2012). Οι Hesseltine et al. (1969) αναφέρουν ότι η

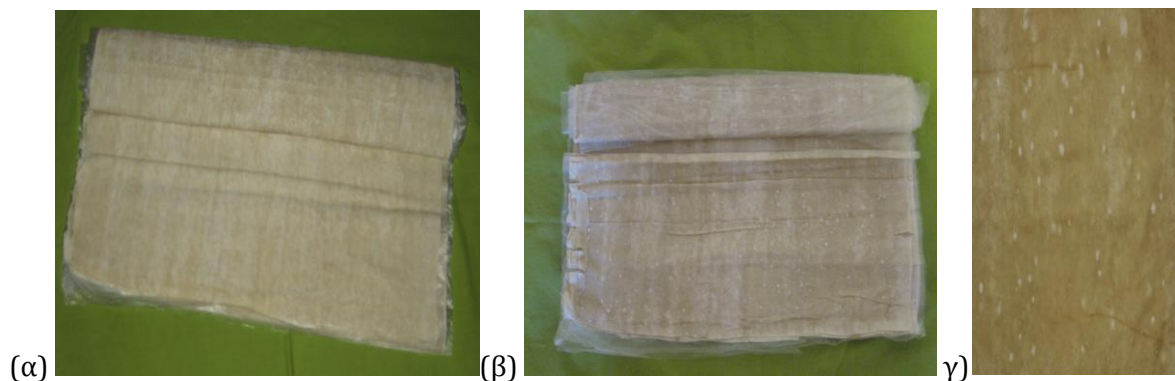
αλλοιωμένη ζύμη (σε σχέση με την φρέσκια) ήταν πιο σκουρόχρωμη και κατά τόπους ελαφρώς αποχρωματισμένη.



**Γράφημα 24:** Μεταβολή της ολικής οργανοληπτικής αξιολόγησης (μέσος όρος βαθμολογιών χρώματος και οσμής) στο χωριάτικο φύλλο κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα, ενεργή συσκευασία και συσκευασία κενού.

Ο χρόνος ζωής του παραδοσιακού φύλλου για πίτα προσδιορίστηκε από την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος, η οποία βασίστηκε στον μέσο όρο των βαθμολογιών του χρώματος και της οσμής του προϊόντος. Αντίστοιχα και οι Li et al. (2011) επέλεξαν την οσμή και το χρώμα ως δείκτες ποιότητας/φρεσκάδας για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής των noodles. Ο χρόνος ζωής (Πίνακας 9 και Γράφημα 24) των δειγμάτων A, AN, AC, ACN, AO, AON, AOC, AOCN, V, VN, VC και VCN σύμφωνα με τον οργανοληπτικό έλεγχο του παραδοσιακού φύλλου για πίτα είναι 5, 6.5, 8.5, 9.5, 8, 10, 11.5, 13, 12, 14, 16 και 18 ημέρες, αντίστοιχα. Αντίστοιχα οι Huang et al. (2007) αναφέρουν ότι ο χρόνος των φρέσκων noodles (χωρίς χιτοζάνη) ήταν περίπου ίσος με 8 ημέρες στους 4 °C και ότι η προσθήκη χιτοζάνης επέκτεινε τον χρόνο ζωής του προϊόντος κατά 6 ημέρες. Ακόμη η προσθήκη του συνδυασμού

χιτοζάνης-γλυκόζης σε αρνίσιο κρέας αύξησε τη διάρκεια ζωής του κατά 2 εβδομάδες και τη διάρκεια ζωής σε χοιρινό σαλάμι κοκτέιλ κατά 28 ημέρες (τα δύο προϊόντα συντηρήθηκαν υπό ψύξη) (Kanatt et al., 2008).



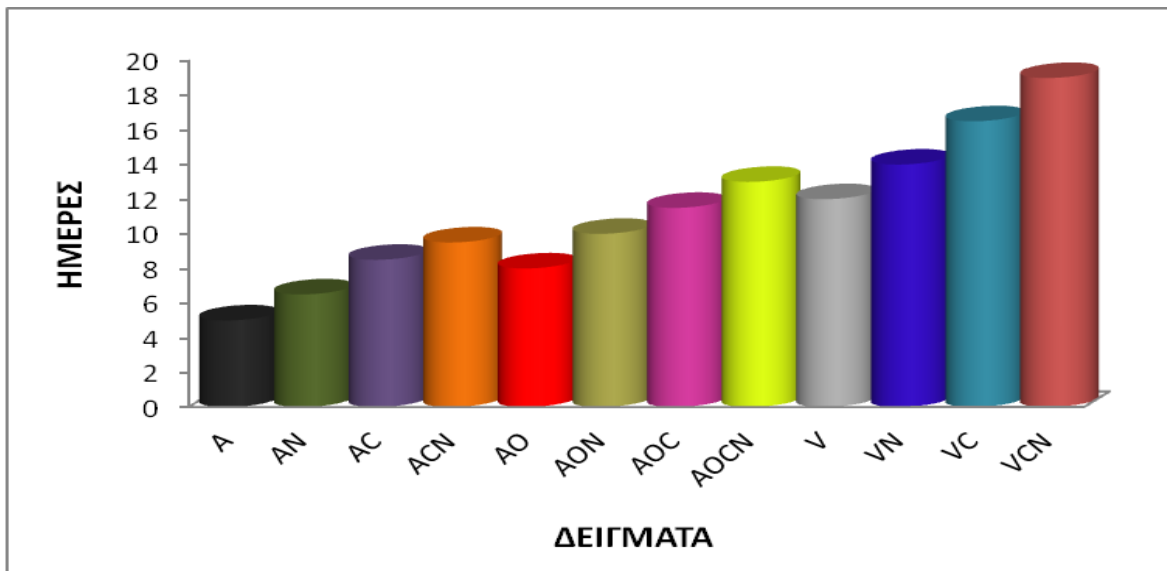
**Εικόνα 20:** Παραδοσιακό φύλλο για πίτα: (α) Δείγμα με φυσικό χρώμα (φρέσκο της ημέρας παραγωγής του), (β) Δείγμα με σκούρο χρώμα με λευκές - αποχρωματισμένες περιοχές (απορρίπτεται την 9<sup>η</sup> ημέρα σε συσκευασία αέρα) και (γ) Απορριπτέο δείγμα, όπου ξεχωρίζει το πιο σκούρο χρώμα του φύλλου και οι λευκές - αποχρωματισμένες περιοχές.

**Πίνακας 9:** Ο χρόνος ζωής του παραδοσιακού φύλλου για πίτα όπως προκύπτει από την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος, βασισμένη στον μέσο όρο των βαθμολογιών του χρώματος και της οσμής του.

Δείγμα	A	AN	AC	ACN	AO	AON	AOC	AOCN	V	VN	VC	VCN
Χρόνος Ζωής Φύλλου (ημέρες)	5	6,5	8,5	9,5	8	10	11,5	13	12	14	16	18

Από το Γράφημα 25 φαίνεται ότι ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και προσθήκης χιτοζάνης και ναταμυκίνης είναι ο καλύτερος συνδυασμός εμποδίων του πειράματος, εφόσον είναι αυτός που δίνει τα καλύτερα οργανοληπτικά αποτελέσματα, σε σχέση με το A ( $P < 0,05$ ). Στο παρελθόν η χιτοζάνη σε γλυκά poodles πατάτας βελτίωσε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Tan et al., 2009). Επίσης σε μια άλλη μελέτη οι Kerch et al. (2010) προσέθεσαν χιτοζάνη

σε ψωμί και διαπίστωσαν αρκετά καλά οργανοληπτικά αποτελέσματα στις περισσότερες περιπτώσεις σε σχέση με τον μάρτυρα. Αντίστοιχα η προσθήκη χιτοζάνης σε μπρόκολο διατήρησε τα φυσικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (Moreira et al., 2011).



**Γράφημα 25:** Ο χρόνος ζωής του παραδοσιακού φύλλου για πίτα όπως προκύπτει από την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος, βασισμένη στον μέσο όρο των βαθμολογιών του χρώματος και της οσμής του.

Επίσης, η μελέτη των Gomes et al. (2012) έδειξε ότι το έτοιμο προς κατανάλωση γεύμα (κοτόπουλο πέστο με noodles) διατήρησε αποδεκτά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του σε ενεργό συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου. Η χρήση ενεργού συσκευασίας (με εκροφητή αιθανόλης και απορροφητή οξυγόνου) δεν αλλοίωσε την αρχική οσμή, γεύση και την υφή του ψωμιού σε φέτες, ενώ η προσθήκη χημικών συντηρητικών είχε ως αποτέλεσμα ένα προϊόν πιο σκληρό (Latou et al., 2010). Σύμφωνα με τους Kotsianis et al. (2002) οι αναερόβιες συνθήκες που δημιουργούνται στην ενεργό συσκευασία με απορροφητή οξυγόνου επιβραδύνουν οξειδωτικές αλλαγές που μπορεί να επιδεινώσουν την οργανοληπτική ποιότητα προϊόντων αρτοποιίας κατά την αποθήκευσή τους. Τέλος, οι Silveira et al. (2007) αναφέρουν ότι μετά από 13 ημέρες εμφανίστηκαν μύκητες στην επιφάνεια ζύμης ζαχαροπλαστικής χωρίς συντηρητικά στους 8° C.

---

## 2.4. Συμπεράσματα

---

- Τόσο η ναταμυκίνη, όσο και η χιτοζάνη, μόνα τους ή σε συνδυασμό μείωσαν σημαντικά την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, σε σχέση με το φύλλο χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών, σε όλες τις υπό εξέταση συσκευασίες. Από όλες τις συσκευασίες πιο αποτελεσματική έναντι της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας ήταν η συσκευασία κενού με την προσθήκη του συνδυασμού ναταμυκίνης και χιτοζάνης.
- Ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων αυξήθηκε σταδιακά στα δείγματα A, AO και V, ενώ για τα υπό επεξεργασία δείγματα η πορεία των Εντεροβακτηρίων ήταν πτωτική. Η προσθήκη χιτοζάνης, τόσο μόνη της, όσο και σε συνδυασμό με ναταμυκίνη, μείωσε τον πληθυσμό τους κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. Αποδείχτηκε ότι η συσκευασία κενού είναι η πιο αποτελεσματική από όλες τις μεταχειρίσεις και ότι ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και προσθήκης χιτοζάνης και ναταμυκίνης είναι ο πιο αποτελεσματικός συνδυασμός.
- Ο πληθυσμός των κολοβακτηριοειδών αυξήθηκε στις μεταχειρίσεις χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών, ενώ μειώθηκε σε όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Η ενεργός συσκευασία δεν επηρέασε σημαντικά τον πληθυσμό των κολοβακτηριοειδών στο φύλλο, σε σχέση με την αερόβια συσκευασία, ενώ η καλύτερη συσκευασία, από τις τρεις που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, αποδείχτηκε η συσκευασία κενού, όσον αφορά την συγκεκριμένη ομάδα μικροοργανισμών.
- Ο πληθυσμός των Γαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε στα δείγματα A, AO και V, ενώ παρέμεινε σταθερός ή μειώθηκε στα υπόλοιπα δείγματα AC, AN, ACN, AOC, AON, AOCN, VC, VN και VCN. Μεταξύ των συσκευασιών (A, AO, V) δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ή μείωση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων του προϊόντος. Η προσθήκη ναταμυκίνης ελάττωσε ελαφρώς τον πληθυσμό τους, ενώ η χιτοζάνη (τόσο μόνη της, όσο και σε συνδυασμό με ναταμυκίνη) μείωσε τον πληθυσμό τους σημαντικά σε όλες τις υπό εξέταση συσκευασίες.

- Η ενεργός συσκευασία μείωσε ελαφρώς, ενώ η συσκευασία κενού μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των Ζυμών-Μυκήτων στο φύλλο σε σχέση με την συσκευασία αέρα. Ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και φυσικών αντιμικροβιακών αποδείχθηκε ο αποτελεσματικότερος έναντι της ανάπτυξης των Ζυμών και Μυκήτων στο φύλλο. Αξίζει να αναφερθεί ότι η προσθήκη των δύο φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, ή/και ο συνδυασμός αυτών, έδωσαν σημαντική μείωση του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο φύλλο τόσο στην ενεργό συσκευασία, όσο και στην συσκευασία κενού.
- Δεν αναπτύχθηκαν Εντερόκοκκοι σε κανένα από τα δείγματα του παραδοσιακού φύλλου για πίτα.
- Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον πληθυσμό των ψυχρότροφων βακτηρίων μεταξύ των υπό εξέταση συσκευασιών του φύλλου. Η προσθήκη χιτοζάνης (με ή χωρίς ναταμυκίνη) στο φύλλο μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό τους σε όλες τις συσκευασίες.
- Το pH των δειγμάτων A, AO και V παρέμεινε πρακτικά σταθερό (~6,5). Οι τιμές pH των δειγμάτων στα οποία προστέθηκαν ναταμυκίνη, χιτοζάνη ή/και ο συνδυασμός αυτών, μειώθηκαν αισθητά την 2<sup>η</sup> ημέρα, ενώ μετά παρέμειναν πρακτικά σταθερές.
- Η γεύση του παραδοσιακού φύλλου δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων. Το προϊόν απορρίφθηκε ως ακατάλληλο από τους κριτές λόγω της έντονης αλλαγής του χρώματος (σκούρο χρώμα και λευκές - αποχρωματισμένες περιοχές) και της έντονης υπόξινης οσμής του.
- Ο χρόνος ζωής του παραδοσιακού φύλλου για πίτα, όπως αυτός προκύπτει από την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων A, AN, AO, AC, ACN, AON, AOC, V, AOCN, VN, VC και VCN ήταν 5, 6.5, 8, 8.5, 9.5, 10, 11.5, 12, 13, 14, 16 και 18 ημέρες, αντίστοιχα.
- Όταν το φύλλο απορρίπτεται από τους κριτές κατά την οργανοληπτική εκτίμηση του προϊόντος, ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων είναι περίπου ίσος με  $4 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Συνεπώς, πληθυσμός Ζυμών και Μυκήτων της τάξεως των  $4 \log_{10}(\text{cfu/g})$  θα μπορούσε να προταθεί ως δείκτης φρεσκάδας/ποιότητας ή και αλλοίωσης του φύλλου.



- Η συσκευασία κενού ήταν η πιο αποτελεσματική από όλες τις συσκευασίες που εξετάστηκαν. Ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και προσθήκης χιτοζάνης και ναταμυκίνης αποδείχθηκε ο καλύτερος συνδυασμός εμποδίων του πειράματος, εφόσον έδωσε τα καλύτερα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά αποτελέσματα.



## **Κεφάλαιο 3:**

**Πορεία Ανάπτυξης/Επιβίωσης της *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 και *Bacillus cereus* στο Χωριάτικο-Παραδοσιακό Φύλλο για Πίτα, με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης, υπό κενό και υπό ψύξη (4° C)**

---

### **3.1. Σκοπός των Πειραμάτων**

---

Ο σκοπός των πειραμάτων στο παρόν Κεφάλαιο ήταν: (1) η μελέτη της επιβίωσης/ ανάπτυξης τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* και *Bacillus cereus*) στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα και (2) η επίδραση της χιτοζάνης στους μικροοργανισμούς αυτούς προστιθέμενη στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα υπό συνθήκες ψύξης. Οι υπό εξέταση παθογόνοι μικροοργανισμοί επιλέχθηκαν εφόσον αποτελούν σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την εκδήλωση τροφοδηλητηριάσεων/τροφοτοξινώσεων σε νωπά προϊόντα (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 1993). Μελετήθηκε η ανάπτυξη των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων στο προϊόν σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς βακτηρίων ( $10^3$  cfu/g και  $10^5$  cfu/g).

---

### **3.2. Υλικά και Μέθοδοι**

---

#### **3.2.1. Καλλιέργειες των παθογόνων βακτηρίων**

Για τις ανάγκες των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα εξής κοκτέιλ μικροοργανισμών:

1. **Listeria spp.** αποτελούμενο από τα στελέχη: α) *Listeria monocytogenes* Scott A WT (strain 0001), ευγενικής χορηγίας του Καθηγητή M. Zwietering, University of Wageningen, The Netherlands (παθογόνο στέλεχος) και β) *Listeria innocua* BFEL-L-392, ευγενικής χορηγίας του Professor Wilhelm Holzapfel, Institut für Hygiene und Toxikologie, Karlsruhe, Germany (μη παθογόνο στέλεχος).
2. **Bacillus cereus** αποτελούμενο από τα παθογόνα στελέχη: (α) *B. cereus* ATCC 10987 (β) *B. cereus* ATCC 14579 (γ) *B. cereus* PAL 22 και (δ) *B. cereus* PAL 25. Στη περίπτωση του *B. cereus* χρησιμοποιήθηκε μίγμα τεσσάρων στελεχών με ικανότητα σπορογονίας >80%, τα οποία ήταν ευγενική χορηγία του Καθηγητή M. Zwietering, University of Wageningen, The Netherlands. Τα στελέχη αυτά είχαν τα εξής χαρακτηριστικά ανάπτυξης: ο *B. cereus* PAL 22 (ψυχρότροφο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία <7 °C με μικρή φάση προσαρμογής, βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 28-30 °C, μεγάλος χρόνος διπλασιασμού στους 37 °C, Wijnands et al. 2007), ο *B. cereus* PAL 25 (μεσόφιλο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία >7 °C, μικρός χρόνος διπλασιασμού στους 37 °C), *B. cereus* ATCC 14579 (μεσόφιλο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία >7 °C); *B. cereus* ATCC 10987 (μεσόφιλο, ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασία >7 °C) (Stetten et al., 1998).
3. **Escherichia coli O157:H7** αποτελούμενο από δύο μη παθογόνα στελέχη: α) την *Escherichia coli* serotype O157:H7 NCTC 12900, η οποία αγοράστηκε από Health Protection Agency Culture Collections (Salisbury, UK) και β) την *Escherichia coli* serotype O157:H7 ATCC 43888 και ήταν μια ευγενική χορηγία της Καθηγήτριας Dr. Hilde Nissen, Matforsk, Norway.
4. **Salmonella enterica** αποτελούμενο από τα παθογόνα στελέχη: (α) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo, που ήταν ευγενική χορηγία του Καθηγητή M. Zwietering, University of Wageningen, The Netherlands και β) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo BAA710, που αγοράστηκε από την American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, USA.

Χρησιμοποιήθηκε κεκλιμένη βακτηριακή καλλιέργεια με άγαρ κάθε παθογόνου βακτηρίου σε Brain Heart Infusion Agar (BHIA) από την οποία και

ελήφθησαν κύτταρα (των εκάστοτε παθογόνων βακτηρίων) με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε νέα τρυβλία και τελικά, όλα τα ενοφθαλισμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37 °C για 24 ώρες, ώστε να αναπτυχθούν οι νέες αποικίες των κυττάρων.

Μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων αποξήθηκε από το στερεό θρεπτικό υλικό (τρυβλίο) με τη βοήθεια του μικροβιολογικού κρίκου, ο οποίος στη συνέχεια εμβαπτίστηκε σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL υγρού θρεπτικού υλικού (Brain Heart Infusion Broth). Η συγκέντρωση (πληθυσμός) των κυττάρων στο βακτηριακό εναιώρημα, μετά το πέρας των 24-48 ωρών στους 37 °C, ήταν περίπου  $10^8$ - $10^9$  CFU/mL (αρχικό ενοφθάλμισμα). Το αρχικό ενοφθάλμισμα της *Listeria spp.*, *Escherihia coli*, *Salmonella enterica* ή του *Bacillus cereus* (με αρχική συγκέντρωση κυττάρων περίπου  $10^8$  - $10^9$  CFU/ml) αραιώθηκε δεκαδικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9 ml πεπτονούχο διάλυμα 0,1% wt/vol (pH=7.0) έτσι ώστε να ληφθεί η επιθυμητή τελική συγκέντρωση. Σημειώνεται ότι πριν τον ενοφθαλισμό επί του προϊόντος, κάθε υγρή καλλιέργεια συντηρήθηκε στους 4 °C, για διάστημα 36-48 h, προκειμένου να προσαρμοστούν τα κύτταρα των μικροοργανισμών σε συνθήκες ψύξης.

Η καταμέτρηση των αποικιών έγινε με την μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και της επιφανειακής επίστρωσης σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό για τον κάθε μικροοργανισμό. Συγκεκριμένα, η καταμέτρηση των αποικιών της *Listeria spp.* έγινε σε τρυβλία με Agar *Listeria* Ottaviani and Agosti (ALOA), της *Escherihia coli* σε Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) εμπλουτισμένο με Cefixime Tellurite supplement (X161), της *Salmonella enterica* σε Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) και του *Bacillus cereus* σε *Bacillus Cereus* Medium (PREP εμπλουτισμένο με egg yolk and polymyxin B). Τα τρυβλία ALOA, SMAC και XLD επώαστηκαν στους 37 °C για 24h ενώ τα τρυβλία PREP στους 30 °C για 48h.

### **3.2.2. Προετοιμασία των δειγμάτων**

Τα δείγματα παραδοσιακού χωριάτικου φύλλου, που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων του παρόντος Κεφαλαίου ήταν χορηγία της εταιρείας παραγωγής προϊόντων ζύμης «ΖΑΓΟΡΙΣΙΟ». Η προετοιμασία των δειγμάτων είχε περιγραφεί στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 89). Επίσης, το διάλυμα της χιτοζάνης, το οποίο

χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτού του κεφαλαίου, παρασκευάστηκε ακριβώς όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 90). Οι μεταχειρίσεις του κεφαλαίου αυτού ήταν:

- L1 :** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- LC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.
- L2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- LC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.
- E1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- EC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό.
- E2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- EC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli O157:H7* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό.

- S1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- SC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.
- S2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- SC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.
- B1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- BC1:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.
- B2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα, ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- BC2:** Πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OL1 :** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OLC1:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.

- OL2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OLC2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OE1:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli O157:H7* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OEC1:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OE2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli O157:H7* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OEC2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OS1:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OSC1:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OS2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.



- OSC2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OB1:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OBC1:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^3$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.
- OB2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus* συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OBC2:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα με την προσθήκη χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^5$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό.

Τοποθετήθηκαν 100 g φύλλου (υπό ασηπτικές συνθήκες) μέσα στην σακούλα συσκευασίας. Τα δείγματα με παθογόνο χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακής ουσίας (L1, L2, E1, E2, S1, S2, B1 και B2) ενοφθαλμίστηκαν αμέσως με την κατάλληλη ποσότητα από την καλλιέργεια του εκάστοτε παθογόνου. Τα 100 g φύλλου των μεταχειρίσεων L2, E2, S2 και B2 ενοφθαλμίστηκαν με 1 ml παθογόνου από το σωληνάκι με πληθυσμό καλλιέργειας  $10^7$  cfu/ml (για να πετύχουμε τελική συγκέντρωση στο προϊόν  $10^5$  cfu/g) και τα 100 g φύλλου των μεταχειρίσεων L1, E1, S1, και B1 ενοφθαλμίστηκαν με 1 ml παθογόνου από το σωληνάκι με πληθυσμό καλλιέργειας  $10^5$  cfu/ml (για να πετύχουμε τελική συγκέντρωση στο προϊόν  $10^3$  cfu/g). Τα δείγματα LC1, LC2, EC1, EC2, SC1, SC2, BC1 και BC2 ψεκάστηκαν αρχικά με το διάλυμα χιτοζάνης, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση χιτοζάνης στο προϊόν να είναι ίση με 1,5% v/w ή 0,03% w/w, και έμειναν περίπου 10 λεπτά για να απορροφηθεί η αντιμικροβιακή ουσία από το παραδοσιακό φύλλο. Μετά από 10 λεπτά τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν με τον εκάστοτε παθογόνο μικροοργανισμό. Τα LC2, EC2, SC2 και BC2 ενοφθαλμίστηκαν με 1 ml παθογόνου από το σωληνάκι με πληθυσμό καλλιέργειας  $10^7$  cfu/ml (για να πετύχουμε τελική συγκέντρωση στο προϊόν  $10^5$  cfu/g) και τα LC1, EC1, SC1, και BC1 ενοφθαλμίστηκαν με 1 ml παθογόνου

από το σωληνάκι με πληθυσμό καλλιέργειας  $10^5$  cfu/ml (για να πετύχουμε τελική συγκέντρωση στο προϊόν  $10^3$  cfu/g). Σημειώνεται ότι κάθε μικροοργανισμός ενοφθαλμίστηκε χωριστά από τους υπόλοιπους σε κάθε μεταχείριση, εφόσον δεν ήταν αντικείμενο της παρούσης έρευνας η ταυτόχρονη πορεία ανάπτυξής τους στα δείγματα. Επομένως, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές για κάθε ξεχωριστό μικροοργανισμό που ενοφθαλμίστηκε. Μετά τον ενοφθαλμισμό του εκάστοτε παθογόνου, τα δείγματα με τα ενοφθαλμισμένα στελέχη διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων του εμβολίου στην επιφάνεια των μεταχειρίσεων. Με το πέρασμα των 15 λεπτών, όλα τα δείγματα συσκευάστηκαν υπό κενό και διατηρήθηκαν εντός ψυγείου ( $4^{\circ}$  C).

Τα δείγματα συσκευάστηκαν υπό κενό, η διαδικασία συσκευασίας των δειγμάτων καθώς και το υλικό συσκευασίας για όλες τις μεταχειρίσεις έχουν ήδη περιγραφεί αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 92). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν την 0<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup> και 15<sup>η</sup> ημέρα (δείγματα L1, L2, E1, E2, S1, S2, B1 και B2) και την 0<sup>η</sup>, 2<sup>η</sup>, 4<sup>η</sup>, 6<sup>η</sup>, 9<sup>η</sup>, 12<sup>η</sup>, 15<sup>η</sup>, 18<sup>η</sup>, 21<sup>η</sup> και 24<sup>η</sup> ημέρα (δείγματα LC1, LC2, EC1, EC2, SC1, SC2, BC1 και BC2).

### 3.2.3. Μικροβιολογική ανάλυση

Μελετήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί: α) *Ολική μεσόφιλη Χλωρίδα* (O.M.X.), β) *Listeria monocytogenes*, γ) *Escherihia coli*, δ) *Salmonella enterica*, ε) *Bacillus cereus*. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 92).

Ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X.) έχει περιγραφεί στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 93). Η καταμέτρηση των αποικιών της *Listeria spp.* έγινε με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία με Agar *Listeria Ottaviani and Agosti* (ALOA) εμπλουτισμένο με 5 ml πολυμιξίνης B (X072) και 25 ml επιλεκτικού διαγνωστικού συμπληρώματος (κυκλοεξιμίδη/ ναλιδιξικό οξύ/ φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη) (X010) και μετά από επώαση στους  $37^{\circ}$  C για 24 ώρες. Μετρήθηκαν οι πράσινες αποικίες που περιβάλλονται από χαρακτηριστικό διαφανές δακτύλιο. Για την καταμέτρηση της *Escherihia coli* χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Sorbitol MacConkey Agar με την προσθήκη του X161 αντιμικροβιακού (Cefixime & Tellurite) και μετά από επώαση στους  $37^{\circ}$  C για 24 ώρες μετρήθηκαν οι ροζ -

κόκκινες αποικίες με άλω. Η *Salmonella enterica* προσδιορίστηκε σε επιλεκτικό υλικό Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) και μετά από επώαση στους 37° C για 24 ώρες καταμετρήθηκαν οι μαύρες και οι ροζ- διαφανείς αποικίες με μαύρο κέντρο. Τέλος, ο *Bacillus cereus* προσδιορίστηκε στο επιλεκτικό υλικό Bacillus Cereus Medium εμπλουτισμένο με 50 ml διαλύματος κρόκου αυγού και πολυμιξίνη B, επώαστηκε στους 30° C για 48 ώρες και τελικά μετρήθηκαν οι ροζ αποικίες με χαρακτηριστικό λευκό δακτύλιο. Όλοι οι παραπάνω μικροοργανισμοί προσδιορίστηκαν με βάση τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Όλα τα θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν με βάση τις οδηγίες που αναγράφονταν στη συσκευασία τους και αποστειρώθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121 °C για 15 λεπτά, εκτός από το υπόστρωμα Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) που αποστειρώθηκε με τη μέθοδο του βρασμού. Όλα τα υποστρώματα διατηρήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $48 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , πριν τη χρήση τους.

#### **3.2.4. Στατιστική επεξεργασία**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε ακριβώς όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.1.2.5. (σελίδα 95).

---

### **3.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση**

---

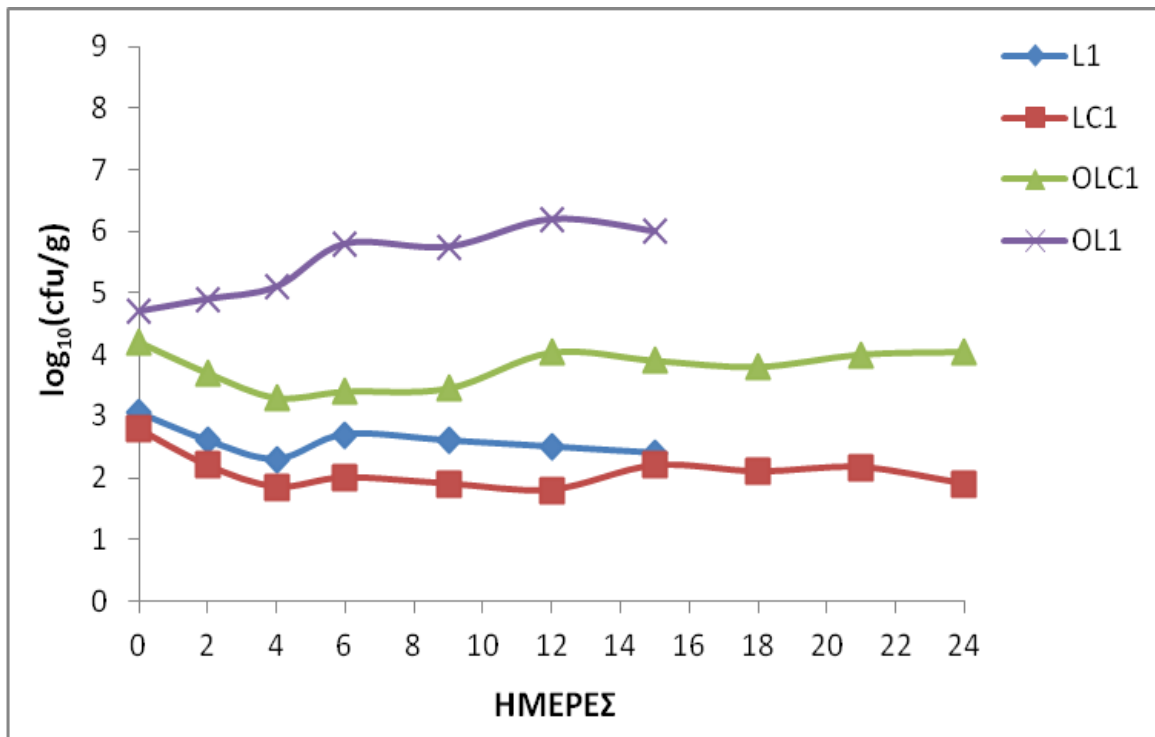
#### **3.3.1. Επιβίωση της *Listeria spp.* στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C**

Τα τελευταία χρόνια, πολλές μελέτες έχουν δημοσιευθεί που συσχετίζουν την κατανάλωση τροφίμων που έχουν μολυνθεί από τη *Listeria monocytogenes* με Λιστερίωση στον άνθρωπο. Ο McLauchlin (1991) αναφέρει 22 κρούσματα. Τα τρόφιμα έχουν αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνα για επιδημίες (Schlech et al, 1983; Bille, 1990) καθώς και για σποραδικές περιστατικά της νόσου (Farber et al, 1990). Μεταξύ 1986 και 1990, η εκτιμώμενη ετήσια επίπτωση της Λιστερίωσης στη Γαλλία κυμάνθησαν 1,1 έως 2,0 ανά 100.000 κατοίκους (Goulet et al., 1991). Η ποιότητα της

ζύμης ζαχαροπλαστικής είναι συχνά μέτρια (Michard et al., 1986), και συχνά αυτή είναι η αιτία των κρουσμάτων τροφικής δηλητηρίασης (Veit, 1984). Οι Ferron και Michard (1993) συνέκριναν το επίπεδο μόλυνσης με *L. monocytogenes* των προϊόντων ζαχαροπλαστικής με άλλα τρόφιμα. Το ποσοστό μόλυνσης τους είναι υψηλότερο από ότι στα προ-μαγειρευμένα τρόφιμα διατηρημένα υπό ψύξη, τα φρέσκα λαχανικά, το νωπό (κατσικίσιο και αγελαδινό) γάλα καθώς και μαλακά και ημίσκληρα τυριά. Είναι της ίδιας τάξεως μεγέθους όπως παρατηρήθηκε σε κρέατα, αλλά χαμηλότερο από ότι στα μαλακά τυριά. Επίσης, οι Uhitil et al. (2004) απομόνωσαν *Listeria monocytogenes* από 12 δείγματα σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 283 δείγματα κέικ, δηλαδή το 4,27% των υπό εξέταση γλυκών ζαχαροπλαστικής βρέθηκε μολυσμένο. Τέλος, στελέχη της *Listeria spp.* ανιχνεύτηκαν στο 2,1% των noodles που εξετάστηκαν στην Ιαπωνία (Okutani et al., 2004).

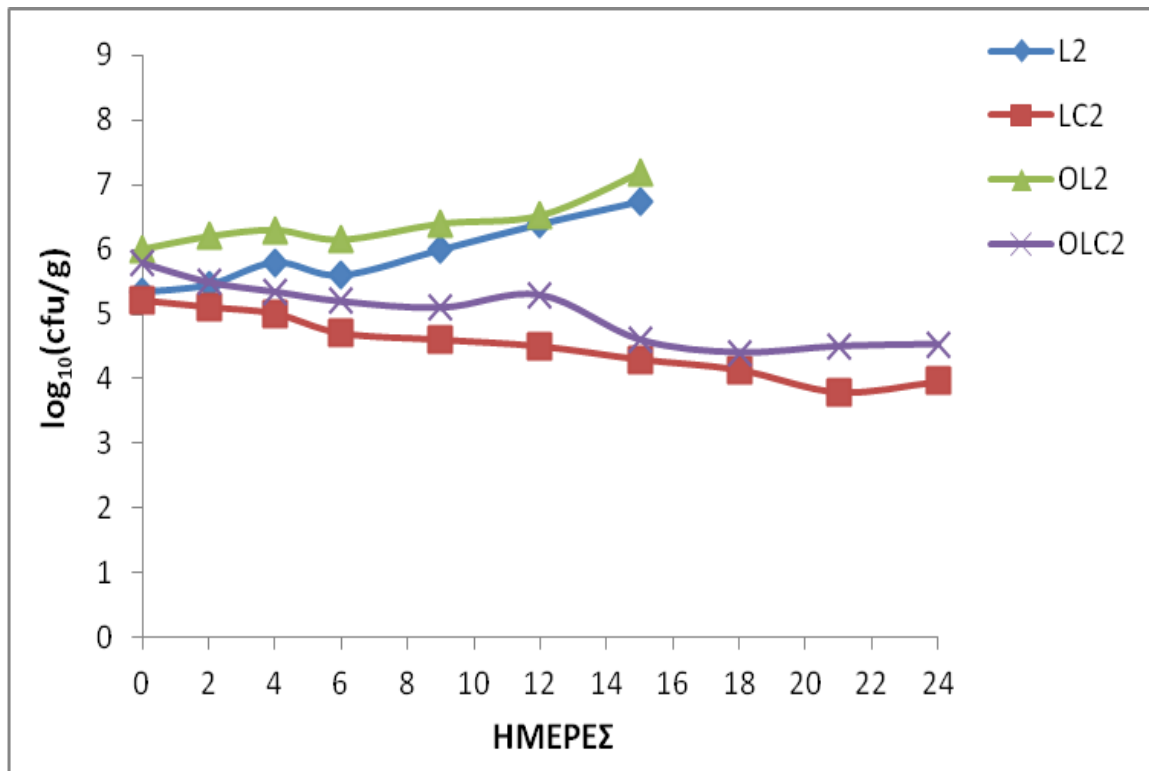
Στο Γράφημα 26 φαίνεται ότι η αρχική ( $4,7 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OL1) αυξήθηκε κατά  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  και κατέληξε στην τιμή  $10^6 \text{ cfu/g}$  την 15<sup>η</sup> ημέρα, ενώ ο πληθυσμός της *Listeria spp.* (L1) μειώθηκε ελαφρώς, οπότε ο μικροβιολογικός πληθυσμός του OL1 είναι μεγαλύτερος κατά 3 λογαριθμικές μονάδες από εκείνον του L1. Επίσης, από το Γράφημα 26 προκύπτει ότι, στο παραδοσιακό φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OLC1) παρέμεινε σταθερή, μετά από μια ελαφρά μείωση της τις πρώτες 9 μέρες του πειράματος κατά περίπου 0,5 λογαριθμικές μονάδες. Σε αντίθεση με τον πληθυσμό της *Listeria spp.* (LC1) ο οποίος παρουσιάζει μια μείωση της τάξης της μίας λογαριθμικής μονάδας, με τελικό πληθυσμό περίπου  $10^2 \text{ cfu/g}$ , έτσι προκύπτει ότι το LC1 έχει μικρότερο πληθυσμό μικροοργανισμών κατά 2 λογαριθμικές μονάδες από το OLC1. Τέλος, αν συγκρίνουμε τις δύο πειραματικές περιπτώσεις μεταξύ τους, παραδοσιακό φύλλο για πίτα με και χωρίς 1,5% χιτοζάνη, παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας είναι μεγαλύτερος κατά 2 λογαρίθμους στο δείγμα χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης (OL1) σε σχέση με εκείνον του δείγματος με την χιτοζάνη (OLC1). Σε αντίθεση, η χιτοζάνη δεν φάνηκε να μειώνει ουσιαστικά (παρά μόνο 0,5 λογάριθμο) τον πληθυσμό της *Listeria spp.*. Είναι πιθανόν η αυξημένη ποσότητα λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου της *L. monocytogenes* να την προστατεύουν από την επίδραση της συσκευασίας ή

αντιμικροβιακών παραγόντων (Lungu et al. 2009), οπότε η χιτοζάνη να μην είναι σε θέση να μειώσει σημαντικά τον πληθυσμό της.



**Γράφημα 26:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^3$  cfu/g *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^\circ$  C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).

Όταν η *Listeria spp.* ενοφθαλμίστηκε στο φύλλο σε πληθυσμό  $10^5$  cfu/g έδειξε ένα διαφορετικό προφίλ ανάπτυξης (Γράφημα 27). Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα του δείγματος χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακού παράγοντα (OL2) αυξήθηκε κατά ένα λογάριθμο, ανάλογη αύξηση όμως παρατηρήθηκε και στον πληθυσμό της *Listeria spp.* (L2), με αποτέλεσμα τελικά να μην υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ τους (παρόλο που τις πρώτες 8 μέρες ο πληθυσμός του OL2 είναι υψηλότερος κατά 0,5 λογάριθμο από εκείνον του L2). Αυτό μας δείχνει ότι η *Listeria spp.* επικράτησε της μικροχλωρίδας του προϊόντος, αφού λόγω του υψηλού της πληθυσμού ήταν πιο ανταγωνιστική από τα υπόλοιπα βακτήρια.



**Γράφημα 27:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^5$  cfu/g *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).

Το Γράφημα 27 δείχνει ότι τόσο η Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OLC2), όσο και ο πληθυσμός της *Listeria spp.* (LC2) μειώθηκαν στο δείγμα με την προσθήκη χιτοζάνης, κατά 1,5 και 1 λογάριθμο, αντίστοιχα, και το LC2 είχε σταθερά μικρότερο μικροβιολογικό πληθυσμό κατά 0,5 λογαριθμική μονάδα από το OLC2. Και σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται η *Listeria spp.* να επικρατεί της μικροχλωρίδας του παραδοσιακού φύλλου. Αξιόλογη όμως είναι η διαφορά που παρατηρείται μεταξύ του μικροβιολογικού φορτίου των δύο δειγμάτων (φύλλο με και χωρίς χιτοζάνη). Συγκεκριμένα, η ολική μεσόφιλη χλωρίδα του δείγματος με την προσθήκη χιτοζάνης (OLC2) είναι μειωμένη καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος κατά 1,5 λογάριθμο και τελικά καταλήγει την 15<sup>η</sup> μέρα μικρότερη κατά 2,5 λογάριθμους, σε σχέση με εκείνη του δείγματος χωρίς αντιμικροβιακή ουσία (OL2). Ανάλογα, η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο μειώνει και τον πληθυσμό της *Listeria spp.* κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες.

Παρατηρήθηκε ότι όταν η *Listeria spp.* ενοφθαλμίστηκε στο φύλλο (συσκευασμένο υπό κενό) σε υψηλό πληθυσμό, ο πληθυσμός της αυξήθηκε σε σχέση με τον χρόνο (Γράφημα 27). Γενικά η ανάπτυξη της *Listeria spp.* ευνοείται σε αναερόβιο περιβάλλον. Οι Buchanan και Klawitter (1990) αναφέρουν ότι ο περιορισμός του διαθέσιμου οξυγόνου κατά την μελέτη της ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό, οδήγησε σε αύξηση της ικανότητας ανάπτυξης της, σε σχέση με τις αερόβιες συνθήκες. Επίσης, σύμφωνα με τους Gounadaki et al. (2007) η χρήση συσκευασίας κενού για την συντήρηση σαλαμιού σε φέτες αύξησε την ικανότητα επιβίωσης της *L. monocytogenes* σε σχέση με την αερόβια συσκευασία, ειδικότερα σε χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης.

Η προσθήκη χιτοζάνης σε φύλλο ενοφθαλμισμένο με *Listeria spp.* μειώνει στατιστικά σημαντικά ( $P < 0,05$ ) την OMX του προϊόντος, ανεξάρτητα από το αρχικό εμβόλιο του παθογόνου, ενώ η δράση της έναντι της *Listeria spp.* είναι σημαντική μόνο όταν ο πληθυσμός του παθογόνου είναι υψηλός (Γραφήματα 26 και 27). Οι Ponce et al. (2008) αναφέρουν ότι η εμφύσηση κολοκύθας σε διάλυμα χιτοζάνης 2% w/v δεν κατάφερε να μειώσει τον πληθυσμό της ενοφθαλμισμένης *L. monocytogenes*. Άλλες πάλι μελέτες δείχνουν αξιόλογη δράση της χιτοζάνης έναντι της *Listeria monocytogenes*, όταν αυτή ενοφθαλμίστηκε σε τρόφιμα. Σύμφωνα με τους Beverly et al. (2008) η εμφύσηση χοιρινού σε διάλυμα γαλακτικού οξέος 1% με χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους, μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 1.4-1.6  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με τον μάρτυρα, κατά την συντήρηση στους 4 °C για διάστημα 14 ημερών. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι η χρήση διαλύματος οξικού οξέος με χιτοζάνη οδήγησε σε καλύτερα αποτελέσματα μειώνοντας τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 2-2.5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  στο ίδιο χρονικό διάστημα. Οι Zivanovic et al. (2005) αναφέρουν ότι η χρήση φιλμ από χιτοζάνη (10 mg χιτοζάνη/cm<sup>2</sup>) για τη συντήρηση τεμαχισμένου προϊόντος κρέατος μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* κατά 1-2  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Σε πατέ βοδινού κρέατος ενοφθαλμισμένο με 10<sup>7</sup> cfu/g *L. monocytogenes*, η προσθήκη 5 mg χιτοζάνη/g μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* από περίπου 7 σε 3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  μετά από 6 ημέρες συντήρησης στους 4 °C, ενώ στο πατέ χωρίς χιτοζάνη ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* ήταν πάνω από 7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  μετά από δύο ημέρες αποθήκευσης (Bento et al., 2011). Σε μελέτη των Fernandez-Saiz et al. (2010) η χρήση μεμβράνης χιτοζάνης (1,5% w/v)

μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* τόσο σε TSB, όσο και σε ψαρόσουπα (ενοφθαλμισμένα με  $10^3$  cfu/g *L. monocytogenes*) στους 4° C.

Άλλωστε, η δραστηριότητα της χιτοζάνης έναντι των μικροοργανισμών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Τα συστατικά των τροφίμων έχουν αρνητική επίδραση επί της αντιμικροβιακής δραστηριότητας της χιτοζάνης. Οι Devlieghere et al. (2004) μελέτησαν την επίδραση των συστατικών των τροφίμων για την ανασταλτική δράση της χιτοζάνης έναντι της *Candida lambica* και βρέθηκε ότι το άμυλο και οι πρωτεΐνες σιτηρών (όταν αυτά προστέθηκαν στο θεραπευτικό μέσο) προσφέρουν προστασία στον μικροοργανισμό από την δράση της χιτοζάνης βακτήρια. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης αυξάνεται, όσο το pH του υποστρώματος μειώνεται. Επίσης από τα Γραφήματα 26 και 27 φαίνεται ότι όταν το φύλλο ενοφθαλμίστηκε με μικρό πληθυσμό του εν λόγω παθογόνου, ο πληθυσμός του δεν αυξήθηκε, ενώ όταν ενοφθαλμίστηκε σε υψηλό πληθυσμό αυξήθηκε πολύ, συνεπώς κατά πάσα πιθανότητα στην δεύτερη περίπτωση επικράτησε της μικροχλωρίδας του τροφίμου (προφανώς το προϊόν είχε αρχικά μικρό αριθμό ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας). Είναι πιθανόν η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα που υπάρχει στο φύλλο, όταν ενοφθαλμίστηκε με χαμηλό πληθυσμό παθογόνου, να λειτουργεί προστατευτικά για την *Listeria spp.* από την δράση της χιτοζάνης. Δηλαδή, η χιτοζάνη πιθανώς να (καταστρέφει) παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση σε μικροοργανισμούς που αποτελούν πιο εύκολους στόχους, αντί των βακτηρίων της *Listeria spp.*. Σε 'in vitro' έρευνα των οι Devlieghere et al. (2004) συμπεραίνουν ότι τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πολύ ευαίσθητα στην χιτοζάνη, ενώ η ευαισθησία των θετικών κατά Gram βακτηρίων είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Παρατηρήθηκε ότι ο *Bacillus cereus* ήταν πολύ ευαίσθητος στην χιτοζάνη, ενώ η *Listeria monocytogenes* (αν και βακτήριο είναι θετικό κατά Gram) ήταν πολύ πιο ανθεκτική στην επίδραση της χιτοζάνης. Σε αντίθεση οι Fernandez-Saiz et al. (2009) παρατήρησαν ότι η *Salmonella spp.* (αρνητικό κατά Gram) ήταν πιο ανθεκτική σε δραστική αντιμικροβιακή μεμβράνη με χιτοζάνη από ότι ο *S. aureus* (θετικό κατά Gram). Ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει την δράση της χιτοζάνης στους μικροοργανισμούς είναι η βακτηριακή φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών-στόχων και συγκεκριμένα, βακτηριακά κύτταρα τα οποία βρίσκονταν στα τελευταία στάδια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, φάνηκαν να είναι



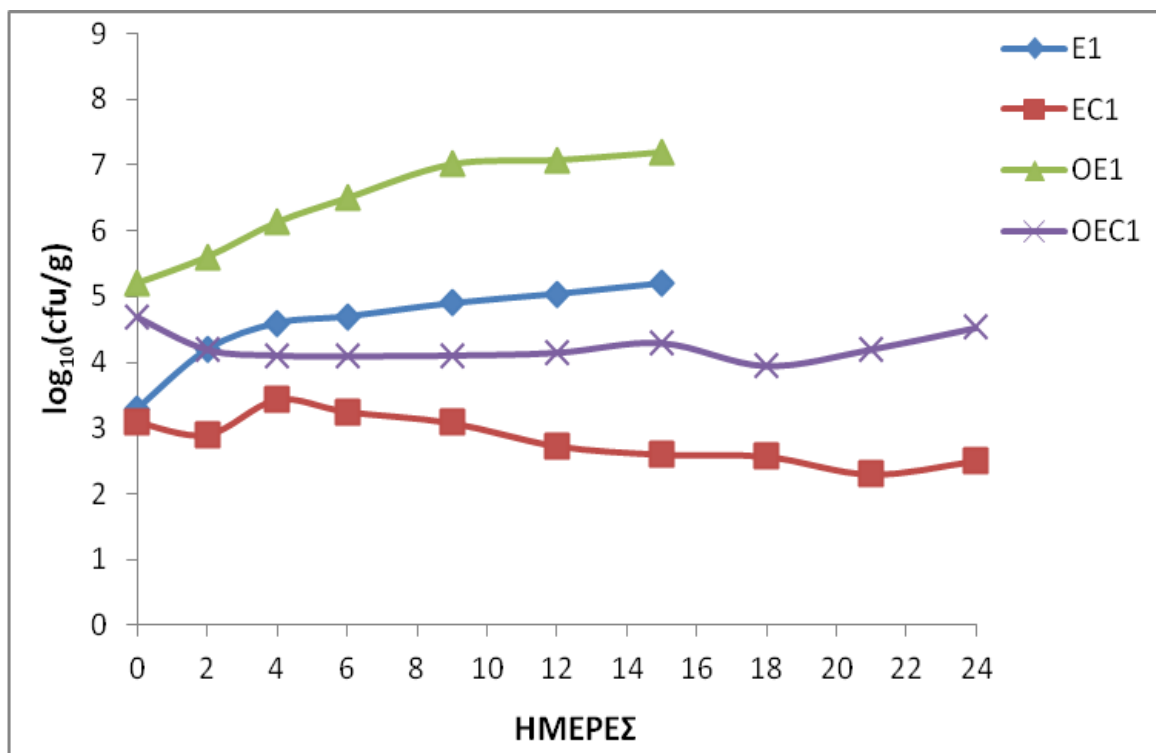
πιο ευαίσθητα στην επίδραση της χιτοζάνης σε σχέση με εκείνα που βρίσκονταν στη στατική φάση (Tsai et al., 2006).

### **3.3.2. Επιβίωση της *Escherichia coli* O157:H7 στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C**

Τα βακτήρια του είδους *Escherichia coli* βρίσκονται συνήθως στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου και των ζώων και θεωρούνται δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης στα τρόφιμα (Olsvik et al., 1991; Ryu et al., 2012). Η *Escherichia coli* O157:H7 είναι ένα από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα. Λόγω της παθογένειας της και της χαμηλής δόσης που απαιτείται για την μόλυνση του ανθρώπου (λιγότερο από 50 κύτταρα), η προστασία των τροφίμων από μόλυνση και εξάπλωση του παθογόνου βακτηρίου *E. coli* O157:H7 αποτελεί μεγάλη πρόκληση για τις βιομηχανίες τροφίμων, καθώς και των υγειονομικών αρχών. Η πιο εκτεταμένη λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 στην ιστορία συνέβη το 1996 στην Ιαπωνία, όπου πάνω από 9000 άτομα μολύνθηκαν και πέθαναν επτά άνθρωποι. Εκτιμάται ότι κάθε χρόνο σημειώνονται 73.000 περιπτώσεις λοίμωξης από *E. coli* O157:H7 στις Ηνωμένες Πολιτείες (Yang et al., 2007). Μάλιστα από τα άτομα αυτά που θα μολυνθούν κάθε χρόνο με *E. coli* O157: H7 στις ΗΠΑ τα 2000 θα νοσήσουν σοβαρά και απαιτούν νοσηλεία και από αυτά τα περιστατικά στατιστικά προκύπτουν 50 θάνατοι (Nadarajah et al., 2005).

Οι Ryu et al. (2012) εξέτασαν 4330 τρόφιμα από την αγορά της Κορέας για παρουσία *Escherichia coli* και 96 δείγματα (2,2%) ήταν θετικά. Τα ποσοστά ανίχνευσης της *E. coli* διέφεραν, ανάλογα με το είδος των τροφίμων και κυμάνθηκε από 0,3% έως 10,9%. Το ωμό κρέας με καρυκεύματα (yukhoe) και η κρύα φασολάδα είχαν 10,9% μόλυνση με *E. coli* (δηλ. το υψηλότερο ποσοστό), ακολουθεί το gimbar (λευκό ρύζι τυλιγμένο σε φύλλα από φύκη) με 5,2%, ο ζωμός κρέατος για κρύα μανέστρα με 2,9% και τα λαχανάκια τύπου Βρυξελλών με 2,1%. Το πόσιμο νερό έχει επίσης συσχετιστεί με την εμφάνιση διάρροιας που οφείλεται σε *E. coli* στις ΗΠΑ (όπου υπήρχε υπόνοια ότι η παροχή ύδατος είχε μολυνθεί από λύματα) και στην Ιαπωνία (Olsvik et al., 1991). Μάλιστα η *E. coli* μπορεί να βρεθεί στα τρόφιμα από το μολυσμένο νερό που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τους και για την πλύση των σκευών που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία τους (Nyatoti et al., 1997).

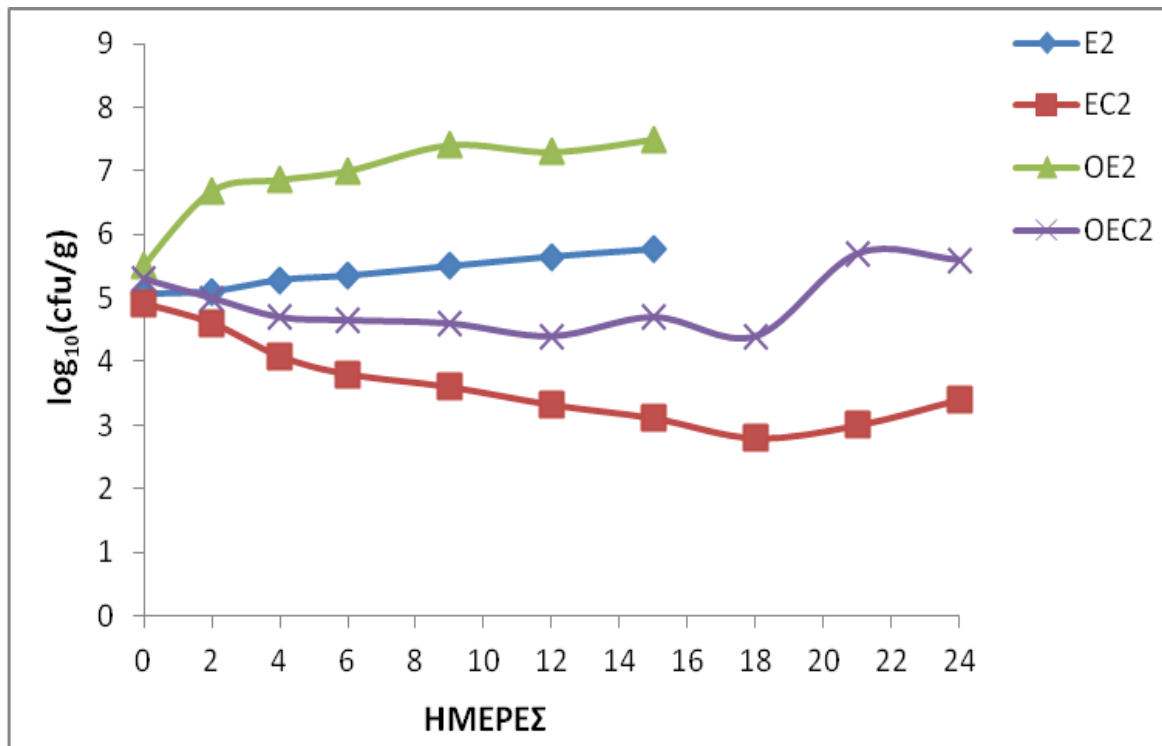
Επίσης, η *Escherichia coli* ανιχνεύτηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε αλεύρι σίτου, με την πλειονότητα των θετικών δειγμάτων να βρίσκονται στο ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης 3 MPN/g (Berghofer et al., 2003) και σε τρόφιμα με βάση τα σιτηρά, συγκεκριμένα βρέθηκε σε 6 από τα 79 δείγματα χυλού που παρασκευάζεται με αλεύρι καλαμποκιού και σε 2 από τα 32 δείγματα βρασμένου καλαμποκιού (Nyatoti et al., 1997).



**Γράφημα 28:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherihia coli* O157:H7 σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^3$  cfu/g *Escherihia coli* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).

Στο Γράφημα 28 φαίνεται ότι στο φύλλο χωρίς συντηρητικά τόσο ο πληθυσμός της OMX (OE1) όσο και εκείνος της *Escherihia coli* O157:H7 (E1) αυξήθηκαν κατά περίπου 2,0 λογαριθμικές μονάδες, ενώ στο φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης οι πληθυσμοί της OMX (OEC1) και της *Escherihia coli* O157:H7 (EC1) μειώθηκαν κατά περίπου 1,0 λογαριθμική μονάδα. Συνεπώς, τελικά η E1 μειώθηκε κατά 3 λογαριθμικές μονάδες ( $P < 0.05$ ) σε σχέση με τα OE1 και EC1 μειωμένο κατά

1,5 λογαριθμική μονάδα ( $P < 0.05$ ) σε σχέση με το ΟΕC1. Επίσης, στο ίδιο Γράφημα φαίνεται ότι η προσθήκη της χιτοζάνης μειώνει την ΟΜΧ κατά 3,0 λογαριθμικές μονάδες ( $P < 0.05$ ) και τον πληθυσμό της *Escherihia coli* 0157:H7 κατά 2,0 λογαριθμικές μονάδες ( $P < 0.05$ ).



**Γράφημα 29:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherihia coli* 0157:H7 σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^5$  cfu/g *Escherihia coli* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).

Παρόμοιο προφίλ ανάπτυξης παρατηρήθηκε όταν ενοφθαλμίστηκε στο φύλλο μεγαλύτερος πληθυσμός του ίδιου μικροοργανισμού (Γράφημα 29). Στο φύλλο χωρίς συντηρητικά οι πληθυσμοί της ΟΜΧ (ΟΕ2) και της *Escherihia coli* 0157:H7 (Ε2) αυξήθηκαν κατά περίπου 2 και 1 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Στο φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης ο πληθυσμός της ΟΜΧ (ΟΕC2) μειώθηκε αρχικά αλλά έπειτα αυξήθηκε κατά περίπου 0,5 λογάριθμο και ο πληθυσμός της *Escherihia coli* 0157:H7 (ΕC2) μειώθηκε κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες ( $P < 0.05$ ). Έτσι, τα Ε2 και ΕC2 είναι μειωμένα κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες σε σχέση με το ΟΕ2 και ΟΕC2,

αντίστοιχα. Επίσης, φαίνεται ότι η προσθήκη της χιτοζάνης μειώνει την OMX κατά 2 λογαριθμικές μονάδες ( $P < 0,05$ ) και τον πληθυσμό της *Escherichia coli* κατά 3 λογαριθμικές μονάδες ( $P < 0,05$ ). Είναι λοιπόν προφανές ότι η προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης σε φύλλο ενοφθαλμισμένο με *Escherichia coli* O157:H7 μειώνει σημαντικά ( $P < 0,05$ ) τους πληθυσμούς της OMX του προϊόντος και της *Escherichia coli* O157:H7, τόσο σε χαμηλή, όσο και σε υψηλή μόλυνση του εν λόγω τροφίμου με το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο.

Παρόμοια αύξηση του πληθυσμού του παθογόνου βακτηρίου *E. coli* βρήκαν και οι Morente et al. (2010), όπου ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 αυξήθηκε κατά περίπου  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε ζύμη από αλεύρι καλαμποκιού (ενοφθαλμισμένη με το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο) που διατηρήθηκε στους  $37^\circ \text{C}$  για 24 h. Ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 σε δημητριακά ρυζιού (σε αερόβια συσκευασία) με  $a_w = 0,73$  και  $\text{pH} = 6,75$  (ενοφθαλμισμένα με  $6,31 \log_{10}(\text{cfu/g})$  *E. coli* O157:H7) μετά από 24 εβδομάδες στους  $5^\circ \text{C}$  ήταν ίσος με  $4,45 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Επίσης, Ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 σε πάστα αμυγδάλου (σε αερόβια συσκευασία) με  $\text{pH} = 5,93$  και  $a_w = 0,82$  (ενοφθαλμισμένα με  $5,48 \log_{10}(\text{cfu/g})$  *E. coli* O157:H7) μετά από 19 εβδομάδες στους  $5^\circ \text{C}$  ήταν ίσος με  $3,83 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Deng et al., 1998). Η διαφοροποίηση αυτή πιθανώς να οφείλεται στην χαμηλότερη  $a_w$  του εν λόγω τροφίμου σε σχέση με το φύλλο ( $a_w$  φύλλου = 0,93), μιας και οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν ότι όσο αυξανόταν η ενεργότητα νερού των δημητριακών ρυζιού (με το ίδιο  $\text{pH}$ , συσκευασία και θερμοκρασία συντήρησης) τόσο υψηλότερος ήταν ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 σε αυτά, σε συνάρτηση με τον χρόνο (Deng et al., 1998). Ακόμη τόσο τα δημητριακά, όσο και η πάστα αμυγδάλου ήταν συσκευασμένα σε αέρα, ενώ το φύλλο στην παρούσα μελέτη συσκευάστηκε υπό κενό. Ως γνωστόν η *E. coli* O157:H7 είναι προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός (Doyle, 1991) κι ως εκ τούτου αναπτύσσεται καλύτερα σε αναερόβιο περιβάλλον. Οι Gill και DeLacy (1991) εμβολίασαν ένα στέλεχος της *Escherichia coli* σε βοδινό κρέας ( $\text{pH} > 6,0$ ), το οποίο συσκευάστηκε υπό κενό και αποθηκεύθηκε στους  $8^\circ \text{C}$ , και συμπέραναν ότι η *E. coli* αυξήθηκε και ο πληθυσμός της ήταν μικρότερος από την OMX του προϊόντος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Οι Dykes et al. (2001) παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 αυξήθηκε κατά  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε βοδινό κρέας (ενοφθαλμισμένο με  $10^5$  και  $10^3$  cfu/g παθογόνου μικροοργανισμού) συσκευασμένο

υπό κενό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 4 ° C, και στις δύο περιπτώσεις ενοφθαλμισμένου παθογόνου στο προϊόν (δηλ. τόσο σε χαμηλό όσο και σε υψηλό πληθυσμό παθογόνου στο τρόφιμο).

Από τα Γραφήματα 28 και 29 προκύπτει ότι η χιτοζάνη μείωσε σημαντικά ( $P < 0,05$ ) τον πληθυσμό της *E. coli* O157:H7 στο φύλλο για πίτα. Η δράση της χιτοζάνης έναντι της *E. coli* O157:H7 έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν από αρκετούς ερευνητές. Οι Fernandes et al. (2008) εξέτασαν 'in vitro' την επίδραση της χιτοζάνης (χαμηλού MB) έναντι της *E. coli*. Κατά τη δοκιμή του χαμηλότερου εμβολίου, δηλαδή  $10^3$  cfu/mL *E. coli*, η χιτοζάνη είχε βακτηριοκτόνο δράση σε όλες τις συγκεντρώσεις, αφού χρειάστηκαν 60,120 και 240 λεπτά για μείωση του πληθυσμού της *E. coli* κατά 3 λογαρίθμους από την προσθήκη χιτοζάνης συγκέντρωσης 0,1%, 0,25% και 0,50% (w/v), αντίστοιχα. Όταν το ίδιο πείραμα έγινε με υψηλότερο εμβόλιο ( $10^5$  cfu/mL), η χιτοζάνη έδειξε μικρότερη μείωση ( $< 3 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) του πληθυσμού της *E. coli*. Γενικά η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ο τύπος της χιτοζάνης (χαμηλού ή υψηλού MB), η συγκέντρωση αυτής (0,1%, 0,25% ή 0,50% w/v) και το επίπεδο ενοφθάμισης με το παθογόνο βακτήριο *E. coli* ( $10^3$  ή  $10^5$  cfu/mL) ήταν σημαντικοί παράγοντες για την μείωση του πληθυσμού της *E. coli*. Οι Li et al. (2010) αξιολόγησαν την δραστηριότητα της χιτοζάνης στην αναστολή της *Escherichia coli* και συμπέραναν ότι η χιτοζάνη αυξάνει τη διαπερατότητα τόσο της εξωτερικής, όσο και της εσωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου της *E. coli*, και τελικά διαρρηγνύει την κυτταρική μεμβράνη με την απελευθέρωση των κυτταρικών περιεχομένων.

Στο παρελθόν αρκετοί ερευνητές έχουν τονίσει ότι η φάση ανάπτυξης των κυττάρων της *E. coli* επηρεάζει δραστικά την αποτελεσματικότητα της χιτοζάνης. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα των παθογόνων βακτηρίων που βρίσκονται στο στάδιο της εκθετικής ανάπτυξης είναι πιο ευαίσθητα στην αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης σε σχέση με εκείνα που βρίσκονται στην στάσιμη κατάσταση, πιθανόν λόγω της διαφορετικής ηλεκτραρνητικότητας που παρουσιάζει η κυτταρική τους επιφάνεια (Tsai και Su, 1999; Yang et al., 2007). Σύμφωνα με τους Yang et al. (2007) ο βιώσιμος πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 σε απιονισμένο νερό το οποίο περιείχε 500 ppm μαλτόζη (παράγωγο της χιτοζάνης), μειώθηκε από περίπου  $7,6 \log_{10}(\text{cfu/ml})$  σε ένα μη ανιχνεύσιμο επίπεδο μετά από 10 ώρες επώασης στους 37 ° C. Οι Kanatt et al. (2008) πειραματίστηκαν με την δράση ενός σύμπλοκου χιτοζάνης-γλυκόζης είναι

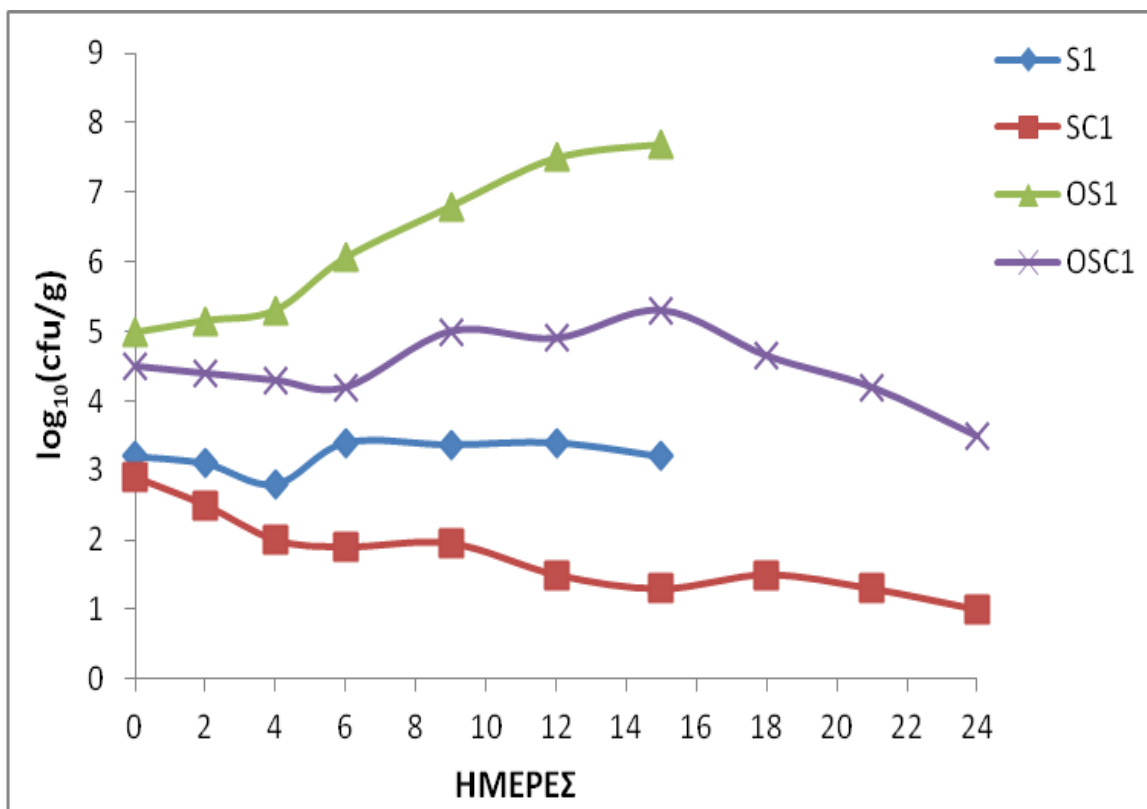
(μια τροποποιημένη μορφή της χιτοζάνης, που παρασκευάστηκε με θέρμανση χιτοζάνης με γλυκόζη) έναντι του παθογόνου βακτηρίου *E. coli* σε θρεπτικό ζωμό. Συμπέραναν ότι όλες οι συγκεντρώσεις του συμπλόκου χιτοζάνης-γλυκόζης μεγαλύτερες από 0,01% είχαν βακτηριοκτόνο δράση έναντι της *E. coli*, αφού δεν ανιχνεύθηκαν βιώσιμα κύτταρα του μικροοργανισμού μετά από 24 ώρες στους 37° C (αρχικός πληθυσμός παθογόνου ίσος με 5,64 log<sub>10</sub>(cfu/ml)). Επίσης, διάλυμα χιτοζάνης - πολυβινυλικής αλκοόλης δείχνει ανασταλτική δράση έναντι της *E. coli* (το ανασταλτικό αποτέλεσμα μετρήθηκε με βάση τη διαυγή ζώνη γύρω από κυκλικές λωρίδες φιλμ / διαλύματος). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η βιοενεργός μεμβράνη χιτοζάνης - πολυβινυλικής αλκοόλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της διάρκειας ζωής τροφίμων, όπως η ντομάτα (Tripathi et al., 2009).

Η χιτοζάνη έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν με επιτυχία σε διάφορα τρόφιμα για την αναστολή του παθογόνου βακτηρίου *E. coli*. Μπρόκολο επικαλυμμένο με χιτοζάνη και ενοφθαλισμένο με *E. coli* O157:H7 (3-4 log<sub>10</sub>(cfu/g)), 24 ώρες μετά την εφαρμογή του φιλμ χιτοζάνης στο προϊόν έδειξε μία σημαντική μείωση (P <0,05) του πληθυσμού της OMX (2,0 - 2,5 log<sub>10</sub>(cfu/g)), συγκρινόμενο με το μάρτυρα (μπρόκολο ενοφθαλισμένο με *E. coli* O157:H7 χωρίς χιτοζάνη), και αυτή η ανασταλτική δράση διατηρήθηκε μέχρι το τέλος της αποθηκεύσεως του προϊόντος υπό ψύξη. Η χιτοζάνη φάνηκε να μειώνει σημαντικά και τον πληθυσμό της *E. coli* O157:H7 κατά 2 λογαριθμικές μονάδες (Moreira et al., 2011). Σύμφωνα με τους Lahmer et al. (2012) η προσθήκη χιτοζάνης (200 μg/ml) σε ωπό (χυμό) κοτόπουλου (αντιπροσωπευτικός του υγρού που συσσωρεύεται στη συσκευασία του κοτόπουλου) που συντηρήθηκε στους 4° C μείωσε τον πληθυσμό της *Escherichia coli* O157:H7 κατά περίπου 4,5 log<sub>10</sub>(cfu/ml). Ο οπός (χυμός) κοτόπουλου ήταν ενοφθαλισμένος με περίπου 8,75 log<sub>10</sub>(cfu/ml).

### **3.3.3. Επιβίωση της *Salmonella enterica* στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C**

Η τροφιμογενής Σαλμονέλωση είναι ένα μείζον πρόβλημα Δημόσιας Υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Εκτιμάται ότι κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες περίπου 1,4 εκατομμύρια άτομα μολύνονται από Σαλμονέλλα, από τα οποία 15.000

νοσηλεύονται και 580 πεθαίνουν. Σε πολλές περιοχές, όπως η Νοτιοανατολική Ασία, υπάρχει έλλειψη επίσημων στοιχείων παρακολούθησης των Σαλμονελλώσεων, αλλά εκτιμάται ότι έως και 22,8 εκατομμύρια περιπτώσεις λαμβάνουν χώρα κάθε χρόνο με 37.600 θανάτους (Van et al., 2012). Η *Salmonella* περιλαμβάνει περισσότερους από 2500 διαφορετικά ορότυπους, από τους οποίους οι κυριότεροι που εντοπίζονται σε λοιμώξεις του ανθρώπου είναι: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. newport*, *S. weltevreden*, *S. stanley*, *S. heidelberg*, *S. javiana* (Hur et al., 2012; Van et al., 2012). Κύριες πηγές των κρουσμάτων Σαλμονέλλωσης είναι τα αυγά, το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Taskila et al., 2012), ωστόσο *Salmonella* έχει εντοπιστεί σε αλεύρι σίτου (Berghofer et al., 2003), δημητριακά για βρέφη (Abushelaibi et al., 2003) και είναι πιθανό να βρεθεί και σε πόσιμο νερό (Levantesi et al., 2012). Συνεπώς καλό θα ήταν να εξεταστεί η επιβίωση της *Salmonella* σε φύλλο για πίτα, το οποίο παρασκευάζεται από αλεύρι σίτου και νερό.



**Γράφημα 30:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^3$  cfu/g *Salmonella enterica* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).

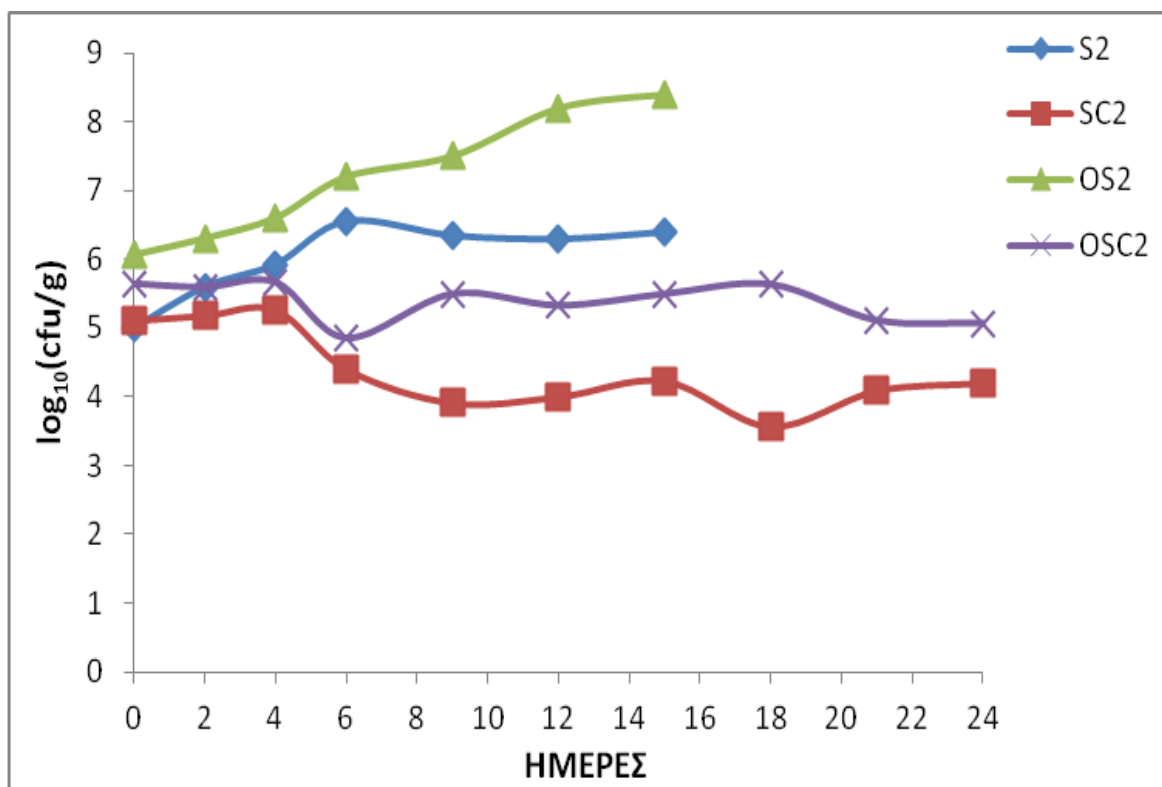
Στο Γράφημα 30 παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός της OMX (OS1) είναι υψηλότερος κατά 4 λογαριθμικές μονάδες από εκείνον της *Salmonella enterica* (S1) στο φύλλο χωρίς την προσθήκη συντηρητικού, ενώ ο πληθυσμός της OMX (OSC1) είναι υψηλότερος κατά περίπου 3,5 λογαριθμικές μονάδες από εκείνον της *Salmonella enterica* (SC1) στο φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης. Ακόμη η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο μειώνει ( $P < 0,05$ ) τους πληθυσμούς της OMX και της *Salmonella enterica* κατά 2 και 1,5 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Σε αυτήν την περίπτωση ο πληθυσμός της OMX στο φύλλο χωρίς την προσθήκη συντηρητικού (OS1) αυξήθηκε κατά περίπου 3 λογαριθμικές μονάδες, ενώ εκείνος της *Salmonella enterica* (S1) παρέμεινε πρακτικά σταθερός. Όμως οι πληθυσμοί της OMX (OSC1) και της *Salmonella enterica* (SC1) στο φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης μειώθηκαν κατά 0,5 και 2 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα.

Η ενοφθάλμιση παθογόνου σε συγκέντρωση  $10^5$  cfu/g ελήφθη ένα διαφορετικό προφίλ ανάπτυξης (Γράφημα 31). Ο πληθυσμός της OMX (OS2) και της *Salmonella enterica* (S2) στο φύλλο, χωρίς την προσθήκη συντηρητικού, αυξήθηκαν κατά περίπου 2 και 1,5 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Όμως ο πληθυσμός της OMX (OSC2) στο φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης παρέμεινε πρακτικά σταθερός και ο πληθυσμός της *Salmonella enterica* (SC2) μειώθηκε κατά περίπου μία λογαριθμική μονάδα. Από το Γράφημα 31 φαίνεται ότι ο πληθυσμός της OMX είναι υψηλότερος κατά 2 λογαριθμικές μονάδες από εκείνον της *Salmonella enterica* στο φύλλο χωρίς την προσθήκη συντηρητικού, ενώ ο πληθυσμός της OMX είναι υψηλότερος κατά περίπου 1,5 λογαριθμικές μονάδες από εκείνον της *Salmonella enterica* στο φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης. Ακόμη η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο μειώνει ( $P < 0,05$ ) τους πληθυσμούς της OMX και της *Salmonella enterica* κατά 2,5 και 2 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα.

Παρατηρήθηκε ότι η ανάπτυξη της *Salmonella enterica* (S1) στο φύλλο χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P > 0,05$ ) όταν το παθογόνο βακτήριο ενοφθαλμίστηκε σε χαμηλό πληθυσμό στο προϊόν και αρκετά μικρή (της τάξης του ενός λογαρίθμου) όταν το εμβόλιο ήταν μεγαλύτερο (S2). Η *Salmonella* έχει αναφερθεί ότι επιβιώνει αλλά δεν αναπτύσσεται εύκολα σε θερμοκρασίες μικρότερες των 5-7 °C, λόγω της χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας της σε χαμηλές θερμοκρασίες και μειωμένης κυτταρικής ανανέωσης (Gill και DeLacy 1991;



Szcawinska et al., 1991; Cox et al., 1999; Koutsoumanis et al., 1999; Beal et al. 2002; Juneja et al., 2007). Αντίστοιχα, οι Morente et al. (2010) παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός της *Salmonella enterica serovar Enteritidis* αυξήθηκε κατά περίπου 1  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε ζύμη από αλεύρι καλαμποκιού (ενοφθαλμισμένη με το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο) που διατηρήθηκε στους 37° C για 24 h. Επίσης, ζύμη από μανιόκα (αμυλούχος καρπός τροπικών χωρών) με pH= 5,7 ενοφθαλμίστηκε με βακτήρια του γένους Σαλμονέλλα ( $10^6$ -  $10^7$  cfu/g το καθένα) και παρατηρήθηκε ότι μετά από 48 h σε θερμοκρασία περιβάλλοντος η *S.enteritidis* και η *S. typhimurium* δεν ανιχνεύτηκαν, ενώ η *S. dysenteriae* είχε πληθυσμό περίπου ίσο με  $10^4$  cfu/g (Mante et al., 2003). Επιπρόσθετα, οι Dykes et al. (2001) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των κυττάρων της *Salmonella typhimurium* και *Salmonella brandenberg* παρέμεινε αμετάβλητος από την αρχική του τιμή (3 και 5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , αντίστοιχα) κατά την συντήρηση τεμαχισμένου μοσχάρσιου κρέατος σε συσκευασία κενού στους 4 °C.



**Γράφημα 31:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση/ του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^5$  cfu/g *Salmonella enterica* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).

Σύμφωνα με τους Ellis et al. (2006) ο πληθυσμός της ενοφθαλμισμένης *Salmonella typhimurium* σε φιλέτα από κοτόπουλο που συσκευάστηκαν σε MAP (25% CO<sub>2</sub>/ 75% N<sub>2</sub>) δεν παρουσίασε αύξηση από την αρχική του τιμή (4 log<sub>10</sub>(cfu/g)) κατά την συντήρηση στους 3 °C για 15 ημέρες. Ούτε ο πληθυσμός της *S. typhimurium* αυξήθηκε σε μοσχαρίσιο κρέας στους 5 °C για διάστημα 8 και 12 ημερών σε συσκευασία αέρα ή κενού, αντίστοιχα (Skandamis et al., 2002). Μη σημαντική αύξηση σημειώθηκε και στον πληθυσμό της *S. enteritidis* κατά την συντήρηση πρόβειου κιμά σε αερόβια συσκευασία στους 4 °C (Govaris et al., 2010). Αντίθετα, οι Gill και DeLacy (1991) εμβολίασαν ένα στέλεχος της *Salmonella typhimurium* σε βοδινό κρέας (pH > 6), το οποίο συσκευάστηκε υπό κενό και αποθηκεύθηκε στους 8 °C, και συμπέραναν ότι η *S. typhimurium* αυξήθηκε και ο πληθυσμός της ήταν μικρότερος από την OMX του προϊόντος καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Αύξηση της *Salmonella spp.* κατά περίπου 1 λογαριθμική μονάδα (από 4,65 log<sub>10</sub>(cfu/g) αρχικό πληθυσμό σε 5,4 log<sub>10</sub>(cfu/g)) παρατηρήθηκε και σε γαρίδες συσκευασμένες υπό κενό μετά από 7 μέρες συντήρησής τους στους 4° C.

Η χιτοζάνη μείωσε σημαντικά (P<0,05) τον πληθυσμό της *Salmonella enterica* του φύλλου για πίτα και στις δύο περιπτώσεις (δηλ. τόσο σε χαμηλό, όσο και σε υψηλό ενοφθαλμισμένο εμβόλιο παθογόνου στο προϊόν). Το MB της χιτοζάνης και ο βαθμός αποακετυλιώσεως αυτής επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση της. Συγκεκριμένα χιτοζάνη με χαμηλό MB έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δραστηριότητα εναντίον της *S. enteritidis*, σε σχέση με εκείνη με υψηλό MB, και όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός αποακετυλιώσεως της χιτοζάνης τόσο καλύτερη είναι η αντιμικροβιακή της δράση (Leleu et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη 75-85 % από-ακετυλιωμένη και χαμηλού MB, κάτι που πιθανώς να συνετέλεσε στην σημαντική μείωση της *S. enterica* στο φύλλο για πίτα. Στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει πλήθος αναφορών σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης έναντι της *Salmonella*. Σε έρευνα "in vitro" των Marques et al. (2008) αναφέρεται ότι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση της χιτοζάνης (μεσαίου MB) ενάντια στην *S. enterica* προσδιορίστηκε ως 0,03-0,05% v/v στους 10 °C. Σε άλλη "in vitro" μελέτη των No et al. (2006) η προσθήκη 0,05% χιτοζάνης υψηλού MB (σε 1% διάλυμα οξικού οξέος) μείωσε τον πληθυσμό της *S. enteritidis* κατά περίπου 4 λογαριθμικές μονάδες μετά από 24h στους 37° C. Επίσης, οι

Fernandez-Saiz et al. (2010) αναφέρουν ότι η προσθήκη ενεργού φιλμ με χιτοζάνη σε ψαρόσουπα (10-20 mg), μείωσε τον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. κατά  $>2 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε 10 ημέρες συντήρησης του προϊόντος στους 12 °C.

Επιπρόσθετα, η εμβάπτιση αυγών ενοφθαλμισμένων με  $3,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  *S. typhimurium* σε διάλυμα χιτοζάνης 1% οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού το παθογόνου βακτηρίου και μετά από 3 ημέρες συντήρησης τους σε θερμοκρασία δωματίου, ο πληθυσμός της *S. typhimurium* ήταν μη ανιχνεύσιμος (Liu et al., 2009). Οι Inatsu et al. (2005) εξέτασαν την προσθήκη διαλύματος χιτοζάνης (0.1%) σε λάχανο (ενοφθαλμισμένο με *S. enteritidis*) και συμπέραναν ότι η χιτοζάνη μείωσε τον πληθυσμό της *S. enteritidis* κατά  $0.7 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στο λάχανο που συντηρήθηκε στους 10 °C για 4 ημέρες. Επιπρόσθετα, οι Roller και Covill (2000) ανέφεραν ότι η προσθήκη διαλύματος γλουταμινικής χιτοζάνης (3 g/L) σε μαγιονέζα που περιείχε χυμό λεμονιού, μείωσε τον πληθυσμό της *S. enteritidis* κατά  $0,5-1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$  κατά την συντήρηση της στους 5 °C για 8 ημέρες. Η επικάλυψη πεπονιού (ενοφθαλμισμένο με  $6,8 \log_{10}(\text{cfu/cm}^2)$  *Salmonella* sp.) με χιτοζάνη (200mg) μείωσε τον πληθυσμό της *Salmonella* sp. κατά  $1,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  μετά από 24h στους 24° C (Chen et al., 2012).

#### **3.3.4. Επιβίωση του *Bacillus cereus* στο παραδοσιακό φύλλο υπό κενό με ή χωρίς την Προσθήκη Χιτοζάνης στους 4° C**

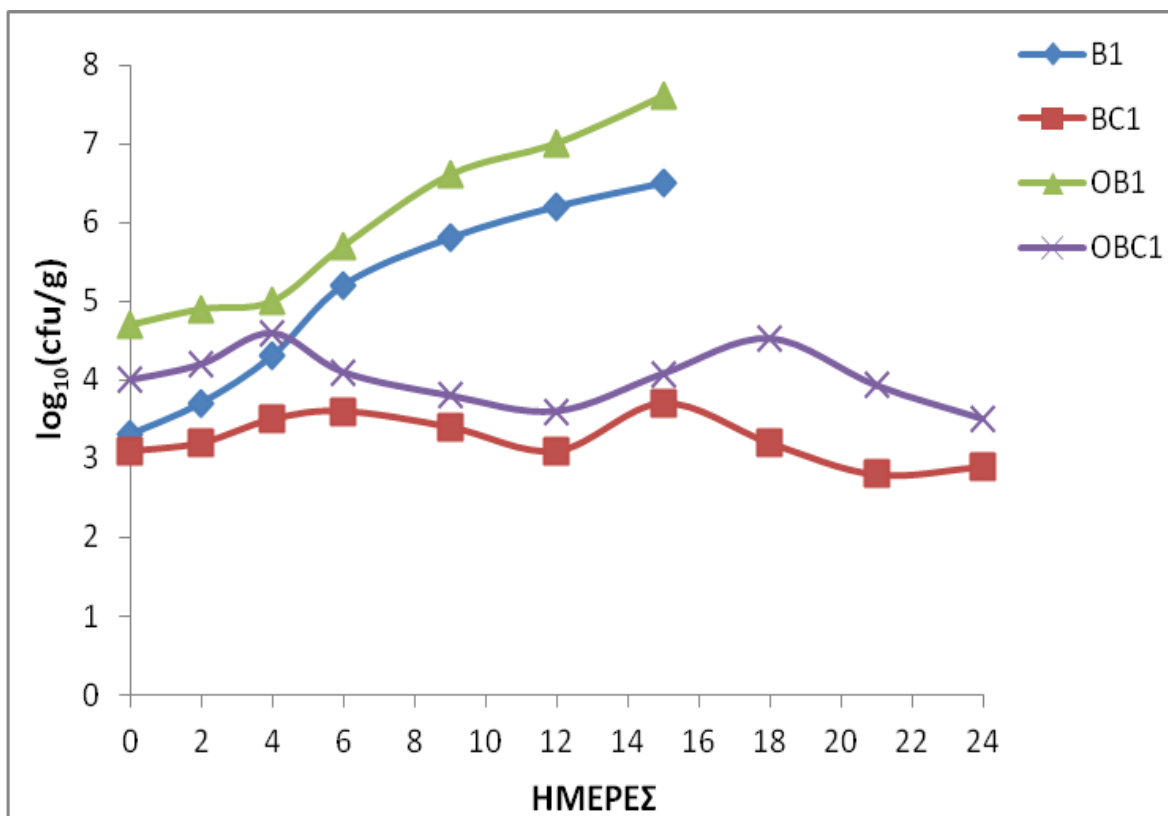
Ο *B. cereus* έχει εμπλακεί στο 33% του συνόλου των βακτηριακών τροφιογενών νόσων στη Νορβηγία (1988-1993), 47% στην Ισλανδία (1987-1992), 22% στη Φινλανδία (1992) και 8% στις Κάτω Χώρες (1991). Ο *Bacillus cereus* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας δύο τύπων τροφικής δηλητηρίασης. Τη διαρροϊκή νόσο, που εμφανίζεται μετά την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν σπορογόνες μορφές ή βλαστικά κύτταρα του *B. cereus* και την εμετική τροφιογενή ασθένεια η οποία προκαλείται από δηλητηρίαση με τη θερμο-ανθεκτική τοξίνη, η οποία έχει προσχηματισθεί από τον *B. cereus* στα τρόφιμα και προκαλεί εμετό λίγες ώρες μετά την κατάποση (Dommel et al., 2010). Μάλιστα οι τροφιογενείς νόσοι που προκαλούνται από τον *B. cereus* έχουν συνδεθεί με όλες σχεδόν τις κατηγορίες τροφίμων (Samarundo et al. 2011).

Η προέλευση των ειδών του *Bacillus*, που πιθανόν να υπάρχει στα προϊόντα αρτοποιίας, φαίνεται να προέρχονται από επιμόλυνση των πρώτων υλών αρτοποιίας και του εξοπλισμού (Bailey και von Holy, 1993). Σπόρια *Bacillus* μολύνουν άλευρα, ως αποτέλεσμα της καλλιέργειας και των μεθόδων επεξεργασίας και μπορεί επίσης να υπάρχουν στις επιφάνειες του εξοπλισμού επεξεργασίας ή στην ατμόσφαιρα. Τα θερμοανθεκτικά σπόρια μπορούν να επιβιώσουν από την διαδικασία ψησίματος (Valerio et al., 2012). Ο *B. cereus* ανιχνεύθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε αλεύρι σίτου (0,3 MPN/g) (Berghofer et al., 2003). Σύμφωνα άλλωστε με τους Rosenquist και Hansen (1995) ενδοσπόρια του *Bacillus cereus* έχουν απομονωθεί από αλλοιωμένο ψωμί και σύμφωνα με τους ερευνητές τα ενδοσπόρια αυτά βρέθηκαν στο ψωμί γιατί μολύνουν τις πρώτες ύλες του ψωμιού (όπως αλεύρι, βελτιωτικά ψωμιού, ζύμη, κλπ.) και επιβιώνουν της θερμοκρασίας ψησίματος. Συνεπώς το σπορογόνο βακτήριο *Bacillus cereus* αποτελεί κίνδυνο για την βιομηχανία παραγωγής προϊόντων αρτοποιίας. Αντίστοιχα στην παρούσα μελέτη και το φύλλο για πίτα (που είναι το αντικείμενο μελέτης του συγκεκριμένου Κεφαλαίου) είναι ένα προϊόν αρτοποιίας που καταναλώνεται πάντα ψημένο, παρ' όλα αυτά κρίνεται απαραίτητο να είναι απαλλαγμένο από τέτοιου είδους βακτήρια για την προστασία του καταναλωτικού κοινού.

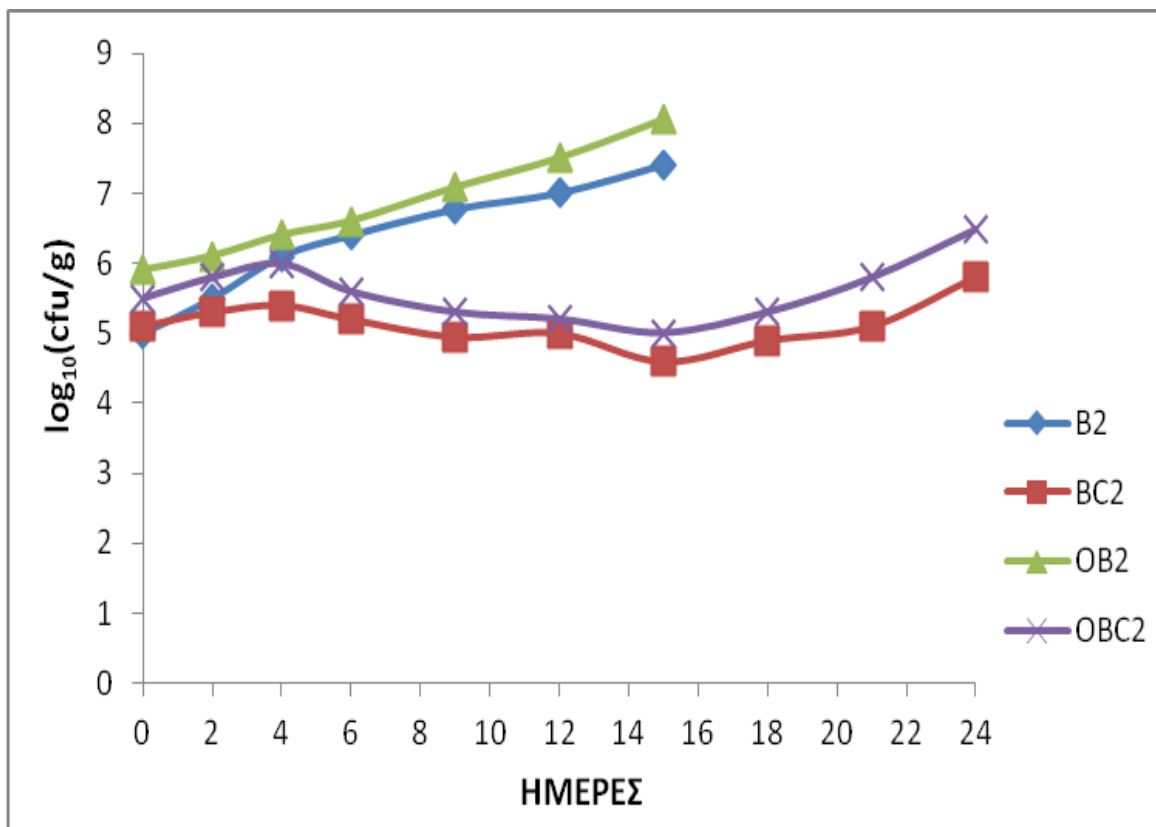
Το 2% των λευκών και ολικής αλέσεως ψωμιών σίτου που εξετάστηκαν από τους Rosenkvist και Hansen (1995) βρέθηκαν θετικά σε *B. cereus*. Επίσης, οι Bahk et al. (2007) ανέφεραν παρουσία *B. cereus* από 1,37 έως 4,49  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε τρόφιμο έτοιμο προς κατανάλωση με βάση το ρύζι, οι Valerio et al. (2012) σε σιμιγδάλι, οι Samarundo et al. (2011) σε ρύζι και ζυμαρικά και οι Rusul και Yaacob (1995) σε noodles ρυζιού και σίτου. Τέλος, οι Latou et al. (2010) προσδιόρισαν ότι ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* σε ψωμί χωρίς συντηρητικά ήταν 4,7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  μετά από 30 ημέρες αποθήκευσης.

Όπως φαίνεται από το Γράφημα 32 στην περίπτωση φύλλου χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης η OMX (OB1) αυξήθηκε 2,5 λογάριθμους και ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* (B1) κατά 3,5 λογάριθμους. Ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* (B1) σε αυτήν την περίπτωση είναι σταθερά μικρότερος κατά περίπου 0,5 λογαριθμική μονάδα σε σχέση με τη συνολική μικροχλωρίδα του φύλλου (OB1). Αντίθετα, η OMX (OBC1) και ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* (BC1) στο δείγμα που προστέθηκε στο

προϊόν χιτοζάνη παρέμειναν πρακτικά σταθερά. Αυτό σημαίνει ότι η OMX (OB1) και ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού (B1) στο δείγμα χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακής ουσίας είναι υψηλότεροι κατά περίπου 2,5 λογαριθμικές μονάδες από του αντίστοιχους πληθυσμούς του δείγματος με χιτοζάνη (OBC1 και BC1, αντίστοιχα). Παρόμοιο προφίλ ανάπτυξης παρατηρήθηκε και με την προσθήκη μεγαλύτερου εμβολίου *Bacillus cereus* στο φύλλο (Γράφημα 33). Συγκεκριμένα, η OMX (OB2) και ο πληθυσμός του παθογόνου (B2) του δείγματος χωρίς αντιμικροβιακή ουσία είχαν υψηλότερο πληθυσμό κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες από τους αντίστοιχους πληθυσμούς του δείγματος με την προσθήκη χιτοζάνης (OBC2 και BC2, αντίστοιχα). Επίσης, στα Γραφήματα 32 και 33 φαίνεται ότι ο *Bacillus cereus* επικρατεί στην μικροχλωρίδα του φύλλου, τόσο σε χαμηλό, όσο και υψηλό αρχικό εμβόλιο παθογόνου στο προϊόν.



**Γράφημα 32:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Bacillus cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^3$  cfu/g *Bacillus cereus* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^\circ$  C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).



**Γράφημα 33:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και η επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Bacillus cereus* σε παραδοσιακό φύλλο για πίτα ενοφθαλμισμένο με  $10^5$  cfu/g *Bacillus cereus* κατά τη διάρκεια συντήρησης του υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε συσκευασία κενού, παρουσία ή απουσία χιτοζάνης (1,5% v/w ή 0,03% w/w).

Ο *B. cereus* παρουσίασε υψηλή ανάπτυξη στο φύλλο για πίτα σε σχέση με το χρόνο συντήρησης, παρόλο που το προϊόν συσκευάστηκε σε κενό. Ως γνωστόν το παθογόνο βακτήριο *B. cereus* παρουσιάζει βέλτιστη (άριστη) ανάπτυξη σε αερόβιες συνθήκες, αλλά διαθέτει την ικανότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται απουσία οξυγόνου, δηλαδή υπό αναερόβιες συνθήκες. Ωστόσο, ο ρυθμός ανάπτυξης και η παραγωγή τοξίνης από το βακτήριο του *B. cereus* είναι μικρότερη σε αναερόβιο περιβάλλον (Whyte και Wong, 2004). Ίσως η μεγάλη αύξηση του πληθυσμού του *B. cereus* και στις δύο περιπτώσεις να οφείλεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε για την αρχική καλλιέργεια μίγμα τεσσάρων στελεχών (κοκτέιλ) με ικανότητα σπορογονίας >80%. Το γεγονός ότι τα στελέχη του *Bacillus cereus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν σπορογόνα καθιστά την καλλιέργεια αυτή ιδιαίτερα ανθεκτική στις διάφορες μεταχειρίσεις (συσκευασία, αντιμικροβιακούς παράγοντες κτλ.) και ανταγωνιστική για την μικροχλωρίδα του

φύλλου. Είναι πιθανόν ακόμη η ανάπτυξη του *B. cereus* στο φύλλο να οφείλεται στην υψηλή ενεργότητα νερού του προϊόντος, που είναι ίση με  $a_w=0,93$ . Το χαμηλότερο όριο  $a_w$  για την ανάπτυξη βλαστικών κυττάρων *B. cereus* έχει αναφερθεί τιμή ίση περίπου με  $a_w=0,95$  (Raevuori και Geonigeorgis, 1975).

Άλλωστε στο παρελθόν έχει αναφερθεί μεγάλη ανάπτυξη του *B. cereus* σε ζύμες. Οι Viedma et al. (2011) αναφέρουν ότι, όταν σπορογόνο στέλεχος του *B. cereus* ενοφθαλμίστηκε σε ζύμη σίτου, σε πληθυσμό ίσο με  $3.7 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , το βακτήριο πολλαπλασιάστηκε εκθετικά με το χρόνο όταν η ζύμη αποθηκεύτηκε στους  $22^\circ \text{C}$  για 48 ώρες (μετά από φάση καθυστέρησης περίπου 8 ωρών). Επίσης, οι Thorsen et al. (2011) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* βρέθηκε να είναι αρκετά υψηλός σε ζύμη ενός παραδοσιακού σνακ ψωμιού (Gergoush) στο Σουδάν. Συγκεκριμένα ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου ήταν παρόμοιος ανάμεσα στους 4 τύπους σνακ που εξετάστηκαν (από ρεβίθια, φάβα, φακή και λευκά φασόλια) μεταξύ  $6,1$  και  $7,7 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Επιπρόσθετα, στην διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για μεγάλη ανάπτυξη του εν λόγω παθογόνου σε τρόφιμα που συντηρήθηκαν υπό ψύξη. Οι Cronin et al. (2009) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του *B. cereus* που ενοφθαλμίστηκε σε μαγειρεμένο ρύζι, αυξήθηκε κατά  $3 \log_{10}(\text{cfu/g})$  μετά από 6 ημέρες συντήρησης στους  $10^\circ \text{C}$ , αλλά δεν παρατηρήθηκε παραγωγή σπόρων στο προϊόν (αρχική συγκέντρωση  $3 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ). Επιπλέον, οι Beuchat et al. (1997) μελέτησαν την πορεία ανάπτυξης ψυχρότροφων στελεχών του *B. cereus* σε βοδινό ζωμό και παρατήρησαν αύξηση των βλαστικών κυττάρων και των σπορίων κατά  $0,6$  και  $2 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , αντίστοιχα, από την αρχική τους τιμή ( $6,2-6,8 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) μετά από 14 ημέρες συντήρησης στους  $8^\circ \text{C}$ . Ακόμη, οι Aires et al. (2009) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του *B. cereus* σε παστεριωμένο γάλα που συντηρήθηκε στους  $4^\circ \text{C}$  αυξήθηκε κατά  $1,5$  και  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  από την αρχική του τιμή ( $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) μετά από 7 και 14 ημέρες, αντίστοιχα.

Το όριο για την παραγωγή εντεροτοξίνης από *B. cereus* θεωρείται ότι είναι ο πληθυσμός των  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , ωστόσο, είναι πιθανό από στέλεχος σε στέλεχος να υπάρχει διαφοροποίηση και πιθανόν να μπορεί να παραχθεί τοξίνη και σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Granum και Baird-Parker, 2000; Nauta et al., 2003; Notermans, et al., 1997). Η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο και στις δύο περιπτώσεις εμβολίου ( $10^3$  και  $10^5 \text{ cfu/g}$ ) διατηρεί σχεδόν σταθερό τον πληθυσμό του *B. cereus*

στο προϊόν σε συνάρτηση με το χρόνο (κάτι που εμποδίζει την παραγωγή εντεροτοξίνης). Γενικότερα, η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο μείωσε σημαντικά ( $P < 0,05$ ) τον πληθυσμό του *B. cereus*, τόσο σε πυκνό ( $10^5$  cfu/g - μείωση πληθυσμού κατά 2 λογάριθμους), όσο και σε αραιό εμβόλιο ( $10^3$  cfu/g - μείωση πληθυσμού κατά 2,5 λογάριθμους) στο προϊόν του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου, σε σχέση με το εκάστοτε φύλλο χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με εκείνα των Fernandes et al. (2009), οι οποίοι αναφέρουν ότι κατά την “in vitro” χρήση χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους (όπως και στην παρούσα μελέτη) ενάντια στην ανάπτυξη των βλαστικών μορφών του *B. cereus* (στέλεχος ATCC 14579), η μείωση των κυττάρων κυμάνθηκε από 1 έως 2,5  $\log_{10}$ (cfu/g). Επίσης, σύμφωνα με τους No et al. (2002), ο πληθυσμός των κυττάρων του *B. cereus* μειώθηκε κατά 3.8  $\log_{10}$ (cfu/g), μετά από 24 ώρες έκθεσης (37 °C) σε χιτοζάνη χαμηλού MB, συγκέντρωσης 0.02% w/v και διαλαλημένη σε 1% οξικό οξύ. Στην ίδια έρευνα αναφέρεται ότι περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης της χιτοζάνης σε 0.04-0.10%, δεν οδήγησε σε βελτίωση της αντιμικροβιακής της δράσης ενάντια στο ίδιο βακτήριο.

Επίσης, σε ‘in vitro’ έρευνα των Devlieghere et al. (2004) παρατηρήθηκε ότι ο *Bacillus cereus* ήταν πολύ ευαίσθητος στην χιτοζάνη. Οι Kanatt et al. (2008) πειραματίστηκαν με την δράση ενός σύμπλοκου χιτοζάνης-γλυκόζης είναι (μια τροποποιημένη μορφή της χιτοζάνης, που παρασκευάστηκε με θέρμανση χιτοζάνης με γλυκόζη) έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Bacillus cereus* σε θρεπτικό ζωμό. Σε συγκεντρώσεις 0,05% έως 0,2% σύμπλοκου χιτοζάνης-γλυκόζης, η ανάπτυξη του *B. cereus* αναστάλη εντελώς και δεν ανιχνεύτηκαν βιώσιμα κύτταρα μετά από 24 ώρες στους 37° C (αρχικός πληθυσμός παθογόνου ίσος με  $10^4$  cfu/ml). Στην μελέτη των Mellegard et al. (2011) αναφέρεται ότι η χιτοζάνη εκτός από την αντιβακτηριακή δραστηριότητα έναντι βλαστικών κυττάρων του *B. cereus*, είναι σε θέση να καταστείλει και την ανάπτυξη των σπορίων του. Διάλυμα χιτοζάνης - πολυβινυλικής αλκοόλης δείχνει ανασταλτική δράση έναντι του *B. subtilis* (το ανασταλτικό αποτέλεσμα μετρήθηκε με βάση τη διαυγή ζώνη γύρω από κυκλικές λωρίδες μεμβράνης/ διαλύματος) (Tripathi et al., 2009). Η προσθήκη 2.000 ppm χιτοζάνης χαμηλού μοριακού βάρους στο νερό άβραστου ρυζιού, πριν τη θερμική επεξεργασία του ρυζιού σε ατμό, ανέστειλε αποτελεσματικά τόσο την ολική μεσόφιλη χλωρίδα,



όσο και τον *B. cereus* στο θερμικά επεξεργασμένο ρύζι που συντηρήθηκε στους 37 και 18° C (Tsai et al., 2006).

---

### 3.4. Συμπεράσματα

---

- Η χιτοζάνη δεν φάνηκε να μειώνει σημαντικά τον πληθυσμό της *Listeria spp.*, όταν αυτή ενοφθαλμίστηκε στο φύλλο σε πληθυσμό 10<sup>3</sup> cfu/g. Η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο μείωσε τον πληθυσμό της *Listeria spp.* κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες. Συνεπώς, η προσθήκη χιτοζάνης σε φύλλο ενοφθαλμισμένο με *Listeria spp.* μειώνει στατιστικά σημαντικά την OMX του προϊόντος ανεξάρτητα από το αρχικό εμβόλιο του παθογόνου, ενώ η δράση της έναντι της *Listeria spp.* είναι σημαντική μόνο όταν ο πληθυσμός του παθογόνου είναι υψηλός, αφού παρουσιάζει πιο αδύναμη δράση όταν η συγκέντρωση παθογόνου στο προϊόν είναι χαμηλή.
- Όταν η *Escherihia coli* ενοφθαλμίστηκε στο φύλλο σε πληθυσμό 10<sup>3</sup> cfu/g τόσο ο πληθυσμός της OMX (OE1) όσο και εκείνος της *Escherihia coli* (E1) αυξήθηκαν κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες, ενώ στο φύλλο με την προσθήκη χιτοζάνης, οι πληθυσμοί της OMX (OEC1) και της *Escherihia coli* (EC1) μειώθηκαν κατά περίπου 1 λογαριθμική μονάδα. Συνεπώς η προσθήκη της χιτοζάνης μειώνει την OMX κατά 3 λογαριθμικές μονάδες και τον πληθυσμό της *Escherihia coli* κατά 2,0 λογαριθμικές μονάδες. Παρόμοιο προφίλ ανάπτυξης ελήφθη όταν ενοφθαλμίστηκε στο φύλλο μεγαλύτερος πληθυσμός του ίδιου βακτηρίου. Στην περίπτωση αυτή η προσθήκη της χιτοζάνης μειώνει την OMX κατά 2 λογαριθμικές μονάδες και τον πληθυσμό της *Escherihia coli* κατά 3 λογαριθμικές μονάδες.
- Ενοφθαλμίζοντας το φύλλο με 10<sup>3</sup> cfu/g *Salmonella enterica* παρατηρείται ότι ο πληθυσμός της OMX (OS1) είναι υψηλότερος κατά 4 λογαριθμικές μονάδες από εκείνον της *Salmonella enterica* (S1) στο φύλλο χωρίς την προσθήκη χιτοζάνης, ενώ ο πληθυσμός της OMX (OSC1) είναι υψηλότερος κατά περίπου 3,5 λογαριθμικές μονάδες από εκείνον της *Salmonella enterica* (SC1) παρουσία

χιτοζάνης. Η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο μειώνει τους πληθυσμούς της OMX και της *Salmonella enterica* κατά 2 και 1,5 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Σε πληθυσμό  $10^5$  cfu/g ελήφθη ένα διαφορετικό προφίλ ανάπτυξης, όπου ο παθογόνος μικροοργανισμός σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται να επικρατεί στην μικροχλωρίδα του προϊόντος. Η προσθήκη χιτοζάνης στο φύλλο μειώνει τους πληθυσμούς της OMX και της *Salmonella enterica* κατά 2,5 και 2 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα.

- Τόσο σε πληθυσμό  $10^3$  cfu/g, όσο και σε  $10^5$  cfu/g ο *Bacillus cereus* επικράτησε στην μικροχλωρίδα του παραδοσιακού φύλλου για πίτα. Όταν ο *Bacillus cereus* ενοφθαλμίστηκε στο φύλλο σε πληθυσμό  $10^3$  cfu/g η OMX (OB1) και ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού (B1) στο δείγμα χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακής ουσίας είναι υψηλότερα κατά περίπου 2,5 λογαριθμικές μονάδες από του αντίστοιχους πληθυσμούς του δείγματος με χιτοζάνη (OBC1 και BC1). Παρόμοιο προφίλ ανάπτυξης παρατηρείται και με το μεγαλύτερο πληθυσμό *Bacillus cereus* στο φύλλο. Συγκεκριμένα, η OMX (OB2) και ο πληθυσμός του παθογόνου (B2) του δείγματος, χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα, είναι υψηλότεροι κατά περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες από τους αντίστοιχους πληθυσμούς του δείγματος με την προσθήκη χιτοζάνης (OBC2 και OB2).
- Η προσθήκη της χιτοζάνης στο φύλλο μείωσε τον πληθυσμό όλων των υπό εξέταση παθογόνων βακτηρίων στο προϊόν, τόσο σε υψηλό ( $10^5$  cfu/g) όσο και σε χαμηλό ( $10^3$  cfu/g) πληθυσμό αυτών. Αποδείχτηκε λοιπόν ισχυρός αντιμικροβιακός παράγοντας στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα, αφού μείωσε αισθητά τον πληθυσμό των παθογόνων βακτηρίων *Listeria spp.*, *Escherihia coli*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus*.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:**

**Μελέτη της Επίδρασης της Συσκευασίας και Φυσικών Αντιμικροβιακών Παραγόντων (Citrox και Ναταμυκίνης) στα Ποιοτικά Χαρακτηριστικά της Παραδοσιακής Ελληνικής Σαλάτας «Τζατζίκι» συντηρημένης υπό Ψύξη (4° C)**

---

### **4.1. Σκοπός των Πειραμάτων**

---

Ο σκοπός των πειραμάτων του συγκεκριμένου Κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβιας και συσκευασίας κενού) και της επιμέρους ή /και της συνδυαστικής επίδρασης των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών: εκχυλίσματος εσπεριδοειδών (Citrox) και ναταμυκίνης, στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής ενός Ελληνικού προϊόντος, το τζατζίκι (μια Ελληνική παραδοσιακή σαλάτα), κατά την συντήρηση του υπό ψύξη (4 °C). Η ολική ποιότητα του προϊόντος αξιολογήθηκε μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και οργανοληπτικά.

---

### **4.2. Υλικά και Μέθοδοι**

---

#### **4.2.1. Προετοιμασία των δειγμάτων**

Το τζατζίκι παράχθηκε από την εταιρία παραγωγής έτοιμων, φρέσκων σαλατών «ΑΜΒΡΟΣΙΑ ΕΠΕ», της οποίας το εργοστάσιο βρίσκεται στην Βιομηχανική Περιοχή Σίνδου, Θεσσαλονίκη. Το τζατζίκι μεταφέρθηκε συσκευασμένο εντός

κατάλληλου περιέκτη (τάπερ), περιεκτικότητας 20 kg, στο εργαστήριο την ημέρα παραγωγής του κι εντός φορητού ψυγείου επικαλυμμένο με πάγο. Το τζατζίκι που παρελήφθη δεν περιείχε συντηρητικά (τόσο το τελικό προϊόν, όσο και τα επιμέρους συστατικά του).

Το εκχύλισμα εσπεριδοειδών (Citrox) με την ονομασία ProGarda 14WPlus ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας POLYPAN GROUP SA (Μοσχάτο- Αττικής) σε μορφή διαλύματος. Τα συστατικά του διαλύματος ήταν: εκχύλισμα του *Citrus Aurantium amara* (νεράτζι), νερό, κιτρικό οξύ και γλυκερίνη. Το Citrox έχει χρώμα φαιοκίτρινο (κεχριμπαρί) έως καφέ, είναι υγρό, χημικά σταθερό, έχει pH = 2.7, διαλυτό στο νερό και την αλκοόλη και είναι κατά 98% βιοδιασπώμενο. Είναι μη τοξικό διάλυμα. Το ProGarda 14WPlus μπορεί να προστεθεί στα τρόφιμα σε συγκέντρωση 0,2% v/w έως 0,5% v/w (<http://www.polypan.gr/products.cfm?catID=102>). Η ναταμυκίνη, της οποίας τα χαρακτηριστικά αναφέρονται στο κεφάλαιο 2 (σελίδα 90), χρησιμοποιήθηκε σε μορφή σκόνης (όπως ακριβώς αγοράστηκε).

Για τις ανάγκες των πειραμάτων κι υπό ασηπτικές συνθήκες ελήφθησαν περίπου 100 g ( $\pm$  5g) τζατζίκι μέσα σε κάθε σακούλα συσκευασίας. Συγκεκριμένα τα δείγματα χωρίστηκαν και συσκευάστηκαν στις εξής μεταχειρίσεις:

- AT:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες (μάρτυρας).
- VT:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- ATK:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη Citrox (2ml/kg).
- VTK:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη Citrox (2ml/kg).
- ATN:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- VTN:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm).
- ATKN:** Τζατζίκι σε συσκευασία αέρα με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm) και Citrox (2ml/kg).
- VTKN:** Τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη ναταμυκίνης (20 ppm) και Citrox (2ml/kg).

Επίσης στο παρόν Κεφάλαιο χρησιμοποιούνται οι εξής συντομογραφίες:

- VT:** Εκτίμηση της γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

- VKG:** Εκτίμηση της γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).
- VO:** Εκτίμηση της οσμής σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- VKO:** Εκτίμηση της οσμής σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).
- MOV:** Μέσος όρος οσμής και γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- MOVK:** Μέσος όρος οσμής και γεύσης σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX(2ml/kg).
- OV10:** Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- OVK10:** Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).
- ZV10:** Ζύμες και Μύκητες σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- ZVK10:** Ζύμες και Μύκητες σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).
- MV10:** Οξυγαλακτικά Βακτήρια σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- MVK10:** Οξυγαλακτικά Βακτήρια σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό με την προσθήκη CitroX (2ml/kg).

Το τζατζίκι στις μεταχειρίσεις χωρίς την προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών τοποθετήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, μέσα στη σακούλα συσκευασίας και στη συνέχεια συσκευάστηκε σε αέρα (AT) και σε κενό (VT). Στις μεταχειρίσεις ATN και VTN 20 rpm ναταμυκίνη σε μορφή σκόνης προστέθηκε απευθείας στο τζατζίκι και στη συνέχεια ανακατεύθηκε με αποστειρωμένη γυάλινη ράβδο για 15 λεπτά, ώστε να αναμιχτεί πλήρως με το τζατζίκι και να κατανεμηθεί ομοιόμορφα η ναταμυκίνη στην μάζα του προϊόντος. Στη συνέχεια, όπως και προηγουμένως, τα δείγματα συσκευάστηκαν σε αέρα (ATN) και κενό (VTN), αντίστοιχα. Για τις μεταχειρίσεις ATK και VTK σε 100 g προϊόντος προστέθηκαν 0,2 ml από το διάλυμα CitroX και ακολούθησε μάλαξη για δέκα λεπτά, στη σακούλα συσκευασίας με το προϊόν και το

διάλυμα CitroX, ώστε να επιτευχθεί η όσο το δυνατόν καλύτερη ανάμιξη του διαλύματος και να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία του δείγματος. Αμέσως μετά τα δείγματα συσκευάστηκαν σε αέρα (ATK) και κενό (VTK). Τέλος, στα δείγματα ATKΝ και VTKΝ αρχικά έγινε η προσθήκη στο τζατζίκι 20 ppm ναταμυκίνης (όπως περιγράφεται παραπάνω για τα ATN και VTN) σε 100 g τζατζίκι σε σακούλα συσκευασίας και στη συνέχεια προστέθηκαν 0,2 ml διαλύματος CitroX (όπως στις μεταχειρίσεις ATK και VTK). Μετά την μάλαξη/ανάμιξη των δειγμάτων ακολούθησε η συσκευασία των δειγμάτων σε αέρα (ATKN) και σε κενό (VTKN). Σημειώνεται ότι τόσο η προσθήκη της σκόνης της ναταμυκίνης όσο και του διαλύματος CitroX έγιναν κάτω από ασηπτικές συνθήκες (χρήση αποστειρωμένων γαντιών, ύπαρξη λύχνου Bunsen, αποστειρωμένα σκεύη, αποστειρωμένο νερό για την παρασκευή διαλυμάτων) προκειμένου να αποφευχθεί τυχόν επιμόλυνση των δειγμάτων.

Η σακούλα συσκευασίας η οποία χρησιμοποιήθηκε φέρει τις προδιαγραφές που αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 92). Επίσης τα δείγματα συσκευάστηκαν στη ίδια μηχανή συσκευασίας και με τον ίδιο χρόνο θερμοσυγκόλλησης που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 92). Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν εντός ψυγείου ( $4 \pm 0.5$  °C) και οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις εξής ημέρες: 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 (δείγματα που συσκευάστηκαν σε αέρα) και 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70 (δείγματα που συσκευάστηκαν σε κενό).

#### **4.2.2. Μικροβιολογική ανάλυση**

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε βάσει των επισήμων μεθόδων ανάλυσης της American Public Health Association (APHA, 1984). Μελετήθηκαν τα ακόλουθα είδη μικροοργανισμών (δεικτών) αλλοίωσης: α) Ολική μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.), β) Εντεροβακτήρια, γ) Γαλακτικά βακτήρια, δ) Ζύμες και Μύκητες, ε) Εντερόκοκκοι και στ) Ψευδομονάδες. Ποσότητα δείγματος 10 g από το τζατζίκι μεταφέρθηκε ασηπτικά εντός αποστειρωμένης σακούλας Stomacher (Seward Medical, London, UK) που περιείχε 90 mL αποστειρωμένο πεπτονόχο διάλυμα (BPW, Merck, Darmstadt, Germany) 0,1% w/v και στη συνέχεια το δείγμα ομογενοποιήθηκε για 60 sec με τη βοήθεια ομογενοποιητή Lab Blender 400 Stomacher (Seward Medical, London, UK). Για τη μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του αρχικού

διαλύματος της ομογενοποιημένης σαλάτας Τζατζίκι σε πεπτονούχο διάλυμα 0,1% w/v.

Η Ολική μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.), τα Εντεροβακτήρια, τα Γαλακτικά βακτήρια, οι Ζύμες και Μύκητες και οι Εντερόκοκκοι προσδιορίστηκαν ακριβώς όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 93). Οι Ψευδομονάδες προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, 0,1 mL δείγματος κατάλληλης αραιώσης απλώνεται στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού σε πλαστικά τρυβλία με αποστειρωμένη ράβδο στο θρεπτικό υπόστρωμα (Certimide Fusidin Cephaloridine Agar (CFC)) στο οποίο έγινε προσθήκη αντιβιοτικού με κωδικό SR 103. Τα τρυβλία στη συνέχεια επώαστηκαν στους 30 °C για 48 h. Μετά την επώαση των τρυβλίων έγινε ο έλεγχος οξειδάσης και καταμετρήθηκαν οι αποικίες που ήταν θετικές στην οξειδάση (λευκές και υπόλευκες αποικίες). Όλες οι αναλύσεις και οι μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, δηλ. για κάθε περίπτωση αναλύθηκαν 2 δείγματα (n=2). Όλα τα θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν με βάση τις οδηγίες που αναγράφονταν στη συσκευασία τους και τα διαλύματα αποστειρώθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121 °C για 15 min, πλην του VRBGA, που παρασκευάστηκε με βρασμό. Τα υποστρώματα (αποστειρωμένα διαλύματα υλικών) διατηρήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $48 \pm 1^\circ\text{C}$ , πριν τη χρήση τους.

#### **4.2.3. Προσδιορισμός του pH**

Η μέτρηση του pH έγινε ακριβώς με τον ίδιο τρόπο όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 94).

#### **4.2.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση**

Ειδικά εκπαιδευμένη ομάδα πέντε μελών του Εργαστηρίου Χημείας και Μικροβιολογίας Τροφίμων αξιολόγησε το προϊόν ως προς το χρώμα, την οσμή και την γεύση. Η πενταμελής ομάδα είχε προηγουμένως συμμετάσχει σε προκαταρκτικές δοκιμές, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 6-8 εβδομάδων, έτσι ώστε τα μέλη της να εξοικιωθούν με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση προϊόντος. Η οργανοληπτική εκτίμηση έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο, έτσι ώστε να μην επηρεάζονται μεταξύ τους οι κριτές, και υπό σταθερές συνθήκες φωτός

και θερμοκρασίας (18° C). Η ομάδα των κριτών αξιολόγησε το χρώμα, την οσμή και την γεύση στο τζατζίκι χρησιμοποιώντας κλίμακα βαθμολογίας 1 έως 9. Βαθμολογία ίση με 9 συνεπάγεται με άριστο προϊόν και βαθμολογία ίση με 1 με ακατάλληλο για κατανάλωση προϊόν. Βαθμολογία ίση με 5 θεωρείται ως το κατώτερο όριο αποδοχής του προϊόντος, συνεπώς βαθμολογία <5 καταδεικνύει μη αποδεκτό προϊόν (Singh και Muthukumarappan, 2008). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τέτοιο τρόπο ώστε οι κριτές να μην επηρεάζονται μεταξύ τους και μεταξύ των δειγμάτων καταναλώθηκε νερό και ψωμί προκειμένου να υπάρχει ξεκάθαρη διάκριση των γεύσεων.

#### **4.2.5. Στατιστική επεξεργασία**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 95).

---

### **4.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση**

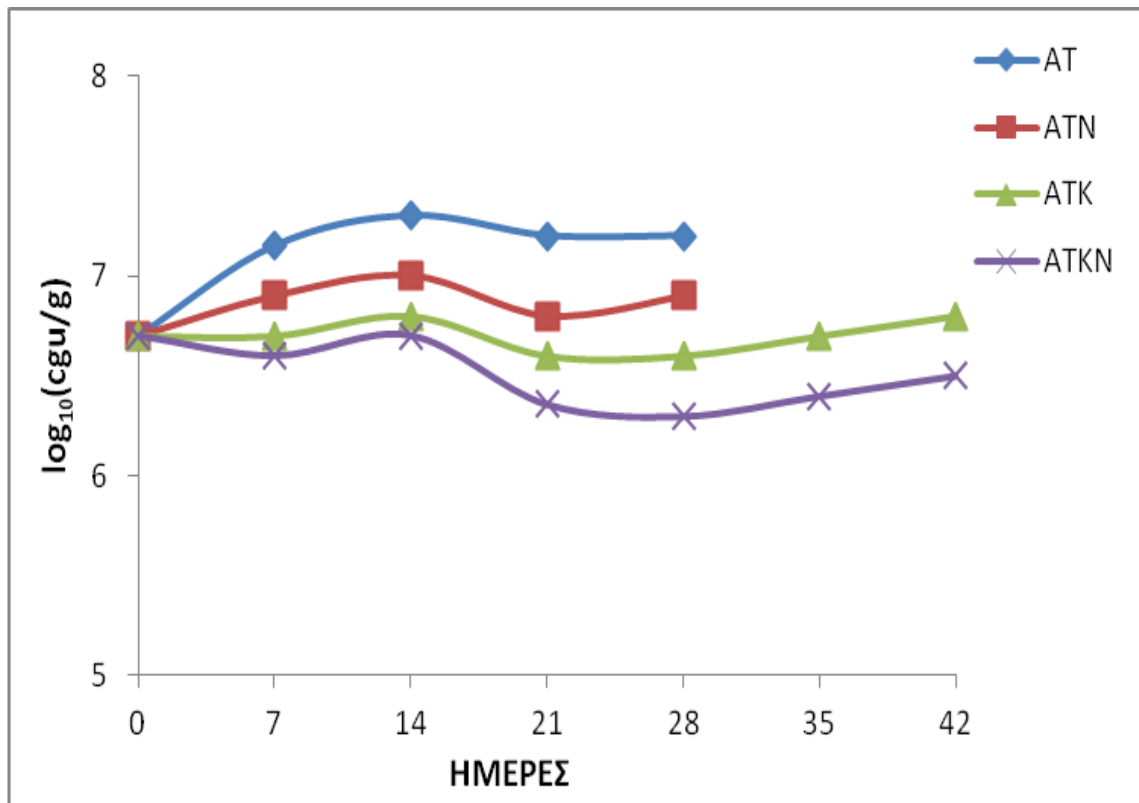
---

#### **4.3.1. Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στο τζατζίκι στους 4° C**

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.) είναι το σύνολο των αερόβιων μεσόφιλων μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα τρόφιμο και αποτελεί δείκτη αλλοίωσης των τροφίμων. Για το λόγο αυτό θα πρέπει να μην υπερβαίνει το καθορισμένο ανώτατο μικροβιολογικό όριο, το οποίο είναι  $7 \log_{10}(\text{cfu/g})$  ή  $10^7 \text{ cfu/g}$ , σύμφωνα με την ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1986). Στην περίπτωση όμως προϊόντων ζύμωσης, όπως είναι το γιαούρτι και κατ' επέκταση το τζατζίκι, η καλλιέργεια εκκίνησης (οξυγαλακτικά βακτήρια) ανεβάζει την αρχική τιμή της, πράγμα επιθυμητό για την απόκτηση ελκυστικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (χαρακτηριστική υπόξινη γεύση γιαουρτιού). Κατά συνέπεια, η O.M.X., ως δείκτης αλλοίωσης δεν είναι το κριτήριο



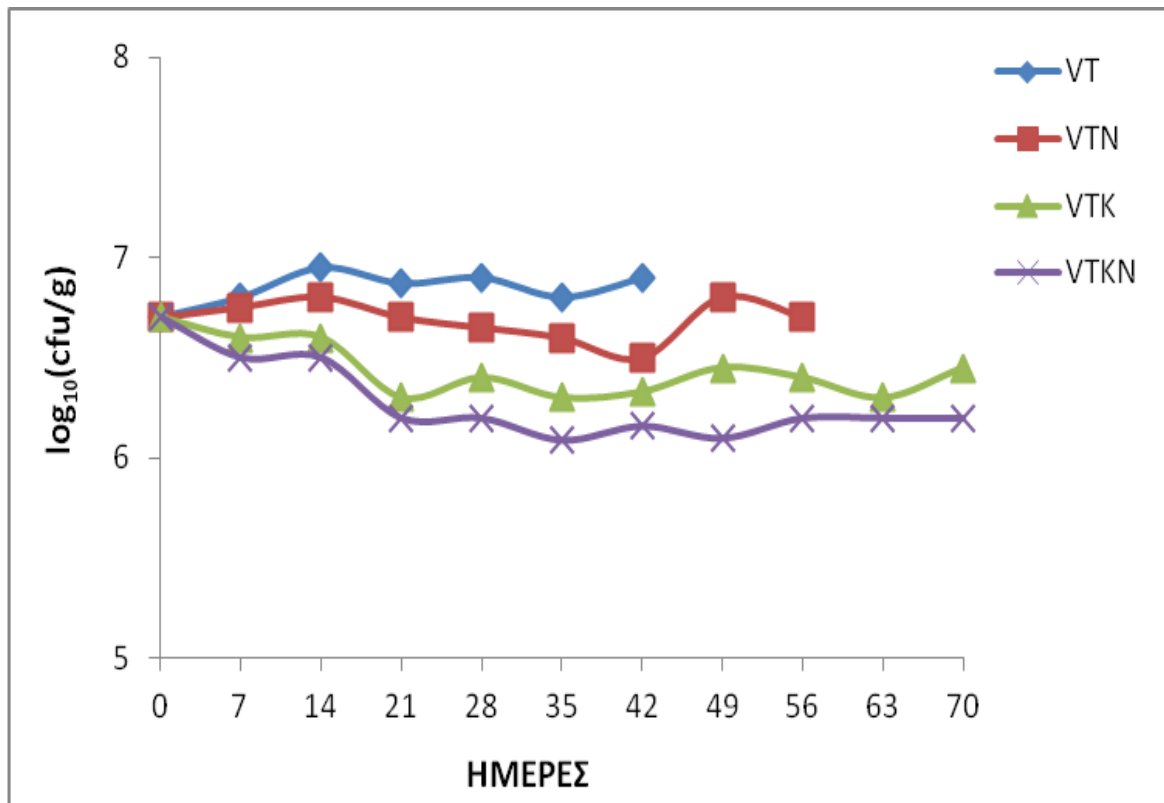
που θα ληφθεί υπ' όψιν στην παρούσα μελέτη για την αποδοχή ή απόρριψη του προϊόντος. Συνεπώς για τις ανάγκες του παρόντος πειράματος, άλλοι ειδικοί μικροοργανισμοί αλλοίωσης και συγκεκριμένα, οι ζύμες, ενδεχομένως, να είναι αποφασιστικό κριτήριο ποιότητας του υπό εξέταση προϊόντος.



**Γράφημα 34 :** Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στο τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Ο αρχικός πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας στο τζατζίκι ήταν 6,7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Για ανάμεικτες σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση έχουν αναφερθεί τιμές ολικής μεσόφιλης χλωρίδας που κυμαίνονταν από 2 έως 7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  (Angelidis et al., 2006; Aycicek et al., 2004; Kubheka et al., 2001; Mosurpye και von Holy, 2000). Οι Dlamini και Buys (2009) αναφέρουν αρχικό πληθυσμό ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ίσο με 5,8  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε Amasi (ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης του γάλακτος με pH= 4,0, που καταναλώνεται σε όλες τις περιοχές της Νότιας Αφρικής) και οι Tamagnini et al. (2005) OMX ίση με 5,89  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε

γίδινο τυρί. Σε μία άλλη μελέτη εξετάστηκαν 100 δείγματα γιαουρτιού (πέντε δείγματα από καθεμιά από είκοσι εμπορικές μάρκες που παράγουν γιαούρτι) και αγοράστηκαν τυχαία από διάφορα καταστήματα στην παροχή Minna (που ανήκει στο κράτος του Νίγηρα). Βρέθηκε ότι ο συνολικός αριθμός βακτηρίων (OMX) κυμαίνονταν από  $1,0 \times 10^7$  έως  $9,4 \times 10^7$  cfu/ml (Oyeleke, 2009).



**Γράφημα 35:** Μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (O.M.X.) σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε συσκευασία κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Είναι φανερό στο Γράφημα 34 ότι η OMX αυξήθηκε κατά  $0,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στα AT, κατά  $0,2 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στα ATN, ενώ έμεινε σταθερή στα ATK δείγματα και μειώθηκε κατά  $0,3 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στα ATKΝ. Αυτό σημαίνει ότι η προσθήκη ναταμυκίνης στο τζατζίκι μείωσε την OMX κατά  $0,3 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , ενώ η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox κατά  $0,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , και η προσθήκη των δύο αντιμικροβιακών ουσιών κατά  $0,8 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Στο Γράφημα 35 φαίνεται ότι η OMX αυξήθηκε ελαφρώς ( $\sim 0,2 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) στα VT, παρέμεινε πρακτικά σταθερή στα

VTN, μειώθηκε κατά περίπου 0,3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  στα VTK και μειώθηκε κατά 0,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  στα VTKN δείγματα. Αυτό σημαίνει ότι στο τζατζίκι που συσκευάστηκε υπό κενό η προσθήκη ναταμυκίνης μείωσε την OMX κατά 0,2  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX κατά 0,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  και η προσθήκη και των δύο αντιμικροβιακών ουσιών κατά περίπου 1 λογάριθμο. Συμπεραίνεται συνεπώς ότι η μείωση της OMX (και στις δύο συσκευασίες) του προϊόντος που επέφερε η προσθήκη ναταμυκίνης δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $P > 0,05$ ), ενώ η μείωση που επιτεύχθηκε με την προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX στο προϊόν, μόνο του ή σε συνδυασμό με ναταμυκίνη, είναι στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ). Αν συγκριθούν τα δείγματα του προϊόντος που συσκευάστηκαν σε αέρα με εκείνα που συσκευάστηκαν σε κενό, όσον αφορά την ανάπτυξη της OMX συμπεραίνεται ότι: (α) η ανάπτυξη της OMX στο VT ήταν μικρότερη κατά 0,3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το AT, (β) η ανάπτυξη της OMX στο VTN είναι ανεπαίσθητα μικρότερη σε σχέση με το ATN, (γ) η ανάπτυξη της OMX στο VTK ήταν μικρότερη κατά 0,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το ATK και (δ) η ανάπτυξη της OMX στο VTKN ήταν μικρότερη κατά 0,4  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με το ATK. Συνεπώς η συσκευασία κενού διατηρεί καλύτερα το τζατζίκι (από άποψη ανάπτυξης της OMX).

Σε παρόμοιες μελέτες ανάλογα αυξήθηκε η OMX και σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες που συσκευάστηκαν σε αέρα. Οι Skalina και Nikolajeva (2010) εξέτασαν τρεις σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση (3 και 7 ° C για 48 ώρες): Σαλάτα με μαγιονέζα, γαρίδες και ντομάτα, σαλάτα με μαγιονέζα και καπνιστό ζαμπόν και σαλάτα με μαγιονέζα, τυρί και σκόρδο. Η αρχική μεσόφιλη χλωρίδα για τις δύο πρώτες σαλάτες ήταν 4,0  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  και 3,4  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  για την τελευταία σαλάτα. Μετά από 48 h στους 3° C ο πληθυσμός τους αυξήθηκε κατά περίπου 1, 1,2 και 1,4  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  στην σαλάτα με γαρίδα, σαλάτα με ζαμπόν και σαλάτα με τυρί και σκόρδο, αντίστοιχα.

Τα φλαβονοειδή (που υπάρχουν στο εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX) έχουν δείξει αντιμικροβιακή δράση σε αρκετές μελέτες (Cushnie και Lamb, 2005). Τα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών (τα οποία επίσης περιέχουν φλαβονοειδή) έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, καθώς και ζύμες, μύκητες και παθογόνα βακτήρια στα τρόφιμα (Deans και Ritchie, 1987). Η προσθήκη

του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX σε κοτόπουλο συσκευασμένο σε αέρα αύξησε τον χρόνο ζωής του προϊόντος (δηλ. η OMX ξεπέρασε το μικροβιολογικό όριο των  $7 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) κατά 1 και 2 ημέρες σε συγκέντρωση 0,1 ml/100g και 0,2 ml/100g, αντίστοιχα (Mexis et al., 2012). Ακόμη, η χρήση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX για την πλύση εσκαρόλ και μαρουλιού μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό της OMX και στα δύο στα λαχανικά, σε σύγκριση με εκείνα που πλύθηκαν με νερό (Allende et al., 2008). Επιπλέον, το εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX περιέχει μεταξύ των άλλων και κιτρικό οξύ, το οποίο είναι δυνατόν να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση (αφού το τζατζίκι έχει χαμηλό pH). Η αντιμικροβιακή δράση των ασθενών οργανικών οξέων οφείλεται στη συγκέντρωση του αδιάστατου οξέος, εξαρτάται μεταξύ άλλων κι από το pH του μέσου (όσο χαμηλότερο είναι το pH, τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αδιάστατου οξέος) (Kasrazadeh και Genigeorgis, 1994). Επίσης, η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων αποδίδεται σε μείωση του pH του τροφίμου, τη μείωση του εσωτερικού pH των μικροβιακών κυττάρων από τον ιονισμό των όξινων μορίων, και τη διακοπή της μεταφοράς υποστρώματος μεταβάλλοντας τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Jay et al., 2005). Οι Del Rio et al. (2007) ανέφεραν ότι η εμβάπτιση (15 λεπτά,  $18 \pm 1^\circ \text{C}$ ) φρέσκου κοτόπουλου σε 2 ml κιτρικού οξέος/100 ml διαλύματος μείωσε την OMX του τροφίμου κατά  $1,2 \log \text{cfu} / \text{g}$ , σε σύγκριση με το control.

Ακόμη το λίπος (η στραγγιστή γιαούρτη έχει 10% λιποπεριεκτικότητα; Ζερφυρίδης, 2001) του εξεταζόμενου τροφίμου (τζατζίκι) πιθανώς να μην επιτρέπει την σωστή δράση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX. Οι Dabbah et al. (1970) αναφέρουν ότι η επίδραση του αιθέριου ελαίου πορτοκαλιού σε παστεριωμένο γάλα σε συγκέντρωση 1,000 ml ανά λίτρο (για 52 ημέρες στους  $4^\circ \text{C}$ ) εξαρτιόνταν από την περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες του γάλακτος. Επομένως, παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών του γάλακτος κατά 7 λογάριθμους σε αποβουτυρωμένο γάλα, 4 λογάριθμους σε γάλα με χαμηλά λιπαρά και 3 λογάριθμους σε πλήρες γάλα, ενώ σε σοκολατούχο γάλα δεν υπήρχαν διαφορές, σε σχέση με το control. Οι υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων στο τρόφιμο δημιουργούν ένα στρώμα γύρω από τα βακτήρια, αποτρέποντας έτσι τα έλαια να απορροφώνται εντός του κυττάρου (Holley και Patel, 2005). Σε αντίθεση με τα λίπη οι υδατάνθρακες δεν θεωρείται ότι προστατεύουν τα βακτήρια από την αντιμικροβιακή δράση του

αιθέριων ελαίων (Shelef et al., 1984), οπότε δεν επηρεάζεται η δράση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox από τα λαχανικά που περιέχει το τζατζίκι.

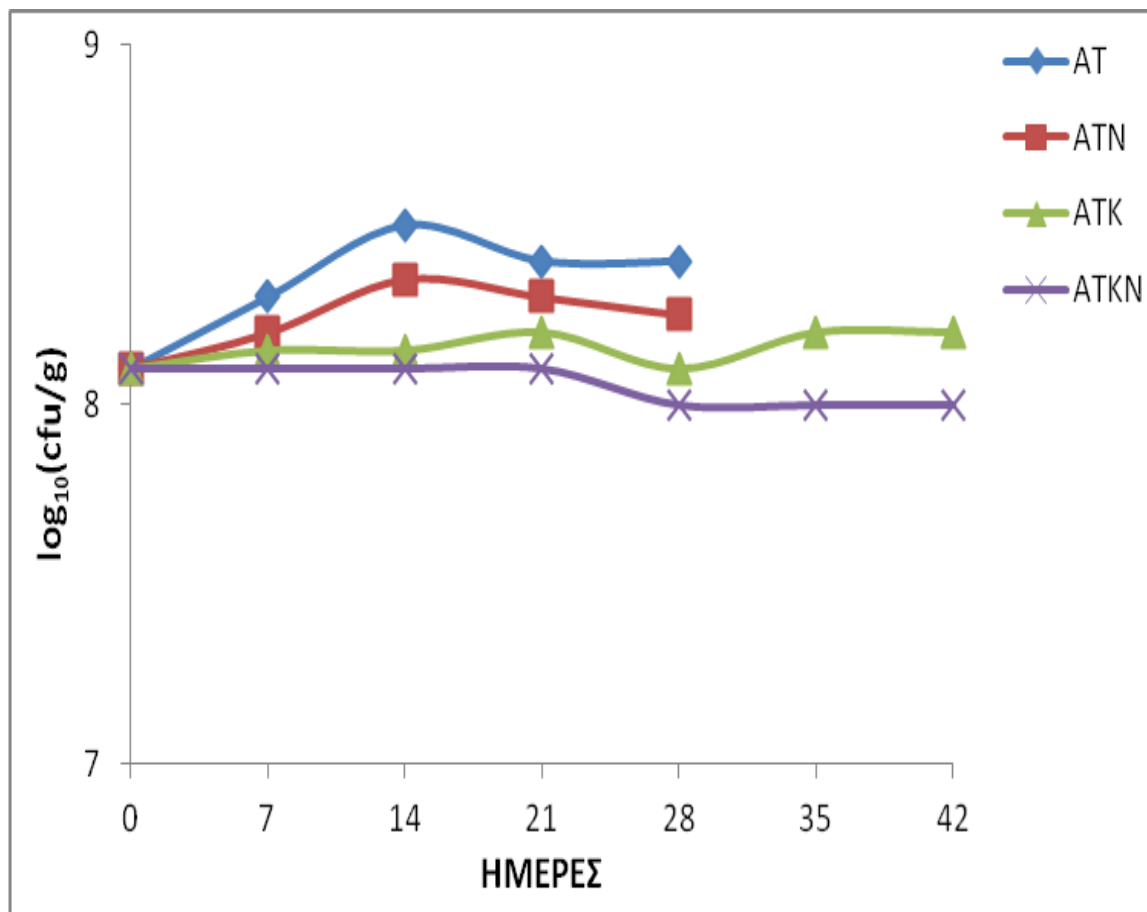
Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να λειτουργεί ανασταλτικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο τζατζίκι είναι η προσθήκη σε αυτό μικρής ποσότητας σκόρδου. Το αιθέριο έλαιο του άνηθου (*Anethum graveolens* L.) έδειξε ασθενή δράση έναντι των Gram - αρνητικών βακτηρίων και του *Staphylococcus aureus*, ενώ δεν έδειξε καμία δράση έναντι των Gram - θετικών βακτηρίων (Delaquis et al., 2002). Επίσης το αιθέριο έλαιο του σκόρδου έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* σε συγκέντρωση 3% ενσωματωμένο στο φιλμ ενεργού συσκευασίας (Seydim και Sarikus, 2006). Επιπλέον, η προσθήκη φρέσκου σκόρδου και σκόνης σκόρδου στο λουκάνικο από κοτόπουλο μείωσε σημαντικά την ολική μεσόφιλη χλωρίδα του προϊόντος (Sallam et al., 2004).

#### **4.3.2. Μεταβολή του πληθυσμού των Οξυγαλακτικών Βακτηρίων στο τζατζίκι στους 4° C**

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μικροοργανισμοί που ζυμώνουν την γλυκόζη είτε αποκλειστικά προς γαλακτικό οξύ (ομοζυμωτικοί), είτε κυρίως γαλακτικό οξύ και άλλα παράγωγα (ετεροζυμωτικοί). Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια και δίνουν αρνητική αντίδραση στην καταλάση. Πρόκειται για προαιρετικά αναερόβια βακτήρια με αντιπροσωπευτικά γένη τα είδη: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1987). Με το θρεπτικό υπόστρωμα MRS προσδιορίζονται κυρίως τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και δευτερευόντως των γενών, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 1993).

Ο αρχικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι ήταν αρκετά υψηλός και ίσος με  $8,1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Γραφήματα 36 και 37). Οι Salvador και Fiszman (2004) μέτρησαν αρχικό πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων σε γιαούρτι με γεύση φράουλας ίσο με  $8,6 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Οι Beukes et al. (2001) αναφέρουν πληθυσμό οξυγαλακτικών βακτηρίων ίσο με  $8,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε παραδοσιακά γάλατα που έχουν υποστεί ζύμωση της Νότιας Αφρικής. Οι Rogga et al. (2005) και οι Kikidou et al. (2007) εξέτασαν γαλοτύρι με  $7,9 \log_{10}(\text{cfu/g})$  και  $8,0$  αρχικό πληθυσμό

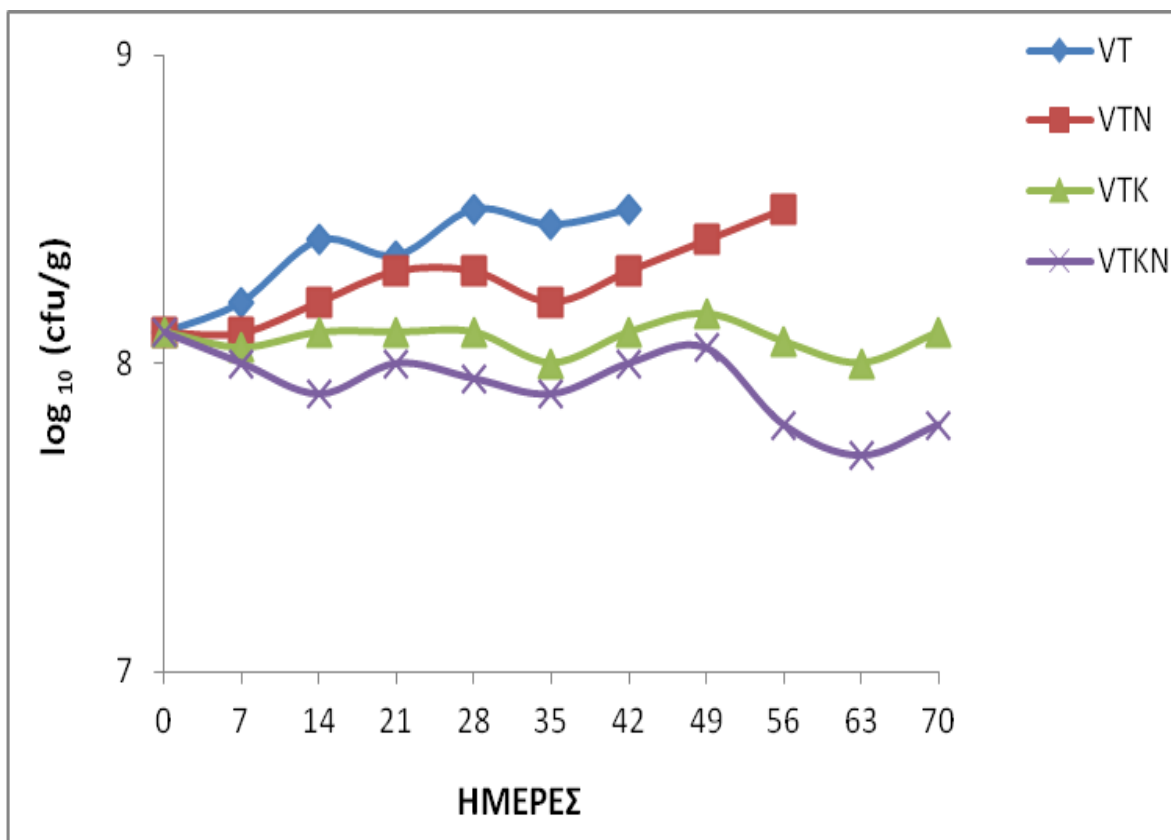
γαλακτοβάκιλλων, αντίστοιχα. Υψηλούς πληθυσμούς γαλακτικών βακτηρίων σε γιαούρτι αναφέρουν και οι Talon et al. (2002), συγκεκριμένα ο πληθυσμός του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* και του *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ήταν ίσος με 10,8 και 10,0  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , αντίστοιχα.



**Γράφημα 36:** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Από το Γράφημα 36 συμπεραίνεται ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξήθηκε ελαφρώς στα δείγματα AT και ATN, ενώ παρέμεινε πρακτικά σταθερός στα δείγματα ATK και ATKN. Η προσθήκη της ναταμυκίνης σε τζατζίκι συσκευασμένο σε αέρα μειώνει ελάχιστα, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά, τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι (~0,2 λογαριθμικές μονάδες), ενώ το Citrox είναι ελαφρώς πιο αποτελεσματικό (~0,4 λογαριθμικές μονάδες). Αποτελεσματικότερος όλων των μεταχειρίσεων είναι ο συνδυασμός των δύο, που

μειώνει τον πληθυσμό τους κατά 0,5 λογαριθμική μονάδα, σε σχέση με το control (AT). Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που συσκευάστηκαν υπό κενό έχει παρόμοιο προφίλ με εκείνα που συσκευάστηκαν σε αέρα, δηλαδή ο πληθυσμός τους αυξήθηκε ελαφρά στα δείγματα VT και VTN, ενώ παρέμεινε σταθερός στα δείγματα VTK και είχε μια ελαφρώς πτωτική τάση στα δείγματα VTKN. Η ναταμυκίνη, όπως αναμενόταν, δεν παρουσίασε κάποια αξιόλογη δράση έναντι των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι και στις δύο συσκευασίες (δεν δρα έναντι Gram - θετικών βακτηρίων). Αντίστοιχα, η προσθήκη ναταμυκίνης δεν φαίνεται να επηρεάζει τα οξυγαλακτικά βακτήρια σε μαύρες ελιές, όταν προστέθηκε στην άλμη τους (Hondrodimou et al., 2011).



**Γράφημα 37:** Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4°C) σε συσκευασία κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας είναι αυτά των Najgebauer-Lejko et al. (2011) που δείχνουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*) αυξήθηκε ελαφρώς στο γιαούρτι. Άλλωστε

η γιαούρτη θεωρείται ότι πρέπει να έχει άφθονη οξυγαλακτική χλωρίδα και πρέπει ακόμα και η λεγόμενη παστεριωμένη γιαούρτη να έχει ζωντανά κύτταρα τουλάχιστον  $>10^6/g$  (Ζερφυρίδης, 2001).

Στο Γράφημα 37 βλέπουμε ότι στο προϊόν που συσκευάστηκε υπό κενό η ναταμυκίνη μειώνει ελαφρώς (όχι στατιστικά σημαντικά) τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων (VTN), το εκχύλισμα εσπεριδοειδών (VTK) μειώνει τον πληθυσμό τους κατά 0,5 λογαριθμικές μονάδες και ο συνδυασμός ναταμυκίνης και Citrox (VTKN) είναι ο πιο αποτελεσματικός, σε σχέση με το τζατζίκι χωρίς αντιμικροβιακές ουσίες (VT). Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε όλα τα δείγματα, δεν έχει μεγάλες διακυμάνσεις (κυμαίνεται από 7,8 έως 8,5). Επίσης, αν συγκριθεί ο πληθυσμός τους με εκείνον όλων των υπόλοιπων υπό εξέταση μικροοργανισμών συμπεραίνεται ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα στο τζατζίκι. Ανάλογα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια επικράτησαν της μικροχλωρίδας στο Amasi (pH= 4.0), ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης του γάλακτος που καταναλώνεται σε όλες τις περιοχές της Νότιας Αφρικής. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν  $6,4 \log_{10}(cfu/g)$  την μηδενική ημέρα και αυξήθηκε σε  $8,9 \log_{10}(cfu/g)$  μετά από 1 ημέρα στους  $30^\circ C$  (Dlamini και Buys, 2009). Τα αποτελέσματα των Mataragas et al. (2011), που είναι σε πλήρη συμφωνία με τα δικά μας, έδειξαν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν η κυρίαρχη μικροχλωρίδα του γιαουρτιού με φρούτα που συντηρήθηκε στους  $5^\circ C$  (λόγω της προσθήκης σε αυτό αρχικής καλλιέργειας) και ο πληθυσμός τους κατά την αποθήκευση του προϊόντος για 60 ημέρες παρέμεινε αμετάβλητος, και μόνο στο τέλος, υπήρξε μια μικρή μείωση. Ωστόσο, οι Viljoen et al. (2003) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε γιαούρτη απλή ή/και με φρούτα μειώθηκε κατά περίπου 1 λογαριθμική μονάδα κατά την διάρκεια συντήρησής του για 30 ημέρες.

Ένας ακόμη λόγος της επικράτησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι πιθανώς να είναι το pH του προϊόντος, το οποίο κυμάνθηκε σε τιμές κοντά στο 5 (Γραφήματα 50 και 51). Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι Gram - θετικά βακτήρια, όπως τα γαλακτικά βακτήρια, σε pH 5 δεν καταστρέφονται, αλλά επιβιώνουν και συνήθως αυξάνονται (Gill και Badoni, 2004; Knarreborg et al., 2002). Άλλωστε, είναι ευρέως γνωστό ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν



δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως βακτηριοσίνες ή άλλα αντιμικροβιακά, που ενεργούν ανασταλτικά στην ανάπτυξη άλλων αλλοιωγόνων ή/και παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα (Bankole και Okagbue, 1992; Adams και Nicolaidis, 1997; Borregaard και Arneborg, 1998; Gonzalaz et al., 2007).

Είναι αξιοσημείωτο ότι, παρόλη την ραγδαία αύξηση των ζυμών (Γραφήματα 44 και 45), ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα και συνεχίζει να αυξάνεται στα δείγματα AT, ATN, VT και VTN, ενώ παραμένει πρακτικά σταθερός στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Αυτό οφείλεται, σύμφωνα με τον Fleet (1990), στο γεγονός ότι υπάρχει μία συνεργιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των ζυμομυκήτων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αφού οι ζύμες κατά τη ζύμωση που προκαλούν παράγουν ενώσεις, που ευνοούν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η άποψη αυτή συμφωνεί με την έρευνα των Liu και Tsao (2009) που μελέτησαν τις επιδράσεις των ζυμομυκήτων στην επιβίωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ζυμούμενο γάλα στους 30 °C. Οι ζυμομύκητες *Saccharomyces bayanus*, *Williopsis saturnus* var. *saturnus*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida kefyr* και *Kluyveromyces marxianus* αύξησαν την επιβίωση του *Lactobacillus bulgaricus* (αλλά όχι *Streptococcus thermophilus*) σε μικτή καλλιέργεια γιαουρτιού. Οι ζυμομύκητες *Candida krusei*, *Geotrichum candidum*, *Pichia subpelliculosa*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membrana-nifaciens*, *Schizosaccharomyces pombe* και *Y. lipolytica* βελτίωσαν την επιβίωση του *Lactobacillus rhamnosus* στο ζυμούμενο γάλα. Η *W. saturnus* var. *saturnus* ενίσχυσε την επιβίωση των *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* και *Lactobacillus reuteri*, αλλά η ίδια ζύμη απέτυχε να βελτιώσει την επιβίωση των *Lactobacillus johnsonii*, *S. thermophilus* και *L. bulgaricus* σε ζυμούμενο γάλα. Έτσι, σύμφωνα με τους Liu και Tsao (2009), προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ζυμομύκητες βοηθούν στην επιβίωση ή/και την ανάπτυξη (αύξηση του πληθυσμού) των οξυγαλακτικών βακτηρίων και φυσικά οι ειδικές επιπτώσεις των ζυμών επί της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων ποικίλουν ανάλογα με ζύμες που αναπτύσσονται, καθώς και ανάλογα με τα οξυγαλακτικά βακτήρια της αρχικής καλλιέργειας, και το ίδιο το προϊόν.

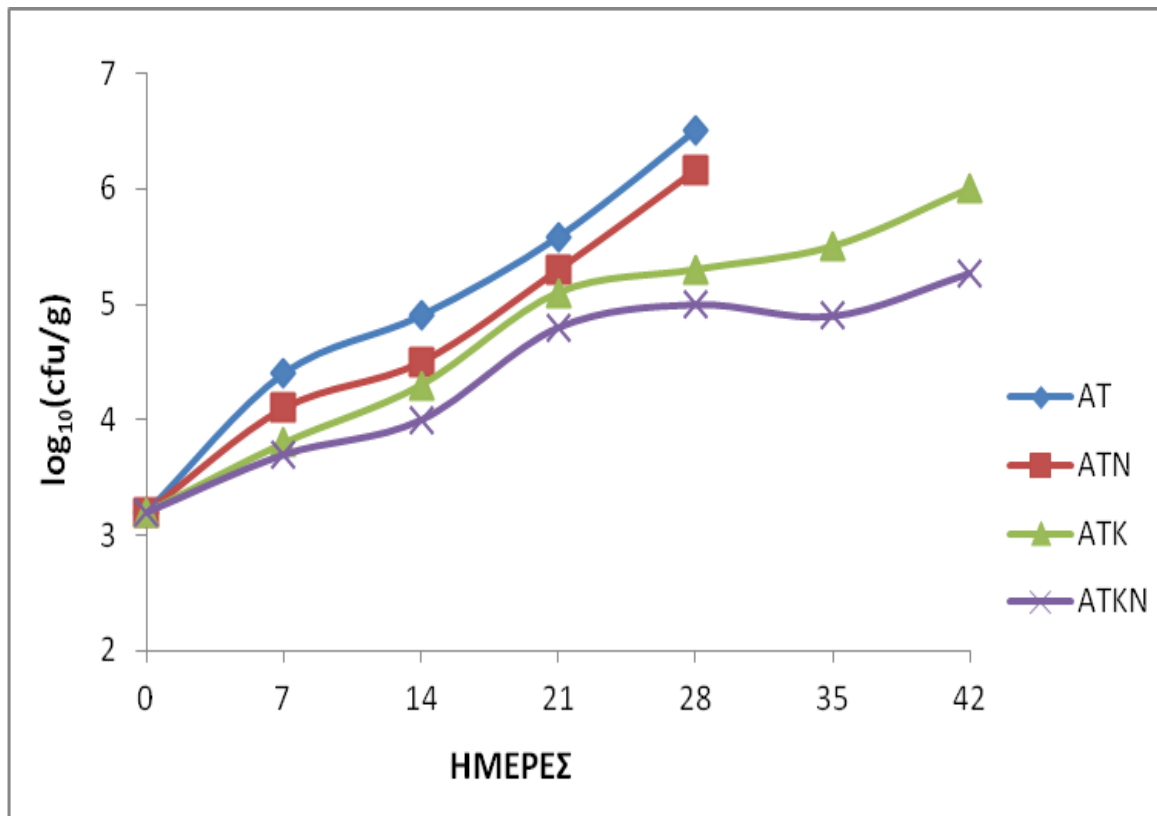
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox μείωσε τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι Karagul- Yuceer et al.

(2001) αναφέρουν ότι, από τα δύο γιαούρτια με φρούτα που εξετάστηκαν (γιαούρτι με φράουλες και γιαούρτι με λεμόνι), ο χαμηλότερος πληθυσμός *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* παρατηρήθηκε στο γιαούρτι με κομματάκια λεμονιού. Οι ερευνητές πιθανολογούν ότι σ' αυτό οφείλονταν η ανασταλτική δράση της φυσικής οξύτητας ή του αιθέριου ελαίου του λεμονιού, που χρησιμοποιούνται για τον αρωματισμό του γιαουρτιού. Επίσης, το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox είχε μικρή, αλλά στατιστικά σημαντική επίδραση επί των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε κοτόπουλο που συσκευάστηκε σε αέρα (Mexis et al., 2012). Οι Del Rio et al. (2007) ανέφεραν ότι η προσθήκη ενός διαλύματος 2% κιτρικού οξέος σε πόδια κοτόπουλου, τόσο αμέσως όσο και μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης, δεν επηρέασε την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Σε συγκέντρωση 2000 ppm τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών (λεμονιού και πορτοκαλιού) προκάλεσαν τη μείωση του πληθυσμού του *Lactobacillus plantarum* σε ( $10^6$  κύτταρα/ml) σε in vitro έρευνα (Subba et al., 1967). Οι Fernandez-Lopez et al. (2005) έβαλαν σκόνη πορτοκαλιού και λεμονιού (5% w/w) σε κεφτέδες από βοδινό κιμά και ανέφεραν ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια μειώθηκαν σε πληθυσμό  $<1,69$  λογάριθμους cfu/g μετά από 12 ημέρες. Τέλος το σκόρδο στο τζατζίκι ίσως να έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι της υπό εξέταση ομάδας βακτηρίων. Το αιθέριο έλαιο του σκόρδου έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του *Lactobacillus plantarum* σε συγκέντρωση 3% σε ενεργή συσκευασία (ενσωματωμένο στο φιλμ συσκευασίας) (Seydim και Sarikus, 2006).

#### **4.3.3. Μεταβολή του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο τζατζίκι στους 4° C**

Κοινά χαρακτηριστικά των ζυμών και των μυκήτων στα οποία βασίζεται η καταμέτρησή τους στα θρεπτικά υποστρώματα είναι η ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε χαμηλές τιμές pH (3,0– 4,0) και η ανθεκτικότητά τους σε χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) (Κοντζεκίδου, 1993). Οι ζύμες είναι αερόβιοι και μικροαερόφιλοι (δηλ. αναπτύσσονται και σε μικρή συγκέντρωση οξυγόνου). Αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 0– 45° C, αλλά υπάρχουν και ψυχρότροφες ζύμες. Η ανάπτυξη των περισσότερων ζυμών ευνοείται από το όξινο pH, το δε άριστο pH ανάπτυξης τους κυμαίνεται από 4 – 4,5 (Καλογρίδου – Βασιλειάδου, 1995). Άρα το

τζατζίκι με αρχικό pH = 4,37 που συντηρείται στους 4° C αποτελεί άριστο υπόστρωμα για τις ζύμες. Οι ζύμες είναι μικροοργανισμοί που μολύνουν τα γιαούρτια μετά την θερμική επεξεργασία του γάλακτος. Έχει βρεθεί σε έρευνα ότι ποσοστό 33,3% δειγμάτων γιαουρτιού, που προέρχονται από αγορές Αθηνών και Θεσσαλονίκης, ήταν μολυσμένα με ζύμες (Λιτοπούλου- Τζανετάκη, 2003).



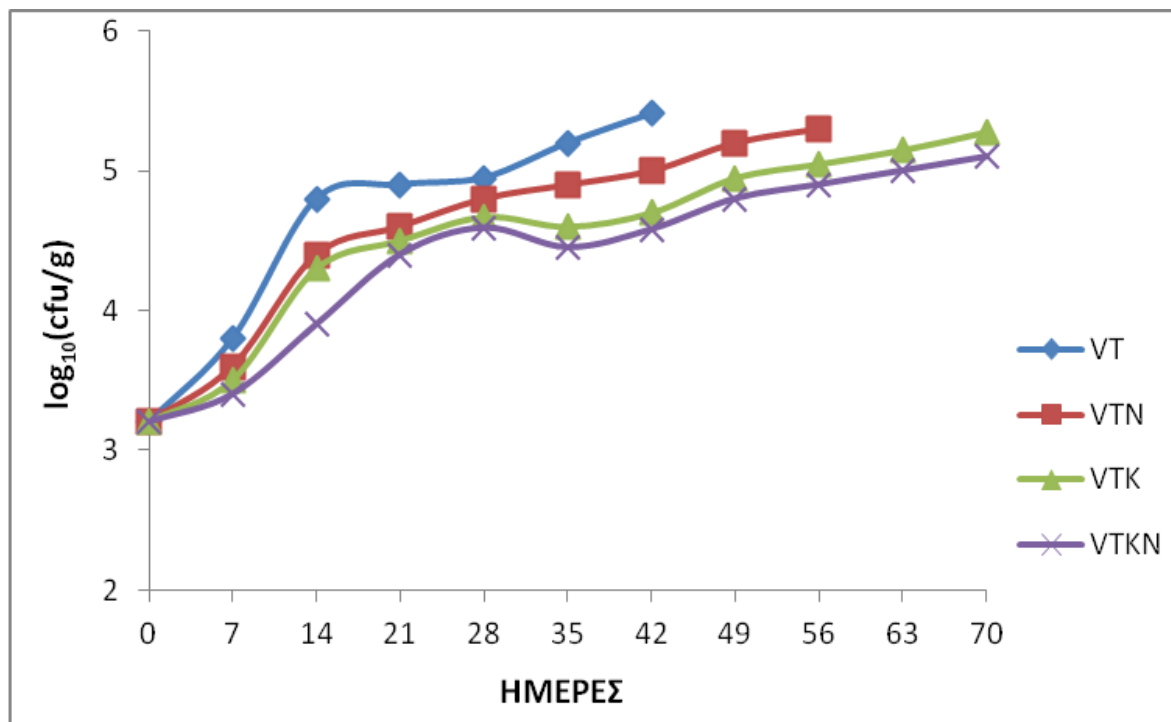
**Γράφημα 38:** Μεταβολή του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων στο τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα δείγματα αναπτύχθηκαν κυρίως ζύμες, ενώ υπήρξε ελάχιστη εμφάνιση νηματοειδών μυκήτων (μούχλα) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Λογική παρατήρηση αφού οι γαλακτοβάκιλλοι προερχόμενοι από γαλακτοκομικά προϊόντα, έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία ως ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη μυκήτων (Voulgari et al., 2010). Επιπρόσθετα ορισμένες ζύμες είναι δυνατόν να αναστέλλουν την ανάπτυξη μυκήτων σε γιαούρτη. Σύμφωνα με την μελέτη των Liou και Tsao (2009) η ζύμη *Debaryomyces*

*hansenii* προστέθηκε ως ανταγωνιστικός μικροοργανισμός σε γιαούρτη και έδειξε ανασταλτική δράση έναντι μυκήτων: *Aspergillus sp.*, *Byssochlamys fulva*, *Byssochlamys nivea*, *Cladosporium sp.*, *Eurotium chevalieri*, *Penicillium candidum* και *Penicillium roqueforti*. Μάλιστα όσο μικρότερος ήταν ο πληθυσμός των μυκήτων στη γιαούρτη, τόσο πιο αποτελεσματική ήταν η αναχαίτιση τους από την ζύμη. Άλλωστε οι Penney et al. (2004) στα πλαίσια μικροβιολογικής μελέτης μιας γιαούρτης με βατόμουρα αναφέρουν ότι το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων στο τρυβλίο με το άγαρ αποτελούνταν από ζύμες, αλλά αναπτύχθηκαν και κάποιοι μύκητες σποραδικά.

Τα πιο συνηθισμένα είδη ζυμομυκήτων που απομονώνονται από τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus var. lactis*, *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida famata*, *Candida diffluens*, *Candida krusei*, *Candida lusitaniae*, *Pichia anomala* και *Saccharomyces cerevisiae* (Suriyarachchi και Fleet, 1981; Jakobsen και Narvhus, 1996; Caggia et al., 2001; Minervini et al., 2001). Αυτές οι ζύμες μπορεί να προέρχονται από μολυσμένα συστατικά (όπως φρούτων, ξηρούς καρπούς, μέλι) που προστίθενται στο γιαούρτι λίγο πριν από τη συσκευασία (Fleet, 1990), για να προκύψουν επιδόρπια γιαουρτιού, όπως γιαούρτι με μέλι, με φρούτα κτλ. Ακόμη, οι ζύμες μπορεί να αναπτυχθούν επί των επιφανειών του εξοπλισμού παραγωγής, όπως οι μηχανές πληρώσεως και οι ζυμωτήρες ανάμειξης, όταν έχουν καθαριστεί και απολυμανθεί ανεπαρκώς (Suriyarachchi και Fleet, 1981), όπως επίσης από τον αέρα της μονάδας παραγωγής ή τα κουτιά συσκευασίας που χρησιμοποιούνται. Σε έρευνα τους οι Kure et al. (2004) αναφέρουν ότι τα επίπεδα ζυμών και μυκήτων που υπάρχουν στον αέρα της βιομηχανίας, στον εξοπλισμό και στα υλικά συσκευασίας, κατέχουν σημαντικό ρόλο στην μικροβιολογική επιβάρυνση του τελικού προϊόντος (ημίσκληρο τυρί). Τον πρωτεύοντα ρόλο από τα παραπάνω βρέθηκε να κατέχει ο αέρας ο οποίος απεδείχθη σημαντική πηγή μόλυνσης του τυριού κυρίως με *Penicillium commune* και *Penicillium raitans*. Επομένως λαμβάνεται πρόνοια ώστε οι χώροι συσκευασίας να μην είναι σε ρεύματα αέρος, πολλές φορές μάλιστα ο αέρας στον χώρο αυτόν φιλτράρεται και το φως είναι υπεριώδες για να απολυμαίνεται ο χώρος (Ζερφυρίδης, 2001, σελ. 318). Μάλιστα οι Suriyarachchi και Fleet (1981) ανέφεραν ότι η εισαγωγή φρούτων στη

γιαούρτη ενισχύει την αλλοίωση του από ζύμες και μύκητες, επειδή προσθέτουμε στο προϊόν επιπρόσθετη πηγή μόλυνσης (φρούτα) και επιπλέον ζυμώσιμα υποστρώματα για τις ζύμες και μύκητες. Για το λόγο αυτόν τα φρούτα πριν από τη χρησιμοποίηση τους συνήθως θερμαίνονται ώστε να καταστραφούν οι μύκητες (Ζερφυρίδης, 2001, σελ. 66).



**Γράφημα 39:** Μεταβολή του πληθυσμού των Ζυμών και Μυκήτων σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Αυτό εξηγεί την ραγδαία αύξηση των ζυμών στο τζατζίκι (και όχι τόσο των μυκήτων), το οποίο είναι γιαούρτη με σκόρδο, αγγουράκι κι άνηθο. Οι επικρατούντες ζυμομύκητες από εκείνους που απομονώθηκαν από γιαούρτη απλή και γιαούρτη με φρούτα στους 5° C, περιλαμβάνουν στελέχη του είδους: *Saccharomyces exiguus*, *Debaryomyces hansenii* και *Rhodotorula glutinis*. Αυτά τα είδη ζυμών υπάρχουν στα γιαούρτια από επιμόλυνση, δηλ. προέρχονται από τον εξοπλισμό, την ανάρμοστη υγιεινή και τα φρούτα που προστίθενται ως μέρος των συστατικών του προϊόντος. Η *Rhodotorula glutinis*, μπορεί να προέρχεται από τον αέρα, καθώς είναι τυπικός μικροοργανισμός που ρυπαίνει τον αέρα (Viljoen et al., 2003).

Είναι γνωστό ότι οι ζύμες δεν εμπλέκονται στη διεργασία της ζύμωσης κατά την παραγωγή γιαουρτιού, αλλά είναι μια σημαντική αιτία αλλοίωσης του τελικού προϊόντος. Η αλλοίωση στη γιαούρτη γίνεται εμφανής όταν ο πληθυσμός των ζυμών φτάνει ίσος με  $10^5$ - $10^6$  cfu/g, γιατί τότε παρατηρείται αλλοίωση στην γεύση και την οσμή της γιαούρτης (Viljoen et al., 2003). Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως δείκτης υποβάθμισης της ποιότητας του γιαουρτιού με φρούτα και το προϊόν ορίστηκε ως αλλοιωμένο όταν ο πληθυσμός των ζυμών ήταν ίσος με  $10^5$  cfu/g (Suriyarachchi και Fleet, 1981). Ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων συνεπώς είναι η πιο καθοριστική, από τις εξεταζόμενες, ομάδες μικροοργανισμών στο τζατζίκι, αφού αφενός ο πληθυσμός τους αυξάνεται ραγδαία και αφετέρου χρησιμοποιείται μαζί με την οργανοληπτική εξέταση για τον καθορισμό του χρόνου ζωής του προϊόντος (βλέπε Κεφάλαιο 4.3.3.8.). Το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης στο τζατζίκι σε ότι αφορά τις ζύμες και μύκητες ορίστηκε ίσο με  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στην παρούσα μελέτη. Συνεπώς, μεταχειρίσεις στις οποίες ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων ήταν  $>5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  θεωρήθηκε ότι έδωσε αλλοιωμένο προϊόν.

Ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων στο τζατζίκι ήταν  $3,2 \log_{10}(\text{cfu/g})$  Γραφήματα 38 και 39). Οι Penney et al. (2004) αναφέρουν μεγάλο αρχικό πληθυσμό ζυμών και μυκήτων σε γιαούρτη με άγρια βατόμουρα ( $10^3$  cfu /g). Επίσης, ο αρχικός πληθυσμός ζυμών και μυκήτων σε γαλοτύρι ήταν ίσος με  $3,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Rogga et al., 2005).

Είναι φανερό ότι ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων του AT αυξάνεται σχεδόν γραμμικά με τις ημέρες συντήρησης (Γράφημα 38) και από την 14<sup>η</sup> κιόλας ημέρα έχει πλησιάσει την τιμή  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Ανάλογη, αλλά σαφώς μικρότερη της τάξης του 0,5 λογάριθμου, είναι και η ανάπτυξη των ζυμών και μυκήτων στο ATN, όπου ο πληθυσμός τους έδωσε τιμή μεγαλύτερη από 5 λογάριθμους την 21<sup>η</sup> ημέρα, ενώ την 28<sup>η</sup> ημέρα ξεπέρασε τους 6 λογάριθμους. Οι ζύμες και μύκητες στο δείγμα ATK άγγιξαν τους 5 λογάριθμους την 21<sup>η</sup> ημέρα, παρέμειναν σε τιμές 5 – 5,5 λογάριθμους ως την 35<sup>η</sup> ημέρα, ώσπου την 42<sup>η</sup> ημέρα έφτασαν τους 6 λογάριθμους. Τέλος, ο πληθυσμός τους στο ATKN ξεπέρασε τους 5 λογάριθμους την 42<sup>η</sup> ημέρα. Την 28<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των ζυμών στο ATKN ήταν μικρότερος κατά  $1,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , στο ATK κατά  $1,2 \log_{10}(\text{cfu/g})$  και στο ATN κατά  $0,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , σε σχέση με το AT. Την 35<sup>η</sup> και 42<sup>η</sup> ημέρα οι ζύμες είναι λιγότερες στο ATKN κατά 0,5

και  $0,7 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σύγκριση με το ATK, αντίστοιχα. Ανάλογη αυξητική τάση του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων, αλλά και των ψυχρότροφων ζυμών, παρατήρησαν οι Al-Kadamany et al. (2003) σε labneh (είδος γιαούρτης) στους  $5^{\circ} \text{C}$  υπό αερόβια συσκευασία.

Στα δείγματα που συσκευάστηκαν υπό κενό παρατηρείται μικρότερη ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων σε σχέση με εκείνα που συσκευάστηκαν σε αέρα (Γράφημα 39). Ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων έφτασε τα  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  την 28<sup>η</sup>, 42<sup>η</sup>, 56<sup>η</sup> και 63<sup>η</sup> ημέρα στα VT, VTN, VTK και VTKN, αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει ότι τα δείγματα που συσκευάστηκαν σε κενό έφθασαν το μικροβιολογικό όριο των ζυμών και μυκήτων ( $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) σε πιο μεγάλο χρονικό διάστημα σε σχέση με το τζατζίκι που συσκευάστηκε σε αέρα. Συγκεκριμένα οι μεταχειρήσεις VT, VTN, VTK και VTKN χρειάστηκαν 15, 24, 35 και 35 ημέρες παραπάνω για να φτάσουν τους  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  από τα AT, ATN, ATK και ATKN, αντίστοιχα. Επίσης από τα Γραφήματα 44 και 45 φαίνεται ότι συνολικά οι ζύμες και μύκητες στο τζατζίκι που συσκευάστηκε σε κενό δεν ξεπέρασαν σε κανένα από τα δείγματα τους  $5,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  καθ' όλη την περίοδο των 70 ημερών του πειράματος, σε αντίθεση με το προϊόν που συσκευάστηκε σε αέρα. Είναι εμφανές από το Γράφημα 45 ότι ο πληθυσμός των ζυμών στο VT είναι υψηλότερος κατά  $\sim 0,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  και  $\sim 1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε σχέση με τα VTN και VTK - VTKN, αντίστοιχα.

Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι η προσθήκη ναταμυκίνης μείωσε τον πληθυσμό των ζυμών και μυκήτων στο τζατζίκι. Οι Thomas και Delves-Broughton (2003) αναφέρουν ότι η ναταμυκίνη είναι αποτελεσματική σε ένα μεγάλο εύρος ζυμών και μυκήτων. Σε γενικές γραμμές οι ζύμες είναι πιο ευαίσθητες στην ναταμυκίνη από τους μύκητες. Οι ζύμες και μύκητες που είναι ευαίσθητοι στην συγκεκριμένη ουσία είναι: *Absidi spp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Botrytis spp.*, *Brettanomyces spp.*, *Candida spp.*, *Cladosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Gloeosporium spp.*, *Hansenula spp.*, *Kloeckera spp.*, *Mucorspp*, *Penicillium spp.*, *Rhizopus spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Sclerotina spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Torulopsis spp.*, *Condense spp.*, *Wallenis spp.*, και *Zygosaccharomyces spp.*, Οι El-Diasty et al (2009) αναφέρουν ότι η προσθήκη ναταμυκίνης σε γιαούρτη συντηρημένο στους  $4^{\circ} \text{C}$  έδειξε αποτελεσματική αντιμυκητιακή δράση, που αυξάνει το χρόνο ζωής του γιαουρτιού, χωρίς αλλαγή στα «φυσικά» οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Επίσης, η προσθήκη

ναταμυκίνης στην άλμη μαύρης ελιάς μείωσε αισθητά την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων στο προϊόν (Hondrodimou et al., 2011). Σύμφωνα με τους Suloff et al. (2003) η δράση ημισυνθετικών παραγώγων ναταμυκίνης (20 ppm) και ναταμυκίνης (10 ppm) μείωσε παρόμοια τον πληθυσμό των ζυμών – μυκήτων σε τυρί Cheddar (περίπου 1 λογαριθμική μονάδα). Ακόμη, η προσθήκη ναταμυκίνης σε μεμβράνη από ορό γάλακτος ανέστειλε την ανάπτυξη των *Yarrowia lipolytica* και *Penicillium spp.* στην επιφάνεια τυριών (Pintado et al., 2010). Οι Var et al. (2006) έδειξαν ότι ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και ναταμυκίνης αναχαιτίζει την ανάπτυξη ζυμών, αφού ο συνδυασμός αυτός είχε σαν αποτέλεσμα να μειωθούν αισθητά οι ζύμες στο τυρί Kashar.

Στην παρούσα μελέτη αξιολογή ήταν η δράση που έδειξε το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox έναντι των ζυμών και μυκήτων στο τζατζίκι, αφού μείωσε αισθητά τον πληθυσμό τους (Γραφήματα 38 και 39). Αντίστοιχα, η χρήση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox για την πλύση εσκαρόλ και μαρουλιού μείωσε τον πληθυσμό των ζυμών και μυκήτων κατά 0,3 – 0,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  και στα δύο λαχανικά, σε σύγκριση με εκείνα που πλύθηκαν με νερό (Allende et al., 2008). Ακόμη, η επεξεργασία σιτηρών με ατμό αιθέριων ελαίων εσπεριδοειδών μείωσε την ανάπτυξη των *Aspergillus niger* και *Penicillium chrysogenum* κατά 50-60%, υποδεικνύοντας την πιθανή χρήση τους στη μείωση της φθοράς στα σιτηρά από αυτούς τους μικροοργανισμούς (Phillips et al., 2012). Από τους Bevilacqua et al. (2012) υπολογίστηκε ότι η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση εκχυλίσματος εσπεριδοειδών για τα σπόρια του μύκητα *Fusarium oxysporum* σε χυμό ανανά ήταν 3700 mg/L. Οι Caccioni et al. (1998) αξιολόγησαν την αντιμυκητιακή δράση των ακόλουθων αιθέριων ελαίων από εσπεριδοειδή: *Citrus sinensis*, *Citrus aurantium*, *Citrus deliciosa*, *Citrus paradises* και *Citrus limon* και βρήκαν ότι η αποτελεσματική δόση αυτών των αιθερίων ελαίων για την αναχαίτιση του *Penicillium digitatum* ήταν 2180, 1015, 713, 910, 1056 ppm, αντίστοιχα. Επίσης, αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών μειώνουν τον πληθυσμό των μυκήτων *Aspergillus parasiticus* και *Aspergillus niger* και της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* (Fisher & Phillips, 2008). Τα αιθέρια έλαια λεμονιού (*Citrus limon L.*), μανταρινιού (*Citrus reticulata L.*), γκρέιπ φρουτ (*Citrus paradisi L.*) και πορτοκαλιού (*Citrus sinensis L.*) εξετάστηκαν σε in vitro έρευνα για την δράση τους έναντι τεσσάρων μυκήτων που συνδέονται με την αλλοίωση



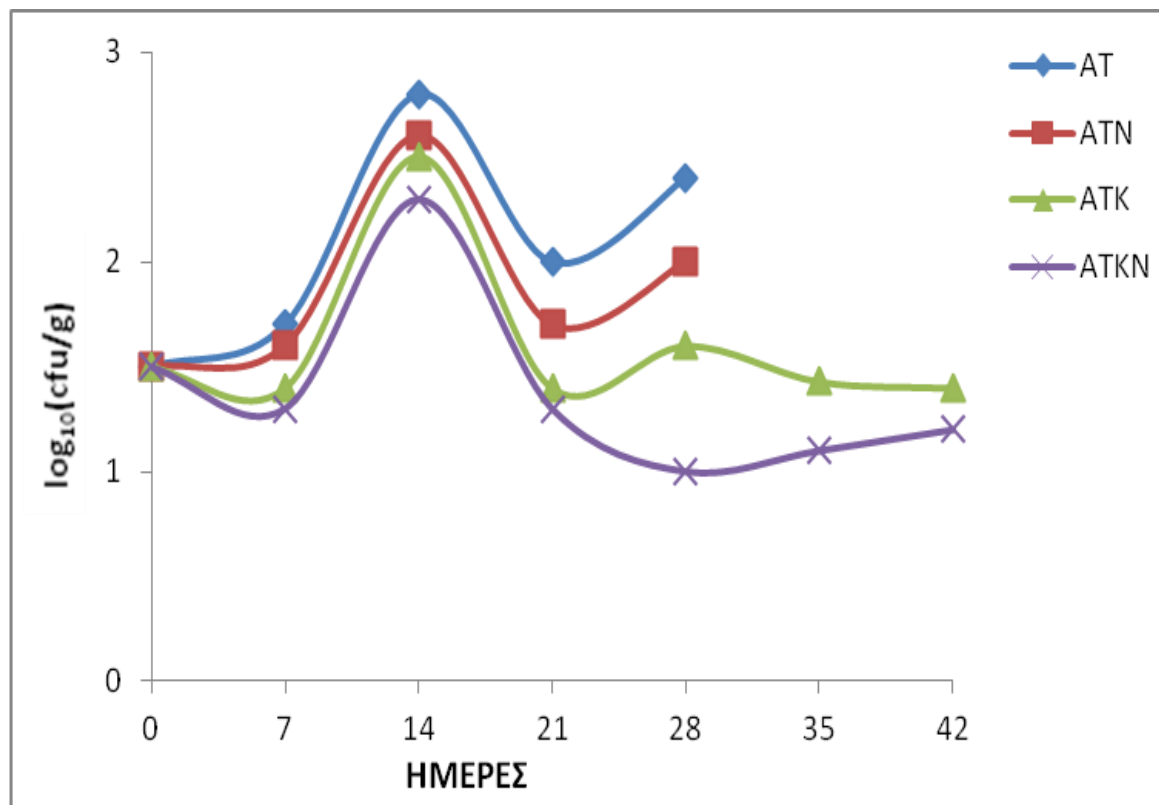
τροφίμων: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* και *Penicillium verrucosum*. Παρατηρήθηκε ότι όλα τα έλαια έδειξαν αντιμυκητιακή δραστικότητα εναντίον όλων των υπό εξέταση μυκήτων (Viuda- Martos et al., 2008). Επιπλέον το αιθέριο έλαιο του *Citrus reticulata* βρέθηκε να είναι δραστικό έναντι των μυκήτων *Alternaria alternata*, *Rhizoctonia solani*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* και *Helminthosporium oryzae* (Chutia et al., 2009). Πέντε αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών έδειξαν αντιμυκητιακή δράση έναντι των *Penicillium digitatum* και *Penicillium italicum* (Caccioni et al., 1998). Επίσης, μελέτες στην βιβλιογραφία αναφέρουν ότι τα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών είναι δραστικά και έναντι αφλατοξινών (Singh et al., 2010; Razzaghi-Abyaneh et al., 2009).

Είναι πιθανόν την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων στην παρούσα μελέτη στο τζατζίκι να αναστέλλουν σε μικρό βαθμό και τα συστατικά του τζατζικιού (σκόρδο κι άνηθο). Το αιθέριο έλαιο του άνηθου (*Anethum graveolens L.*) έδειξε αξιόλογη αντιμυκητιακή δράση, έναντι των μυκήτων *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* και *Alternaria alternate*, *Aspergillus flavus* (Singh et al., 2005; Tian et al., 2011) και έδρασε έναντι της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* (Delaquis et al., 2002). Οι Kim et al. (2004) διαπίστωσαν ότι το αιθέριο έλαιο του σκόρδου παρουσίασε ασθενή δράση έναντι των ζυμών.

#### **4.3.4. Μεταβολή του πληθυσμού των Ψευδομονάδων στο τζατζίκι στους 4° C**

Οι Ψευδομονάδες είναι αερόβιοι, αρνητικοί κατά Gram και ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί (Κοτζεκίδου, 2000). Οι μικροοργανισμοί αυτοί παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην Τεχνολογία Τροφίμων γιατί από το περιβάλλον (αέρα, έδαφος και νερό) που βρίσκονται μεταφέρονται εύκολα στα σκεύη και στα μηχανήματα επεξεργασίας των τροφίμων με αποτέλεσμα να επιμολύνουν τα τρόφιμα. Τα μολυσμένα τρόφιμα παρουσιάζουν συχνά αλλοίωση γιατί τα βακτήρια αυτά με τα ένζυμα που εκκρίνουν (λιπάσες) διασπούν μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων και παράγουν προϊόντα δυσάρεστης οσμής και γεύσης (Καλογρίδου – Βασιλειάδου, 1995). Συνήθως είναι μια σημαντική ομάδα μικροοργανισμών που συμβάλλει στην αλλοίωση των νωπών ευαλλοιώτων τροφίμων που συντηρούνται σε θερμοκρασίες

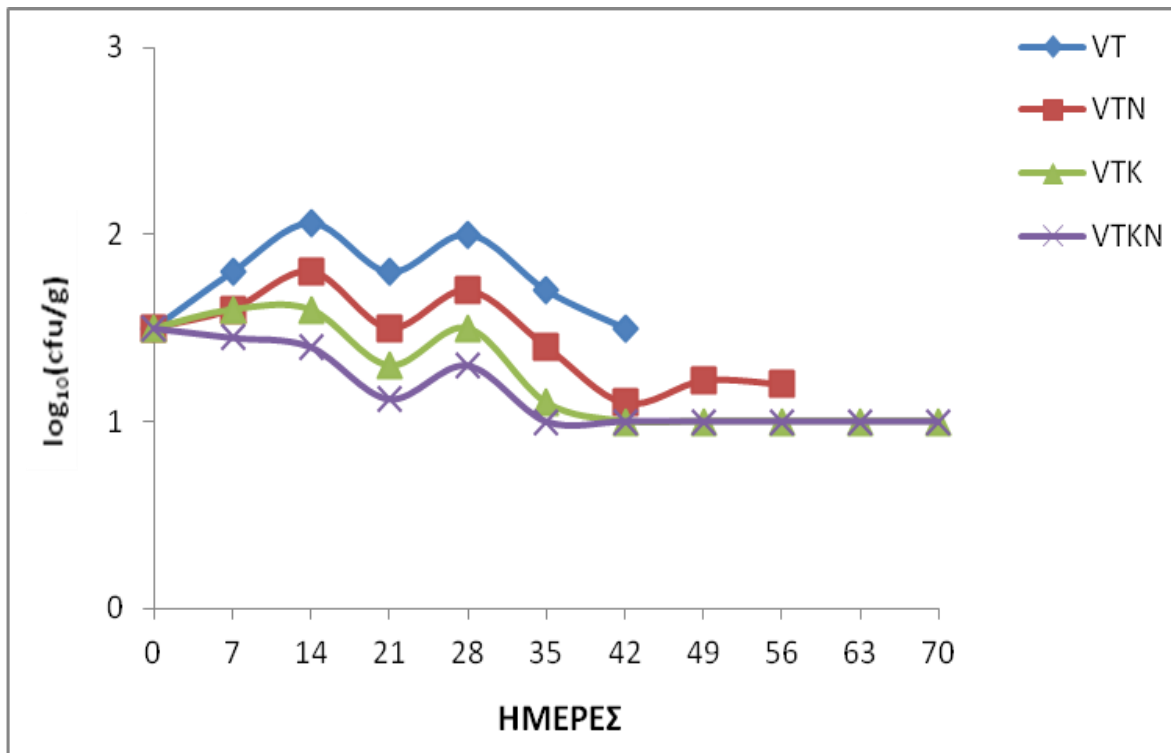
ψύξης (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 1993). Επίσης, οι ψευδομονάδες θεωρούνται ένας από τους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης σε φρέσκα λαχανικά (όπως το αγγούρι, το σκόρδο και ο άνηθος που περιέχονται στο τζατζίκι) που έχουν υποστεί ελάχιστη επεξεργασία (τεμάχισμα και έκπλυση) και διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες (Ragaert et al. 2007; Francis et al., 1999).



**Γράφημα 40:** Μεταβολή του πληθυσμού των Ψευδομονάδων σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Ο αρχικός πληθυσμός των ψευδομονάδων στο τζατζίκι ήταν  $1,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Γραφήματα 40 και 41). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με εκείνο των Rogga et al. (2005) και Kykidou et al. (2007) που αναφέρουν πληθυσμό σε γαλοτύρι μικρότερο από  $2,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων στο τζατζίκι (και στις δύο συσκευασίες) κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές, αυτό πιθανώς να οφείλεται στο χαμηλό pH του προϊόντος, αφού οι μικροοργανισμοί αυτού το είδους σπάνια αναπτύσσονται σε  $\text{pH} < 5-6$  (Καλογρίδου– Βασιλειάδου, 1995). Ο πληθυσμός τους δεν ξεπέρασε σε κανένα δείγμα που συσκευάστηκε στον αέρα τους  $3 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Γράφημα 40). Την

28<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός των ψευδομονάδων στο AT ήταν  $\sim 2,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , στο ATN  $\sim 2,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$ , στο ATK  $\sim 1,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  και στο ATK  $\sim 1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Στην μελέτη των Al-Kadamany et al. (2003) σε labneh (είδος γιαούρτης δημοφιλές στην Μέση Ανατολή) διατηρημένο στους 5° C υπό αερόβια συσκευασία, ο αριθμός των ψυχρότροφων βακτηρίων ήταν σταθερός για σχεδόν μία εβδομάδα, ενώ στη συνέχεια αυξήθηκε.



**Γράφημα 41:** Μεταβολή του πληθυσμού των Ψευδομονάδων σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων στο τζατζίκι που συσκευάστηκε υπό κενό (Γράφημα 41) δεν ξεπέρασε σε κανένα δείγμα τους  $2 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Ως την 28<sup>η</sup> ημέρα το VT έχει υψηλότερο πληθυσμό ψευδομονάδων κατά 0,3, 0,5 και 0,7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , σε σύγκριση με τα VTN, VTK και VTKN, αντίστοιχα. Ο πληθυσμός τους μειώνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) την 42<sup>η</sup> ημέρα στο δείγμα VTK και την 35<sup>η</sup> στο VTKN, οπότε τα δείγματα αυτά είχαν  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  χαμηλότερο πληθυσμό, σε σχέση με τα VT και VTN. Συνολικά προκύπτει ότι οι ψευδομονάδες κυμάνθηκαν σε

πληθυσμούς, περίπου 1,0 λογάριθμο υψηλότερους στο τζατζίκι που συσκευάστηκε σε αέρα σε σχέση με εκείνο που συσκευάστηκε σε κενό, γεγονός αναμενόμενο εφόσον οι ψευδομονάδες είναι αυστηρά αερόβιοι μικροοργανισμοί.

Συμπεραίνεται λοιπόν ότι η προσθήκη ναταμυκίνης δεν είχε κάποια σημαντική δράση έναντι των ψευδομονάδων, ενώ η προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox μείωσε την πληθυσμό των ψευδομονάδων στο τζατζίκι. Οι Dabbah et al. (1970) αναφέρουν ότι τα αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών εξαλείφουν εντελώς τον *Pseudomonas fluorescens* σε ζωμό (broth), ενώ σημειώθηκε μείωση του πληθυσμού του *Pseudomonas aeruginosa* κατά 75%. Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε τέτοια μείωση των ψευδομονάδων από την χρήση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox, αυτό πιθανώς να οφείλεται στο λίπος που υπάρχει στη στραγγιστή γιαούρτη (10% λιποπεριεκτικότητα) και το οποίο μπορεί να προσφέρει μια προστατευτική ασπίδα έναντι της δράσης των ψευδομονάδων (Burt, 2004). Οι Del Rio et al. (2007) ανέφεραν μείωση της τάξης του 1,4  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  στον πληθυσμό των ψευδομονάδων αμέσως μετά την εμφάνιση ποδιών κοτόπουλου σε διάλυμα κιτρικού οξέος (2 ml/100 ml διαλύματος) ενώ μετά από 5 ημέρες αποθήκευσης ανέφεραν μείωση τους κατά 0,7  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , σε σύγκριση με το control. Ακόμη, νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs), που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας εκχύλισμα από φλούδα των εσπεριδοειδών Citrus, έδειξαν αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa* (Kaviya et al., 2011). Επιπρόσθετα, η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox σε κοτόπουλο συσκευασμένο σε αέρα μείωσε τον πληθυσμό των ψευδομονάδων κατά περίπου 0,5 και 1 λογαριθμική μονάδα σε συγκέντρωση 0,1 ml/100 g και 0,2 ml/100 g, αντίστοιχα (Mexis et al., 2012). Τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού, μανταρινιού και λεμονιού εξετάστηκαν σε 'in vitro' πείραμα για την ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC) έναντι της *Pseudomonas aeruginosa* (συγκέντρωσης  $10^7$  κύτταρα/ml) και αυτή βρέθηκε ίση με >30, 5 και >30 μl αιθέριου ελαίου/ml broth, αντίστοιχα (Espina et al., 2011).

#### **4.3.5. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων στο τζατζίκι στους 4° C**

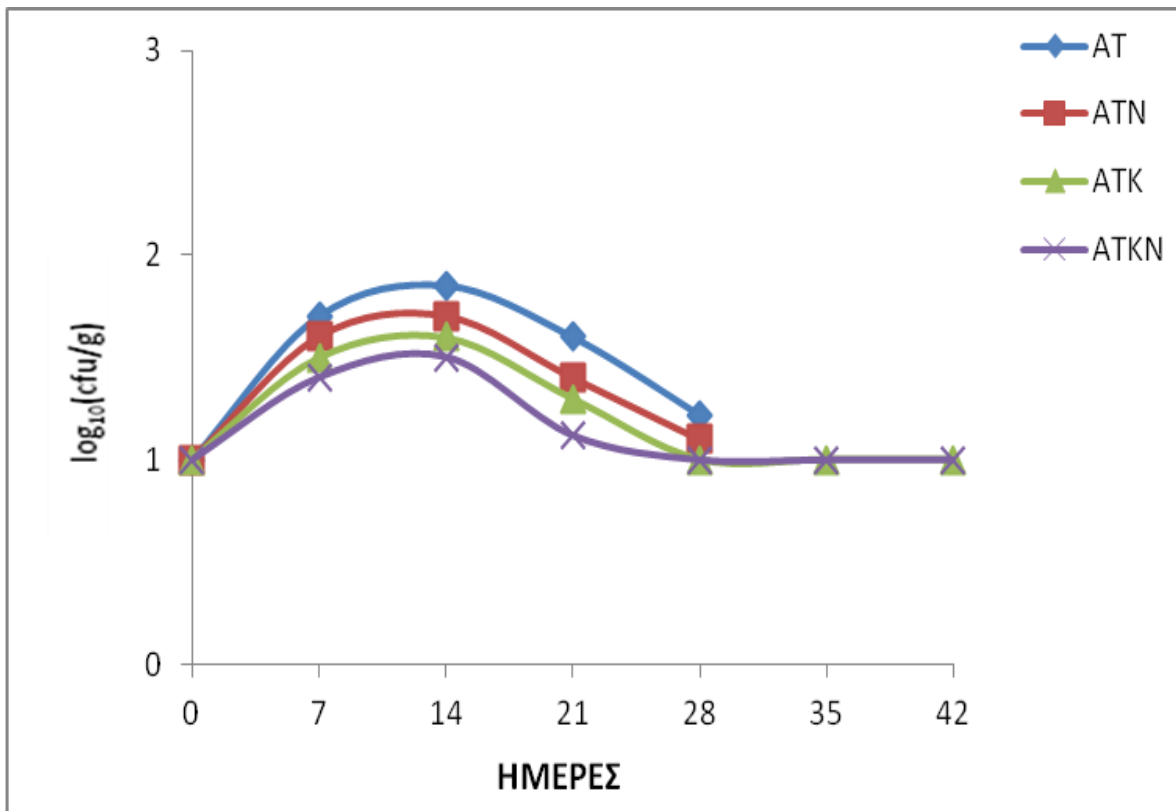
Τα Εντεροβακτήρια είναι Gram αρνητικά αερόβια, προαιρετικά αναερόβια σε σχήμα ράβδου, παράγουν οξύ από τη γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες. Επειδή τα

Εντεροβακτήρια καταστρέφονται με ήπια θερμική επεξεργασία η παρουσία τους στα επεξεργασμένα τρόφιμα υποδηλώνει επιμόλυνση. Γι' αυτό τα Εντεροβακτήρια θεωρούνται δείκτης των συνθηκών υγιεινής που επικρατούν στη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων (Κοτζεκίδου- Ρουκά, 1993). Τα νωπά φρούτα και λαχανικά έχουν συνήθως υψηλό πληθυσμό Εντεροβακτηρίων, ως μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας τους. Για αυτόν τον λόγο Εντεροβακτήρια μπορεί να εντοπιστούν σε τρόφιμα που περιέχουν νωπά λαχανικά (Gilbert et al., 2000). Τα σπουδαιότερα γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* είναι: *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Versinia*, *Erwinia*. Τα γένη *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* και *Enterobacter*, αποτελούν την ομάδα των κολοβακτηριοειδών (Καλογρίδου – Βασιλειάδου, 1995). Η παρουσία κολοβακτηριοειδών από μόλυνση του γιαουρτιού μετά τη θερμική κατεργασία του γάλακτος (από διάφορες πηγές) διαπιστώθηκε σε μεγάλο ποσοστό των δειγμάτων που εξετάστηκαν σε γιαούρτια της αγοράς της Θεσσαλονίκης (Λιτοπούλου- Τζανετάκη, 2003). Σε μία άλλη μελέτη το 15% των δειγμάτων των γιαουρτιών, που εξετάστηκαν στην περιοχή Minna (ανήκει στο κράτος του Νίγηρα), ανιχνεύτηκαν κολοβακτηριοειδή και στο 5% αυτών βρέθηκε η παρουσία του *Enterobacter spp.* (Oyeleke, 2009).

Στη δική μας μελέτη, επιπλέον, η παρουσία τεμαχισμένων λαχανικών (αγγουράκι, άνηθος) στο τζατζίκι, είναι πιθανόν να αυξάνει τον αρχικό πληθυσμό των Εντεροβακτηρίων του, εφόσον τα Εντεροβακτήρια αποτελούν έναν από τους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης σε λαχανικά που έχουν υποστεί επεξεργασία, όπως το τεμάχισμα (κυρίως *Erwinia herbicola* και *Rahnella aquatilis*) (Ragaert et al., 2007). Γενικά, το τεμάχισμα των τροφίμων διευκολύνει την μικροβιολογική αλλοίωση, εφόσον απελευθερώνονται θρεπτικά συστατικά και υγρασία, όχι μόνο στην επιφάνεια των τροφίμων αλλά και στα εργαλεία τεμαχισμού (π.χ. μαχαίρια) και διευκολύνεται έτσι η ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Francis et al., 1999).

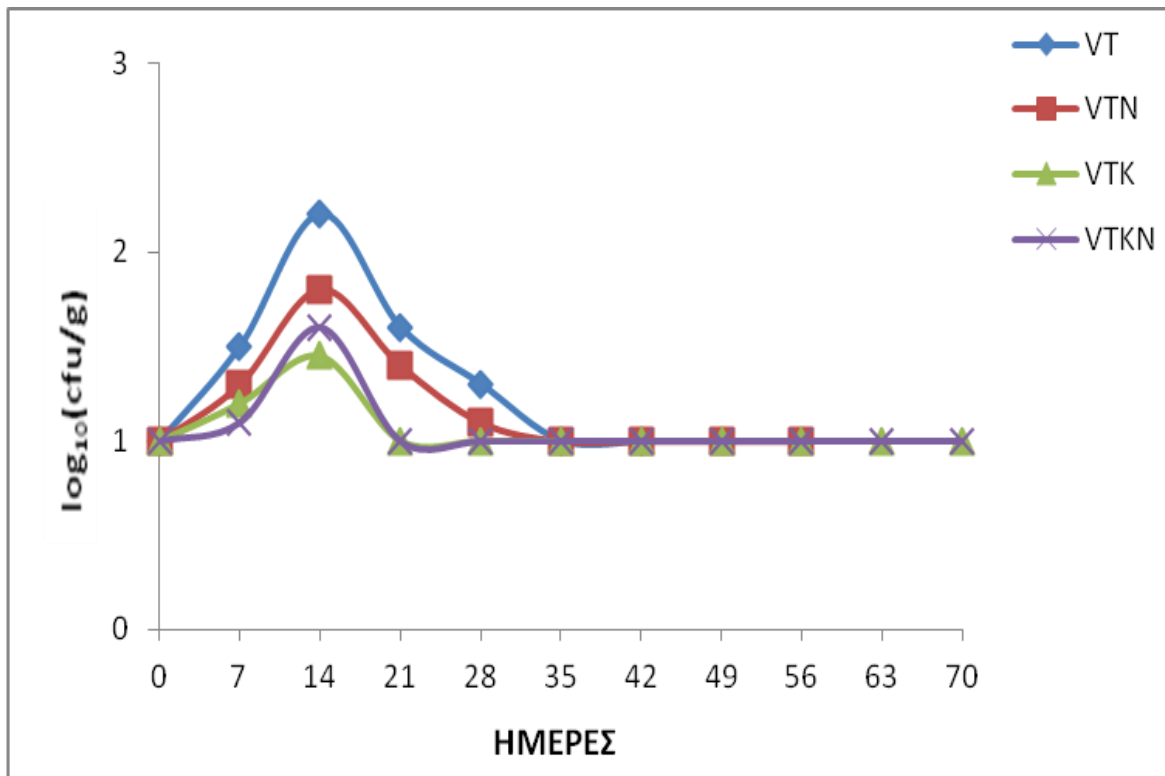
Στη μικροχλωρίδα του υπό εξέταση προϊόντος δεν ανιχνεύτηκαν Εντεροβακτήρια (όριο ανίχνευσης  $1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ). Πληθυσμός Εντεροβακτηρίων μικρότερος από  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  αναφέρθηκε επίσης σε γαλοτύρι (Rogga et al., 2005; Kykidou et al., 2007) και σε ανάλατο-συμπυκνωμένο γιαούρτι (Gohil et al., 1995). Επίσης, οι Al-Kadamany et al. (2002) και Al-Kadamany et al. (2003) δεν ανίχνευσαν

κολοβακτηριοειδή σε κανένα δείγμα Labneh (είδος γιαούρτης) κατά τη διάρκεια αποθήκευσης του, γεγονός που (σύμφωνα με τους ερευνητές) αποτελεί απόδειξη επαρκών συνθηκών υγιεινής του προσωπικού και του χώρου παρασκευής του προϊόντος.



**Γράφημα 42:** Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων αυξήθηκε αρχικά και παρέμεινε για λίγο σε χαμηλές τιμές, ενώ στη συνέχεια μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης (1  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ ), σε όλες τις μεταχειρίσεις (Γραφήματα 42 και 43). Συνεπώς τα Εντεροβακτήρια είναι μια ομάδα μικροοργανισμών που δεν επηρεάζει την αλλοίωση του τζατζικιού (Γραφήματα 42 και 43). Οι Karagul- Yuceer et al. (2001) αναφέρουν ότι ο αριθμός των κολοβακτηριδίων ήταν υψηλότερος (2.48  $\log \text{ cfu/g}$ ) στο γιαούρτι με φρούτα με pH 5.0 από εκείνον (1.81  $\log \text{ cfu/g}$ ) σε γιαούρτι με φρούτα σε pH 4.2 την πρώτη ημέρα αποθήκευσης στους 4° C.



**Γράφημα 43:** Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηρίων σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης βρίσκονται εκείνα των Skalina και Nikolajeva (2010), οι οποίοι εξέτασαν τρεις σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση (σε θερμοκρασία συντήρησης 3 °C και 7 °C για 48 ώρες): Σαλάτα με μαγιονέζα, γαρίδες και ντομάτα, σαλάτα με μαγιονέζα και καπνιστό ζαμπόν και σαλάτα με μαγιονέζα τυρί και σκόρδο. Τα επίπεδα των *Enterobacteriaceae* στη σαλάτα με γαρίδα και καπνιστό ζαμπόν κυμάνθηκαν μεταξύ 1,7 έως 1,9 log<sub>10</sub>(cfu/g) κατά την έναρξη του πειράματος, ενώ μετά από 48 ώρες στους 3° C ο πληθυσμός τους μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης (1 log<sub>10</sub>(cfu/g)), ενώ στην σαλάτα με τυρί και σκόρδο αρχικά ο πληθυσμός τους ήταν 2,8 log<sub>10</sub>(cfu/g) και μετά από 48 h στους 3° C μειώθηκε κάτω από το επίπεδο ανίχνευσης.

Επιπρόσθετα, οι Del Nobile et al. (2009) αναφέρουν ότι η βιωσιμότητα των Εντεροβακτηρίων σε pH 5, επηρεάζεται σημαντικά από τα οργανικά οξέα. Τα Βενζοϊκό, φουμαρικό και γαλακτικό οξύ είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά, ενώ τα βουτυρικό, μυρμηκικό και προπιονικό οξύ είναι λιγότερο σημαντικές

αντιμικροβιακές ενώσεις. Πιθανώς ο υψηλός αριθμός των γαλακτικών βακτηρίων (τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ) στο τζατζίκι να μην επιτρέπει την ανάπτυξη των εντεροβακτηρίων κι έτσι ο πληθυσμός τους να διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ακόμη φαίνεται ότι το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox επηρεάζει, όχι όμως στατιστικά σημαντικά ( $P > 0,05$ ), την ανάπτυξη της εν λόγω ομάδας μικροοργανισμών στο τζατζίκι. Η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox μείωσε τον πληθυσμό των Εντεροβακτηρίων σε κοτόπουλο συσκευασμένο σε αέρα (Mexis et al., 2012). Η χρήση του Citrox για την πλύση εσκαρόλ και μαρουλιού μείωσε κατά περίπου μια λογαριθμική μονάδα τον πληθυσμό των κολοβακτηριοειδών και στα δύο λαχανικά, σε σύγκριση με εκείνα που πλύθηκαν με νερό (Allende et al., 2008). Τέλος, η προσθήκη ναταμυκίνης στην άλμη μαύρης ελιάς δεν επηρέασε τα Εντεροβακτήρια στο προϊόν (Hondrodimou et al., 2011) και αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης.

#### **4.3.6. Μεταβολή του πληθυσμού των Εντερόκοκκων στο τζατζίκι στους 4<sup>ο</sup> C**

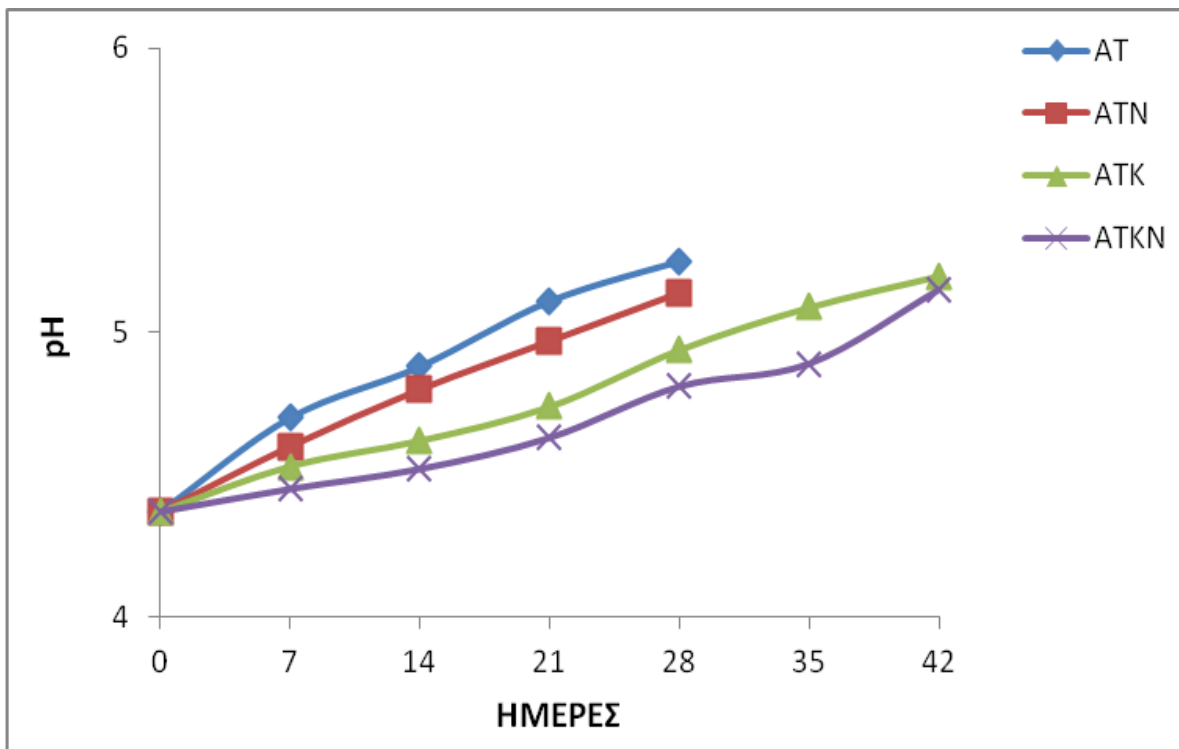
Οι εντερόκοκκοι βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου, άλλων θηλαστικών και πτηνών, επίσης στα ερπετά, έντομα, φυτά, το έδαφος και το νερό. Θεωρούνται παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο και συνδέονται συχνά με νοσοκομειακή λοίμωξη (Koluman et al., 2009). Οι εντερόκοκκοι, καθώς και τα Εντεροβακτήρια όπως αναφέραμε παραπάνω, χρησιμοποιούνται ως δείκτες της υγιεινής κατάστασης των τροφίμων (Κοτζεκίδου, 1993). Η ύπαρξη τους σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα είναι αποτέλεσμα άμεσης μόλυνσης από τα ζώα ή έμμεσης μόλυνσης με προσθήκη μολυσμένου νερού ή μολυσμένου εξοπλισμού (Melek et al., 2012). Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει 16 είδη, ενώ ιδιαίτερη σημασία για τα τρόφιμα έχουν οι *Enterococcus faecalis* και *Enterococcus faecium* (Κοτζεκίδου, 2000). Ο *Enterococcus faecium* μάλιστα έχει απομονωθεί από γιαούρτι (Hadjji-Sfafi et al., 2011) και τυρί (Melek et al., 2012). Επίσης σε έρευνα που έγινε σε τρόφιμα από διάφορα καταστήματα για την ανίχνευση προϊόντων, μολυσμένων με εντερόκοκκους, βρέθηκαν μολυσμένα τα 32 από τα 50 δείγματα τυριού (64%) και 5 από τα 20 δείγματα γιαούρτης (25%) (Koluman et al., 2009).



Στην παρούσα μελέτη δεν εντοπίστηκαν εντερόκοκκοι στο τζατζίκι την αρχική ημέρα και καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, ο πληθυσμός τους ήταν μικρότερος από το όριο ανίχνευσης ( $1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ). Οι Kykkidou et al. (2007) αναφέρουν αρχικό πληθυσμό εντερόκοκκων  $<2 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε γαλοτύρι. Είναι πιθανόν το χαμηλό pH και ο υψηλός πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι να μην επιτρέπει την ανάπτυξη των εντερόκοκκων. Σύμφωνα με μελέτη των Gonzalez et al. (2007) όσον αφορά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες γαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ισπανικό τυρί 'Genestoso', βρέθηκε ότι οι γαλακτοβάκιλλοι αναχαίτισαν την ανάπτυξη του *Enterococcus faecalis*. Οι ερευνητές απέδωσαν την αντιμικροβιακή δράση των γαλακτοβάκιλλων στην παραγωγή βακτηριοσινών ή άλλων μεταβολιτών. Ένας λόγος παραπάνω για τις μεταχειρίσεις με την προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox να μην ανιχνεύονται εντερόκοκκοι είναι και το γεγονός ότι τα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών έχουν επιδείξει στο παρελθόν αξιόλογη αντιβακτηριδιακή δράση έναντι αυτής της ομάδας βακτηρίων. Συγκεκριμένα, αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών (λεμονιού και πορτοκαλιού) προκάλεσαν αισθητή μείωση του *Enterococcus faecalis* σε 'in vitro' έρευνα (Subba et al., 1967). Σε μια παρόμοια έρευνα τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού, μανταρινιού και λεμονιού εξετάστηκαν σε in vitro πείραμα για την ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση έναντι της *Enterococcus faecium* (συγκέντρωσης  $10^7$  κύτταρα/ml) η οποία βρέθηκε ίση με 2.0, 2.0 και 0.5 μl αιθέριου ελαίου/ml broth, αντίστοιχα (Espina et al., 2011).

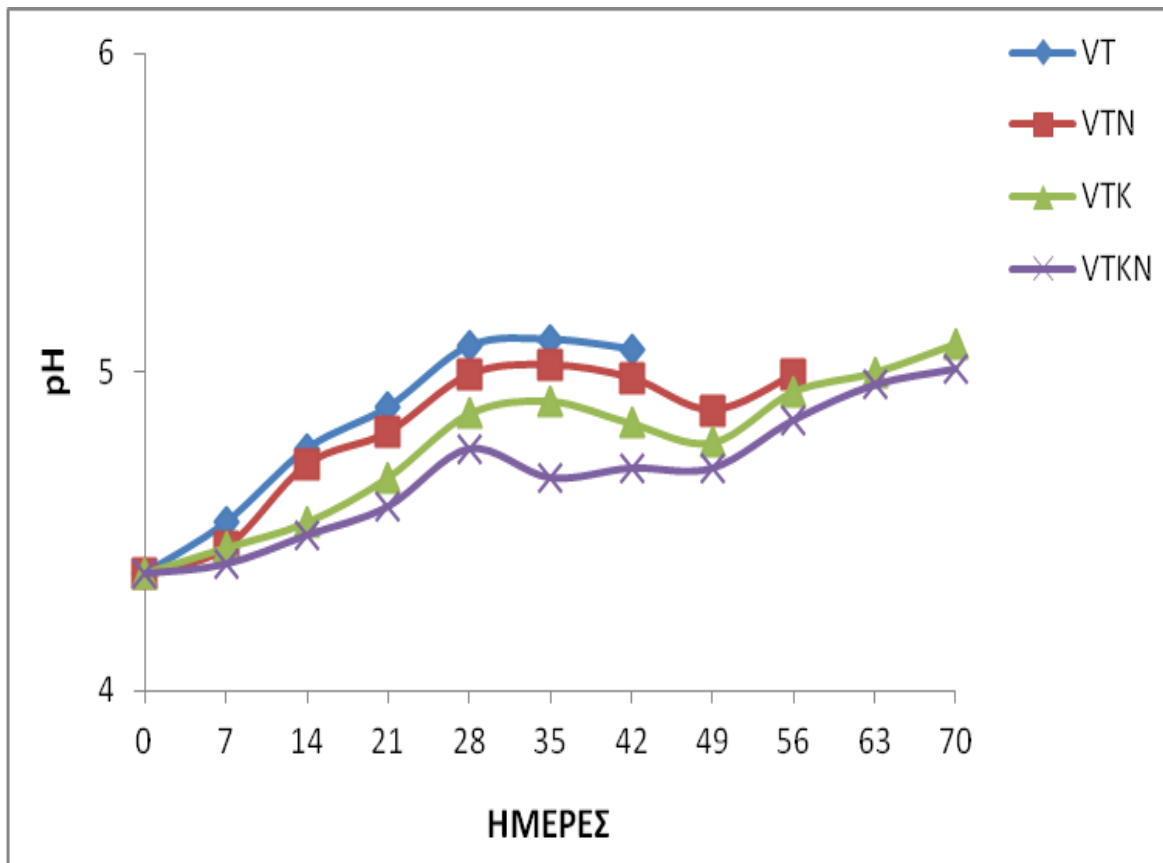
#### **4.3.7. Προσδιορισμός του pH στο τζατζίκι στους 4° C**

Το αρχικό pH στο τζατζίκι ήταν ίσο με 4,37 (Γραφήματα 44 και 45). Στην βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί τιμές pH σε γιαούρτι που κυμαίνονται από 4,16 έως 4,66 (Voutsinas et al., 1996; Dave και Shah, 1997; Pirkul et al., 1997; Vinderola et al., 2000; Penney et al., 2004; Salvador και Fiszman, 2004; Vivar-Quintana, 2006; Maragoudakis et al., 2006; Fernandes et al., 2007), το pH σε γιαούρτι με φράουλες αναφέρεται ίσο 4,32 (Karagul- Yuceer et al., 2001) με το pH σε ποτό γιαουρτιού (Ayran) είναι ίσο με 4,2 (Evrendilek και Balasubramaniam, 2011) και το pH σε γαλοτύρι είναι ίσο με 4,3 (Rogga et al., 2005).



**Γράφημα 44:** Μεταβολή του pH σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4°C) σε συσκευασία αέρα, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Το pH του προϊόντος αυξήθηκε ελάχιστα ( $P>0,05$ ) με το χρόνο για όλες τις μεταχειρίσεις. Οι τιμές pH του προϊόντος, ανεξαρτήτως μεταχείρισης, σε αερόβια συσκευασία κυμάνθηκαν μεταξύ 4,37 και 5,2 (Γράφημα 44), ενώ σε συσκευασία κενού κυμάνθηκαν μεταξύ 4,37 και 5,0 (Γράφημα 45). Οι Tamagnini et al. (2005) παρατήρησαν αύξηση του pH με το χρόνο σε κατσικίσιο τυρί κατά την συντήρηση στους 5° C. Το χαμηλότερο pH και στις δύο συσκευασίες (αέρα, κενό) το έχουν οι μεταχειρίσεις με τον χαμηλότερο πληθυσμό ζυμών-μυκήτων (ATKN και VTKN), ενώ το μεγαλύτερο pH μετρήθηκε στα δείγματα με τον υψηλότερο πληθυσμό ζυμών-μυκήτων (AT και VT). Συνεπώς πιθανώς η μικρή αυτή αύξηση στο pH του προϊόντος σε όλες τις μεταχειρίσεις να οφείλεται κυρίως στον μεταβολισμό του γαλακτικού οξέως από ζύμες - μύκητες και στον καταβολισμό αμινοξέων από ζύμες - μύκητες που οδηγεί σε παραγωγή  $\text{NH}_3$  (Gobbetti et al., 1997).



**Γράφημα 45:** Μεταβολή του pH σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

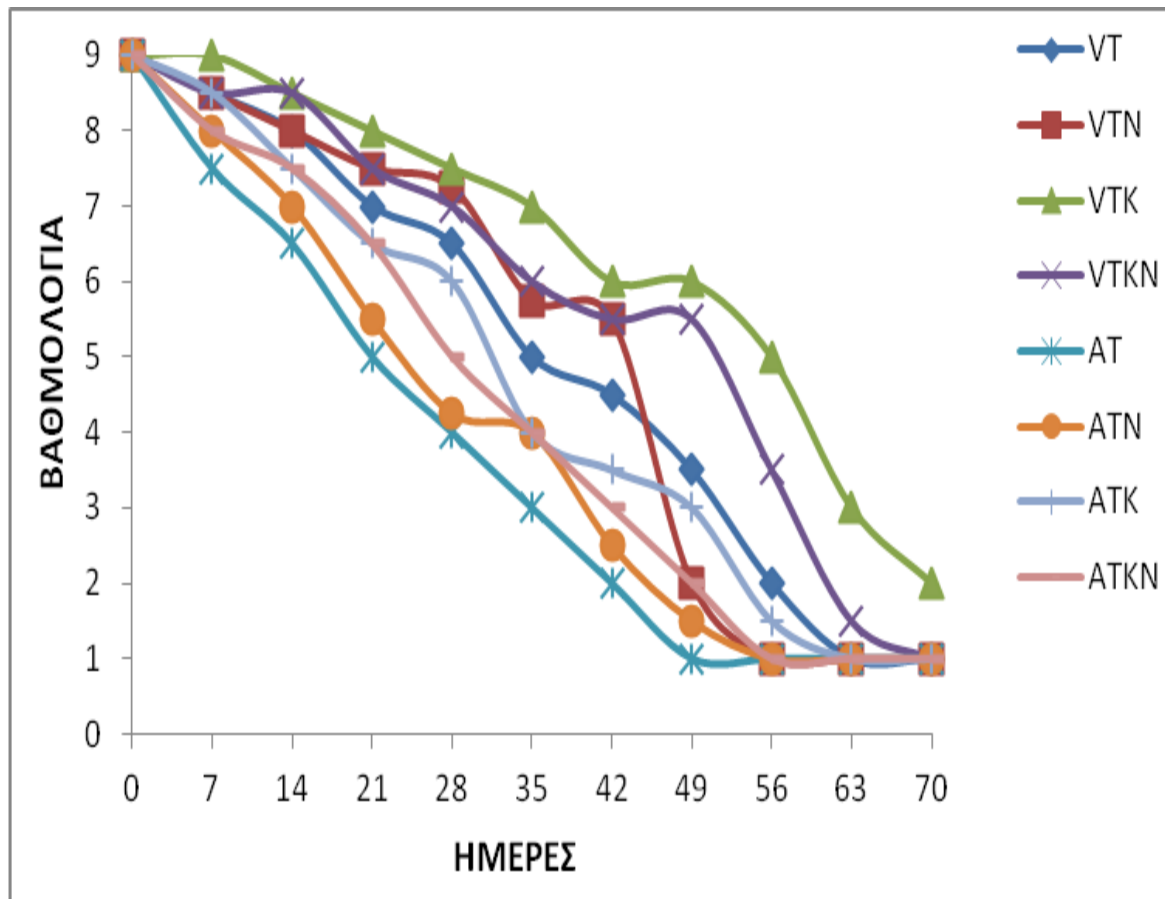
Οι Mexis et al. (2012) αναφέρουν ότι η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση που χρησιμοποιείται, δεν επηρεάζει σημαντικά το pH του κοτόπουλου. Σε αντίθεση, οι Del Rio et al. (2007) ανέφεραν ότι το pH του κοτόπουλου που εμβαπτίστηκε σε διάλυμα κιτρικού οξέος 2% μειώθηκε σημαντικά. Επίσης, το pH της μαύρης ελιάς ήταν παρόμοιο στο δείγμα που είχε προστεθεί ναταμυκίνη στην άλμη των ελιών και στο control (Hondrodimou et al., 2011). Οι Oliveira et al., (2010) αναφέρουν ότι δεν υπήρχε σημαντική επίδραση στο pH από την συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε σχέση με την συσκευασία σε αέρα, σε τεμαχισμένο μαρούλι. Συγκεκριμένα το pH κυμάνθηκε σε όλες τις πειραματικές περιπτώσεις μεταξύ 6,3- 6,5 στους 5 ° C.

#### **4.3.8. Οργανοληπτική εξέταση και προσδιορισμός του χρόνου ζωής του προϊόντος στους 4° C**

Εφόσον το τζατζίκι είναι προϊόν με βάση τη γιαούρτη, αναφέρονται τα βασικά χαρακτηριστικά που καθορίζουν την ποιότητα της γιαούρτης. Τα σημαντικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά για την γιαούρτη είναι η γεύση, το άρωμα (οσμή), η συνεκτικότητα, το ιξώδες και η εμφάνιση (Ζερφυρίδης, 2001). Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του γιαουρτιού εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Οι Johansen et al. (2008) αναφέρουν ότι επίδραση στην υφή (εμφάνιση) του γιαουρτιού έχουν η περιεκτικότητά σε πρωτεΐνη και λίπος. Οι Folkenberg et al. (2006) υποστηρίζουν ότι η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από την καλλιέργεια γαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του επηρεάζει την υφή του γιαουρτιού. Στην μελέτη των Yazici και Akgun (2004) οι δοκιμαστές κατά την οργανοληπτική εκτίμηση στραγγιστής γιαούρτης έδωσαν υψηλότερη βαθμολογία για την γεύση και την οσμή στην γιαούρτη με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος. Ανάλογα, οι δοκιμαστές κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο στραγγιστής γιαούρτης προτίμησαν την πλήρη γιαούρτη, αμέσως μετά την γιαούρτη με χαμηλά λιπαρά και τελευταία στην επιλογή τους ήταν η γιαούρτη με μηδέν λιπαρά, όσον αφορά την βαθμολογία τους στην εμφάνιση, το flavor (γεύση και οσμή), την υφή και την γενική αποδοχή του προϊόντος (Kaaki et al., 2012). Τελικά σύμφωνα με τον Ζερφυρίδη (2001) η γεύση και το άρωμα της γιαούρτης είναι ίσως τα πιο σημαντικά κριτήρια κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση της γιαούρτης.

Στην οργανοληπτική εξέταση του τζατζικιού αξιολογήθηκαν το χρώμα, η υφή, η γεύση και η οσμή του προϊόντος. Οι κριτές παρατήρησαν ότι η ναταμυκίνη διατηρεί καλύτερα το χρώμα από το εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX, το οποίο υποκιτρινίζει ελαφρώς το τζατζίκι. Οι διαφορές όμως στο χρώμα ήταν σταθερά ανεπαίσθητες ( $P > 0,05$ ), οπότε το χρώμα δεν θεωρήθηκε καθοριστική παράμετρος για την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος στην παρούσα μελέτη. Τα οργανοληπτικά αποτελέσματα (χρώμα) συμφωνούν με εκείνα των Salvador και Fiszman (2004) οι οποίοι δεν βρήκαν σημαντικές διαφορές στο χρώμα του γιαουρτιού με γεύση φράουλας κατά την διάρκεια των 91 ημερών συντήρησης του στους 10° C. Σε μία άλλη μελέτη, επιπρόσθετα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στο χρώμα του

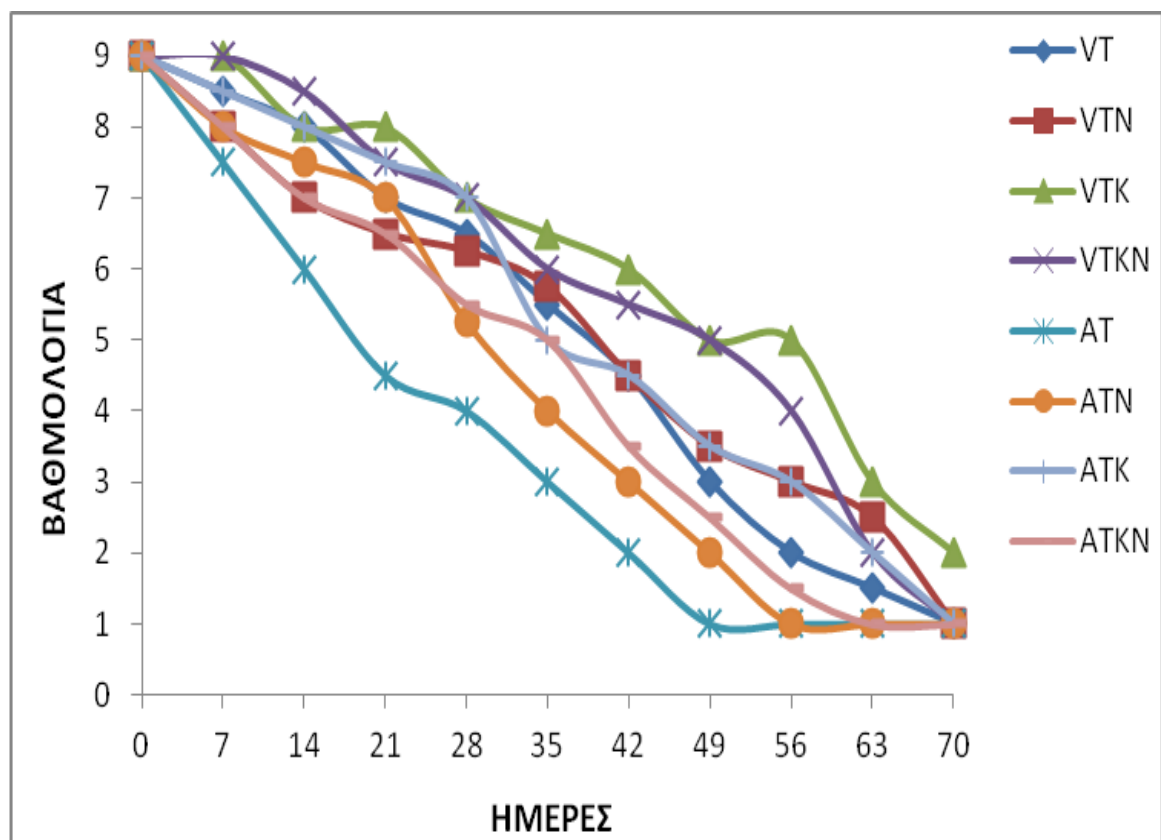
κοτόπουλου με την προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox (Mexis et al., 2012), κάτι που συμπίπτει με τα δικά μας αποτελέσματα, αφού η επίδραση στο χρώμα του τζατζικιού από το εκχύλισμα Citrox κρίθηκε άνευ σημασίας από τους κριτές κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος.



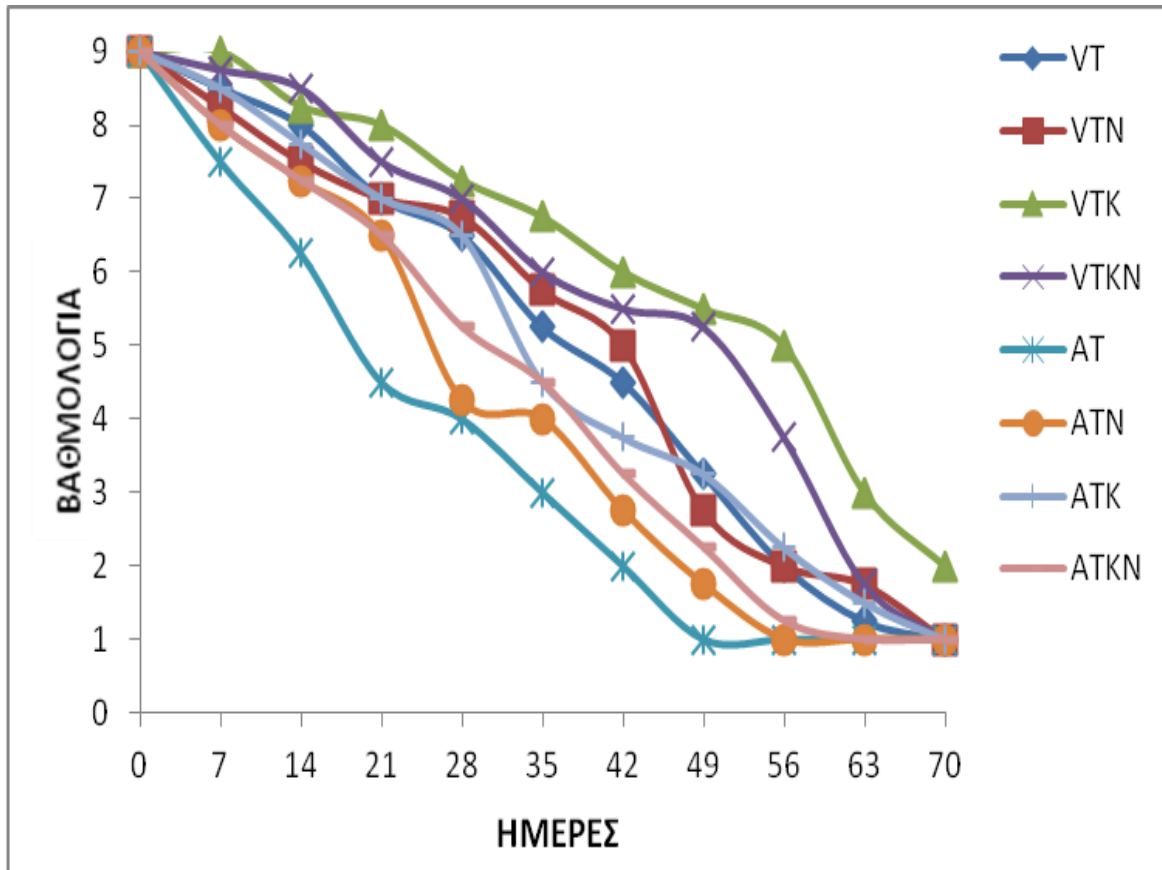
**Γράφημα 46:** Οργανοληπτική αξιολόγηση της γεύσης σε τζατζικί κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα ή κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Η υφή- εμφάνιση του προϊόντος επίσης δεν επηρεάστηκε σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και σε όλες τις μεταχειρίσεις ( $P > 0,05$ ), εκτός από τα δείγματα που συντηρήθηκαν μετά την 56<sup>η</sup> ημέρα, όπου παρατηρήθηκε μια ελάχιστα πιο υδαρή εμφάνιση του τζατζικιού. Οι Al-Kadamany et al. (2002) παρατήρησαν ελαττώματα υφής σε μεταγενέστερο στάδιο αποθήκευσης από ότι παρατηρήθηκαν οι αλλαγές γεύσης και οσμής (flavor) σε στραγγιστό γιαούρτι συντηρημένο στους 5° C. Αυτό ίσως να εξηγεί την μικρή αλλοίωση στην υφή (ελαφρώς υδαρή εμφάνιση)

του τζατζικιού που παρατηρήθηκε μετά την 56<sup>η</sup> ημέρα. Οι Salvador και Fiszman (2004) αναφέρουν έντονη μεταβολή της εμφάνισης του γιαουρτιού (συναίρεση, σταθερότητα, συντήρηση του σχήματος), κάτι που δεν παρατηρήθηκε στο τζατζίκι (στους 4° C). Πιθανώς, λοιπόν, η έντονη μεταβολή αυτή της εμφάνισης του γιαουρτιού να οφείλεται στην υψηλότερη θερμοκρασία συντήρησης (10° C). Όπως επίσης πιθανόν τα πρόσθετα λαχανικά (αγγουράκι, άνηθος και σκόρδο) στην γιαούρτη να μειώνουν την αλλοίωση της υφής στο τζατζίκι. Σε ανάλογα αποτελέσματα κατέληξαν και οι Cueva και Aryana (2008), όπου η συναίρεση της γιαούρτης μειώθηκε με την προσθήκη σε αυτό διαιτητικών ινών, κάτι που σύμφωνα με τους ερευνητές αποδόθηκε στην βελτιωμένη ικανότητα συγκράτησης νερού των διαιτητικών ινών. Άλλωστε οι Kondyli et al. (2008) και οι Katsiari et al. (2009) δεν εντόπισαν σημαντικές διαφορές στην εμφάνιση και την υφή γαλοτυριού καθ' όλη τη διάρκεια των 30 ημερών συντήρησης του στους 2-3° C.



**Γράφημα 47:** Οργανοληπτική αξιολόγηση της οσμής σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα ή κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).



**Γράφημα 48:** Οργανοληπτική ολική αποδοχή (που προκύπτει από το μέσο όρο της βαθμολογίας της οσμής και της γεύσης του προϊόντος) σε τζατζίκι κατά τη διάρκεια συντήρησης υπό ψύξη (4° C) σε συσκευασία αέρα ή κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Citrox, Ναταμυκίνη).

Τελικά τόσο το χρώμα, όσο και η υφή ως παράμετροι της οργανοληπτικής αξιολόγησης του προϊόντος, δεν ελήφθησαν υπόψη στον προσδιορισμό του χρόνου ζωής στο τζατζίκι. Για το λόγο αυτό κρίθηκε ότι οι καθοριστικοί παράγοντες που έκριναν την οργανοληπτική ποιότητα του προϊόντος, υπό τις μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν, ήταν οι παράμετροι της γεύσης και της οσμής. Αντίστοιχα οι Cueva και Aryana (2008) αναφέρουν ότι κατά την οργανοληπτική εξέταση γιαούρτης με διαιτητικές ίνες οι δοκιμαστές δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφορές στην εμφάνιση και το χρώμα της και ότι ο χρόνος αποθήκευσης του προϊόντος υπό ψύξη (5° C) επηρέασε σημαντικά τη γεύση και την οσμή (flavor) της γιαούρτης.

Το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox όταν προστίθεται στο τζατζίκι του προσδίδει μια ευχάριστη γεύση (Γράφημα 46), μειώνοντας την γεύση του σκόρδου

και αναδεικνύοντας την ευχάριστη και δροσερή γεύση του αγγουριού (ATK και VTK), ενώ τα δείγματα που περιείχαν ναταμυκίνη (ATN και VTN), μετά την τρίτη εβδομάδα είχαν μια πικρή-ουδέτερη γεύση. Στις μεταχειρίσεις όμως ATKΝ και VTKΝ οι δοκιμαστές δεν αντιλήφθηκαν τόσο έντονα την ουδέτερη προς πικρή γεύση που δίνει στο τζατζίκι η ναταμυκίνη, αλλά υπερίσχυσε η ευχάριστη γεύση του Citrox. Συνεπώς οι κριτές συμπέραναν ότι όταν το Citrox συνδυάζεται με την ναταμυκίνη τα δύο αυτά προσδίδουν ικανοποιητική γεύση στο προϊόν. Αντίθετα, οι Mexis et al. (2012) παρατήρησαν στα δείγματα που περιέχουν το εκχύλισμα εσπεριδοειδών ανεπιθύμητη αλλοίωση της γεύσης στο κρέας κοτόπουλου (συγκεκριμένα οι δοκιμαστές ανέφεραν φρουτώδη γεύση για αυτά τα δείγματα). Στο τζατζίκι η προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox βελτίωσε την γεύση του ( $P < 0,05$ ), ίσως γιατί το συγκεκριμένο προϊόν έχει έντονη γεύση σκόρδου, η οποία αλληλεπιδρώντας με τη φρουτώδη γεύση του Citrox, αναδεικνύει την ευχάριστη δροσερή γεύση του αγγουριού, μειώνοντας παράλληλα εκείνη του σκόρδου. Τέλος, στο τζατζίκι στους 4 °C, παρατηρήθηκε όξινη γεύση και μείωση της οργανοληπτικής αξιολόγησης με το χρόνο συντήρησης (Γράφημα 46 και 48). Αντίστοιχα οι Salvador και Fiszman (2004) παρατήρησαν σημαντική μεταβολή στην γεύση του προϊόντος κατά την διάρκεια των 91 ημερών συντήρησης του στους 10° C. Επίσης, οι Cueva και Aryana (2008) αναφέρουν ότι κατά την οργανοληπτική εξέταση γιαούρτης με διαιτητικές ίνες η βαθμολογία την 34<sup>η</sup> ημέρα ήταν σημαντικά χαμηλότερη από εκείνη των άλλων ημερών, λόγω όξινης γεύσης. Όσον αφορά την οσμή (Γράφημα 47) παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox στο τζατζίκι μειώνει την οσμή του σκόρδου και αναδεικνύει την πιο «λεπτή» και ευχάριστη οσμή του αγγουριού. Η ναταμυκίνη διατηρεί την φυσική οσμή σκόρδου στο τζατζίκι, αλλά οι δοκιμαστές προτίμησαν την πιο ντελικάτη και φίνα οσμή (οσμή εσπεριδοειδών) που προσέδωσε στο προϊόν το εκχύλισμα Citrox.

Η βαθμολογία της ολικής οργανοληπτικής αποδοχής (μέσος όρος γεύσης και οσμής) μειώθηκε ( $P < 0,05$ ) συναρτήσει του χρόνου συντήρησης του προϊόντος (Γράφημα 47). Ανάλογα, ο χρόνος συντήρησης (14 ημέρες) στραγγιστής γιαούρτης στους 4-6° C είχε αρνητική επίδραση στο flavor (γεύση και οσμή) του προϊόντος, αφού η βαθμολογία μειωνόταν ανάλογα με το χρόνο συντήρησης. Τα ελαττώματα που σημειώθηκαν από τους δοκιμαστές ήταν υψηλή οξύτητα και ταγγή γεύση για



όλα τα δείγματα κατά το τέλος της περιόδου αποθήκευσης (Yazici και Akgun, 2004). Ακόμη, η συσκευασία κενού έδωσε υψηλότερη βαθμολογία ( $P < 0,05$ ) σε ότι αφορά την οσμή και γεύση (ολική οργανοληπτική αποδοχή), συγκριτικά με το προϊόν σε αέρα (Γράφημα 47). Άξιο λόγου είναι ότι τα δείγματα που απορρίφθηκαν είχαν μια υπόξινη γεύση και οσμή, σύμφωνα με τους δοκιμαστές της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Από τα αποτελέσματα της ολικής οργανοληπτικής αποδοχής του προϊόντος προκύπτει ο οργανοληπτικός χρόνος ζωής για το τζατζίκι, ο οποίος ήταν: 19, 26, 32, 30, 36, 42, 56 και 51 ημέρες για τις μεταχειρίσεις AT, ATN, ATK, ATKN, VT, VTN, VTK και VTKN, αντίστοιχα.

**Πίνακας 10 :** Ο χρόνος ζωής σε τζατζίκι όπως προκύπτει από την οργανοληπτική και μικροβιολογική εξέταση του.

Δείγματα	Οργανοληπτικός Χρόνος Ζωής*	Μικροβιολογικός Χρόνος Ζωής**	Χρόνος Ζωής στο ΤΖΑΤΖΙΚΙ***
AT	19 ημέρες	15 ημέρες	17 ημέρες
ATN	26 ημέρες	18 ημέρες	22 ημέρες
ATK	32 ημέρες	21 ημέρες	26,5 ημέρες
ATKN	30 ημέρες	28 ημέρες	29 ημέρες
VT	36 ημέρες	30 ημέρες	33 ημέρες
VTN	42 ημέρες	42 ημέρες	42 ημέρες
VTK	56 ημέρες	56 ημέρες	56 ημέρες
VTKN	51 ημέρες	63 ημέρες	57 ημέρες

\* Ο οργανοληπτικός χρόνος ζωής προέκυψε από την εκτίμηση της γεύσης και της οσμής του προϊόντος

\*\* Ο μικροβιολογικός χρόνος ζωής προσδιορίστηκε με βάση μια τιμή πληθυσμού Ζυμών/Μυκήτων ίση με ( $10^5$  cfu/g)

\*\*\* Ο χρόνος ζωής στο τζατζίκι προκύπτει από τον μέσο όρο του μικροβιολογικού και οργανοληπτικού χρόνου ζωής

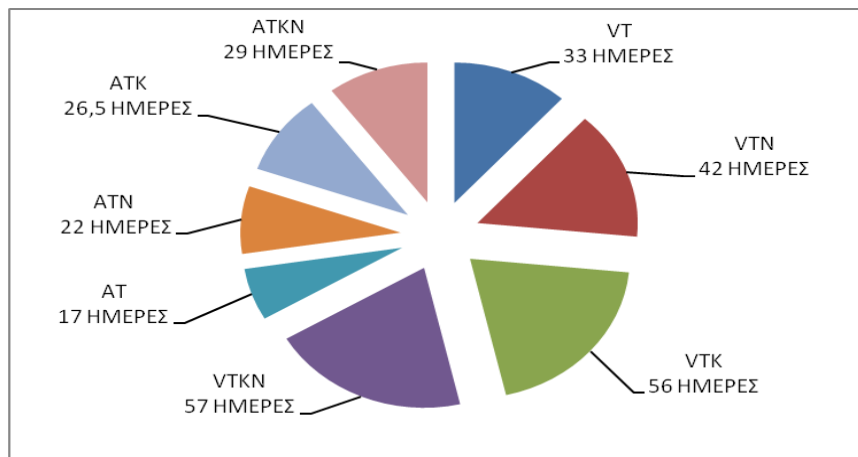
Το τζατζίκι μοιάζει με άλλα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα (όπως έχει αναφερθεί παραπάνω), όπως η γιαούρτη και το γαλοτύρι, στη μικροχλωρίδα των οποίων εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορεί να υπάρξουν κι άλλοι ανθεκτικοί μικροοργανισμοί, όπως πχ, ζύμες και μύκητες. Η υποβάθμιση αυτών των προϊόντων μετά από αποθήκευση προκαλείται κυρίως από ζύμες/μύκητες, των οποίων οι πληθυσμοί μπορεί να είναι υψηλοί ( $> 10^5$  cfu/g) και συνήθως προκαλούν ανεπιθύμητα ελαττώματα στη γεύση και το άρωμα των προϊόντων (Kykidou et al.,

2007). Οι ζύμες είναι μια σημαντική αιτία αλλοίωσης της γιαούρτης. Η αλλοίωση της από ζύμες γίνεται εμφανής όταν ο πληθυσμός τους φθάσει ίσος με  $10^5$ - $10^6$  cfu/g (Fleet, 1990).

Ο Robinson (2004) υποστηρίζει ότι η αλλοίωση των γιαουρτιών κατά την διάρκεια αποθήκευσης τους προκαλείται κυρίως από ζύμες και ορίζει ως σημείο αναφοράς την χρονική στιγμή που ο πληθυσμός τους αγγίζει τις 5 λογαριθμικές μονάδες. Παρομοίως στην παρούσα μελέτη, ο μικροβιολογικός χρόνος ζωής υπολογίστηκε σύμφωνα με τον πληθυσμό των ζυμών και μυκήτων, αφού πληθυσμός ίσος με  $5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  δίνει απορριπτέο προϊόν. Οι ζύμες έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως δείκτης υποβάθμισης της ποιότητας του γιαουρτιού με φρούτα και το προϊόν θεωρήθηκε αλλοιωμένο όταν ο πληθυσμός τους ήταν ίσος με  $10^5$  cfu/g. Όταν αλλοιωθεί η γιαούρτη από ζύμες παρατηρείται δυσάρεστη γεύση και οσμή στο προϊόν (Suriyarachchi και Fleet, 1981). Επίσης και οι Kykkidou et al. (2007) χρησιμοποίησαν ως μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης σε γαλοτύρι τον πληθυσμό ζυμών και μυκήτων ίσο με  $10^5$  cfu/g και αναφέρουν ότι όταν το γαλοτύρι περιείχε αυτό τον πληθυσμό ζυμών/μυκήτων το προϊόν είχε αναπτύξει ορατά σημάδια της αλλοίωσης (κυρίως υπόλευκες και κιτρινωπές κηλίδες στην επιφάνεια) και δυσάρεστη γεύση, οπότε κρίθηκε ως μη αποδεκτό τους δοκιμαστές. Ανάλογα και ο χρόνος ζωής στο labneh (είδος γιαούρτης της Μέσης Ανατολής) επιλέχθηκε να οριστεί από τον πληθυσμό των ψυχρότροφων ζυμών και των ζυμών και μυκήτων, δηλ. όταν ο πληθυσμός αυτών των μικροοργανισμών φτάσει να είναι μεγαλύτερος ή ίσος του  $10^5$  cfu/g λήγει ο χρόνος ζωής του προϊόντος, και παράλληλα από την αλλοίωση της γεύσης της γιαούρτης, όπως προκύπτει από την οργανοληπτική εξέταση της. Στην ίδια εργασία άλλωστε αναφέρεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ανάπτυξης των ζυμών και μυκήτων και της ανάπτυξης δυσάρεστης γεύσης (ζυμούμενη γεύση) στο labneh (Al-Kadamany et al., 2003).

Τελικά στον Πίνακα 10 και από τα Γραφήματα 38 και 39 φαίνεται ότι τα AT, ATN, ATK, ATKN, VT, VTN, VTK και VTKN δείγματα προσεγγίζουν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης για Ζύμες/Μύκητες ( $10^5$  cfu/g) στις 15, 18, 21, 28, 30, 42, 56 και 63 ημέρες, αντίστοιχα. Σε γιαούρτη με βατόμουρα χωρίς συντηρητικά η ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων (από αρχικά επίπεδα  $3 \log$  cfu/g) ήταν  $>5 \log(\text{cfu/g})$  μετά από 3 εβδομάδες αποθήκευσης στους  $4^\circ \text{C}$  (συσκευασμένο σε αέρα). Στην ίδια μελέτη μετά

από δύο εβδομάδες η γιαούρτη με βατόμουρα είχε μια κίτρινη βλέννα στην επιφάνεια του (Penney et al., 2004). Μετά από 21 ημέρες αυξήθηκε ο αριθμός των Ζυμών και Μυκήτων σε πληθυσμό υψηλότερο από 5 log(cfu/g) σε γαλοτύρι (pH = 4.2) συσκευασμένο σε αέρα στους 4° C (Kykkidou et al., 2007).



**Γράφημα 49:** Σχηματική απεικόνιση του χρόνου ζωής της παραδοσιακής σαλάτας «τζατζίκι» στους 4° C, σε συσκευασία αέρα και κενού, απουσία ή παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων (Ναταμυκίνης και CitroX).

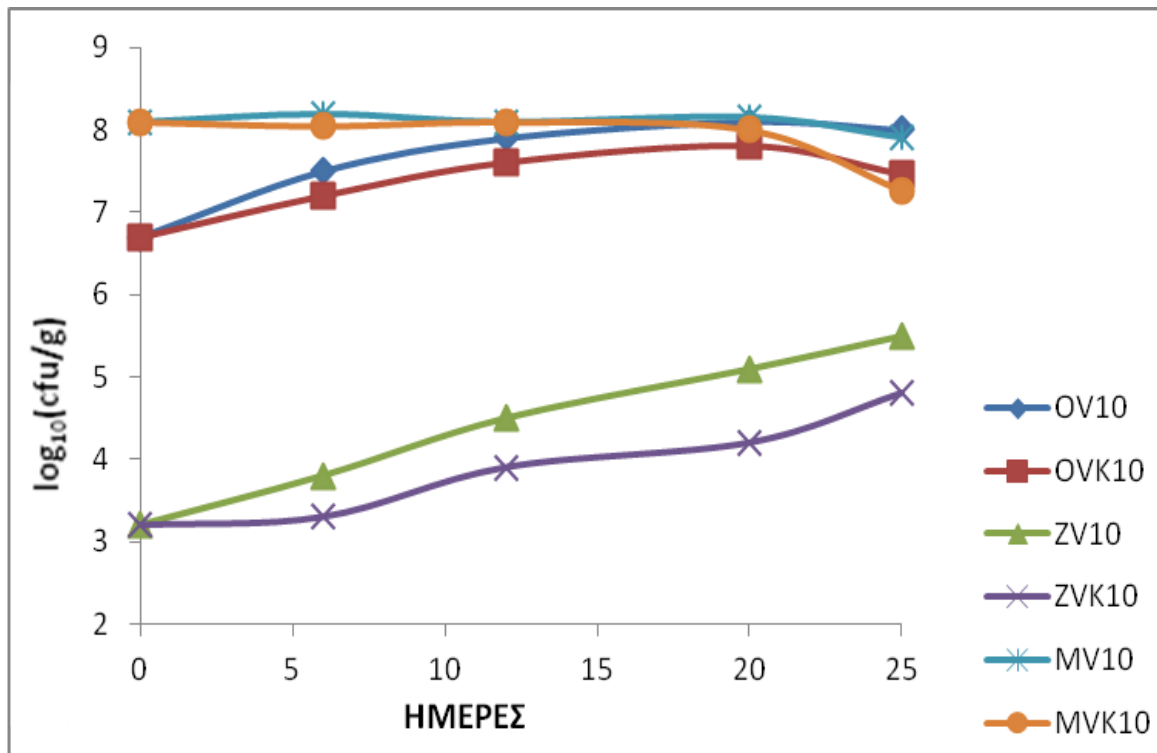
Ο χρόνος ζωής του προϊόντος (Γράφημα 49 και Πίνακας 10) όπως προκύπτει από τον συνδυασμό (μέσο όρο) του οργανοληπτικού και μικροβιολογικού χρόνου ζωής, στο τζατζίκι είναι: 17, 22, 26.5, 29, 33, 42, 56 και 57 ημέρες για τα AT, ATN, ATK, ATKN, VT, VTN, VTK και VTKN, αντίστοιχα. Ο χρόνος ζωής του labneh (είδος γιαούρτης στην Μέση Ανατολή) βρέθηκε ίσος με 18,5 ημέρες, συντηρημένο υπό ψύξη και συσκευασμένο σε αερόβια συσκευασία (Al-Kadamany et al., 2003). Παρατηρούμε (Πίνακας 10) ότι ο μικροβιολογικός είναι μικρότερος ή ίσος από τον οργανοληπτικό χρόνο ζωής στο τζατζίκι σε όλες τις μεταχειρίσεις (εκτός από το δείγμα VTKN). Αυτό πιθανώς οφείλεται στην φύση του προϊόντος. Συγκεκριμένα εξαιτίας της έντονης οσμής και γεύσης που προσδίδει το σκόρδο στο τζατζίκι δεν είναι εύκολο να αντιληφθεί ο καταναλωτής την αλλοίωση (γεύσης και οσμής) που προκαλείται από την αύξηση του πληθυσμού των ζυμών και μυκήτων στο προϊόν, παρά μόνο όταν αυτός φτάσει σε αρκετά υψηλό πληθυσμό (επιφανειακή αλλοίωση). Για το λόγο

αυτόν σε ένα τέτοιο τρόφιμο μια εκτίμηση του χρόνου ζωής του μόνο με οργανοληπτική αξιολόγηση θα μπορούσε να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα. Η διαφοροποίηση του δείγματος VTKN οφείλεται στο γεγονός ότι ο συνδυασμός ναταμυκίνης- CitroX- συσκευασίας κενού έδωσε τα καλύτερα μικροβιολογικά αποτελέσματα στο τζατζίκι, όμως η προσθήκη ναταμυκίνης προσέδωσε μια ουδέτερη προς πικρή γεύση στο προϊόν, με αποτέλεσμα να απορρίπτεται οργανοληπτικά πολύ πριν από την μικροβιολογική αλλοίωση του.

#### **4.3.9. Προσδιορισμός χρόνου ζωής τζατζικιού υπό συσκευασία κενού, διατηρημένου στους 10° C**

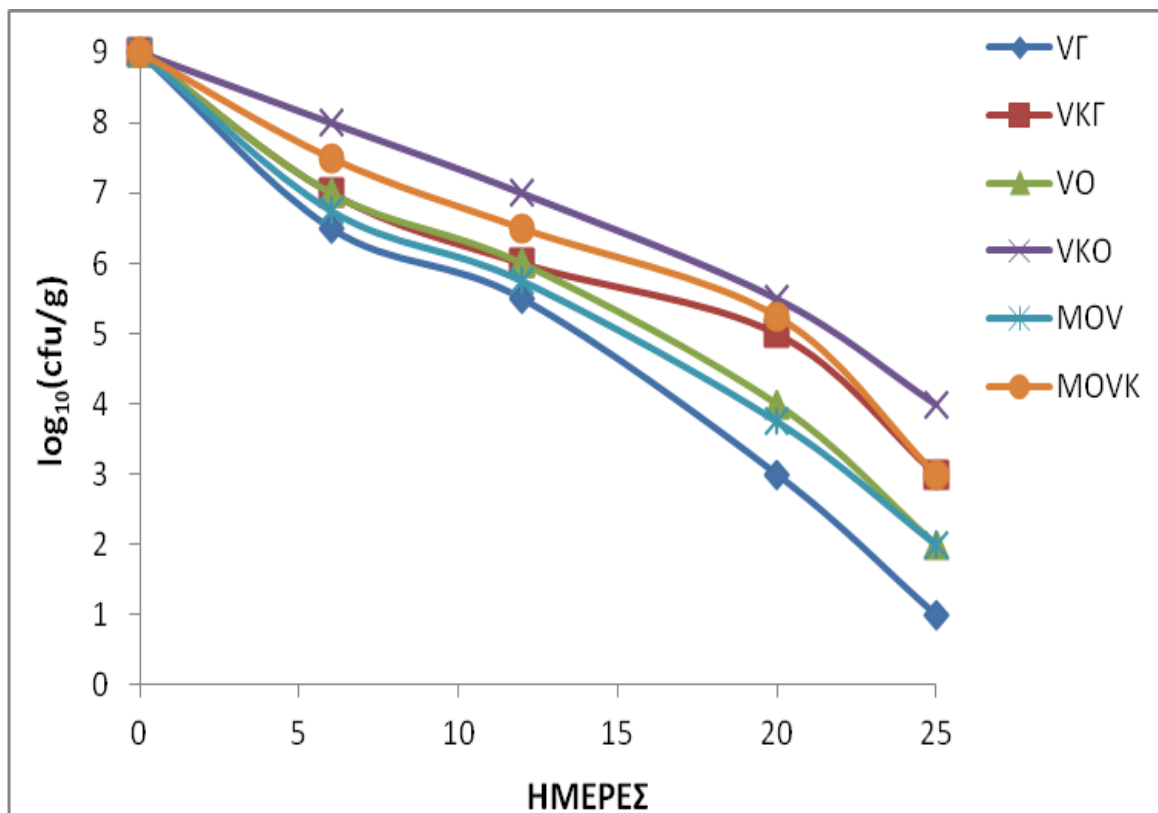
Κρίθηκε απαραίτητο να προσδιοριστεί ο χρόνος ζωής του προϊόντος σε συσκευασία κενού στους 10° C έτσι ώστε να προσδιοριστεί το χρονικό διάστημα διεξαγωγής του πειράματος της επιβίωσης των παθογόνων βακτηρίων στο προϊόν αυτό σε αυτήν την θερμοκρασία (Κεφάλαιο 5). Για το σκοπό αυτό έγινε οργανοληπτική εκτίμηση του προϊόντος και προσδιορίστηκαν η OMX, τα Γαλακτικά βακτήρια και οι Ζύμες -Μύκητες στο τζατζίκι. Παρατηρήθηκε ότι τα γαλακτικά βακτήρια επικράτησαν της μικροχλωρίδας του προϊόντος (Γράφημα 55), και ότι ο πληθυσμός τους παρέμεινε πρακτικά σταθερός και ίσος με  $8 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Η OMX αυξήθηκε κατά περίπου  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στο τζατζίκι (με ή χωρίς την προσθήκη CitroX) στους 10° C (Γράφημα 50). Η προσθήκη CitroX στο τζατζίκι δεν μείωσε τον πληθυσμό της OMX και των γαλακτικών βακτηρίων (Γράφημα 50). Ο αριθμός των Ζυμών-Μυκήτων αυξήθηκε κατά 2 λογαριθμικές μονάδες στο τζατζίκι υπό κενό που συντηρήθηκε στους 10° C. Στο τζατζίκι με την προσθήκη του CitroX ο πληθυσμός τους ήταν μειωμένος κατά περίπου 0,7 λογαριθμικές μονάδες σε σχέση με εκείνο χωρίς συντηρητικά (Γράφημα 50). Όσον αφορά την οργανοληπτική εξέταση εκτιμήθηκαν η γεύση και η οσμή στο τζατζίκι και σημειώθηκε σημαντική μείωση (υποβάθμιση) και των δύο αυτών παραγόντων με την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης του προϊόντος στους 10° C (Γράφημα 51). Η προσθήκη του φυσικού συντηρητικού CitroX έδωσε καλύτερα οργανοληπτικά αποτελέσματα στο τζατζίκι,

βελτιώνοντας την βαθμολογία του προϊόντος τόσο για την οσμή, όσο και για την γεύση, καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης του στους 10° C (Γράφημα 51).



**Γράφημα 50:** Μικροβιολογική ανάλυση (O.M.X., Γαλακτικά βακτήρια και Ζήμες/Μύκητες) σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό στους 10° C, απουσία ή παρουσία Citroх.

Ο μικροβιολογικός χρόνος ζωής του τροφίμου (Γράφημα 50), με βάση τον πληθυσμό των Ζυμών-Μυκήτων, είναι 20 και 25 ημέρες για το τζατζίκι σε κενό και το τζατζίκι σε κενό με την προσθήκη Citroх, αντίστοιχα, στους 10° C. Ο χρόνος ζωής του σύμφωνα με την οργανοληπτική εκτίμηση (Γράφημα 51) του προϊόντος είναι 16 και 21 ημέρες για το τζατζίκι σε κενό και το τζατζίκι σε κενό με την προσθήκη Citroх, αντίστοιχα. Οπότε ο χρόνος ζωής του προϊόντος, όπως αυτός προκύπτει από τον συνδυασμό του μικροβιολογικού και οργανοληπτικού χρόνου ζωής του, είναι ίσος με 18 και 23 ημέρες για το τζατζίκι σε κενό και το τζατζίκι σε κενό με προσθήκη Citroх, αντίστοιχα, στους 10° C.



**Γράφημα 51:** Οργανοληπτική αξιολόγηση σε τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό στους 10° C, απουσία ή παρουσία CitroX.

Ήταν αναμενόμενο να προκύψει μικρότερος χρόνος διάρκειας ζωής του προϊόντος όταν συντηρείται σε υψηλότερη θερμοκρασία (10° C), σε σχέση με τους 4° C. Οι Skalina και Nikolajeva (2010) εξέτασαν τρεις σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση (σε θερμοκρασία συντήρησης 3 και 7 ° C για 48 ώρες): Σαλάτα με μαγιονέζα, γαρίδες και ντομάτα, σαλάτα με μαγιονέζα και καπνιστό ζαμπόν και σαλάτα με μαγιονέζα τυρί και σκόρδο. Η αρχική μεσόφιλη χλωρίδα για τις πρώτες δύο σαλάτες ήταν 4,0 log<sub>10</sub>(cfu/g) και 3,4 log<sub>10</sub>(cfu/g) για την τελευταία σαλάτα. Μετά από 48 h στους 3° C ο πληθυσμός τους αυξήθηκε κατά περίπου 1, 1.2 και 1.4 log<sub>10</sub>(cfu/g) στην σαλάτα με γαρίδα, σαλάτα με ζαμπόν και σαλάτα με τυρί και σκόρδο, αντίστοιχα. Ενώ μετά από το ίδιο χρονικό διάστημα αποθήκευσης στους 7° C ο πληθυσμός τους αυξήθηκε κατά 3, 2.5 και 2 log<sub>10</sub>(cfu/g) στην σαλάτα με γαρίδα, σαλάτα με ζαμπόν και σαλάτα με τυρί και σκόρδο, αντίστοιχα. Παρομοίως οι Oliveira

et al., (2010) αναφέρουν ότι οι πληθυσμοί τόσο της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας όσο και των ψυχρότροφων βακτηρίων σε τεμαχισμένο μαρούλι αυξήθηκαν σημαντικά κατά τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης σε όλους τους τύπους συσκευασίας, αλλά ο ρυθμός αύξησης ήταν ταχύτερος στους 25 °C από εκείνον στους 5 °C.

Ακόμη, σύμφωνα με τους Viljoen et al. (2003) η θερμοκρασία αποθήκευσης της γιαούρτης επηρέασε σαφώς τον πληθυσμό των ζυμών και των γαλακτικών βακτηρίων στο προϊόν, αφού παρατήρησαν μεγαλύτερη ανάπτυξη τόσο ζυμών και μυκήτων, όσο και γαλακτικών βακτηρίων σε γιαούρτη (με ή χωρίς φρούτα) που συντηρήθηκε στους 10° C, σε σχέση με εκείνο που συντηρήθηκε στους 5° C. Επίσης ο πληθυσμός ζυμών και μυκήτων και των ψυχρότροφων βακτηρίων σε labneh (είδος γιαούρτης) συσκευασμένης σε αέρα, ήταν μεγαλύτερος όταν το προϊόν συσκευάστηκε στους 15° C από εκείνον στους 5° C, ενώ στην ίδια έρευνα δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων μεταξύ των δύο θερμοκρασιών. Επίσης, η αλλοίωση της γεύσης ήταν σε μικρότερο βαθμό στο προϊόν που συντηρήθηκε στους 5° C από ότι στους 15° C (Al- Kadamany et al., 2003).

---

#### 4.4. Συμπεράσματα

---

- Η προσθήκη ναταμυκίνης στο τζατζίκι που συσκευάστηκε σε αέρα μείωσε την OMX κατά 0,3  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox κατά 0,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  και η προσθήκη και των δύο αντιμικροβιακών ουσιών κατά 0,8  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ . Στο τζατζίκι που συσκευάστηκε υπό κενό η προσθήκη ναταμυκίνης μείωσε την OMX κατά 0,2  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ , η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox κατά 0,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$  και η προσθήκη και των δύο αντιμικροβιακών ουσιών κατά περίπου ένα λογάριθμο. Η OMX ήταν μικρότερη σε όλες τις μεταχειρίσεις σε κενό σε σχέση με εκείνη των αντίστοιχων δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε αέρα.
- Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (7,8 έως 8,5  $\log_{10}(\text{cfu/g})$ ) καθ' όλη την διάρκεια του

πειράματος (70 ημέρες), επικρατώντας της τελικής μικροχλωρίδας του προϊόντος, ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία αντιμικροβιακών παραγόντων.

- Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων κυμάνθηκε σε χαμηλές τιμές και δεν ξεπέρασαν σε κανένα δείγμα που συσκευάστηκε σε αέρα τους  $3 \log_{10}(\text{cfu/g})$  και στα αντίστοιχα υπό κενό δείγματα τους  $2 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Συμπερασματικά, φαίνεται ότι οι ψευδομονάδες κυμάνθηκαν σε πληθυσμούς περίπου 1 λογάριθμο υψηλότερους στο τζατζίκι σε αέρα σε σχέση με το κενό.
- Στη μικροχλωρίδα του υπό εξέταση προϊόντος δεν ανιχνεύτηκαν αρχικά Εντεροβακτήρια. Ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων παρέμεινε σε χαμηλές τιμές σε όλες τις περιπτώσεις (συσκευασία αέρα και κενού). Συνεπώς δεν αποτελεί μια ομάδα μικροοργανισμών που παίζει σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση του συγκεκριμένου προϊόντος.
- Επιπρόσθετα στο τζατζίκι δεν αναπτύχθηκαν Εντερόκοκκοι καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος σε όλες τις μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν.
- Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα δείγματα αναπτύχθηκαν κυρίως ζύμες, ενώ υπήρξε ελάχιστη εμφάνιση νηματοειδών μυκήτων (μούχλα) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων αυξάνεται σημαντικά στο τζατζίκι (τόσο σε αέρα όσο και σε VP) σε σχέση με το χρόνο συντήρησής του στους  $4^{\circ} \text{C}$ . Στα δείγματα που συσκευάστηκαν υπό κενό παρατηρείται μικρότερη ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων σε σχέση με εκείνα που συσκευάστηκαν σε αέρα, σε όλες τις μεταχειρίσεις. Η προσθήκη ναταμυκίνης και του Citrox μείωσαν και στις δύο συσκευασίες τον πληθυσμό των ζυμών/μυκήτων κατά 0,5 και 1 λογάριθμο, αντίστοιχα, ενώ ο συνδυασμός τους ήταν πιο δραστικός έναντι των ζυμών/μυκήτων σε σχέση με την προσθήκη του καθενός χωριστά στο τζατζίκι.
- Το αρχικό pH στο τζατζίκι ήταν ίσο με 4,37 και έφτασε το 5,2 και 5,0 στο προϊόν υπό αερόβιες συνθήκες συσκευασίας και σε συσκευασία κενού την 28<sup>η</sup> ημέρα, αντίστοιχα. Η προσθήκη της ναταμυκίνης και του Citrox στο τζατζίκι δεν επηρέασαν σημαντικά το pH του προϊόντος.
- Διαπιστώθηκε ότι η αλλοίωση όλων των δειγμάτων προκλήθηκε από υψηλό αριθμό ζυμών και μυκήτων, συνεπώς ο μικροβιολογικός χρόνος ζωής του



προϊόντος ορίζεται με κριτήριο αυτή την ομάδα μικροοργανισμών. Τα AT, ATN, ATK, ATKΝ, VT, VTN, VTK και VTKN δείγματα αγγίζουν το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης που ορίστηκε για τις ζύμες και μύκητες ( $10^5$  cfu/g) την 15, 18, 21, 28, 30, 42, 56 και 63 ημέρα, αντίστοιχα.

- Ο οργανοληπτικός χρόνος ζωής της παραδοσιακής σαλάτας «τζατζίκι», υπό ψύξη ( $4^{\circ}$  C) σε όλες τις μεταχειρίσεις του πειράματος, με βάση την οργανοληπτική αξιολόγηση του προϊόντος (γεύση και οσμή), είναι: 19, 26, 30, 32, 36, 42, 51 και 56 ημέρες για τις μεταχειρίσεις AT, ATN, ATKΝ, ATK, VT, VTN, VTKΝ και VTK, αντίστοιχα.
- Τελικά, ο χρόνος ζωής του προϊόντος (στους  $4^{\circ}$  C), όπως προκύπτει από τον συνδυασμό του μικροβιολογικού και οργανοληπτικού χρόνου ζωής, ήταν: 17, 22, 26.5, 29, 33, 42, 56 και 57 ημέρες για τα AT, ATN, ATK, ATKΝ, VT, VTN, VTK και VTKΝ, αντίστοιχα.
- Αντίστοιχα ο χρόνος ζωής του τζατζικιού υπό κενό στους  $10^{\circ}$  C προκύπτει ίσος με 18 και 23 ημέρες για το τζατζίκι σε κενό και το τζατζίκι σε κενό με την προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox, αντίστοιχα.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:**

**Πορεία Ανάπτυξης/Επιβίωσης της *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 και *Bacillus cereus* στο Τζατζίκι, με ή χωρίς την Προσθήκη Διαλύματος CitroX, διατηρημένο στους 4° C και 10° C και σε Θρεπτικό Ζωμό (37° C)**

---

### **5.1. Σκοπός των Πειραμάτων**

---

Ο σκοπός των πειραμάτων στο Κεφάλαιο αυτό ήταν: (α) η μελέτη της ανάπτυξης/ επιβίωσης τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 και *Bacillus cereus*) ενοφθαλμισμένων σε πληθυσμό 10<sup>6</sup> cfu/g στο τζατζίκι και (β) η επίδραση της ‘φυσικής’ αντιμικροβιακής ουσίας CitroX στους παθογόνους αυτούς μικροοργανισμούς. Μελετήθηκε η ανάπτυξη των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων στο τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό, με ή χωρίς την προσθήκη CitroX, στους 4° C και 10° C.

---

### **5.2. Υλικά και Μέθοδοι**

---

#### **5.2.1. Καλλιέργειες των παθογόνων βακτηρίων**

Χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια παθογόνα με εκείνα που περιγράφηκαν στο Κεφάλαιο 3 και πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία για την προετοιμασία των καλλιεργειών (σελίδα 133). Έτσι τόσο τα χαρακτηριστικά των παθογόνων όσο και ο

τρόπος παρασκευής της εκάστοτε καλλιέργειας παθογόνου περιγράφονται αναλυτικά στις σελίδες 140-142.

### 5.2.2. Προετοιμασία των δειγμάτων

Η προετοιμασία του προϊόντος έλαβε χώρα όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 4 (σελίδα 173). Χρησιμοποιήθηκε το ίδιο διάλυμα CitroX (ίδιας συγκέντρωσης) με το κεφάλαιο 4 (σελίδα 174) και για τα πειράματα που περιγράφονται στο παρόν κεφάλαιο. Τα δείγματα που παρασκευάστηκαν για τις ανάγκες αυτής της πειραματικής περίπτωσης είναι τα εξής:

- L:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria monocytogenes*, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- LK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria monocytogenes*, με την προσθήκη CitroX (2‰ v/v).
- B:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Bacillus cereus*, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- BK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Bacillus cereus* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Bacillus cereus*, με την προσθήκη CitroX (2‰ v/v).
- S:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Salmonella enterica*, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.
- SK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Salmonella enterica* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Salmonella enterica*, με την προσθήκη CitroX (2‰ v/v).
- E:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Escherichia coli O157:H7* σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Escherichia coli O157:H7*, χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες.

- EK:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Escherichia coli* O157:H7 σε θρεπτικό υλικό (TSB) ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Escherichia coli* O157:H7, με την προσθήκη Citrox (2‰ v/v).
- L4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- LK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- L10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- LK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *Listeria spp.* σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.
- E4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- EK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- E10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- EK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε τζατζίκι με την προσθήκη Citrox (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.
- S4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.

- SK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^{\circ}$  C.
- S10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^{\circ}$  C.
- SK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *S. enterica* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^{\circ}$  C.
- B4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^{\circ}$  C.
- BK4:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^{\circ}$  C.
- B10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^{\circ}$  C.
- BK10:** Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του βακτηρίου *B. cereus* σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^{\circ}$  C.
- OL4 :** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^{\circ}$  C.
- OLK4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^{\circ}$  C.
- OL10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^{\circ}$  C.

- OLK10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^{\circ}$  C.
- OE4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^{\circ}$  C.
- OEK4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^{\circ}$  C.
- OE10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^{\circ}$  C.
- OEK10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^{\circ}$  C.
- OS4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^{\circ}$  C.
- OSK4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^{\circ}$  C.
- OS10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^{\circ}$  C.
- OSK10:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^{\circ}$  C.
- OB4:** Πορεία ανάπτυξης της O.M.X. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^{\circ}$  C.

- OBK4:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- OB10:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- OBK10:** Πορεία ανάπτυξης της Ο.Μ.Χ. (Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας) σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.
- ML4 :** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- MLK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- ML10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.
- MLK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *L. monocytogenes*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 10° C.
- ME4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 4° C.
- MEK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό, στους 4° C.
- ME10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli O157:H7*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους 10° C.



- MEK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *E. coli* O157:H7, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- MS4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- MSK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- MS10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ενοφθαλμισμένο τζατζίκι με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- MSK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2g/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *S. enterica*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.
- MB4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $4^\circ$  C.
- MBK4:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $4^\circ$  C.
- MB10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό και χωρίς αντιμικροβιακούς παράγοντες, στους  $10^\circ$  C.
- MBK10:** Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (2ml/kg) και ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *B. cereus*, συσκευασμένο υπό κενό, στους  $10^\circ$  C.

Χρησιμοποιήθηκε ποσότητα  $100 \pm 5$  g τζατζίκι σε σακούλα συσκευασίας. Στα δείγματα με παθογόνο χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακής ουσίας (L4, L10, E4, E10, S4, S10, B4 και B10) ενοφθαλμίστηκαν αμέσως με 1 ml πληθυσμού καλλιέργειας παθογόνου  $10^8$  cfu/ml (για να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση του βακτηρίου στο προϊόν περίπου ίση με  $10^6$  cfu/g). Στα δείγματα με παθογόνο και με προσθήκη 2ml

Citrox/kg προϊόντος (LK4, LK10, EK4, EK10, SK4, SK10, BK4 και BK10) προστέθηκαν αρχικά στο τζατζίκι 0,2 ml διάλυμα Citrox σε 100 g τζατζίκι, έγινε μάλαξη 10 λεπτά για να επιτευχθεί ομοιόμορφη διασπορά του αντιμικροβιακού παράγοντα. Τα δείγματα αυτά μετά από 10 λεπτά ενοφθαλμίστηκαν με 1 ml παθογόνου πληθυσμού  $10^8$  cfu/ml (τελική συγκέντρωση στο προϊόν περίπου ίση με  $10^6$  cfu/g). Σημειώνεται ότι κάθε βακτήριο ενοφθαλμίστηκε χωριστά σε κάθε μεταχείριση. Επομένως, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε 4 φορές για κάθε μικροοργανισμό. Μετά τον ενοφθαλμισμό του εκάστοτε παθογόνου, τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά έτσι ώστε να επιτευχθεί βέλτιστη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια του προϊόντος. Με το πέρας των 15 λεπτών, όλα τα δείγματα συσκευάστηκαν υπό κενό. Τα δείγματα L4, E4, S4, B4, LK4, EK4, SK4 και BK4 διατηρήθηκαν στους  $4^{\circ}$  C, ενώ τα δείγματα L10, E10, S10, B10, LK10, EK10, SK10 και BK10 διατηρήθηκαν στους  $10^{\circ}$  C.

Η σακούλα συσκευασίας ήταν η ίδια για όλες τις μεταχειρίσεις και τα χαρακτηριστικά της είναι εκείνα που αναφέρονται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 92). Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο υλικό συσκευασίας λόγω της χαμηλής διαπερατότητας του σε αέρια και υγρασία, κάτι που το καθιστά κατάλληλο για συσκευασία υπό κενό. Επίσης τα δείγματα συσκευάστηκαν με τον ίδιο τρόπο και στη ίδια μηχανή συσκευασίας που αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 92). Οι δειγματοληψίες στους  $4^{\circ}$  C πραγματοποιήθηκαν τις 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 και 70 ημέρες, ενώ τα δείγματα στους  $10^{\circ}$  C τις 0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25 και 30 ημέρες συντήρησης.

Τέλος, όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox σε broth (in vitro έρευνα) χρησιμοποιήθηκαν βιδωτά μπουκαλάκια τύπου SIMAX. Συγκεκριμένα, σε 4 βιδωτά μπουκάλια των 100 ml τοποθετήθηκαν 40 ml αποστειρωμένου ζωμού T.S.B. (Tryptic Soy Broth) και στη συνέχεια ενοφθαλμίστηκαν τα τέσσερα παθογόνα σε συγκέντρωση  $10^6$  cfu/g. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε στην περίπτωση προσθήκης διαλύματος Citrox 0,02% v/v. Όλα τα μπουκάλια τοποθετήθηκαν στους  $37^{\circ}$  C για 32 h. Η δειγματοληψία έγινε μετά από 0, 4, 8, 12, 16, 24 και 32 h.

### 5.2.3. Μικροβιολογική ανάλυση

Μελετήθηκαν οι εξής μικροοργανισμοί: α) *Ολική μεσόφιλη Χλωρίδα* (O.M.X.), β) *Γαλακτικά βακτήρια*, γ) *Escherihia coli*, δ) *Salmonella enterica*, ε) *Bacillus cereus* και στ) *Listeria monocytogenes*.

Ποσότητα δείγματος 10 g από το τζατζίκι μεταφέρθηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher (Seward Medical, London, UK) που περιείχε 90 mL αποστειρωμένο πεπτονόχο διάλυμα (BPW, Merck, Darmstadt, Germany) 0,1% w/v και στη συνέχεια το δείγμα ομογενοποιήθηκε για 60 sec με τη βοήθεια Lab Blender 400 Stomacher (Seward Medical, London, UK). Για τη μικροβιολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του αρχικού διαλύματος του ομογενοποιημένου Φύλλου σε πεπτονόχο διάλυμα 0,1% w/v.

Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (O.M.X.), τα Γαλακτικά βακτήρια και οι Ζύμες και Μύκητες προσδιορίστηκαν ακριβώς όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2 (σελίδα 93), ενώ ο πληθυσμός των παθογόνων βακτηρίων *Escherihia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* καταμετρήθηκε με τον ίδιο τρόπο, όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3 (σελίδα 146).

Όλες οι αναλύσεις και οι μεταχειρίσεις έγιναν εις διπλούν, δηλ. για κάθε περίπτωση υπήρχαν 2 δείγματα, και κάθε αραιώση έγινε εις διπλούν, ώστε να μειωθεί στα πλαίσια του δυνατού η πιθανότητα λάθους και να εξακριβωθεί αν υπάρχει επαναληψιμότητα στις μετρήσεις. Όλα τα θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν με βάση τις οδηγίες που αναγράφονταν στη συσκευασία τους και αποστειρώθηκαν σε κλίβανο αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121 °C για 15 λεπτά, εκτός από το υπόστρωμα Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) που αποστειρώθηκε με τη μέθοδο του βρασμού. Όλα τα υποστρώματα διατηρήθηκαν σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας  $48 \pm 1^\circ\text{C}$ , πριν τη χρήση τους.

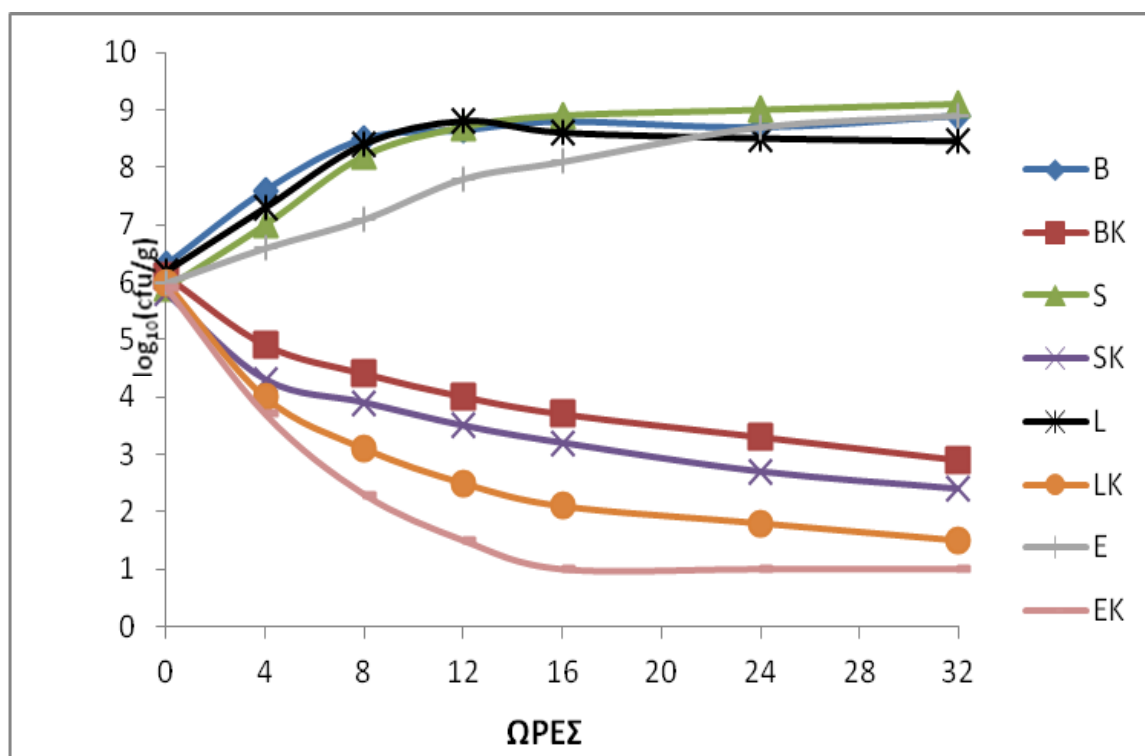
### 5.2.4. Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε ακριβώς όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 (σελίδα 95).

### 5.3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

#### 5.3.1. Μελέτη 'in vitro' της αντιμικροβιακής δράσης του Citrox έναντι της επιβίωσης παθογόνων βακτηρίων σε θρεπτικό υλικό ανάπτυξης (TSB)

Το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox ήταν δραστικό έναντι όλων των παθογόνων μικροοργανισμών που εφαρμόστηκε σε θρεπτικό ζωμό (TSB) (Γράφημα 52). Παρατηρείται ότι το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox μετά από 32 h μείωσε τον πληθυσμό των *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* και *Escherichia coli* O157H7 κατά 7.0, 6.0, 6.7 και 8.9 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα (Γράφημα 52). Συνεπώς η δράση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox έναντι των συγκεκριμένων παθογόνων βακτηρίων ήταν στατιστικώς σημαντική ( $P < 0,05$ ).



**Γράφημα 52:** Μελέτη της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* και *Escherichia coli* O157:H7), παρουσία ή απουσία του διαλύματος Citrox (2‰ v/v), σε θρεπτικό ζωμό (TSB) στους 37° C για 32h.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα, αφού η δράση των αιθέριων ελαίων των εσπεριδοειδών έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών είναι ευρέως γνωστή. Οι Si et al. (2006) αναφέρουν ότι παρατήρησαν μικρότερη από 50% αναχαίτηση ενάντια της *S. typhimurium* και *E. coli* από αιθέριο έλαιο λεμονιού και κιτράλη (συστατικό των αιθέριων ελαίων των εσπεριδοειδών) σε 'in vitro' έρευνα σε TSB. Το αιθέριο έλαιο εσπεριδοειδών βρέθηκε να είναι δραστικό έναντι τεσσάρων στελεχών *E. coli* με ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση ίση με 2.8 ml/100ml θρεπτικού ζωμού Brain Heart Infusion Broth (BHI) στους 37 °C (Moreira et al., 2005).

Η μελέτη των Subba et al. (1967) απέδειξε ότι αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών (πορτοκαλιού και λεμονιού) σε συγκέντρωση 2000 ppm ανέστειλαν την ανάπτυξη των σπορογόνων βακτηρίων *Bacillus subtilis* σε θρεπτικό άγαρ. Επίσης, τα αιθέρια έλαια λεμονιού, πορτοκαλιού και περγαμόντου, καθώς και τα συστατικά τους λιναλόλη και κιτράλη, βρέθηκε ότι έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* και *Bacillus cereus* (Fisher και Phillips, 2006). Τέλος, η προσθήκη Citrox (5 ml/L) μείωσε τον πληθυσμό των *E. coli* O157H7 και *L. innocua* (αρχικού πληθυσμού  $10^7$  cfu/ml) σε 'in vitro' πείραμα, κατά 4,0 και 2,0 λογαριθμικές μονάδες αντίστοιχα (Abadias et al., 2011).

### **5.3.2. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της *Listeria spp.* σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος Citrox, διατηρημένο στους 4° C και 10° C**

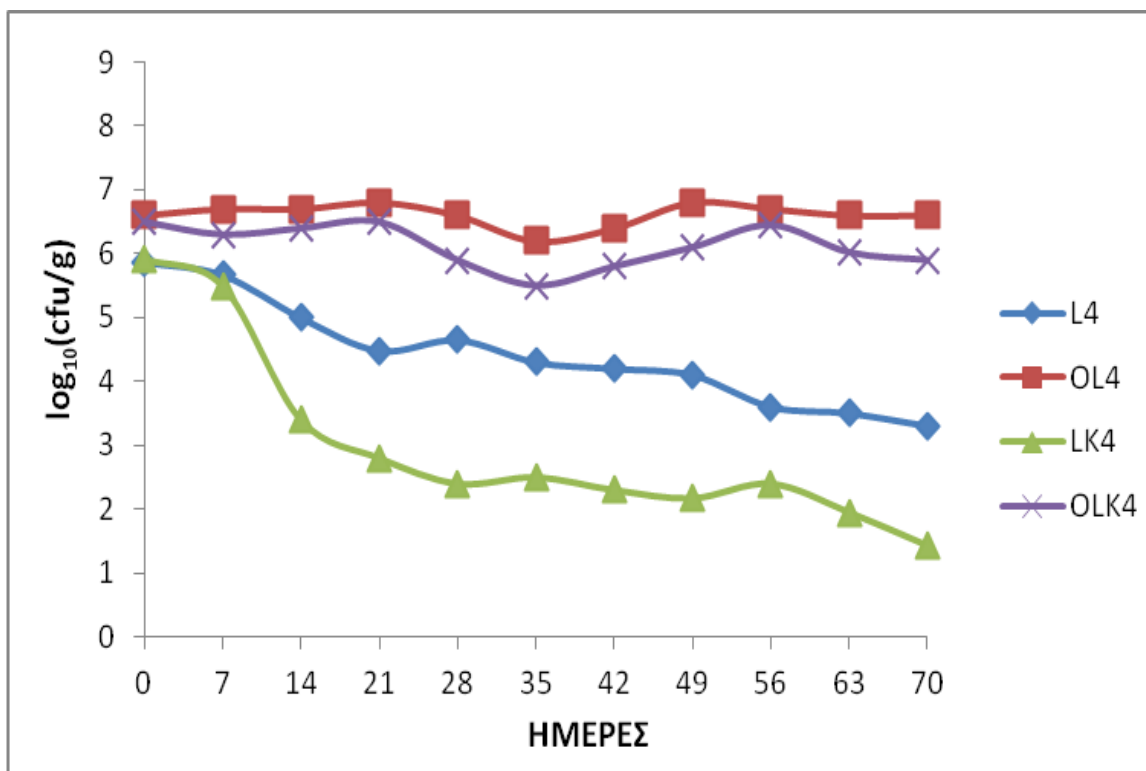
Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα παθογόνο βακτήριο που μπορεί να βρίσκεται σε διάφορα τρόφιμα και να προκαλεί κρούσματα Λιστερίωσης, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων, λαχανικών, κρέατος, προϊόντων ψαριών και έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (Farber και Peterkin, 1991; McLauchlin et al., 2004; Aygun και Pehlivanlar, 2006). Το νωπό γάλα, ειδικότερα, αναγνωρίζεται ευρέως ως πηγή της μόλυνσης από Λιστέρια και έχει ενοχοποιηθεί στο παρελθόν για πρόκληση Λιστερίωσης (Ryser, 1999; Meyer-Brosseta et al., 2003). Από το γάλα το παθογόνο μπορεί να μεταδοθεί και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυροκομικά), όπου μπορεί να επιβιώσει της επεξεργασίας και να προκαλέσει λοίμωξη (McLauchlin et al., 1990; De Buyser et al., 2001). Υπάρχει

πληθώρα μελετών στην διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με την ικανότητα της *L. monocytogenes* να επιβιώνει σε μαλακά τυριά (Genigeorgis et al., 1991; Back et al., 1993; Rasmaman et al., 1997; Bolton και Frank, 1999; Ryser, 1999; Morgan et al., 2001). Επίσης, *L. monocytogenes* ανιχνεύτηκε σε 4 από τα 180 δείγματα γιαουρτιού που εξετάστηκαν στην αγορά της Αγγλίας σε χρονικό διάστημα ενός έτους (Greenwood et al., 1991). Η *L. monocytogenes* έχει βρεθεί σε πατατοσαλάτα, τονοσαλάτα, σαλάτα ζυμαρικών και λαχανικών, σαλάτες με θαλασσινά, σαλάτες με ζαμπόν και σαλάτες με κοτόπουλο (Uyttendaele et al., 1999; Gombas et al., 2003).

Όπως φαίνεται στα Γραφήματα 53 και 54, η προσθήκη της φυσικής αντιμικροβιακής ουσίας Citrox μείωσε τον πληθυσμό της *Listeria spp.* κατά περίπου 1,5 λογάριθμο στους 4° C, ενώ στους 10° C μείωσε τον πληθυσμό της περίπου 1 λογάριθμο. Και στις δύο περιπτώσεις η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox μείωσε τον πληθυσμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του προϊόντος κατά περίπου 0,5 λογάριθμο. Είναι φανερό ότι ο πληθυσμός της *Listeria spp.* μειώνεται (τόσο στους 4° C, όσο και στους 10° C) με το χρόνο συντήρησης του προϊόντος (την τελευταία ημέρα ο πληθυσμός της ήταν μειωμένος κατά 3 λογαριθμικές μονάδες). Μετά από συντήρηση του τζατζικιού για περίπου ένα μήνα, ο πληθυσμός της *Listeria spp.* ήταν 4,6 και 3,0 log<sub>10</sub>(cfu/g) στους 4 και 10° C, αντίστοιχα.

Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε σαλάτα με μαγιονέζα και αυγά αυξήθηκε σημαντικά σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία αποθήκευσης, ενώ η αύξηση του pH της μαγιονέζας δεν επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Ακόμη, η θερμοκρασία αποθήκευσης είχε επίδραση στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε σαλάτα ζυμαρικών με μαγιονέζα (pH = 3,8 ή 4,0, στους 4 ° C), επιβραδύνοντας την ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου στο προϊόν (Hwang et al., 2007). Η σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης και η μικρότερη επίδραση του pH της μαγιονέζας, που επηρεάζουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, έχει αναφερθεί σε μελέτες που εξετάζουν σαλάτα με μαγιονέζα και θαλασσινά, μαγιονέζα και ζαμπόν και πατατοσαλάτα. Παράλληλα από τους ίδιους ερευνητές εξετάστηκε και η επίδραση των συστατικών των τροφίμων στις ίδιες σαλάτες και η συμπεριφορά της *L. monocytogenes*. Παρατηρήθηκε ότι η *L. monocytogenes* ήταν σε θέση να αναπτυχθεί σε σαλάτα θαλασσινών και σαλάτα ζαμπόν, αλλά όχι σε πατατοσαλάτα (Hwang και Tamplin 2005; Hwang, 2005). Οι Erickson και Jenkins (1991) αναφέρουν ότι η *L.*

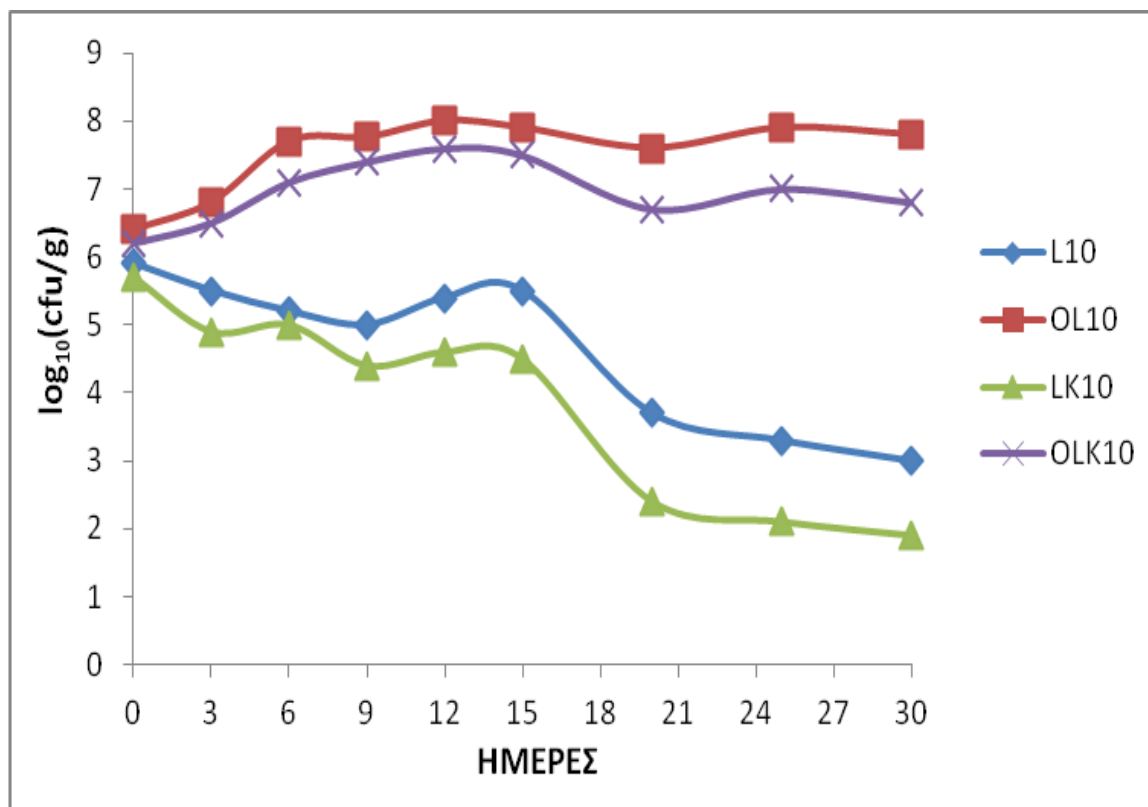
*monocytogenes* ήταν σε θέση να αναπτυχθεί σε σπιτική σαλάτα κοτόπουλο στους 4 ° C, ενώ οι Guentert et al. (2005) ανέφεραν ότι το βακτήριο αδρανοποιήθηκε σε σαλάτα κοτόπουλο όταν το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 4,0 - 5,2 και σε θερμοκρασία 5,0 - 21,1 ° C. Γενικά έχει αποδειχθεί ότι το χαμηλό pH (<5) της μαγιονέζας έχει ως αποτέλεσμα την αδρανοποίηση της *L. monocytogenes*, κυρίως λόγω της οξύτητας της μαγιονέζας (Erickson and Jenkins, 1991; Glass and Doyle, 1991; Erickson et al., 1993; Hwang and Tamplin, 2005).



**Γράφημα 53:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria spp.* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό 10<sup>6</sup> cfu/g *Listeria spp.* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 4° C σε συσκευασία κενού.

Οι Skalina και Nikolajeva (2010) εξέτασαν τρεις σαλάτες έτοιμες προς κατανάλωση (σε θερμοκρασίες συντήρησης 3 ° C και 7 ° C για 48 ώρες): Σαλάτα με μαγιονέζα, γαρίδες και ντομάτα, σαλάτα με μαγιονέζα και καπνιστό ζαμπόν και σαλάτα με μαγιονέζα τυρί και σκόρδο. Παρατήρησαν ότι η αύξηση του πληθυσμού του συγκεκριμένου παθογόνου ήταν μεγαλύτερη στους 7 ° C από ότι στους 3 ° C. Στην σαλάτα με γαρίδες ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αυξήθηκε κατά μέσο όρο

κατά περίπου 0,5 και 0.6 λογαριθμική μονάδα στους 3 και 7° C, αντίστοιχα. Στην σαλάτα με ζαμπόν ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αυξήθηκε κατά μέσο όρο κατά περίπου 0,5 και 0,8 λογαριθμική μονάδα στους 3 και 7° C, αντίστοιχα. Τέλος, στην σαλάτα τυρί και σκόρδο ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* αυξήθηκε κατά μέσο όρο κατά περίπου 0,5 και 0.9 λογαριθμική μονάδα στους 3 και 7° C, αντίστοιχα. Η *L. monocytogenes* σε τεμαχισμένο μαρούλι αυξήθηκε κατά περίπου 1,0 λογαριθμικής μονάδας στους 5 ° C σε όλες τις συσκευασίες (αέρα και τροποποιημένης ατμόσφαιρας), ενώ στους 25 ° C, το βακτήριο αναπτύχθηκε ταχύτατα και αυξήθηκε περίπου 3 λογαριθμικές μονάδες κατά τη διάρκεια των τριών ημερών συντήρησης του μαρουλιού σε αυτήν την θερμοκρασία (Oliveira et al., 2010).



**Γράφημα 54:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria spp.* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Listeria spp.* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 10° C σε συσκευασία κενού.

Είναι πιθανόν στην δική μας περίπτωση, ο υψηλός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τζατζίκι (Γραφήματα 61 και 62) να μην επιτρέπουν την ανάπτυξη της *Listeria spp.*. Σύμφωνα με μελέτη των Gonzalez et al. (2007) όσον



αφορά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από το Ισπανικό τυρί 'Genestoso', βρέθηκε ότι οι γαλακτοβάκιλλοι αναχαιτίσαν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Οι ερευνητές απέδωσαν την αντιμικροβιακή δράση των γαλακτοβάκιλλων στην παραγωγή βακτηριοσινών ή άλλων μεταβολιτών. Επιπλέον, βακτηριοσίνες που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια μειώνουν τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* σε τυρί και γιαούρτι (Arques et al., 2005; Benkerroum et al., 2003). Άλλωστε έχει αποδειχθεί ότι η επιβίωση της *L. monocytogenes* στο γιαούρτι εξαρτάται από το μέγεθος του αρχικού πληθυσμού της καλλιέργειας της *Listeria* και το στέλεχος της, το τελικό pH του προϊόντος, τη διάρκεια ζύμωσης και τη θερμοκρασία συντήρησης του προϊόντος (Benkerroum et al., 2003).

Υπάρχει στην βιβλιογραφία πληθώρα μελετών που δείχνουν μείωση του υπό εξέταση παθογόνου σε γαλακτοκομικά προϊόντα, χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακής ουσίας (όπως άλλωστε συνέβη και στην παρούσα μελέτη). Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειώθηκε σε γιαούρτη (pH=4,2) με φρούτα (ενοφθαλμισμένο με  $10^3$  cfu/g *L. monocytogenes* Scott A) ως την 21<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης (4 ° C), ενώ δεν υπήρχαν βιώσιμα κύτταρα του παθογόνου την 45<sup>η</sup> ημέρα (Karagul- Yuceer et al., 2001). Επίσης, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειώθηκε αισθητά σε συνάρτηση με το χρόνο σε γαλοτύρι (pH=4,3), και κατέληξε, από  $6,9 \log_{10}(\text{cfu/g})$  που είχε ενοφθαλμιστεί αρχικά (ημέρα 0) να απαριθμεί πληθυσμό  $1,6 \log_{10}(\text{cfu/g})$  την 28<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 4° C. Μάλιστα όταν το ίδιο γαλοτύρι συντηρήθηκε στους 12° C, δεν παρατηρήθηκε η θερμοκρασία να επηρεάζει την επιβίωση του εν λόγω παθογόνου στο προϊόν (Rogga et al., 2005). Επίσης, η *L. monocytogenes* επιβίωσε για 13 ημέρες σε γιαούρτη (ενοφθαλμισμένο με περίπου  $10^6$  cfu/g) που συντηρήθηκε στους 7° C (Benkerroum et al., 2003). Οι Lammerding και Doyle (1989) ανίχνευσαν *L. monocytogenes* σε γιαούρτη μετά από 7 ημέρες στους 4 ° C, αν και το αρχικό εμβόλιο ήταν σχετικά χαμηλό (περίπου  $32 \times 10^2$  cfu/ml).

Τα δεδομένα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δείχνουν ότι ο πιο σημαντικός και ουσιαστικός παράγοντας για την καταστροφή του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* είναι το pH και ότι η ανασταλτική τιμή είναι ίση με 4,5, ενώ μπορεί να αυξηθεί ο πληθυσμός της σε pH 4,5 - 9,6 (Rogga et al., 2005;

Smittle, 2000). Βέβαια σύμφωνα με τους Ribeiro και Carminati (1996), η *L. monocytogenes* Scott A (στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη) ήταν πολύ ανθεκτική σε χαμηλό pH (4,05 και 3,76). Ωστόσο, το pH του τζατζικιού στην παρούσα μελέτη κατά τη διάρκεια του πειράματος κυμάνθηκε από 4,37 έως 5,0, οπότε η πιο απότομη μείωση του πληθυσμού του εν λόγω παθογόνου σε λιγότερες ημέρες στο γιαούρτη και γαλοτύρι (σε σχέση με το τζατζίκι) πιθανώς να οφείλεται στο χαμηλότερο pH αυτών των προϊόντων. Αυτή η υπόθεση συμφωνεί με εκείνη των Rogga et al. (2005) ότι όσο υψηλότερο είναι το pH του μαλακού τυριού, τόσο μεγαλύτερη είναι η επιβίωση της *Listeria monocytogenes*. Η *L. monocytogenes*, όχι μόνο επιβιώνει αλλά ο πληθυσμός της αυξάνεται σε μαλακά τυριά με pH 5,5 ή παραπάνω, όπως το Camembert, Ricotta και Ανθότυρος (Genigeorgis et al., 1991; Back et al., 1993; Samelis et al., 2003). Σε αντίθεση, στα μαλακά ώριμα τυριά με pH κοντά στο 4.5 και περιεκτικότητα σε αλάτι πάνω από 2%, όπως το τυρί φέτα, η *L. monocytogenes* επιβιώνει σε χαμηλούς πληθυσμούς για παρατεταμένες περιόδους αποθήκευσης στους 4 ° C (Genigeorgis et al., 1991). Αντίθετα το τυρί Cottage, μπορεί να υποστηρίξει την επιβίωση και δυνητικά την ασθενή ανάπτυξη του *L. monocytogenes*, λόγω του υψηλότερου pH (4.8 έως 5.1), τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε αλάτι (περίπου 1%) και την έλλειψη ωρίμανσης (Hicks και Lund, 1991; Piccinin και Shelef, 1995).

Επίσης έχει αναφερθεί η αναχαιτιστική δράση του σκόρδου (το οποίο περιέχεται στο τζατζίκι) έναντι του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Οι Kumar και Berwal (1998) διαπίστωσαν ότι το σκόρδο επιβραδύνει αισθητά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* μόνο εάν η περιεκτικότητα του φθάσει το 10% του συνολικού βάρους του προϊόντος, ενώ το υπό εξέταση τζατζίκι περιείχε 2% σκόρδο. Παρόλα αυτά το αιθέριο έλαιο σκόρδου έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της *Listeria monocytogenes* σε συγκέντρωση 3% σε ενεργή συσκευασία (όταν ενσωματώθηκε στο υλικό συσκευασίας) (Seydim και Sarikus, 2006). Τέλος, το αιθέριο έλαιο του σκόρδου δείχνει να μην έχει κάποια αξιόλογη δράση έναντι της *Listeria monocytogenes*, παρόλα αυτά, η πτώση του pH ενίσχυσε την ευαισθησία της *Listeria monocytogenes* σε συνδυασμό του αιθέριου ελαίου και της νισίνης (Rohani et al., 2011).

Τέλος, δραστηριότητα έναντι του εν λόγω βακτηρίου έδειξε το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox. Όταν φρεσκοκομμένο μήλο πλύθηκε με εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox ο πληθυσμός της *Listeria spp.* μειώθηκε κατά  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  (Abadias et al., 2011). Η γερανιόλη (συστατικό των αιθέριων ελαίων των εσπεριδοειδών) έχει βρεθεί αποτελεσματική έναντι πληθυσμού  $10^6 \text{ cfu/ml}$  *Listeria spp.* σε χυμό μήλου στους  $35^\circ \text{C}$ , μειώνοντας τον πληθυσμό του παθογόνου κατά 1,8 λογάριθμους (Raybaudi-Massilis et al., 2006). Τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού, μανταρινιού και λεμονιού εξετάστηκαν σε 'in vitro' πείραμα για την ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC) έναντι της *L. monocytogenes* (συγκέντρωσης  $10^7$  κύτταρα/ml) και η MIC βρέθηκε ίση με 5, 1 και 1 μl αιθέριου ελαίου/ml broth, αντίστοιχα (Espina et al., 2011). Έξι επιπλέον αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών έδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Listeria monocytogenes* σε 'in vitro' έρευνα (Settanni et al., 2012).

### **5.3.3. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης του *Bacillus cereus* σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος Citrox, διατηρημένο στους $4^\circ \text{C}$ και $10^\circ \text{C}$**

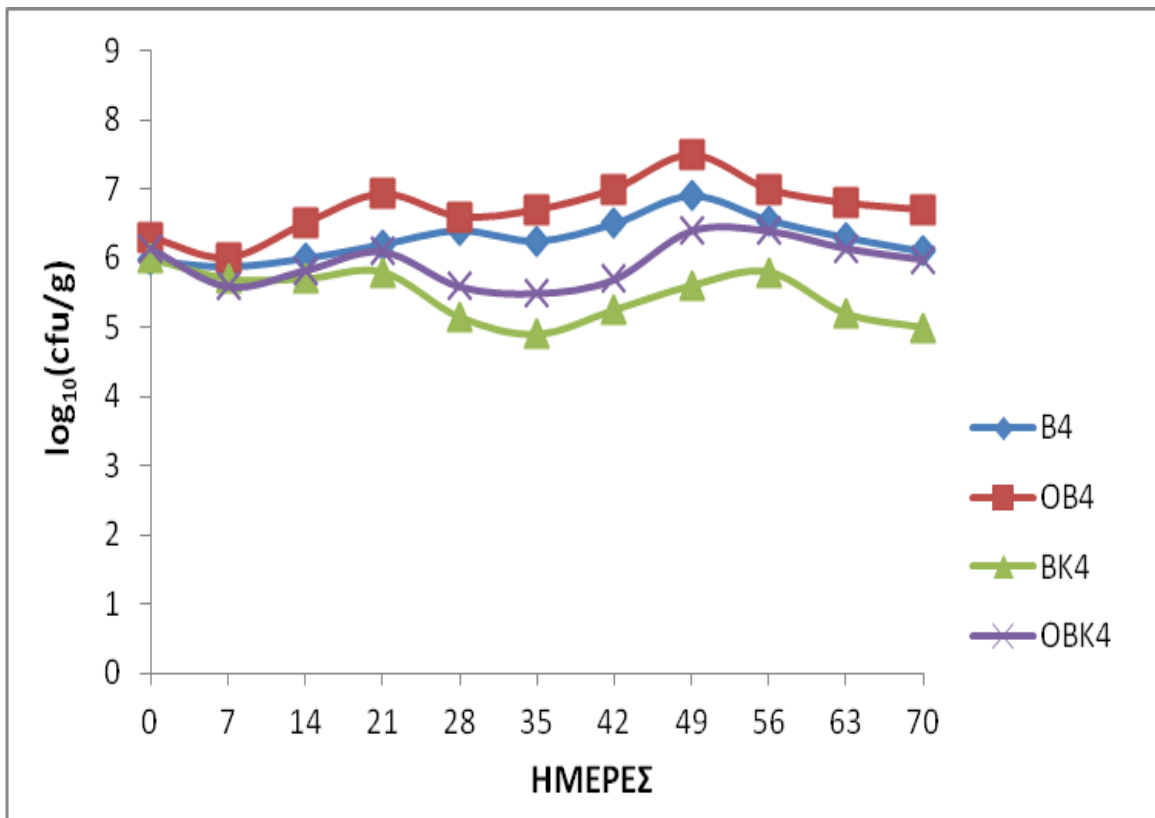
Ο *Bacillus cereus* είναι ένα σπορογόνο βακτήριο που μολύνει συχνά το νωπό γάλα και για το λόγο αυτό θεωρείται ένα σημαντικό πρόβλημα στην βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Andersson et al., 1995). Είναι γνωστό ότι ο *B. cereus* και σπόρια αυτού εμφανίζονται σε μικρούς αριθμούς ( $10^2$ - $10^3$  cfu ανά λίτρο) στο γάλα που συλλέγεται στο αγρόκτημα (Banyko και Vyletelova, 2009; Bartoszewicz et al., 2008). Τα αγροκτήματα όμως δεν είναι η μόνη πηγή μόλυνσης του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων με *B. cereus*, αφού είναι δυνατόν να επιμολυνθούν και στο εργοστάσιο γαλακτοκομικών προϊόντων (έχουν απομονωθεί σπόρια του *B. cereus* από σιλό και δεξαμενές μονάδας παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων) (Shaheen et al., 2010). Αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι *Bacillus cereus* εντοπίστηκε σε επεξεργασμένα δείγματα γάλακτος (παστεριωμένο γάλα ή γιαούρτι), ενώ δεν υπήρχαν στο αρχικό νωπό γάλα με το οποίο παρασκευάστηκαν (Banyko και Vyletelová, 2009). Οι βλαστικές μορφές του *Bacillus cereus* αδρανοποιούνται τάχιστα στην γιαούρτη λόγω της ζύμωσης που υφίσταται το γάλα, καθώς το pH μειώνεται, οι βλαστικές μορφές του *B. cereus* θανατώνονται, όμως τα σπόρια που δεν έχουν

βλαστήσει ακόμη μπορεί να επιζήσουν στο προϊόν (Christiansson, 2002). Οι Rukure και Bester (2001) μελέτησαν την ανάπτυξη του *Bacillus cereus* κατά τη διάρκεια κατασκευής του τυριού τύπου Gouda. Το γάλα για την παρασκευή του τυριού μολύνθηκε τεχνητά με  $10^2$  σπόρια *B. cereus* ανά kg γάλακτος. Τα σπόρια του *B. cereus* επέζησαν και βλάστησαν σε βλαστικά κύτταρα του μικροοργανισμού, τα οποία αυξήθηκαν σε  $10^4$  cfu/gr τυροπήγματος περίπου 4 ώρες μετά την προσθήκη πυτιάς. Μετά την αλάτιση (περίπου 40 ώρες μετά την προσθήκη της πυτιάς) ο *B. cereus* δεν ανιχνεύθηκε στο τυρόπηγμα.

Υπάρχουν αρκετά κρούσματα τα τελευταία χρόνια που οφείλονται στην ανίχνευση του παθογόνου *Bacillus cereus* σε γιαούρτη. Στην Ολλανδία τα καλοκαίρια του 1979 και του 1980 συχνά παρουσιαζόταν προβλήματα στα γιαούρτια, όπως αργή αύξηση της οξύτητας του γάλακτος, εμφάνιση του ορού του τυροπήγματος πριν την ανάδευση και μη αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν. Τα ελαττώματα αυτά οφείλονταν σε σπόρια του *Bacillus cereus*, τα οποία ήταν σε θέση να αναπτυχθούν στα αρχικά στάδια της επώασης, πριν κυριαρχήσουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Driessen και Stadhouders, 1980). Στο 2% των γιαουρτιών που εξετάστηκαν (50 δείγματα εξετάστηκαν συνολικά) στο Beni-Suef της Αιγύπτου ανιχνεύτηκε *B. cereus* σε πληθυσμούς  $6 \pm 5.9$  κύτταρα/ g (Hassan et al., 2010). Το 25% των δειγμάτων γιαουρτιών, που εξετάστηκαν στην παροχή Minna (ανήκει στο κράτος του Νίγηρα) βρέθηκε μολυσμένο με *B. cereus* (Oyeleke, 2009). Επίσης, ένα ποσοστό περίπου 8,3% έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών (με μαγιονέζα, μουστάρδα και λαχανικά), συντηρούμενες υπό ψύξη, βρέθηκε μολυσμένο με *B. cereus* στην Αμερική (Valero et al., 2007). Τέλος, *Bacillus spp.* και *Bacillus cereus* ανιχνεύτηκαν στο 1,8% σε sause σκόρδου και 3,7% σε sause με βάση το γιαούρτι που χρησιμοποιούνται ευρέως στα γρήγορα φαγητά, που πωλούνται στην Αγγλία, Ουαλλία και Ιρλανδία (Meldrum et al., 2009).

Επίσης, ένα προϊόν όπως το τζατζίκι, είναι δυνατόν να μολυνθεί και από τα πρόσθετα συστατικά (λαχανικά) που περιέχει, αφού στο παρελθόν έχουν ενοχοποιηθεί λαχανικά και φρούτα για τροφική δηλητηρίαση από *Bacillus cereus*. Οι McIntyre et al. (2008) αναφέρουν ότι το 11,5% των τροφικών δηλητηριάσεων από *B. cereus* οφείλονται σε ωμές τροφές, όπως φρούτα και πράσινες σαλάτες. Ο *Bacillus cereus* έχει εντοπιστεί σε φράουλες (McIntyre et al., 2008), κουνουπίδι (Fricker et al.,

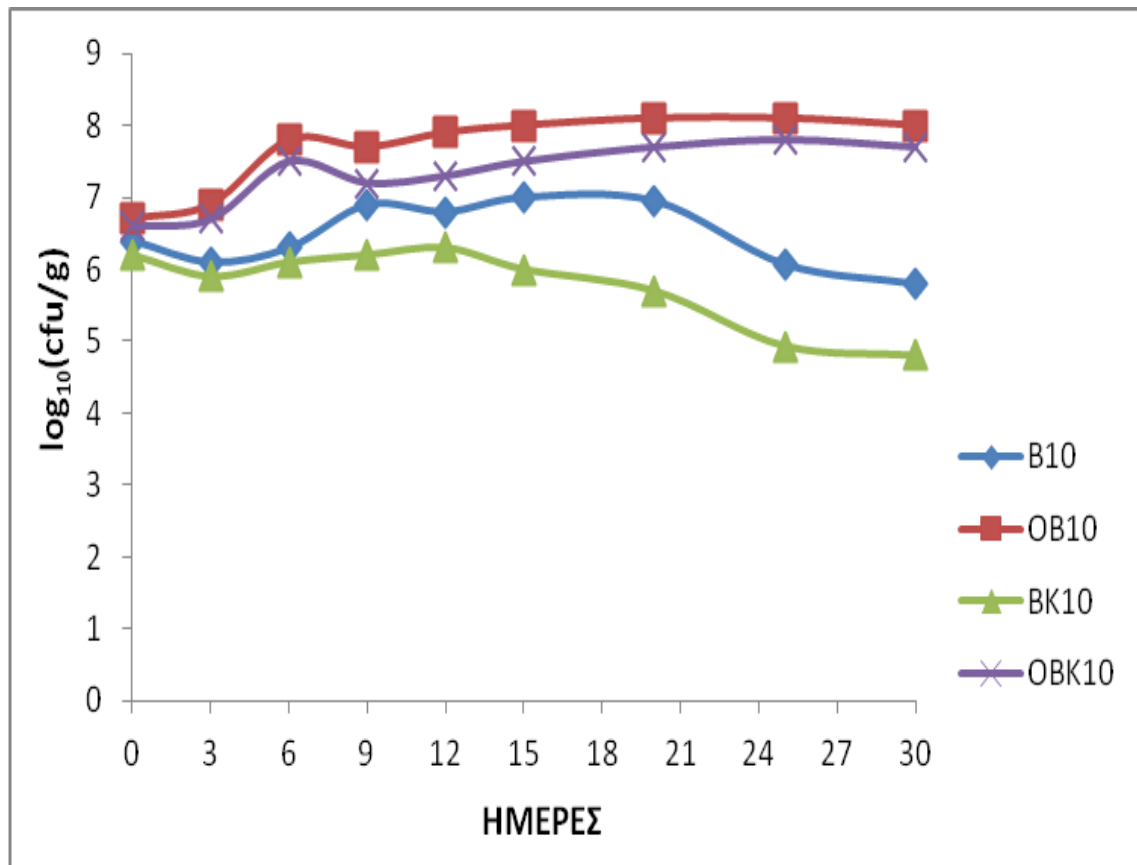
2007), καρότα (Samarundo et al., 2011), αγγούρια και ντομάτες (Rosenquist et al., 2005).



**Γράφημα 55:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Bacillus cereus* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Bacillus cereus* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους  $4^\circ$  C σε συσκευασία κενού.

Η ανάπτυξη του *Bacillus cereus* δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές- διακυμάνσεις ( $P > 0,05$ ) με το χρόνο στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης του προϊόντος ( $4^\circ$  και  $10^\circ$  C) (Γραφήματα 55 και 56). Άλλωστε είναι γνωστό ότι ψυχρότροφα στελέχη του *B. cereus* αναπτύσσονται σε θρεπτικά υποστρώματα πολύ καλά στους  $5-8^\circ$  C, όμως αναπτύσσονται σχετικά γρήγορα και στους  $10^\circ$  C (Valero et al., 2003). Η προσθήκη του Citrox στο τζατζίκι επηρεάζει την ανάπτυξη του *Bacillus cereus*, αφού αναστέλλει την ανάπτυξή του κατά περίπου μία λογαριθμική μονάδα (σε σχέση με το control), τόσο στους  $4^\circ$  C, όσο και στους  $10^\circ$  C (Γραφήματα 55 και 56). Επίσης, μειώνει την ολική μεσόφιλη χλωρίδα στο τζατζίκι κατά περίπου  $0,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$  και στις δύο περιπτώσεις. Πολύ πιθανόν τα συστατικά των αιθέριων

ελαίων των εσπεριδοειδών και τα συστατικά τους (λιναλοόλη, κιτράλη, φλαβονοειδή) διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια Gram-θετικών, Gram-αρνητικών βακτηρίων, ζυμών, μυκήτων (Deans & Ritchie, 1987), συμπεριλαμβανομένου και του *Bacillus cereus* (Fisher & Phillips, 2006).



**Γράφημα 56:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Bacillus cereus* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Bacillus cereus* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους  $10^{\circ}$  C σε συσκευασία κενού.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ ο πληθυσμός όλων των άλλων παθογόνων που εξετάστηκαν μειώθηκε στο τζατζίκι, ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* παραμένει πρακτικά σταθερός στο δείγμα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία (B4 και B10) και μειώνεται ανεπαίσθητα στο δείγμα με την προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX (BK4 και BK10), και στις δύο θερμοκρασίες. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι στη περίπτωση του *B. cereus* χρησιμοποιήθηκε για την

αρχική καλλιέργεια μίγμα (cocktail) τεσσάρων στελεχών με ικανότητα σπορογονίας >80% . Το γεγονός ότι τα στελέχη του *Bacillus cereus* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν σπορογόνα καθιστά την καλλιέργεια αυτή πιο ανθεκτική από ότι εκείνη των υπόλοιπων παθογόνων μικροοργανισμών που εξετάστηκα (*Listeria spp.*, *Salmonella enterica* και *Escherichia coli* O157:H7). Άλλωστε, και σε σαλάτα λαχανικών με μαγιονέζα (έτοιμη προς κατανάλωση), ενοφθαλμισμένη με πληθυσμό  $4 \times 10^3$  cfu/g κυττάρων ψυχρόφιλου και σπορογόνου στελέχους του *B. cereus*, δεν παρατηρήθηκε κάποια αύξηση στον πληθυσμό του υπό εξέταση παθογόνου (Valero et al., 2007). Αυτό το αποτέλεσμα είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας. Αντίθετα, οι Sims et al. (1989) αναφέρουν ότι ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* αυξήθηκε σε τυρί Cottage ενοφθαλμισμένο με  $10^6$  cfu/gr στους  $10^\circ \text{C}$ . Ακόμη, ψυχρότροφο στέλεχος του *B. cereus* (απομονωμένο από μαγειρεμένα τρόφιμα με λαχανικά διατηρημένα υπό ψύξη) είναι σε θέση να αυξηθεί και τα σπόρια του έχουν την ικανότητα να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες ψυγείου σε ζωμό από καρότο ή κολοκύθια σε θερμοκρασίες ψυγείου ( $5^\circ \text{C}$ ,  $8^\circ \text{C}$ ) (Valero et al., 2007).

Μάλιστα, το ελάχιστο pH ανάπτυξης για τον *Bacillus cereus* είναι 4,3-4,9 (Christiansson, 2002), οπότε το χαμηλό pH του τζατζικιού δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την ανάπτυξη του. Ωστόσο, ο συνδυασμός χαμηλού pH και συντήρησης ενός τροφίμου υπό ψύξη, μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη του εν λόγω παθογόνου. Οι Valero et al. (2003) αναφέρουν ότι ο συνδυασμός ήπιας οξύνισης (pH = 5,0) και ψύξης ( $\leq 8^\circ \text{C}$ ) ανέστειλε την ανάπτυξη του *B. cereus* για τουλάχιστον 60 ημέρες σε ζωμό από καρότο και κολοκυθάκια. Ακόμη, δεν ανιχνεύτηκαν σπορογόνες μορφές του *Bacillus licheniformis* σε γιαούρτη με φρούτα (ενοφθαλμισμένο με  $10^3$  cfu/g *Bacillus licheniformis*) καθ' όλη την διάρκεια των 90 ημερών συντήρησης του προϊόντος υπό ψύξη. Η διαφορά αυτή ίσως οφείλεται στα διαφορετικά σπορογόνα στέλεχη που χρησιμοποιήθηκαν, αφού κάθε σπορογόνο στέλεχος του βάκιλλου έχει διαφορετική ανθεκτικότητα στα διάφορα εμπόδια, όπως θέρμανση, NaCl, pH κ.α. (Raevuori και Genigeorgis, 1975; Besten et al., 2010). Επιπρόσθετα, οι Pranoto et al. (2005) ανέφεραν ότι ο *Bacillus cereus* είναι ευαίσθητος στο αιθέριο έλαιο του σκόρδου, οπότε πιθανώς το σκόρδο που περιέχει

το τζατζίκι να είναι ένας ακόμη παράγοντας που κρατά σταθερό τον πληθυσμό του παθογόνου στο προϊόν (η πιθανότητα αυτή δεν εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη).

#### **5.3.4. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της *Salmonella enterica* σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος Citrox, διατηρημένο στους 4° C και 10° C**

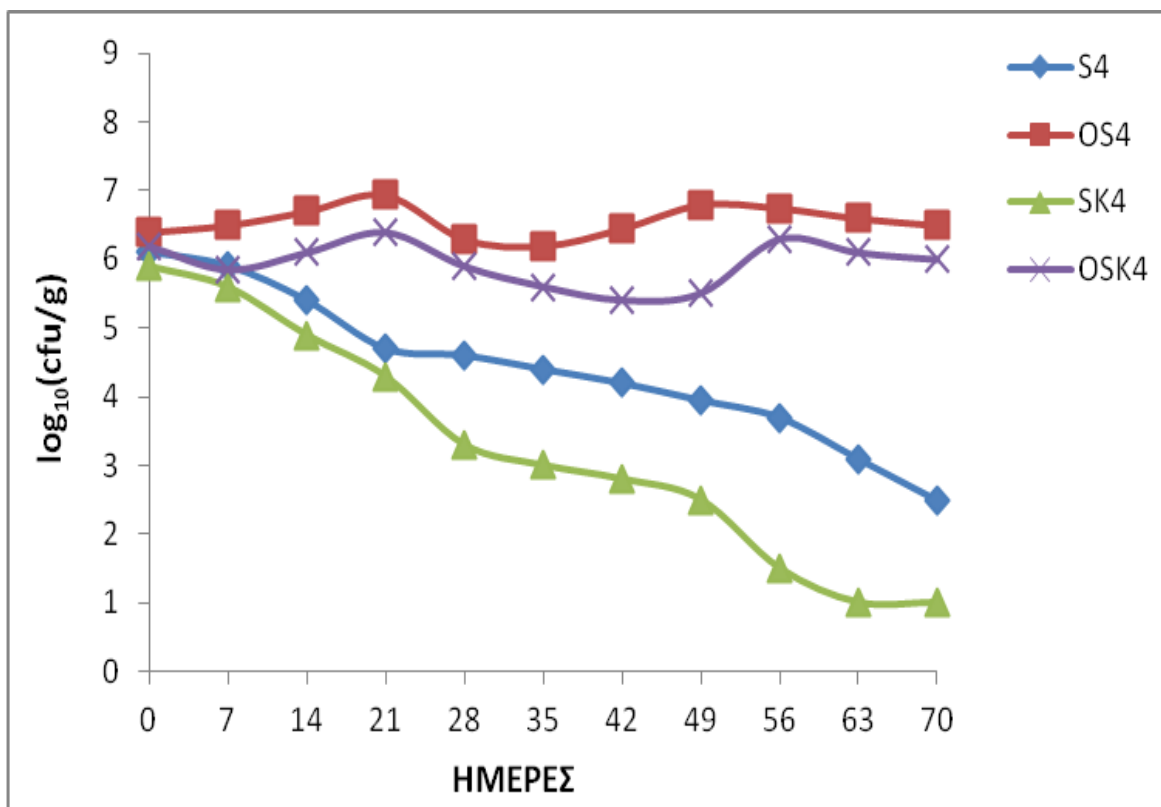
Τα διάφορα είδη Σαλμονέλλας είναι σημαντική αιτία τροφιμογενών ασθενειών στις Ηνωμένες Πολιτείες. Υπολογίζεται ότι το 26% του συνόλου των τροφιμογενών λοιμώξεων στις Ηνωμένες Πολιτείες προκαλούνται από *Salmonella enterica*. Η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, όπως πουλερικά, αυγά, νωπό γάλα, γαλακτοκομικά προϊόντα, θαλασσινά και νωπά προϊόντα, έχουν καταγραφεί ως κύρια αιτία Σαλμονέλλωσης (Leverentz et al., 2006; Srikumar και Fuchs, 2011).

Μια από τις κύριες πηγές μόλυνσης του ανθρώπου με *Salmonella* είναι το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αφού η Σαλμονέλλα μπορεί να επιβιώσει σε χαμηλό pH και σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση (Tamagnini et al., 2008). Μεταξύ του 1992 και του 2000, εντοπίστηκαν κρούσματα τροφιμογενών λοιμώξεων από *Salmonella spp.* στην Αγγλία και στη Γαλλία που αποδόθηκαν σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα (De Buyser et al., 2001; Gillespie et al., 2003). Το 1984 τυρί Cheddar συνδέθηκε με Σαλμονέλλωση στον Καναδά, όπου μολύνθηκαν με *S. typhimurium*. *Salmonella spp.* απομονώθηκε από το 2,4% των τυριών Tulum στην Κωνσταντινούπολη κατά την περίοδο 2004 - 2005 (Colak et al., 2007).

Ένα μολυσμένο γάλα, αν δεν υποστεί σωστή παστερίωση, μπορεί να παραχθούν γαλακτοκομικά προϊόντα στα οποία έχουν επιβιώσει ή μπορεί μετέπειτα να αναπτυχθούν σ' αυτά παθογόνα βακτήρια. Για παράδειγμα στις Ηνωμένες Πολιτείες, η πώληση μολυσμένου νωπού γάλακτος και η χρήση του για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων οδήγησε σε ξέσπασμα Σαλμονέλλωσης σε Καλιφόρνια και Ουάσιγκτον (Reed και Grivetti, 2000). Είναι γνωστό ότι οι φάρμες γαλακτοπαραγωγής αποτελούν έναν τόπο όπου μπορεί να μολυνθεί το γάλα (και πιθανώς τα γαλακτοκομικά προϊόντα αν παραχθούν από μολυσμένη πρώτη ύλη) με



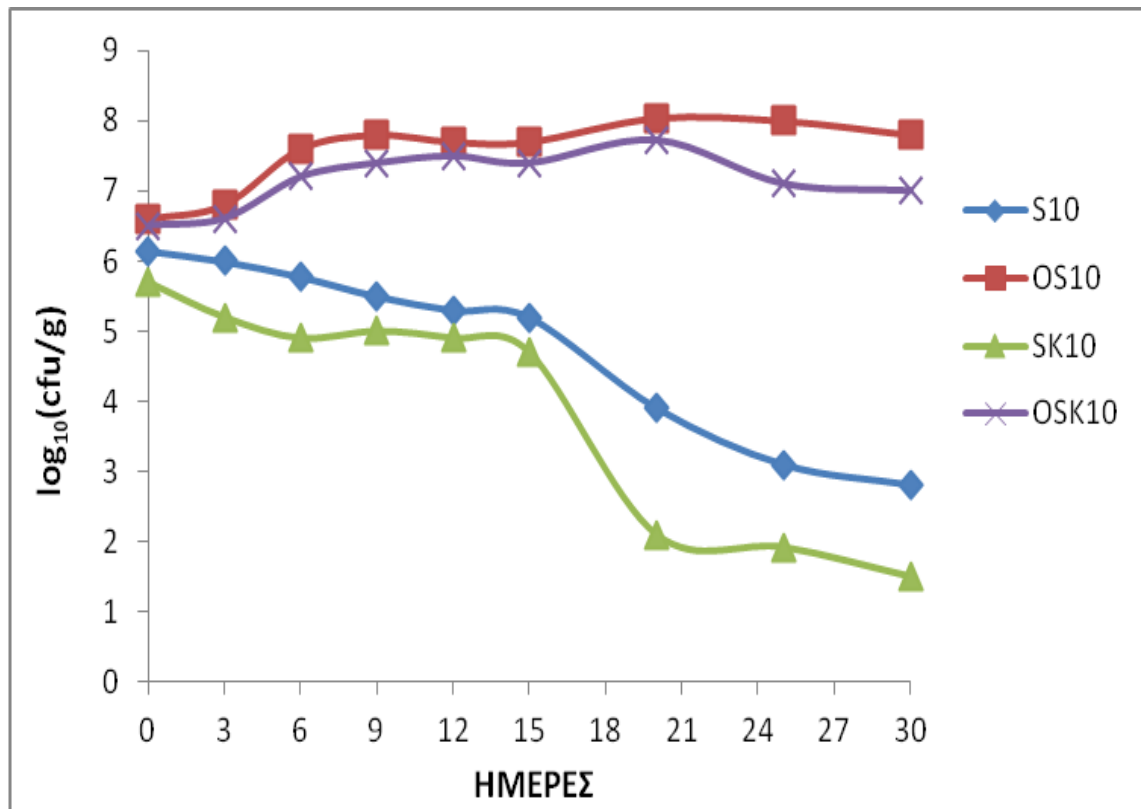
*Salmonella spp.* (Jayarao και Henning, 2001; Oliver et al., 2005). Μεταξύ των στελεχών *Salmonella spp.*, η *S. enterica* έχει εντοπιστεί σε δεξαμενή συλλογής νωπού γάλακτος και μάλιστα οι σημαντικότεροι ορότυποι της ήταν οι *Salmonella enterica* ορότυπος *Typhimurium* και *Salmonella enterica* ορότυπος *Newport* (Jayarao et al., 2006). Κρίνεται λοιπόν απαραίτητο τόσο στον εξοπλισμό, όσο και στους ανθρώπους που έρχονται σε επαφή με τα γαλακτοκομικά προϊόντα να εφαρμόζονται αυστηρές συνθήκες υγιεινής.



**Γράφημα 57:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Salmonella enterica* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους  $4^{\circ}$  C σε συσκευασία κενού.

Ακόμη, ένα προϊόν όπως το τζατζίκι είναι δυνατόν να επιμολυνθεί με Σαλμονέλλα και από τα νωπά λαχανικά που περιέχει (π.χ. αγγουράκι), εάν αυτά είναι επιμολυσμένα. Οι Leverentz et al. (2006) αναφέρουν ότι τα φρούτα και λαχανικά

μπορούν να είναι σημαντική δεξαμενή της *Salmonella spp.*, αφού έχουν εντοπιστεί στελέχη της σε ντομάτες και πεπόνια. Επίσης *Salmonella Kentucky* εντοπίστηκε σε μαρούλι στην Αγγλία. Η μόλυνση του λαχανικού προήλθε από την κακή υγιεινή κατάσταση των εγκαταστάσεων παραγωγής σαλάτας (Meldrum et al., 2009).



**Γράφημα 58:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella enterica* σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Salmonella enterica* κατά τη διάρκεια συντήρησης στους  $10^{\circ}$  C σε συσκευασία κενού.

Ενδιαφέρουσα είναι η πορεία της επιβίωσης της *Salmonella enterica* στο τζατζίκι που συντηρήθηκε στους  $4^{\circ}$  C (Γράφημα 57), όπου ο πληθυσμός της (S4) μειώνεται καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος, καταλήγοντας τελικά την 70<sup>η</sup> ημέρα να έχει μειωθεί κατά περίπου  $4 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX (SK4) μειώνει τον πληθυσμό της επιπλέον κατά  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  ως την 49<sup>η</sup> ημέρα, ώσπου την 63<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός της *Salmonella enterica* στο δείγμα με το εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX ήταν μικρότερος από το

όριο ανίχνευσης  $1 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Στους  $10^{\circ} \text{C}$  παρατηρείται ένα διαφορετικό profil ανάπτυξης της *Salmonella enterica* (Γράφημα 58). Εδώ παρατηρείται μείωση του πληθυσμού της (S10), αλλά σε μικρότερη κλίμακα (ως την 15<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός της μειώθηκε μόνο κατά 1 λογαριθμική μονάδα), ενώ την 30<sup>η</sup> ημέρα μειώθηκε κατά 3 λογαριθμικές μονάδες. Η επίδραση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox (SK10) είναι μικρότερη στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού (ως την 15<sup>η</sup> ημέρα μείωσε τον πληθυσμό της κατά περίπου 0,5 λογαριθμική μονάδα και ως την 30<sup>η</sup> ημέρα τον μείωσε κατά περίπου 1 λογαριθμική μονάδα). Τέλος, σε αυτήν την θερμοκρασία η επίδραση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών Citrox στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα του προϊόντος είναι ανεπαίσθητη.

Είναι φανερό ότι και στις δύο θερμοκρασίες ( $4$  και  $10^{\circ} \text{C}$ ) ο πληθυσμός της *Salmonella enterica* (S4, S10) μειώνεται στο τζατζίκι (Γραφήματα 57, 58). Αντίστοιχα και στην μελέτη του Septin (2008) η ανάπτυξη του παθογόνου βακτηρίου *Salmonella typhi* μειώθηκε όταν ενοφθαλμίστηκε σε γιαούρτι. Η μελέτη των Yesillik et al. (2011) αναφέρει ότι η ανάπτυξη της *S. typhimurium* αναστέλλεται σε σπιτική και εμπορική γιαούρτη και μάλιστα ότι το γαλακτικό οξύ της γιαούρτης έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου. Πιστεύουν, δε, ότι η δράση του γαλακτικού οξέος οφείλεται στις μεταβολικές αλλαγές που προκαλούνται μετά την είσοδο του εντός του βακτηριακού κυττάρου (*S. typhimurium*).

Στην παρούσα μελέτη είναι πιθανόν η πτωτική πορεία του παθογόνου να οφείλεται στο χαμηλό pH του προϊόντος, αφού τις πρώτες 14 ημέρες του πειράματος το pH στο τζατζίκι ήταν  $\leq 4,5$ . Είναι άλλωστε γνωστό ότι από τους πιο σημαντικούς και ουσιαστικούς παράγοντες για την καταστροφή των παθογόνων βακτηρίων είναι το pH, οπότε το ίδιο ισχύει και για την Σαλμονέλλα, για την οποία η αναφερόμενη ανασταλτική τιμή pH είναι 4.5, παρουσία οξικού οξέος (Smittle, 2000). Οι Radford και Board (1993) αναφέρουν ότι η επιβίωση της *Salmonella spp.* σε μαγιονέζα επηρεάζεται από το pH της μαγιονέζας και οι Koutsoumanis et al. (1999) ότι η αδρανοποίηση της *S. enteritidis* σε ταραμοσαλάτα ήταν μεγαλύτερη σε χαμηλό pH. Οι Stecchini et al. (1991) παρατήρησαν αναστολή της ανάπτυξης της *S. typhimurium* όταν το pH του γάλακτος μειώθηκε από 6,07 σε 4,77. Τα αποτελέσματα της μελέτης των Kasrazadeh και Genigeorgis (1994) έδειξαν επίσης ότι μείωση του pH μαλακού τυριού από 6,6 σε pH 6.0 επιβραδύνει την ανάπτυξη του παθογόνου στο τυρί,

ιδιαίτερα σε χαμηλές θερμοκρασίες (6 – 8° C). Στην ίδια μελέτη αποδείχθηκε ότι ο πληθυσμός της Σαλμονέλλα μειώθηκε σε γάλα που συσκευάστηκε υπό κενό σε σχέση με γάλα σε αερόβια συσκευασία. Συνεπώς πολύ πιθανόν και η συσκευασία υπό κενό να ήταν ένας επιπλέον λόγος για την μείωση του πληθυσμού του εν λόγω παθογόνου στην παρούσα μελέτη.

Η μείωση του πληθυσμού της Σαλμονέλλας μπορεί να αποδοθεί και στην παρουσία του σκόρδου (που περιέχει το τζατζίκι), μιας και έχει αποδειχθεί στο παρελθόν ότι είναι δραστικό έναντι του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Το αιθέριο έλαιο του σκόρδου έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της *Salmonella enteritidis* σε συγκέντρωση 3% σε ενεργή συσκευασία (όταν ενσωματώθηκε στο υλικό συσκευασίας) (Seydim και Sarikus, 2006). Επίσης, οι Kumar και Berwal (1998) αναφέρουν ότι το σκόρδο έχει αναχαιτιστική δράση έναντι του μικροοργανισμού *Salmonella typhi*. Ακόμη, το αιθέριο έλαιο του άνηθου (*Anethum graveolens* L.) έδειξε ασθενή δράση έναντι της *Salmonella typhimurium* (Delaquis et al., 2002).

Επίσης, είναι πιθανόν η μείωση του πληθυσμού του εν λόγω παθογόνου βακτηρίου να οφείλεται στην ανταγωνιστική μικροχλωρίδα που υπάρχει στο τζατζίκι, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι ζύμες. Άλλωστε πολλές είναι οι μελέτες που δείχνουν ότι η χρήση ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας οξυγαλακτικών βακτηρίων μειώνουν τον πληθυσμό των *Salmonella spp.*, *Salmonella Enteritidis* και *Salmonella Typhimurium* (Kasrazadeh και Genigeorgis, 1994; Vescovo et al., 1996; Nitisinprasert et al., 2000; Higgins et al., 2007). Οι Szczawinska και Szczawinski (2011) αναφέρουν ότι τα γαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν στο γιαούρτι (*Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*) παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση επί των παθογόνων μικροοργανισμών (και ειδικότερα έναντι της *Salmonella enteritidis*). Ο *Lactobacillus bulgaricus* που απομονώθηκε από γιαούρτι έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της *S. typhi* (Tufail et al., 2011) και οι *Lactobacillus casei* και *L. bulgaricus* επέδειξαν ανασταλτική δράση έναντι της *Salmonella typhimurium* (Erdourul και Erbulur, 2006). Σύμφωνα με τους Stecchini et al. (1991) η προσθήκη της καλλιέργειας *Lactobacillus plantarum* (0,2% v / v) σε ημίσκληρο τυρί Montasio είχε ως αποτέλεσμα μια αξιοσημείωτη μείωση του πληθυσμού της *Salmonella typhimurium*. Σε προγενέστερη μελέτη των Raccach et al. (1979) ο *L. plantarum* κατέστειλε την ανάπτυξη της *S. typhimurium* σε θρεπτικό ζωμό

(Brain Heart Infusion). Ακόμη, οι Leverentz et al. (2006) αναφέρουν ότι οι ζύμες *Candida sp.*, *Discosphaerina fagi* και *Metschnikowia pulcherrima* λειτούργησαν ανταγωνιστικά και ανέστειλαν (σε μικρό βαθμό) την ανάπτυξη της *Salmonella enterica* σε ιστό μήλου.

Στην παρούσα εργασία διαπιστώθηκε ότι ο πληθυσμός της *Salmonella enterica* στο τζατζίκι μετά από ένα μήνα περίπου αποθήκευσης του στους 4 (S4) και 10° C (S10) είναι ίσος με 4,6 και 2,8 log<sub>10</sub>(cfu/g), αντίστοιχα (Γραφήματα 57 και 58). Σε πρόσφατη έρευνα δείγματα γιαούρτης εμβολιάστηκαν με το μίγμα τριών στελεχών *S. enteritidis* και αποθηκεύθηκαν στους 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C και 25 °C για 24 ώρες. Διαπιστώθηκε ότι ο πληθυσμός της *S. enteritidis* μειώθηκε γραμμικά με το χρόνο αποθήκευσης σε όλα τα δείγματα και μάλιστα όσο υψηλότερη ήταν η θερμοκρασία συντήρησης τόσο περισσότερο μειώθηκε ο πληθυσμός της (Szcawinska και Szcawinski, 2011). Παρόμοια μείωση του πληθυσμού της *Salmonella enteritidis* βρήκαν και οι Koutsoumanis et al. (1999) σε ταραμοσαλάτα με pH 4,3 όταν συντηρήθηκε στους 10° C, σε σχέση με τους 4° C. Σύμφωνα με αυτούς τους ερευνητές ο λόγος που η επιβίωση της *Salmonella enteritidis* ήταν μεγαλύτερη καθώς η θερμοκρασία μειωνόταν, πιθανώς να οφείλεται στην μικρότερη μεταβολική δραστηριότητα του βακτηρίου σε μειωμένες θερμοκρασίες.

Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια της *Salmonella spp.* ότι αναπτύσσονται σε θερμοκρασία <5° C (Garcia de Fernando et al., 1995). Οι Radford και Board (1993) αναφέρουν ότι η αποθήκευση της μαγιονέζας στους 18-22 ° C μείωσε τον πληθυσμό της *Salmonella spp.* σε σχέση με την συντήρηση του προϊόντος υπό ψύξη. Η *S. typhimurium* δεν αναπτύχθηκε στους 6 ° C και ο πληθυσμός της μειώθηκε κατά 1 λογάριθμο, κατά τη διάρκεια 70 ημερών συντήρησης μαλακού τυριού (ενοφθαλμισμένο με 10<sup>4</sup> cfu/g παθογόνου βακτηρίου) συσκευασμένο υπό κενό, ενώ η ανάπτυξη της σε θερμοκρασίες >12° C ήταν ταχεία (Kasrazadeh και Genigeorgis, 1994). Σε εμβολιασμένα δείγματα μαλακού τυριού που συντηρήθηκαν στους 5° C για 40 ημέρες ο πληθυσμός της *S. typhimurium* μειώθηκε κατά περίπου 1,5 λογαριθμική μονάδα (Tamagnini et al., 2008). Επίσης ο πληθυσμός της *S. typhimurium* μειώθηκε σε γίδινο τυρί τόσο τους 5° C, όσο και στους 15° C, θερμοκρασία στην οποία όμως παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με τους 5° C (Tamagnini et al., 2005).

Η αναχαιτιστική δράση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX στην Σαλμονέλλα έχει αναφερθεί και από τους Abadias et al. (2011), οι οποίοι αναφέρουν ότι όταν φρεσκοκομμένο μήλο πλύθηκε με CitroX μειώθηκε ο πληθυσμός της *Salmonella spp.* του προϊόντος κατά 1 log<sub>10</sub>(cfu/g). Μετά από 10 ημέρες στους 5 ° C, οι πληθυσμοί της *Salmonella choleraesuis* στο τεμαχισμένο μαρούλι μειώθηκαν κατά περίπου 1,0 λογαριθμική μονάδα σε όλες τις υπό εξέταση συσκευασίες (σε αέρα και σε δύο διαφορετικές συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας), ενώ αυξήθηκαν σημαντικά (περίπου 2,0 λογαριθμικές μονάδες) μετά από 3 ημέρες στους 25 ° C σε όλες τις συσκευασίες (Oliveira et al., 2010).

Η χρήση τερπενίων από αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού μείωσε τον πληθυσμό της Σαλμονέλλας σε χυμούς φρούτων (Parish et al., 2003). Η γερανιόλη (συστατικό των αιθέριων ελαίων των εσπεριδοειδών) έχει βρεθεί αποτελεσματική έναντι 10<sup>6</sup> cfu/ml *Salmonella spp.* σε χυμό μήλου στους 35 ° C, όπου μειώνει τον πληθυσμό της κατά 10<sup>3</sup> cfu/ml (Raybaudi-Massilis et al., 2006). Τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού, μανταρινιού και λεμονιού εξετάστηκαν σε 'in vitro' πείραμα για την ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC) έναντι της *Salmonella enteritidis* (συγκέντρωσης 10<sup>7</sup> κύτταρα/ml) και βρέθηκε ίση με 30.0, 5.0 και >30.0 μl αιθέριου ελαίου/ml broth, αντίστοιχα (Espina et al., 2011). Έξι ακόμη αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών έδειξαν ασθενή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Salmonella enterica* σε 'in vitro' έρευνα (Settanni et al., 2012). Το ίδιο αιθέριο έλαιο του κίτρου μείωσε την επιβίωση της *Salmonella enteritidis* σε φρουτοσαλάτα που συντηρήθηκε στους 9° C (Belletti et al., 2008).

### **5.3.5. Πορεία ανάπτυξης/επιβίωσης της *Escherihia coli* O157:H7 σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος CitroX, διατηρημένο στους 4° C και 10° C**

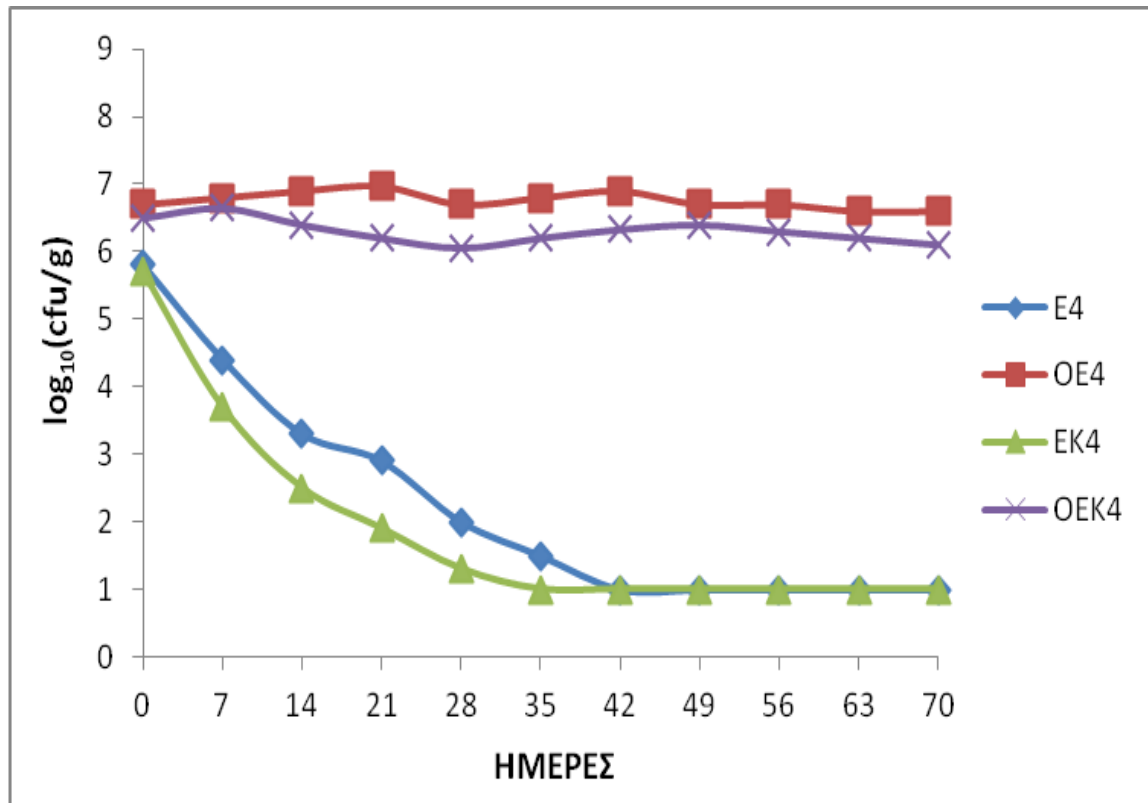
Έχει εντοπιστεί *E. coli* στο 1,2% και 0,2% των sauce με βάση την γιαούρτη και το σκόρδο, αντίστοιχα, που χρησιμοποιούνται σε εστιατόρια της Αγγλίας, Ουαλίας και Ιρλανδίας για την παρασκευή γρήγορου φαγητού (Meldrum et al., 2009). Η *E. coli* O157:H7 επιβιώνει σε μέτρια όξινα προϊόντα, όπως ο χυμός μήλου και ο μηλίτης, το γιαούρτι και η μαγιονέζα και μάλιστα το παθογόνο αυτό υπήρξε στο παρελθόν η

αιτία πολλών κρουσμάτων αιμορραγικής κολίτιδας από αυτά τα προϊόντα (Besser et al, 1993; Centers for Disease Control and Prevention, 1995; Morgan et al, 1993; Zhao et al., 1993). Η μείωση του pH και/ή ο ανταγωνισμός από τις καλλιέργειες εκκίνησης δεν μπορούν να εξασφαλίσουν την εξάλειψη της *E. coli* O157: H7 από τα ζυμούμενα προϊόντα (Dineen et al., 1998), για τον λόγο αυτόν είναι πιθανόν να υπάρχει στο γιαούρτι και σε προϊόντα που παράγονται με πρώτη ύλη αυτό. Η γιαούρτη άλλωστε, παρόλο που ανέκαθεν θεωρούνταν ασφαλής τροφή λόγω της όξινης φύσης της, έχει εμπλακεί σε θανατηφόρο λοίμωξη (Morgan et al., 1993). Αυτό υποδηλώνει ότι η *E. coli* O157: H7 μπορεί να είναι ανεκτική και να επιβιώσει στο προϊόν σε όξινες συνθήκες, ιδιαίτερα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Weagant et al. 1994). Άλλωστε ένα προϊόν όπως είναι το τζατζίκι, που περιέχει γιαούρτη αγγουράκι, σκόρδο και άνηθο, είναι δυνατόν να μολυνθεί με *E. coli* από τα λαχανικά που περιέχει, αν αυτά είναι μολυσμένα με το παθογόνο βακτήριο. Σε έρευνα των Meldrum et al. (2009) σε έτοιμες σαλάτες λαχανικών που πωλούνται σε εστιατόρια γρήγορου φαγητού σε Αγγλία, Ουαλλία και Ιρλανδία βρέθηκε το 6% των αγγουριών μολυσμένο με *E. coli*.

Στην παρούσα μελέτη ο πληθυσμός της *E. coli* μειώνεται ραγδαία με το χρόνο συντήρησης στο τζατζίκι που συντηρήθηκε στους 4° C (Γράφημα 59), ώσπου την 42<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός της μειώνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης 1,0 log<sub>10</sub>(cfu/g) στο control (E4) και την 35<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός της μειώνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης 1,0 log<sub>10</sub>(cfu/g) στο τζατζίκι με την προσθήκη της φυσικής αντιμικροβιακής ουσίας CitroX (EK4). Ως την 35<sup>η</sup> ημέρα του πειράματος το CitroX μείωσε σταθερά τον πληθυσμό της *Escherichia coli* κατά περίπου 0,5 log<sub>10</sub>(cfu/g). Παρόμοιο profil ανάπτυξης της *E. coli* παρατηρείται και στο τζατζίκι που συντηρήθηκε στους 10° C (Γράφημα 60), όπου ο πληθυσμός της μειώνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης 1,0 log<sub>10</sub>(cfu/g), στις 20 και 30 ημέρες στα δείγματα τζατζίκι με την προσθήκη CitroX (EK10) και το τζατζίκι χωρίς αντιμικροβιακή ουσία (E10), αντίστοιχα. Και στις δύο θερμοκρασίες η αντιμικροβιακή ουσία CitroX μειώνει την ολική μεσόφιλη χλωρίδα του προϊόντος κατά περίπου 0,5 log<sub>10</sub>(cfu/g).

Αρκετές είναι οι μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία που δείχνουν παρόμοια πορεία μείωσης του πληθυσμού της *E. coli* όταν αυτό έχει ενοφθαλμιστεί σε παρόμοια τρόφιμα. Μείωση του πληθυσμού της *E. coli* παρατήρησαν και οι Penney et al. (2004) σε γιαούρτη με βατόμουρα που συντηρήθηκε στους 4° C. Συγκεκριμένα

μετά από 24 h δεν ανιχνεύτηκε *E. coli* σε γιαούρτη που εμβολιάστηκε με  $10^3$  cfu/g, αλλά όταν το εμβόλιο αυξήθηκε σε  $10^6$  cfu/g επιβίωσαν  $170 \pm 70$  κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού. Οι Dineen et al. (1998) παρατήρησαν την ύπαρξη  $<10$  cfu/g *E. coli* O157:H7 μετά από 12 ημέρες σε γιαούρτι ενοφθαλμισμένο (κατά προσέγγιση) με  $3,0 \log(\text{cfu/g})$  που συντηρήθηκε στους  $4^\circ\text{C}$ .

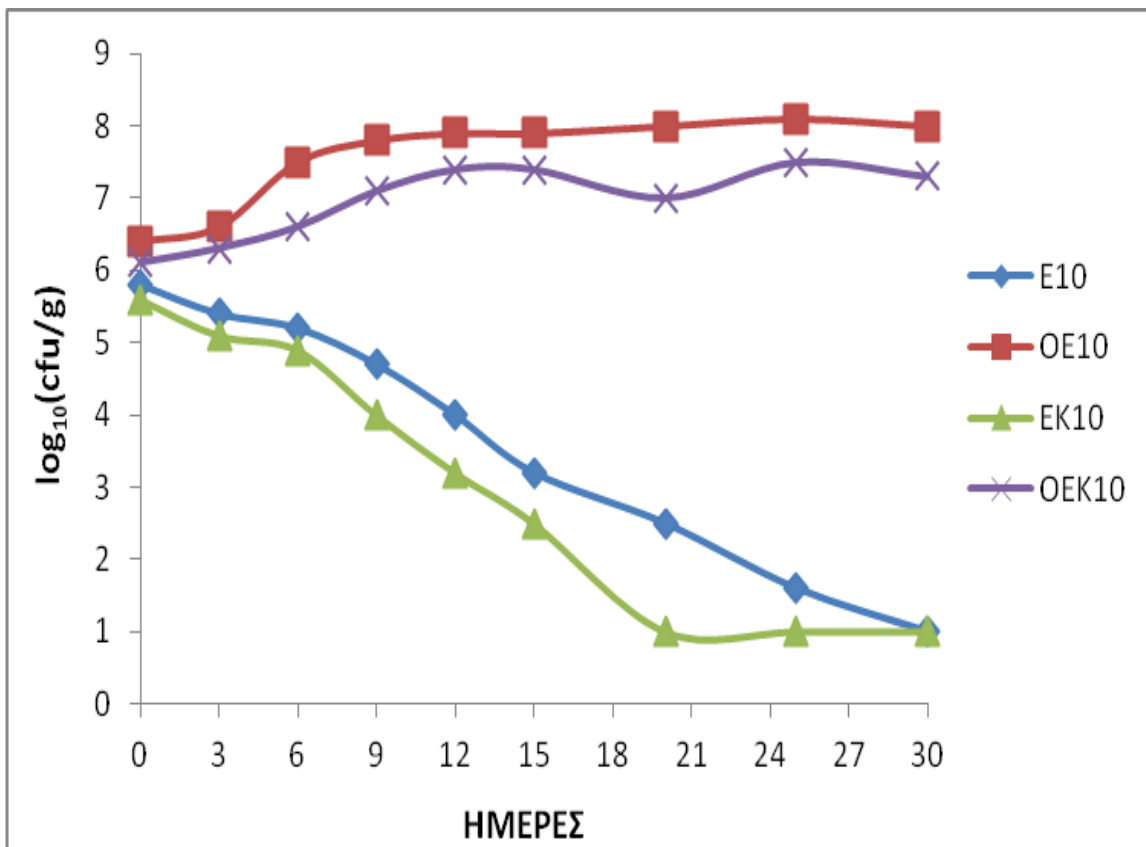


**Γράφημα 59:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherihia coli* O157:H7 σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g *Escherihia coli* O157:H7 κατά τη διάρκεια συντήρησης στους  $4^\circ\text{C}$  σε συσκευασία κενού.

Επίσης, οι Guraya et al. (1998) βρήκαν ότι η *E. coli* O157:H7 μετά από μια περίοδο 7 ημερών είχε μια μείωση μιας λογαριθμικής μονάδας περίπου, ενώ δεν ανιχνεύτηκε μετά από 35 ημέρες, σε γιαούρτη χωρίς λιπαρά στους  $4^\circ\text{C}$ . Ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 μειώθηκε απότομα από  $6.3 \log_{10}(\text{cfu/g})$  σε  $3.1 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στο Ayran (είναι ένα προϊόν ζύμωσης που παραδοσιακά παρασκευάζονται με ανάμιξη γιαούρτης με νερό και αλάτι) με pH 4,4 μετά από 7 ημέρες και ο πληθυσμός της δεν ανιχνεύθηκε μετά από 14 ημέρες συντήρησης του προϊόντος στους  $4^\circ\text{C}$  (Simsek et



al., 2007). Η *E. coli* O157: H7 δεν ανιχνεύτηκε μετά από 3 ημέρες σε Amasi (ένα παραδοσιακό προϊόν ζύμωσης του γάλακτος που καταναλώνεται σε όλες τις περιοχές της Νότιας Αφρικής) με pH= 4.0 στους 30° C (Dlamini και Buys, 2009). Ο μικρότερος χρόνος της ελάττωσης του παθογόνου μικροοργανισμού κάτω από το όριο ανίχνευσης σε ορισμένες από τις παραπάνω μελέτες, σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το τζατζίκι της παρούσας μελέτης δεν περιέχει καθόλου συντηρητικά (σε αντίθεση με ορισμένα από τα παραπάνω προϊόντα που περιέχουν συντηρητικά), το pH των προϊόντων αυτών είναι σαφώς χαμηλότερο (αναφέρεται pH 3,9 – 4,5) σε σχέση με το τζατζίκι (pH 4,4-5,0) και τέλος όλα τα παραπάνω προϊόντα ήταν συσκευασμένα σε αέρα, ενώ το τζατζίκι συσκευάστηκε υπό κενό.



**Γράφημα 60:** Η ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό 10<sup>6</sup> cfu/g *Escherichia coli* O157:H7 κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 10° C σε συσκευασία κενού.

Σύμφωνα με τον Smittle (2000) ο πιο σημαντικός παράγοντα για την καταστροφή των παθογόνων βακτηρίων, μεταξύ των οποίων και η *Escherichia coli* O157:H7, είναι το pH (η αναφερόμενη ανασταλτική τιμή είναι περίπου 4,5). Σύμφωνα με τους Karagul- Yuceer et al. (2001) δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη της *E. coli* σε γιαούρτη με φρούτα (ενοφθαλμισμένο με  $10^3$  cfu/g *E. coli* ATCC 11775) με pH 4,2 και 5,0 μετά από 21 και 45 ημέρες, αντίστοιχα. Επίσης, οι Ogwaro et al. (2002) βρήκαν ότι ο πληθυσμός της *E. coli* O157: H7 μειώθηκε σταδιακά σε συνάρτηση με την μείωση του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης παστεριωμένου γάλακτος (ενοφθαλμισμένο με  $10^5$  cfu/ml) που είχε υποστεί ζύμωση (με γαλακτική καλλιέργεια για την παρασκευή γιαουρτιού) στους 4° C. Συγκεκριμένα η *E. coli* O157: H7 μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, όταν το pH του γάλακτος μειώθηκε σε τιμή μικρότερη από 4,4. Οι Massa et al. (1997) παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157: H7 σε γάλα (pH= 6.4) μειώθηκε περίπου 1-2 λογαριθμικές μονάδες στους 4° C. Μάλιστα, σύμφωνα με τους Yokoigawa et al. (2003) (σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε σπαράγγια, μπρόκολο, καρότο, σέλινο, αγγούρι, μελιτζάνα, πιπερόριζα, πράσινη πιπεριά, κρεμμύδι, πατάτα, ραπανάκι, ντομάτα και βόειο κρέας ενοφθαλμισμένα με 3000 cfu/gr *E. coli* O157:H7) η ανθεκτικότητα της *E. coli* O157:H7 σε όξινες τιμές pH δεν εξαρτάται μόνο από το χαμηλό pH του τροφίμου, αλλά και τα επιμέρους συστατικά των τροφίμων, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την ανθεκτικότητα του εν λόγω παθογόνου σε όξινο περιβάλλον. Αυτή η πληροφορία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για ένα προϊόν όπως το τζατζίκι, που αποτελείται από διάφορα συστατικά όπως: γιαούρτη, αγγουράκι, σκόρδο, άνηθο και ελαιόλαδο, και που συνυπάρχουν σε όξινο περιβάλλον.

Στην παρούσα μελέτη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε κατά περίπου παρόμοιο τρόπο και στις δύο θερμοκρασίες. Επίσης, παρατηρείται ότι ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 μειώθηκε σε πληθυσμό μικρότερο από το όριο ανίχνευσης  $1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$  στις 42 και 30 ημέρες για το τζατζίκι χωρίς την προσθήκη συντηρητικών στους 4 και 10° C, αντίστοιχα (Γραφήματα 59 και 60). Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα που υπάρχουν στην βιβλιογραφία για την επιβίωση της *E. coli* O157: H7 στο γιαούρτι. Οι Bachgiouri et al. (2006) σε μελέτη που έκαναν σε σπιτικό γιαούρτι (το γιαούρτι παράχθηκε με γάλα ενοφθαλμισμένο με 4,9 cfu/ml *E. coli* O157: H7), όπου παρατήρησαν ότι ο πληθυσμός

της *E. coli* O157: H7 δεν ανιχνεύτηκε μετά από 21 ημέρες σε γιαούρτι στους 4° C και μετά από 10 ημέρες σε γιαούρτι στους 8 ° C. Οι Canganella et al. (1998) δεν ανίχνευσαν το παθογόνο βακτήριο *E. coli* μετά από 28 ημέρες στους 4 °C και μετά από 14 ημέρες στους 8 °C, σε γιαούρτι με φράουλες ενοφθαλμισμένο με 10<sup>6</sup> cfu/gr *E. coli* (DSMZ 498). Σε βιομηχανικό γαλοτύρι (με pH=3,7-3,9), ενοφθαλμισμένο με 6,5 log<sub>10</sub>(cfu/g), ο πληθυσμός της *E. coli* O157:H7 ήταν μικρότερος από το όριο ανίχνευσης 1,0 log<sub>10</sub>(cfu/g) την 14<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης του προϊόντος στους 4 και στους 12° C (Lekkas et al., 2006). Τονίζεται ότι σε όλες τις προαναφερθείσες μελέτες το προϊόν ήταν συσκευασμένο σε αέρα, οπότε και ο χρόνος συντήρησης τους ήταν μικρότερος από το τζατζίκι της παρούσας μελέτης που συσκευάστηκε υπό κενό.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές που αποδεικνύουν πιθανή ανάμειξη των συστατικών του τζατζικιού στην πορεία/επιβίωση του εν λόγω παθογόνου. Η *E. coli* έχει αποδειχτεί ότι είναι πολύ ευαίσθητη στην παρουσία σκόρδου, το οποίο επιδεικνύει ισχυρή αναχαιτιστική δράση έναντι αυτού του μικροοργανισμού (Kumar και Berwal, 1998). Μάλιστα το αιθέριο έλαιο του σκόρδου έδειξε σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της *Escherichia coli* O157:H7 σε συγκέντρωση 3% σε ενεργή συσκευασία (ενσωματωμένο στο φιλμ συσκευασίας) (Seydim και Sarikus, 2006). Ωστόσο, επιπλέον, η προσθήκη 0,2% σκόρδου στο Ayran (ποτό που παραδοσιακά παρασκευάζεται με γιαούρτη) δεν έδειξε κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στον πληθυσμό του εν λόγω παθογόνου βακτηρίου (Simsek et al., 2007). Επίσης, το αιθέριο έλαιο του άνηθου (*Anethum graveolens* L.) έδειξε ασθενή δράση έναντι της *Escherichia coli* O157:H7 (Delaquis et al., 2002).

Ακόμη, η παρουσία Citrox μείωσε στην παρούσα έρευνα τον πληθυσμό της *Escherichia coli* (Γραφήματα 59 και 60), κάτι που συμφωνεί με τις βιβλιογραφικές αναφορές. Όταν φρεσκοκομμένο μήλο πλύθηκε με Citrox μειώθηκε ο πληθυσμός της *E. coli* του προϊόντος κατά 1 log<sub>10</sub>(cfu/g) (Abadias et al., 2011). Τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs), που παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας εκχύλισμα από φλούδα των εσπεριδοειδών Citrus, έδειξαν αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli* (Kaviya et al., 2011). Μπάρες σοκολάτας γάλακτος 1 kg εμβολιάστηκαν με ένα μείγμα από *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* και *S. aureus* και 1 ml αιθέριο έλαιο λεμονιού, το οποίο μείωσε τον πληθυσμό της *E. coli* κατά 1.7— 1.8 λογάριθμους (Kotzekidou et al, 2007). Προσθήκη 75 μL/L αιθέριου ελαίου λεμονιού

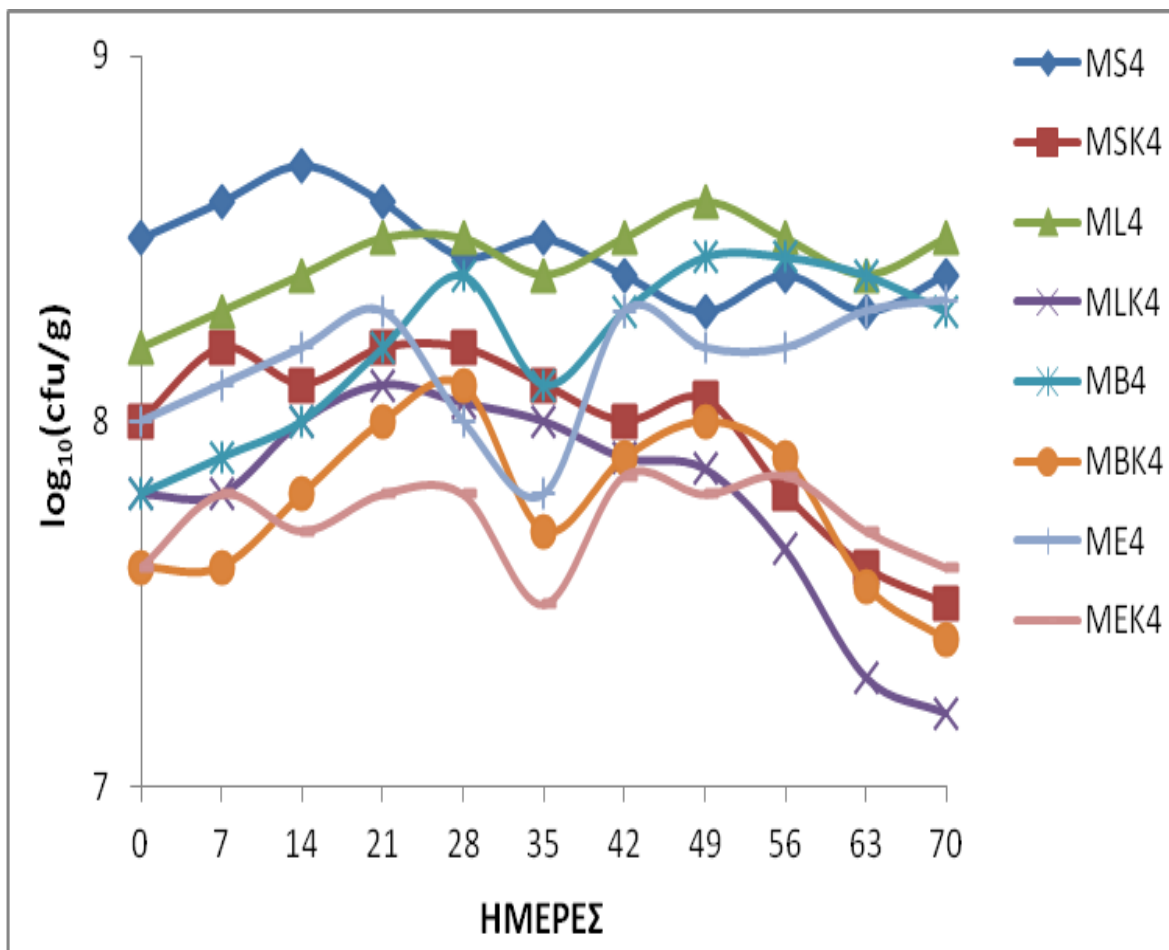
σε χυμό μήλου σε συνδυασμό με ήπια θερμική επεξεργασία μείωσε τον πληθυσμό της *E. coli* O157: H7 από  $3 \times 10^7$  σε  $3 \times 10^4$  cfu/mL (Espina et al., 2012). Η γερανιόλη (συστατικό των αιθέριων ελαίων των εσπεριδοειδών) έχει βρεθεί αποτελεσματική έναντι  $10^6$  cfu/ml *E. coli* σε χυμό μήλου στους  $35^\circ \text{C}$ , αφού μειώνει τον πληθυσμό του παθογόνου κατά  $10^3$  cfu/ml (Raybaudi-Massilis et al., 2006). Τα αιθέρια έλαια πορτοκαλιού, μανταρινιού και λεμονιού εξετάστηκαν σε 'in vitro' πείραμα για την ελάχιστη ανασταλτική τους συγκέντρωση (MIC) έναντι της *E. coli* O157:H7 (συγκέντρωσης  $10^7$  κύτταρα/ml) και βρέθηκε ίση με 30.0, 5.0 και >30.0 μl αιθέριου ελαίου/ml broth, αντίστοιχα (Espina et al., 2011).

### **5.3.6. Πορεία ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τζατζίκι, με ή χωρίς την προσθήκη διαλύματος Citrox, διατηρημένο στους $4^\circ \text{C}$ και $10^\circ \text{C}$**

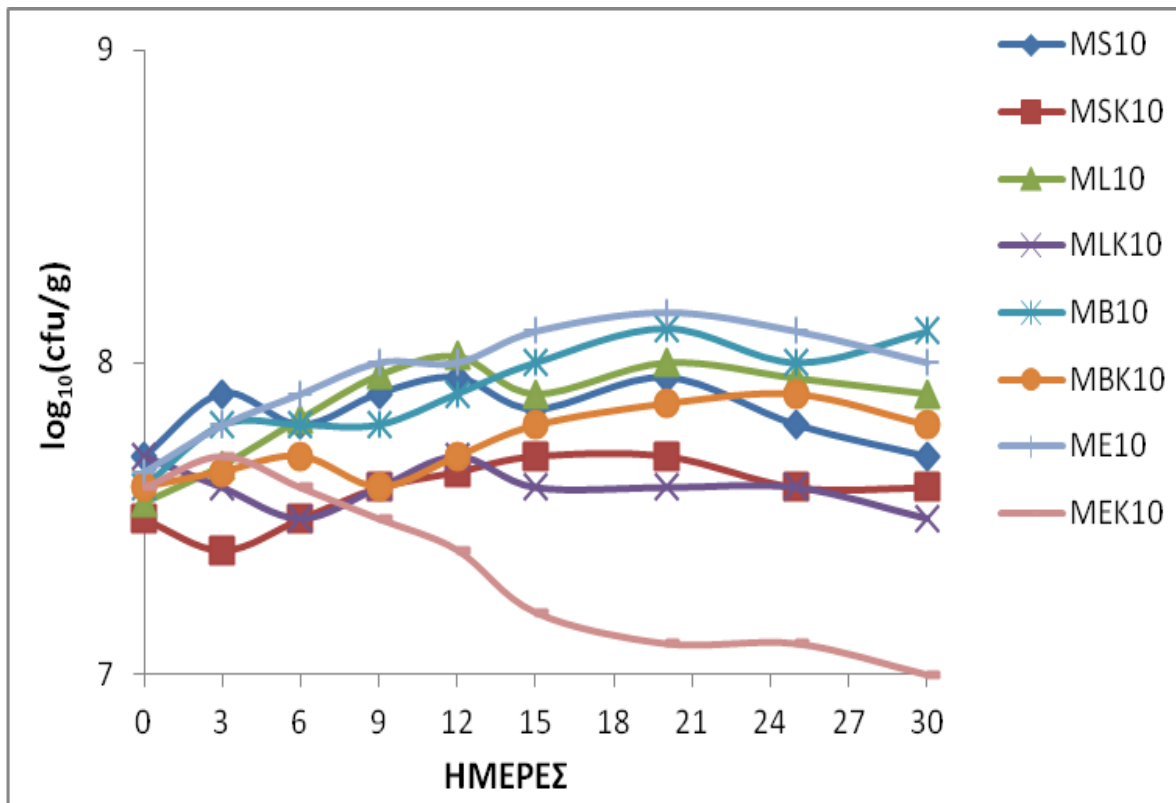
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που υπάρχουν στη γιαούρτη (*Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*) παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση έναντι ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών (Szcawinska και Szcawinski, 2011). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχει αποδειχθεί ότι είναι σε θέση να αναστείλουν την ανάπτυξη των *Listeria monocytogenes* (Gonzalez et al., 2007), *Bacillus cereus* (Yang et al., 2008), *Salmonella enteritidis* (Szcawinska και Szcawinski, 2011) και *Escherichia coli* (Mufandaedza et al., 2006). Επιπλέον, σύμφωνα με τα συμπεράσματα του Κεφαλαίου 4, τα οξυγαλακτικά βακτήρια επικρατούν στην μικροχλωρίδα του τζατζικιού, με αποτέλεσμα να λειτουργούν ανταγωνιστικά για την επιβίωση/ανάπτυξη των ενοφθαλμισμένων παθογόνων βακτηρίων.

Όσον αφορά τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι σαφές από τα Γραφήματα 61 και 62 ότι σε όλες τις μεταχειρήσεις ο πληθυσμός τους είναι υψηλός και δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό τους σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης ( $P > 0,05$ ). Σε συμφωνία με το παραπάνω συμπέρασμα βρίσκονται και τα αποτελέσματα των Mataragas et al. (2011), που δείχνουν ότι ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων του γιαουρτιού με φρούτα παρέμεινε σταθερός τόσο στους  $5^\circ \text{C}$  όσο και στους  $10^\circ \text{C}$  διατήρησης του προϊόντος.

Ο ενοφθαλμισμός του *B. cereus* δεν επηρέασε την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της παρασκευής τυριού Gouda, αφού ο πληθυσμός τους αυξήθηκε από  $10^7$  έως  $10^9$  cfu ανά γραμμάριο τυροπήγματος κατά την παραγωγή τυριού και παρέμεινε σχετικά σταθερός 6 εβδομάδες (Rukure και Bester, 2001). Επίσης, ο αριθμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε σπιτική γιαούρτη (ενοφθαλμισμένο με *E. coli* O157:H7) ήταν σταθερός (μεταξύ  $10^7$  και  $10^8$  cfu/gr) καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (25 ημέρες), τόσο στους 4° C, όσο και στους 8° C (Bachrouri et al., 2006). Σύμφωνα με τους Al-Kadamany et al. (2003) ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε labneh (είδος γιαούρτης στην Μέση Ανατολή) εμφάνισε σχετικά μικρές αλλαγές κατά την συντήρηση του προϊόντος, στους 5 ° C και 15 ° C.



**Γράφημα 61:** Η ανάπτυξη των Οξυγαλακτικών Βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g παθογόνο μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 4° C σε συσκευασία κενού.



**Γράφημα 62:** Η ανάπτυξη των Γαλακτικών Βακτηρίων σε τζατζίκι ενοφθαλμισμένο με πληθυσμό  $10^6$  cfu/g παθογόνο μικροοργανισμό κατά τη διάρκεια συντήρησης στους  $10^\circ\text{C}$  σε συσκευασία κενού.

Επίσης, παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις (Γραφήματα 61 και 62) συντήρησης του προϊόντος στους  $4^\circ\text{C}$  και στους  $10^\circ\text{C}$  η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX στο τζατζίκι μειώνει ελαφρώς τον πληθυσμό τους, αλλά η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $P>0,05$ ). Η μικρή αυτή μείωση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν αναμενόμενη, αφού (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι τα αιθέρια έλαια των εσπεριδοειδών είναι σε θέση να μειώσουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Subba et al., 1967; Karagul- Yuceer et al., 2001; Mexis et al., 2012).

---

#### 5.4. Συμπεράσματα

---

- Το εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX ήταν δραστικό έναντι όλων των παθογόνων μικροοργανισμών που εφαρμόστηκε στην 'in vitro' έρευνα (σε

θρεπτικό υλικό TSB στους 37° C). Η προσθήκη του CitroX μετά από 32 h μείωσε τον πληθυσμό των *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* και *Escherichia coli* O157H7 κατά 7.0, 6.0, 6.7 και 8.9 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα.

- Η προσθήκη της φυσικής αντιμικροβιακής ουσίας CitroX μείωσε τον πληθυσμό της *Listeria spp.* κατά περίπου 1,5 λογάριθμο στους 4° C, ενώ στους 10° C μείωσε τον πληθυσμό της κατά περίπου 1 λογάριθμο. Και στις δύο περιπτώσεις η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τον πληθυσμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του προϊόντος. Ακόμη, ο πληθυσμός της *Listeria spp.* μειώνεται (και στις δύο περιπτώσεις) με το χρόνο συντήρησης του προϊόντος.
- Η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX στο τζατζίκι επηρεάζει την ανάπτυξη του *Bacillus cereus*, αφού ελαττώνει την ανάπτυξή του κατά περίπου μία λογαριθμική μονάδα (σε σχέση με τον μάρτυρα), τόσο στους 4° C, όσο και στους 10° C. Επίσης η προσθήκη CitroX μειώνει την ολική μεσόφιλη χλωρίδα του προϊόντος κατά περίπου 0,5 log<sub>10</sub>(cfu/g) και στις δύο περιπτώσεις. Τέλος, ενώ ο πληθυσμός όλων των άλλων παθογόνων που εξετάστηκαν, μειώθηκε στο τζατζίκι, ο πληθυσμός του *Bacillus cereus* αυξήθηκε ελαφρώς στο δείγμα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία (control) ενώ παρέμεινε πρακτικά σταθερός ή μειώθηκε ανεπαίσθητα στο δείγμα με την προσθήκη της αντιμικροβιακής ουσίας CitroX.
- Η *Salmonella enterica* στο τζατζίκι που συντηρήθηκε στους 4° C, μειώθηκε κατά περίπου 3 λογαριθμικές μονάδες καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης του προϊόντος (70 ημέρες), ενώ η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX στο προϊόν μείωσε τον πληθυσμό της την 70<sup>η</sup> ημέρα κατά περίπου 1,5 log<sub>10</sub>(cfu/g). Στους 10°C παρατηρήθηκε επίσης μείωση του πληθυσμού της *Salmonella enterica*, κατά περίπου 3 λογαριθμικές μονάδες ως την 30<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης του προϊόντος, αλλά η επίδραση του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX ήταν μικρότερη στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού (την 30<sup>η</sup> ημέρα, τον μείωσε κατά περίπου 1 λογαριθμική μονάδα). Τέλος, η προσθήκη του CitroX στο τζατζίκι μείωσε την ολική μεσόφιλη χλωρίδα του

προϊόντος κατά περίπου 0,5 λογαριθμική μονάδα και ανεπαίσθητα, στους 4 και 10° C, αντίστοιχα.

- Ο πληθυσμός της *E. coli* μειώνεται στους 4° C κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) την 42<sup>η</sup> και 35<sup>η</sup> ημέρα για το τζατζίκι χωρίς αντιμικροβιακή ουσία και το τζατζίκι με εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX, αντίστοιχα. Παρόμοιο profil ανάπτυξης της *E. coli* παρατηρείται και στο τζατζίκι που συντηρήθηκε στους 10° C, όπου ο πληθυσμός της μειώνεται κάτω από το όριο ανίχνευσης ( $1,0 \log_{10}(\text{cfu/g})$ ) στις 20 και 30 ημέρες στα δείγματα τζατζίκι με την προσθήκη εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX και το control (χωρίς αντιμικροβιακή ουσία), αντίστοιχα. Και στις δύο θερμοκρασίες η αντιμικροβιακή ουσία CitroX μειώνει την ολική μεσόφιλη χλωρίδα του προϊόντος κατά περίπου  $0,5 \log_{10}(\text{cfu/g})$ .
- Όσον αφορά τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με το χρόνο αποθήκευσης ( $P > 0,05$ ). Επίσης, παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις συντήρησης του προϊόντος στους 4° C και στους 10° C η προσθήκη του εκχυλίσματος εσπεριδοειδών CitroX στο τζατζίκι μειώνει ελαφρώς τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αλλά η μείωση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική ( $P > 0,05$ ).



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:**

### **Γενικά Συμπεράσματα και Περίληψη Διδακτορικής Διατριβής**

---

#### **6.1. Γενικά Συμπεράσματα**

---

- Ο χρόνος ζωής του παραδοσιακού φύλλου για πίτα είναι: 5, 6.5, 8, 8.5, 9.5, 10, 11.5, 12, 13, 14, 16 και 18 ημέρες για τα δείγματα A, AN, AO, AC, ACN, AON, AOC, V, AOCN, VN, VC και VCN είναι, αντίστοιχα. Τελικά η συσκευασία κενού είναι η πιο αποτελεσματική από όλες τις μεταχειρίσεις που χρησιμοποιήθηκαν (ενεργός συσκευασία και συσκευασία αέρα) και ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και προσθήκης χιτοζάνης και ναταμυκίνης είναι ο καλύτερος συνδυασμός εμποδίων του πειράματος, εφόσον δίνει τα καλύτερα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά αποτελέσματα.
- Η προσθήκη της χιτοζάνης στο φύλλο μείωσε τον πληθυσμό όλων των υπό εξέταση παθογόνων βακτηρίων στο προϊόν, τόσο σε υψηλό ( $10^5$  cfu/g) όσο και σε χαμηλό ( $10^3$  cfu/g) πληθυσμό αυτών. Αποδείχτηκε λοιπόν ισχυρός αντιμικροβιακός παράγοντας στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα, αφού μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό των παθογόνων βακτηρίων *Listeria spp.*, *Escherihia coli*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus*. Συγκεκριμένα, όταν τα παθογόνα ενοφθαλμίστηκαν στο φύλλο σε πληθυσμό  $10^3$  cfu/g η χιτοζάνη

δεν φάνηκε να μειώνει σημαντικά τον πληθυσμό της *Listeria spp.*, ενώ μείωσε τους πληθυσμούς των *Escherihia coli*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus* κατά 2, 1.5 και 2.5 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Ενώ, όταν το φύλλο ενοφθαλμίστηκε με πληθυσμό παθογόνου ίσο με  $10^5$  cfu/g η προσθήκη χιτοζάνης μείωσε τους πληθυσμούς των *Listeria spp.*, *Escherihia coli*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus* κατά περίπου 2, 3, 2 και 2 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα.

- Ο χρόνος ζωής στο τζατζίκι (στους 4° C), όπως προκύπτει από τον συνδυασμό του μικροβιολογικού και οργανοληπτικού χρόνου ζωής, ήταν: 17, 22, 26.5, 29, 33, 42, 56 και 57 ημέρες για τα AT, ATN, ATK, ATKN, VT, VTN, VTK και VTKN, αντίστοιχα. Η συσκευασία κενού αύξησε το χρόνο ζωής του προϊόντος κατά 16 ημέρες. Η ναταμυκίνη και το Citrox όταν συνδυαστούν και προστεθούν στο τζατζίκι παρατείνουν το χρόνο ζωής του, χωρίς να υποβαθμίζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του.
- Το εκχύλισμα εσπεριδοειδών Citrox αποδείχτηκε ισχυρός αντιμικροβιακός παράγοντας. Σε 'in vitro' έρευνα η προσθήκη του Citrox σε θρεπτικό υλικό TSB (στους 37° C) μετά από 32 h μείωσε τον πληθυσμό των *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* και *Escherichia coli O157H7* κατά 7.0, 6.0, 6.7 και 8.9 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Η προσθήκη της φυσικής αντιμικροβιακής ουσίας Citrox σε τζατζίκι στους 4° C μείωσε τον πληθυσμό της *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli O157:H7* και *Bacillus cereus* κατά περίπου 1.5, 1.5, 0,5, 1 λογάριθμο, αντίστοιχα. Όταν το τζατζίκι συντηρήθηκε στους 10° C η φυσική αντιμικροβιακή ουσίας Citrox μείωσε κατά περίπου 1 λογάριθμο τον πληθυσμό των *Listeria spp*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* και *Escherihia coli O157:H7*.

---

## 6.2. Περίληψη

---

Σκοπός της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής ήταν: α) ο προσδιορισμός ή/και η επιμήκυνση του χρόνου ζωής δύο παραδοσιακών Ελληνικών προϊόντων-τροφίμων, του παραδοσιακού φύλλου για πίτα και της παραδοσιακής σαλάτας 'τζατζίκι', με τη χρήση συσκευασίας και φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων και β) η διερεύνηση της μικροβιολογικής ασφάλειας (πορεία ανάπτυξης/ επιβίωσης παθογόνων βακτηρίων) των υπό εξέταση προϊόντων. Η Διδακτορική Διατριβή απαρτίζεται από τέσσερα πειραματικά κεφάλαια:

Ο σκοπός των πειραμάτων του 1<sup>ου</sup> Κεφαλαίου ήταν η μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβιας, ενεργής συσκευασίας με απορροφητή οξυγόνου και συσκευασία κενού) και της επιμέρους ή/και της συνδυαστικής επίδρασης των φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων, χιτοζάνης και ναταμυκίνης, στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής ενός Ελληνικού παραδοσιακού προϊόντος, συγκεκριμένα χωριάτικο φύλλο για πίτα, κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 °C). Με βάση τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης ο χρόνος ζωής των δειγμάτων A, AN, AO, AC, ACN, AON, AOC, V, AOCN, VN, VC και VCN ήταν 5, 6.5, 8, 8.5, 9.5, 10, 11.5, 12, 13, 14, 16 και 18 ημέρες, αντίστοιχα. Όταν οι κριτές απέρριψαν το φύλλο, λόγω της έντονης αλλαγής του χρώματος (σκούρο χρώμα και λευκές - αποχρωματισμένες περιοχές) αλλά και λόγω της υπόξινης οσμής του, ο πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων ήταν περίπου ίσος με  $4 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Συνεπώς, πληθυσμός Ζυμών και Μυκήτων της τάξεως των  $4 \log_{10}(\text{cfu/g})$  θα μπορούσε να προταθεί ως δείκτης φρεσκάδας/ποιότητας ή και αλλοίωσης του φύλλου. Η συσκευασία κενού αποδείχτηκε η πιο αποτελεσματική από όλες τις μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν, ενώ ο συνδυασμός συσκευασίας κενού και χιτοζάνης - ναταμυκίνης ήταν η καλύτερη μεταχείριση, εφόσον έδωσε τα καλύτερα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά αποτελέσματα.

Στο 2<sup>ο</sup> Κεφάλαιο μελετήθηκε (α) η επιβίωση/ανάπτυξη τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 και *Bacillus cereus*) στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα και (β) η επίδραση της χιτοζάνης στους μικροοργανισμούς αυτούς προστιθέμενη στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα

υπό συνθήκες ψύξης. Μελετήθηκε η ανάπτυξη των τεσσάρων παθογόνων στο προϊόν σε δύο διαφορετικούς πληθυσμούς βακτηρίων και συγκεκριμένα της τάξεως των  $10^5$  και  $10^3$  cfu/g για κάθε παθογόνο. Η προσθήκη της χιτοζάνης στο φύλλο μείωσε τον πληθυσμό όλων των υπό εξέταση παθογόνων βακτηρίων στο προϊόν, τόσο σε υψηλό ( $10^5$  cfu/g) όσο και σε χαμηλό ( $10^3$  cfu/g) πληθυσμό αυτών. Αποδείχτηκε λοιπόν ισχυρός αντιμικροβιακός παράγοντας στο παραδοσιακό φύλλο για πίτα, αφού μείωσε αισθητά τον πληθυσμό των παθογόνων βακτηρίων *Listeria sp.*, *Escherihia coli* 0157:H7, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus*. Όταν τα παθογόνα ενοφθαλμίστηκαν στο φύλλο σε πληθυσμό  $10^3$  cfu/g η χιτοζάνη δεν φάνηκε να μειώνει σημαντικά τον πληθυσμό της *Listeria spp.*, ενώ μείωσε τους πληθυσμούς των *Escherihia coli*, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus* κατά 2, 1.5 και 2.5 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Όταν το φύλλο ενοφθαλμίστηκε με πληθυσμό παθογόνου ίσο με  $10^5$  cfu/g η προσθήκη χιτοζάνης μείωσε τους πληθυσμούς των *Listeria spp.*, *Escherihia coli* 0157:H7, *Salmonella enterica* και *Bacillus cereus* κατά περίπου 2, 3, 2 και 2 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα.

Το 3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο αναφέρεται στην μελέτη της επίδρασης της συσκευασίας (αερόβιας και συσκευασίας κενού) και της επιμέρους ή/και της συνδυαστικής επίδρασης των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών: Εκχυλίσματος εσπεριδοειδών (Citrox) και ναταμυκίνης, στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής ενός Ελληνικού προϊόντος, το τζατζίκι (μια Ελληνική παραδοσιακή σαλάτα), κατά την συντήρηση υπό ψύξη (4 °C). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια επικράτησαν της μικροχλωρίδας του προϊόντος. Η OMX ήταν μικρότερη σε όλες τις μεταχειρίσεις υπό κενό και σε σχέση με εκείνη των αντίστοιχων δειγμάτων που συσκευάστηκαν σε αέρα. Ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων και ψευδομονάδων κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλές τιμές, ενώ ο πληθυσμός των ζυμών/μυκήτων αυξήθηκε σε σχέση με το χρόνο συντήρησης του προϊόντος. Ο χρόνος ζωής για το τζατζίκι (στους 4<sup>ο</sup> C), όπως προκύπτει από τον συνδυασμό του μικροβιολογικού και οργανοληπτικού χρόνου ζωής, ήταν: 17, 22, 26.5, 29, 33, 42, 56 και 57 ημέρες για τα AT, ATN, ATK, ATKΝ, VT, VTN, VTK και VTKΝ, αντίστοιχα. Συνεπώς, ο συνδυασμός της ναταμυκίνης και του Citrox όταν εφαρμόζεται στο τζατζίκι παρατείνει τον χρόνο ζωής του, χωρίς να υποβαθμίζει τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Αντίστοιχα, ο χρόνος ζωής του τζατζικιού υπό

κενό στους 10° C ήταν ίσος με 18 και 23 ημέρες για το προϊόν υπό κενό και το προϊόν με την προσθήκη CitroX, αντίστοιχα.

Τέλος στο 4° Κεφάλαιο, μελετήθηκε η ανάπτυξη/επιβίωση τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 και *Bacillus cereus*) ενοφθαλμισμένων σε πληθυσμό 10<sup>6</sup> cfu/g στο τζατζίκι, και η επίδραση της ουσίας CitroX στους παθογόνους αυτούς μικροοργανισμούς. Μελετήθηκε η ανάπτυξη των τεσσάρων παθογόνων βακτηρίων στο τζατζίκι συσκευασμένο υπό κενό, με ή χωρίς την προσθήκη CitroX, στους 4 και 10° C. Το εκχύλισμα εσπεριδοειδών CitroX ήταν δραστικό έναντι όλων των παθογόνων μικροοργανισμών που εφαρμόστηκε στην 'in vitro' έρευνα (σε θρεπτικό υλικό TSB στους 37° C). Η προσθήκη του CitroX σε TSB (θρεπτικό ζωμό) μετά από 32 h μείωσε τον πληθυσμό των *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* και *Escherichia coli* 0157:H7 κατά 7.0, 6.0, 6.7 και 8.9 λογαριθμικές μονάδες, αντίστοιχα. Η προσθήκη CitroX σε τζατζίκι στους 4° C μείωσε τον πληθυσμό της *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 και *Bacillus cereus* κατά περίπου 1.5, 1.5, 0.5, 1 λογάριθμο, αντίστοιχα. Στους 10° C το CitroX μείωσε κατά περίπου 1 λογάριθμο τον πληθυσμό των *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* και *Escherihia coli* 0157:H7.

---

### 6.3. Abstract

---

The objectives of the present Doctoral Thesis were: (i) to study the quality and the extension of the shelf-life of two traditional Greek food products, traditional phyllo for Greek style pies and traditional Greek salad 'tzatziki', using packaging and natural antimicrobials and (ii) to examine the microbiological safety (growth/survival of pathogenic bacteria) of selected pathogens, inoculated into these products. The present study consists of four Chapters:

Chapter 1: Study of the effect of packaging (aerobic, active and vacuum) and the individual and/or the combined effect of natural antimicrobial agents (chitosan and natamycin) in prolonging the shelf-life of the traditional phyllo for Greek style pies at 4 ° C. The shelf-life of samples A, AN, AO, AC, ACN, AON, AOC, V, AOCN, VN, VC and VCN was 5, 6.5, 8, 8.5, 9.5, 10, 11.5, 12, 13, 14, 16 and 18 days, respectively, as determined by sensory evaluation. The panelists of the sensory evaluation team rejected phyllo because of an intense color (dark color and white discolored areas) and a sour flavor, while the population of yeasts and moulds had reached approximately a level of  $4 \log_{10}(\text{cfu/g})$ . Consequently, a yeasts and moulds population of  $4 \log_{10}(\text{cfu/g})$  could be proposed as an indicator of freshness and quality of fresh phyllo pastry. Finally vacuum packaging was the most effective of all the packaging treatments. Moreover the combination of vacuum packaging, chitosan and natamycin proved the best combination of hurdles, as it gave the best microbiological and organoleptic results.

Chapter 2: The survival/fate of four pathogens (*Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* 0157:H7 and *Bacillus cereus*) was studied in the traditional phyllo for Greek style pies and the effect of chitosan (added to phyllo) on those bacteria inoculated into the product at 4° C. The fate of these four pathogens on the product was studied at two different populations,  $10^5$  cfu/g and  $10^3$  cfu/g for each pathogen inoculated separately onto the phyllo. The addition of chitosan in phyllo reduced the population of all pathogenic bacteria, at both populations ( $10^5$  and  $10^3$  cfu/g). Chitosan proved a strong antibacterial agent in phyllo, reducing significantly the population of pathogenic bacteria, *Listeria spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella*

*enterica* and *Bacillus cereus*. When pathogens were inoculated onto the phyllo with a population of  $10^3$  cfu/g, chitosan did not appear to significantly effect the population of *Listeria spp.*, while it reduced populations of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella enterica*, and *Bacillus cereus* by 2, 1.5 and 2.5  $\log_{10}$ (cfu/g), respectively. When phyllo was inoculated with higher pathogen population ( $10^5$  cfu/g), chitosan reduced populations of *Listeria spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Bacillus cereus* by 2, 3, 2 and 2  $\log_{10}$ (cfu/g), respectively.

Chapter 3: The effect of the packaging (aerobic and vacuum packaging) and the individual, or the combined effect of natural antimicrobials: Citrus extract (Citrox) and natamycin were studied, in extending the shelf-life of a Greek fresh deli salad (tzatziki: a Traditional Greek salad), during storage under refrigeration (4 ° C). Lactic acid bacteria dominated the microflora of the product. The mesophilic total plate counts were lower in all vacuum packaging treatments compared to samples in air packaging. The shelf-life of traditional salad "tzatziki" (at 4 °C), as deduced from the combination of microbiological and sensory data, was: 17, 22, 26.5, 29, 33, 42, 56 and 57 days for AT, ATN, ATK , ATKN, VT, VTN, VTK and VTKN respectively. Therefore, natamycin and Citrox in combination extended the shelf-life of tzatziki, without affecting the sensory characteristics of tzatziki. At 10 ° C shelf-life was equal to 18 and 23 days for the tzatziki stored in vacuum packaging and the tzatziki with the treated citrus extract, respectively.

Chapter 4: Finally in the last chapter, the growth/survival of four pathogens (*Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 and *Bacillus cereus*) inoculated at a population into tzatziki of  $10^6$  cfu/g and the effect of 'natural' antimicrobial agent Citrox in these pathogenic microorganisms was studied. Experiments were performed at 4 °C and 10 °C. The addition of Citrus extract (Citrox) in TSB broth 'in vitro' (at 37 °C) after 32 h affected significantly the population of *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* 0157:H7 reducing populations by 7.0, 6.0, 6.7 and 8.9  $\log_{10}$ (cfu/g), respectively. Additionally, the addition of Citrox in tzatziki at 4 °C reduced the population of *Listeria spp.*, *Salmonella enterica*, *Escherihia coli* 0157:H7 and *Bacillus cereus* by approximately 1.5, 1.5, 0.5, 1  $\log_{10}$ (cfu/g), respectively. At 10 °C, Citrox reduced the population of *Listeria*

- 264 -

*spp*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* and *Escherihia coli* O157: H7 by approximately 1 log<sub>10</sub>(cfu/g).



# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

## Βιβλιογραφία Ξενόγλωσση

---

- Abadias, M., Alegre, I., Usall, J., Torres, R., Vinas, I. (2011). Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing foodborne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 289 – 297.
- Abushelaibi, A.A., Sofos, J.N., Samelis, J., Kendall, P.A. (2003). Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4°C, 15°C and 25°C. *Food Microbiology*, 20, 17-25.
- Aday, M.S. and Caner, C. (2012). The shelf life extension of fresh strawberries using the oxygen absorber in the biobased package. *Food Science and Technology*, 1-8.
- Adams, R.A., Moss, M.O. (2008). *Food Microbiology*. RSC Publishing, Cambridge, UK. pp 249-252
- Adams, M.R., Nicolaides, L., 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, 8, 227-239.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 837–842.
- Aires G.S.B., Walter E.H.M., Junqueira V.C.A., Roig S.M., Faria J.A.F. (2009). *Bacillus cereus* in refrigerated milk submitted to different heat treatments. *Journal of Food Protection*, 72, 1301-1305.
- Al-Kadamany, E., Toufeili, I., Khattar, M., Abou-Jawdeh, Y., Harakeh, S., Haddad, T. (2002). Determination of shelf-life of concentrated yogurt (Labhen) produced by

- in-bag straining of set yogurt using Hazard Analysis. *Journal of Dairy Science*, 85, 1023-1030.
- Al-Kadamany, E., Khattar, M., Haddad, T., Toufeili, I. (2003). Estimation of shelf-life of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 407-414.
- Allende A., Selma M.V., Lopez-Galvez F., Villaescusa R., Gil M.I. (2008). Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 155-163.
- Alterkruse, S.F., Timbo, B.B., Mowbray, J.C., Bean, N.H., Potter, M.E. (1998). Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: Sanitary manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Protection*, 61, 1405-1407.
- Altieri, C., Scrocco, C., Sinigaglia, M., Del Nobile, M.A. (2005). Use of Chitosan to Prolong Mozzarella Cheese Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, 88, 2683-2688.
- Andersson, A., Ronner, U., Granum, P. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, 28, 145—155.
- Angelidis, A. S., Chronis, E. N., Papageorgiou, D. K., Kazakis, I. I., Arsenoglou, K. C., Stathopoulos, G. A. (2006). Non-lactic acid contaminating flora in ready-to-eat foods: A potential food-quality index. *Food Microbiology*, 23, 95-100.
- Appendini, P., Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 113-126.
- Arques, J. L., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., & Nunez, M. (2005). Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal*, 15, 893-900.
- Ausa, S.F., Passalacqua, N., Castagna, L.F., Bianco, I.D., Beiramo, D.M. (2002). Growth of milk fermentative bacteria in the presence of chitosan for potential use in cheese making. *International Dairy Journal*, 12, 899-906.

- Aycicek, H., Sarimehmetoglu, B., & Cakiroglu, S. (2004). Assessment of the microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. *Food Control*, 15, 379-384.
- Bachrouri, M., Quinto, E.J., Mora M.T. (2006). Kinetic parameters of *Escherichia coli* O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. *International Dairy Journal*, 16, 474-481.
- Back, J. P., Langford, S. A., Kroll, R. G. (1993). Growth of *Listeria monocytogenes* in Camembert and other soft cheeses at refrigeration temperatures. *Journal of Dairy Research*, 60, 421-429.
- Bahk G.J., Todd E.C.D., Hong C.H., Oh D.H., Ha S.D. (2007). Exposure assessment for *Bacillus cereus* in ready-to-eat Kebab selling at stores. *Food Control*, 18, 682-688.
- Baiano, A., Del Nobile M.A. (2005). Shelf life extension of almond paste pastries. *Journal of Food Engineering*, 66m 487- 495.
- Bailey, C.P. and von Holy, A. (1993) *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiology*, 10, 287-294.
- Balatsouras, G.D., Vaughn, R.H. (1958). Some fungi that might cause softening of storage olives. *Journal of Food Science*, 23, 235—243.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin K.A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209-228.
- Bankole, M.O., Okagbue, R.N. (1992). Properties of nono, a Nigerian fermented milk food. *Ecology of Food and Nutrition*, 27, 145-149.
- Bento, R.A., Stamford, T.L.M., Stamford, T.L.M., Andrade, S.A.C., Souza, E.L. (2011). Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucor rouxii*. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 588-591.
- Banyko, J., Vyletelova, M. (2009). Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 318—323.
- Bas, M., Ersun, A. S., Kivanc, G. (2006). The evaluation of food hygiene knowledge, attitudes and practices of food handlers' in food businesses in Turkey. *Food Control*, 17, 317-322.

- Bartoszewicz, M., Hansen, B.M., Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food microbiology*, 25, 588—596.
- Beal, J.D., Niven, S.J., Campbell A., Brooks P.H. (2002). The effect of temperature on the growth and persistence of *Salmonella* in fermented liquid pig feed. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 99-104.
- Belletti, N., Lanciotti, R., Patrignani, F., Gardini, F. (2008). Antimicrobial Efficacy of Citron Essential Oil on Spoilage and Pathogenic Microorganisms in Fruit-Based Salads. *Journal of Food Science*, 73, 331-338.
- Benkerroum, N., Oubel, H., & Sandine, W. E. (2003). Effect of nisin on yogurt starter, and on growth and survival of *Listeria monocytogenes* during fermentation and storage of yogurt. *Internet Journal of Food Safety*, 1, 1-5.
- Berghofer, L.K., Hocking, A.D., Miskelly, D Jansson, E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 137-149.
- Besser, R. E., Lett, S. M., Weber, L. T., Doyle, M. P., Barrett, T. J., Wells, J. G., & Griffin, P. M. (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Journal of American Medical Association*, 269, 2217-2220.
- Besten, H.M.W., Mark, E.J.V., Hensen, L., Abee,T., Zwietering M.H. (2010). Quantification of the Effect of Culturing Temperature on Salt-Induced Heat Resistance of *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 4286-42392.
- Beuchat L.R., Rocelle M., Clavero S., Jacquette C.B. (1997). Effects of Nisin and Temperature on Survival, Growth, and Enterotoxin Production Characteristics of Psychrotrophic *Bacillus cereus* in Beef Gravy. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1953-1958.
- Beukes, E.M., Bester, B.H., Mostert, J.F. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 189-197
- Beverly R., Janes M.E., Prinyawiwatkula W., No H.K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food*

- Microbiology, 25, 534-537.
- Bevilacqua, A., Campaniello, D., Sinigaglia, M., Ciccarone, C., Corbo, M.R. (2012). Sodium-benzoate and citrus extract increase the effect of homogenization towards spores of *Fusarium oxysporum* in pineapple juice. *Food Control*, 28, 199-204.
- Bhounia, A.K. (2008). *Foodborne Microbial Pathogens – Mechanisms and Pathogenesis*. Springer, USA.
- Bielaszewska, M., Janda, J., Blahova, K., Minarikova, H., Jikova, E., Karmali, M.A., Laubova, J., Sikulova, J., Preston, M.A., Khakhria, R., Karch, H., Klazarova, H., Nyc, O. (1997). Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiology Infection*, 119, 299-305.
- Billie, J. (1990). Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: A.J. Miller, J.L. Smith and G.A. Somkcuti (Ed.), *Foodborne Listeriosis Society for Industrial Microbiology*, Elsevier, Amsterdam, Holland, pp. 71-74.
- Bolton, L. F., Frank, J. F. (1999). Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheeses based on salt, pH, and moisture content. *Journal of Food Protection*, 62, 601-609.
- Borregaard, D.E., Arneborg, N., 1998. Interactions between *Lactococcus lactis* subsp. *lactic* and *Issatchenkia orientalis* at milk fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 36, 75-78.
- Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. (1990). Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Journal of Food Science*, 55, 1754-1756.
- Buchanan, R.L., Phillips J.C. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 53, 370-376.
- Buchanan R.L., Klawitter L.A. (1990). Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4.5. *Journal of Food Science*, 55, 1754-1756.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223—253.

- Caccioni, D.R.L., Guizzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A., Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*, *International Journal of Food Microbiology*, 43, 73-79.
- Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A., Giudici, P. (2001). Identification of *Picchia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 71 -73.
- Canganella, F., Ovidi, M., Paganini, S., Vettraino, A. M., Bevilacqua, L., Trovatelli, L. D. (1998). Survival of undesirable microorganisms in fruit yoghurts during storage at different temperatures. *Food Microbiology*, 15, 71-77.
- Centers for Disease Control and Prevention. (1995). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California. 1994. Centers for Disease Control and Prevention. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 44, 157-160.
- Casey, P.G., Condon, S. (2002). Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 199–206
- Cauvain, S.P, Young, L.S. (2000). *Bakery Food Manufacturer and Quality: Water Control and Effects*. Blackwell Sciences, Oxford, UK.
- Charles, F., Sanchez, J., Gontard, N. (2003). Active modified atmosphere [ackaging of fresh fruits and vegetables: modeling with tomatoes and oxygen absorber. *Journal of Food Science*, 68, 1736-1742.
- Charles, F., Guillaume, C., Contard, N. (2008). Effect if passive and active modified atmosphere packaging on quality changes of fresh andives. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 22-29.
- Chen, Y. H., Jackson, K. M., Chea, F. P., & Schaffner, D. W. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 64, 72-80.
- Chen, W., Jin, T.Z., Gurtler, J.B., Geveke,D.J., Fan, X. (2012). Inactivation of *Salmonella* on whole cantaloupe by application of an antimicrobial coating containing chitosan and allyl isothiocyanate. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 165-170.

- Chhabra, P., Huang, Y.-W., Frank, J.F., Chmielewski, R., Gates, K. (2006). Fate of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, and *Vibrio vulnificus* in raw oysters treated with chitosan. *Journal of Food Protection*, 69, 1600-1604.
- Chirife, J., Favetto, J. (1992). Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. *Applied Technology*, 25,389-396.
- Christiansson, A. (2002). Pathogens in milk-Bacillus cereus. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 123-128, Swedish Dairy Association, Lund, Sweden.
- Christison C.A, Lindsay D., Holy A.(2008). Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control* 19, 727-733.
- Chung, Y.-C., Wang, H.-J., Chen, Y.-M., Li, S.-L. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*, 88, 179-184.
- Chung, Y.-C., Chen, C.-Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99, 2806-2814.
- Chutia, M., Deka Bhuyan, P., Pathak, M.G., Sarma, T.C., Boruah. P. (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 777-780.
- Clubbs E.A., Vittadini E., Thomas H. Shellhammer T.H., Vodovotz Y. (2008). Effects of storage on the physico-chemical properties of corn tortillas prepared with glycerol and salt. *Journal of Cereal Science* 47, 162-171.
- Colak, H., Hampikyan, H., Bingol, E.B., Ulusoy, B. (2007). Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. *Food Control*, 18, 576-579.
- Cong, F., Zhang, Y., Dong, W. (2007). Use of surface coatings with natamycin to improve the storability of Hami melon at ambient temperature. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 71-75.
- Conner, D.E., Kotrola, J.S., 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 382-385.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., Damiani, P., 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by

- Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Applied Microbiology and Biotechnology, 50, 253-256.
- Cox, J. (1999). Salmonella/Introduction. Encyclopedia of Food Microbiology, Elsevier Ltd, Academic Press, Washington, USA, pp 1928-1937.
- Cretu, C., Floristean, V., Carp-Carare, M., Bradatan, G., Isan, E. (2009). The influence of pH and temperature on *Salmonella spp.* From fresh, chilled and frozen poultry carcasses. Cercetari Agronomice in Moldova, 2, 79-84.
- Cronin U.P., Wilkinson M.G. (2009). The growth, physiology and toxigenic potential of *Bacillus cereus* in cooked rice during storage temperature. Food Control, 20, 822-828.
- Cueva, O., Aryana, K.J. (2008). Quality attributes of a heart healthy yogurt. LWT - Food Science and Technology, 41, 537-544.
- Dabbah, R., Edwards, V. M., & Moats, W. A. (1970). Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. Applied Microbiology, 19, 27-31.
- Dave R.I. and Shah N.P. (1997). Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made from Commercial Starter Cultures. International Dairy Journal, 7, 31-41.
- De Buyser, M., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialized countries. International Journal of Food Microbiology, 67, 1-17.
- De Ruig, W.G., Van den Berg, G. (1985). Influence of the fungicides sorbate and natamycin in cheese coatings on the quality of the cheese. Netherlands Milk Dairy Journal, 39, 165-169.
- Deans, S. G., Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. International Journal of Food Microbiology, 5, 165-180.
- Del Nobile M.A., Di Benedetto N., Suriano N., Conte A., Lamacchia C., Corbo M.R., Sinigaglia M. (2009a). Use of natural compounds to improve the microbial stability of Amaranth-based homemade fresh pasta. Food Microbiology, 26, 151-156.
- Del Nobile M.A., Di Benedetto N., Suriano N., Conte A., Corbo M.R., Sinigaglia M. (2009b). Combined effects of chitosan and MAP to improve the microbial quality of amaranth homemade fresh pasta. Food Microbiology, 26, 587-591.



- Del Rio, E., Muriente, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., & Capite, R. (2007a). Effectiveness of trisodium phosphate, acidified sodium chlorite, citric acid and peroxyacids against pathogenic bacteria on poultry during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 70, 2063—2071.
- Del Rio, E., Panizo-Moran, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2007b). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 268—280.
- Delaquis, P.J., Stanich, K., Girard, B., Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 101-109.
- Darmadji, P., Izumimoto, M. (1994). Effects of chitosan and nitrite on the properties of fermented meat. *Animal Science Technology*, 65, 639-646.
- Deng, Y., Ryu, J.H., Beuchat, L.R. (1998). Influence of temperature and pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry foods and growth in reconstituted infant rice cereal. *International Journal of Food Microbiology*, 45, 173-184.
- Darmadji, P., Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation, *Meat Science*, 38, 243-254.
- Deschenes, G., Casenave, C., Grimont, F., Desenclos, J.C., Benoit, S., Collin, M., Baron, S., Mariani, P., Grimont, P.A., Nivet, H. (1996). Cluster of cases due to unpasteurized cheese. *Pediatric Nephrology*, 10, 203 -205.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004a). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004b). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21, 703-714.
- Dineen, S. S., Takeuchi, K., Soudah, J. E., & Boor, K. J. (1998). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *Journal of Food Protection*, 61, 1602-1608.
- Dommel, M.K., Frenzel, E., Strasser, B., Blochinger, C., Scherer, S., Ehling-Schulz, M. (2010). Identification of the Main Promoter Directing Cereulide Biosynthesis in Emetic *Bacillus cereus* and Its Application for Real-Time Monitoring of *ces* Gene

- Expression in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1232-1240.
- Doyle, M.P. (1991). *Escherichia coli* 0157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 289-302.
- Doyle, M.P., Schoemi, M.P. (1987). Isolation of *Escherichia coli* 0157 : H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied Environmental Microbiology*, 53, 2394 – 2396.
- Driessen, F. M., Stadhouders, J. (1980). A new defect in stirred yoghurt. *Zuivelzicht*, 72, 754-755.
- Durango, A.M., Soares, N.F.F., Andrade, N.J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17, 336-341.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114, 1173-1182.
- Dykes G.A., Moorhead S.M., Roberts S.L. (2001). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on chill-stored vacuum or carbon dioxide packaged primal beef cuts. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 401-405.
- Earle, M.D., Putt, G.J., 1984. Microbial spoilage and use of sorbate in bakery products. *Food Technology in New Zealand*, 19, 25-36.
- El-Diasty, E. M., El-Kaseh, R. M., Salem, R. M. (2009). The effect of natamycin on keeping quality and organoleptic characters of yoghurt. *Arab Journal of Biotechnology*, 12, 41-48.
- Ellis M., Cooksey K., Dawson P., Han J., Vergano P. (2006). Quality of Fresh Chicken Breasts Using a Combination of Modified Atmosphere Packaging and Chlorine Dioxide Sachets. *Journal of Food Protection*, 69, 1991-1996.
- Erdourul, Z., Erbulur, F. (2006). Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. *Turkish Journal of Biology*, 30, 39-44.
- Erickson, J.P., Jenkins, P. (1991). Comparative *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* inactivation rates in four commercial mayonnaise products. *Journal of Food Protection*, 54, 913-916.
- Erickson, J.P., Mckenna, D.N., Woodruff, M.A., Bloom, J.S. (1993). Fate of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and spoilage microorganisms in home-style salads

- prepared with commercial real mayonnaise or reduced calorie mayonnaise dressings. *Journal of Food Protection*, 56, 1015-1021.
- Espina, L., Somolinos, M., Loran, S., Conchello, P., Garcia, D., Pagan, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 19, 1130-1138.
- Espina, L., Somolinos, M., Ouazzou, A.A., Condon, S., Garcia-Gonzalo, D., Pagan, R. (2012). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fruit juices by combined treatments of citrus fruit essential oils and heat. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 9-16.
- Eun Kim J., Hee Choi N., Chul Kang S. (2007). Anti-listerial properties of garlic shoot juice at growth and morphology of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 1198- 1203.
- Evrendilek, G.A., Balasubramaniam V.M. (2011). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. *Food Control*, 22, 1435-1441.
- Fajardo, P., Martins, J.T., Fucinos, C., Pastrana, L., Teixeira, J.A. , Vicente A.A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*, 101, 349-356.
- Farber, J.M., Carter, A.O., Varughese, P.V., Ashton, F.E. and Ewan, E.P. (1990) Listeriosis traced to the consumption of alfalfa tablets and soft *cheese*. *New England Journal of Medicine*, 10, 322-338.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes* a food- borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.
- Fernandes, A.M., Oliveira, C.A.F., Lima, C.G. (2007). Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, 111-115.
- Fernandes, J.C., Tavarina, F.K., Soares, J.C., Ramos, O.S., Monteiro, M.J., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2008). Antimicrobial effects of chitosan and chitooligosaccharide, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology*, 25, 922-928.

- Fernandes J.C., Eaton P., Gomes A.M., Pintado M.E., Malcata F.X. (2009). Study of the antibacterial effects of chitosans on *Bacillus cereus* (and its spores) by atomic force microscopy imaging and nanoindentation. *Ultramicroscopy*, 109, 854-860.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J. A., & Kuri, V. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371 —380.
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J.M., Ocio, M.J. (2009). Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in the food area. *Food Hydrocolloids*, 23, 913-921.
- Fernandez-Saiz, P., Soler, C., Lagaron, J.M., Ocio, M.J. (2010). Effects of chitosan films on the growth of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* in laboratory media and in fish soup. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 287-294.
- Ferron, P., Michard, J. (1993). Distribution of *Listeria spp.* in confectioners' pastries from western France: comparison of enrichment methods. *International Journal of Food Microbiology*, 18, 289-303.
- Fields, M.L., Hamad, A.M., Smith, D.K. (1981) Natural lactic acid fermentation of corn meal. *Journal of Food Science*, 46, 900-902.
- Finol, M.L., Marth, E.H., Lindsay, R.C. (1982). Depletion of sorbate from different media during growth of *Penicillium* species. *Journal of Food Protection*, 45,398-404.
- Fisher, M.H., Aitken, T.R., Anderson, J.A. (1949). Effects of mixing, salt and consistency on extensograms, *Cereal Chemistry*, 26, 81-97.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232—1240.
- Fisher, K., Phillips C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 156—164.
- Fleet, G.H. (1990). Yeasts in dairy products; a review. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 199-211.
- Fleet, G.H. (1992). Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 1-44.

- Folkenberg, D.M., Dejmek, P., Skriver, A., Guldager, H.S., Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal*, 16, 111-118.
- Francis G.A., Thomas C., O' Beirne D. (1999). The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 1-22.
- Fricker, M., Messelhauber, U., Busch, U., Scherer, S., Ehling-Schulz M. (2007). Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1892-1898.
- FSAI (Food Safety Authority of Ireland), 2007. Resources and publications/factsheets. ([http://www.fsai.ie/resources\\_and\\_publications/factsheets.html](http://www.fsai.ie/resources_and_publications/factsheets.html)).
- Fu, B. X. (2008). Asian noodles: History, classification, raw materials, and processing. *Food Research International*, 41, 888-902.
- Galvin, S., Boyle, M., Russell, R.J., Coleman, D.C., E. Creamer, E., O'Gara, J.P., Fitzgerald-Hughes, D., Humphreys, H. (2012). Evaluation of vaporized hydrogen peroxide, Citrox and pH neutral Ecasol for decontamination of an enclosed area: a pilot study. *Journal of Hospital Infection*, 80, 67- 70.
- Garcia de Fernando, G.D., Nychas, G.J.E., Peck, M.W., Ordonez, J.A. (1995). Growth/survival of psychrotrophic pathogens under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 221-2231.
- Gavini, F., Leclerc, H., Mossel, D.A.A. (1985). Enterobacteriaceae of the "Coliform Group" in Drinking Water: Identification and Worldwide Distribution. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 312-318.
- Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D., Farver, T. B. (1991). Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4°C to 30°C. *Journal of Food Protection*, 54, 662-668.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S. A. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Science*, 76, 172-181.

- Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. (2007). Effect of rosemary extract, chitosan and a-tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. *Meat Science*, 75, 256-264.
- Giatrakou, V., Ntzimani, A., Savvaidis, I.N. (2010). Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. *Food Microbiology*, 27, 132-136.
- Gibson, A.M., Hocking, A.D. (1997). Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 353-358.
- Gilbert, R.G., De Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C.D., Richards, J., Roberts, D., Bolton F.J. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health*, 3, 163-7.
- Gill, C.O., Harison, J.C.L., Penney, N. (1990). The storage life of chicken carcasses packaged under CO<sub>2</sub>. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 151-158.
- Gill C.O., DeLacy K.M. (1991). Growth of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* on high-pH beef packed under vacuum or carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 21-30.
- Gill, C.O., Badoni, M. (2004). Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 43-50.
- Gillespie, I. A., Adak, G. K., O'Brien, S. J., Bolton, F. J. (2003). Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992-2000. *Epidemiology and Infection*, 130, 461-468.
- Glass, K.A., Doyle, M.P. (1991). Fate of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in commercial, reduced-calorie mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 54, 691-695.
- Gobbetti, M., Lowney, S., Smacchi, E., Battistotti, B., Damiani, P., Fox, P.F. (1997). Microbiology and biochemistry of taleggio cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7, 509-517.
- Gohil, V.S., Ahmed, M.A., Davies, R., Robinson R.K. (1995). The direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in a food with a low background microflora. *Food Control*, 6, 365-369.

- Gombas, D.E., Chen, Y., Clavero, R.S., Scott, V.N., 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection*, 66, 559-569.
- Gomes, C., Castell-Perez, M.E., Chimbombi, E., Karagoz, I., Hare, B., Liang, Y.L., Sue, H.J., Sherman, P., Dunne, P., Wright, A.O. (2012). Quality of olive oil reformulated MRE entree packaged in oxygen-absorbing film. *LWT - Food Science and Technology*, 45, 191-197/
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18, 716-722/
- Goulet, V., Rebiere, I., Mamet, J.P., Miegerville, A.F. and Courtieu, A.L. (1991). Surveillance de la listeriose humaine en France de 1987 a 1989 a partir d'un reseau de laboratoires. In: A. Amgar (Ed.) *Proceedings of the International Conference: Listeria and Food Safety*, 13-14 June 1991, Laval, France, A.S.E.P.T., 31-37.
- Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., Nychas, G.J. (2007). Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami. *Journal of Food Protection*, 70, 2313-2320.
- Govaris A., Solomakos N., Pexara A., Chatzopoulou P.S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin, and their combinations against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 175-180.
- Goy, R.C., De Britto, D., Assis, O.B.G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros: Ciencia e Tecnología*, 19, 241-247.
- Granum, P. E., Baird-Parker, T. C. (2000). *Bacillus species*. In B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, G. W. Gould (Eds.). *The Microbiological safety and quality of Food* (Vol. II, pp. 1029-1039). Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers.
- Grattan, D., Gilberg, M. (1994). Ageless oxygen absorber: chemical and physical properties. *Studies in Conservation*, 39, 210—214.

- Greenwood, M.H., Roberts, D., Burden, P. (1991). The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 197-206.
- Guentert, M.S., Linton, R.H., Luchansky, J.B., Cousin, M.A. (2005). Behavior of *Listeria monocytogenes* in pH-modified chicken salad during refrigerated storage. *Journal of Environmental Health*, 68, 31-37.
- Guerzoni, M.E., Sinigaglia, M., Gardini, F., Lanciotti, R. (1994). Microbiological aspects of processed pasta products. In: *Pasta Based Meals: Qualitative, Nutritional and Technological Aspects*. AITA-ASTER, Italy, 115-128.
- Guraya, R., Frank, J. F., Hassan, A. N. (1998). Effectiveness of salt, pH, and diacetyl as inhibitors for *Escherichia coli* O157:H7 in dairy foods stored at refrigeration temperatures. *Journal of Food Protection*, 61, 1098-1102.
- Gutierrez, L., Sanchez, C., Batlle, R., Nerin, C. (2009). New antimicrobial active package for bakery products. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 92-99.
- Guynot M.E., Ramos A.J., Sala D., Sanchis V., Marin S. (2002). Combined effects of weak acid preservatives, pH and water activity on growth of *Eurotium* species on a sponge cake. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 39—46.
- Guynot, M.E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S. (2005). Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5). *International Journal of Food Microbiology*, 101, 161-168.
- Hadji-Sfafi, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay-Laliberte, G., Barbier, G., Haertle, T., Chobert, J.M. (2011). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control*, 22, 2020-2027.
- Halm, M., Lillie, A., Sorensen, A.K., Jakobsen M. (1993). Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 135-143.
- Han, J.H. (2000). Antimicrobial Food packaging. *Food Technology*, 54, 91-97.
- Hanusova, K., Stastna, M., Votavova, L., Klaudisova, K., Dobias, J., Voldrich, M., Mecer, M. (2010). Polymer films releasing nisin and/ or natamycin from



- polyvinylidene chloride lacquer coating: Nisin and Natamycin migration, efficiency in cheese packaging. *Journal of Food Engineering*, 99, 491-496.
- Hao, Y.Y., Brackett, R.E., Doyle, M.P. (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology*, 15, 367–378.
- Hassan, G.M., Al-Ashmawy, M.A.M., Meshref, A.M.S., Afify, S.I. (2010). Studies on enterotoxigenic *Bacillus cereus* in raw milk and some dairy products, *Journal of Food Safety*, 30, 569-583.
- Hawley L., Dunn D.J., Ruebush M. (2004). *Microbiology & Immunology*, Kaplan Medical Inc., USA.
- Helander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 235-244.
- Hesseltine, C. W., Graves, R. R., Rogers, R., Burmeister, H. R.(1969). Aerobic and Facultative Microflora of Fresh and Spoiled Refrigerated Dough Products. *Applied Microbiology*, 18, 848-853
- Hicks, S. J., Lund, B. M. (1991). The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 308-314.
- Higgins, J. P., Higgins, S. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Tellez, G., Hargis, B. M. (2007). Temporal Effects of Lactic Acid Bacteria Probiotic Culture on *Salmonella* in Neonatal Broilers. *Poultry Science*, 86, 1662-1666.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22, 273—292.
- Hondrodinou, O., Kourkoutas, Y., Panagou, E.Z. (2011). Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology*, 28, 621-627.
- Huang, J., Huang, C., Huang, Y., Chen, R. (2007). Shelf-life of fresh noodles as affected by chitosan and its Maillard reaction products. *LWT*, 40, 1287-1291.
- Hur, J., Jawale, C., Lee, J.H. (2012). Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review, *Food Research International*, 45, 819-830.

- Hwang, C.A. (2005). The effect of mayonnaise pH and storage temperature on the behavior of *Listeria monocytogenes* in ham salad and potato salad. *Journal of Food Protection*, 68, 1628-1634.
- Hwang, C.A., Tamplin, M.L. (2005). The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in seafood salad. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 277-285.
- Hwang C. A., Marmer B.S. (2007). Growth of *Listeria monocytogenes* in egg salad and pasta salad formulated with mayonnaise of various pH and stored at refrigerated and abuse temperatures, *Food Microbiology*, 24, 211-218.
- I.C.M.S.F. (1998). Milk and dairy products. In: *Microorganisms in Foods. Microbial ecology of food commodities*, Chapter 15, Blackie Academic and Professional, London, UK, pp 161-174
- Inatsu, Y., Bari, M.L., Kawasaki, S., Kawamoto, S. (2005). Effectiveness of some natural antimicrobial compounds in controlling pathogen or spoilage bacteria in lightly fermented Chinese cabbage. *Journal of Food Science*, 70, 393-397.
- Iurlina, M. O., Saiz, A. I., Fuselli, S. R. and Fritz, R. (2006). Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technology*, 39, 105-110.
- Jackson, V., Blair, I. S., McDowell, D. A., Kennedy, J., & Bolton, D. J. (2007). The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control*, 18, 346-351.
- Jakobsen, M., Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal*, 6, 755 -768.
- James, J., Simpson, B.K. (1996). Application of enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 437-463.
- Jasson, V., Baert, L., Uyttendaele, M. (2011). Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enteric* in chocolate. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 488-491.
- Jay, M. J. (1996). *Modern Food Microbiology*. 5th edition, Chapman and Hall. New York, USA, pp 113-162
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.) New York: Springer Science Business Media, Inc., pp 253 - 406

- Jayarao, B. M., Henning, D. R. (2001). Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 84, 2157-2162.
- Jayarao, B. M., Donaldson, S. C., Straley, B. A., Sawant, A. A., Hegde, N. V., Brown, J.L. (2006). A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 89, 2451-2458.
- Jensen, N., Hocking, A. D., Miskelly, D. (2004). Microbiological safety of high moisture noodles: Marketplace survey of noodles sold in Australia. *Food Science Australia*, 56, 71-78.
- Jespersen, L., Halm, M., Kpodo, K., Jakobsen, M. (1994). Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for 'kenkey' production. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 248-289.
- Ji, Y., Zhu, K., Qian, H., Zhou, H. (2007). Microbiological characteristics of cake prepared from rice flour and sticky rice flour. *Food Control*, 18, 1507-1511.
- Johansen, S.M.B., Laugesen, J.L., Janhoj, T., Ipsen, R.H., Frost M.B. (2008). Prediction of sensory properties of low-fat yoghurt and cream cheese from surface images. *Food Quality and Preference*, 19, 232-246.
- Juneja V.K., Marmer B.S. (1999). Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7 D- and z-value determinations in turkey, lamb and pork. *Food Research International*, 32, 23-28.
- Juneja V.K., Valenzuela Melendres M., Huang L., Gumudavelli V., Subbiah J., Thippareddi H. (2007). Modelling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiology*, 24, 328-335.
- Kaaki, D., Baghdadi, O.K., Najm, N.E., Olabi, A. (2012). Preference mapping of commercial Labneh (strained yogurt) products in the Lebanese market. *Journal of Dairy Science*, 95, 521-532.
- Kanatt, S.R., Chander, R., Sharma, A. (2008). Chitosan glucose complex – A novel food preservative. *Food Chemistry*, 106, 521-528.
- Karagui-Yuceer, Y., Wilson, J. C., White C. H. (2001). Formulations and Processing of Yogurt Affect the Microbial Quality of Carbonated Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 84, 543-550.

- Kasrazadeh, M., Genigeorgis, C. (1994). Potential growth and control of *Salmonella* in Hispanic type soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 22, 127-140.
- Katsiari, M.C., Kondyli, E., Voutsinas, L.P. (2009). The quality of Galotyri-type cheese made with different starter cultures. *Food Control*, 20, 113-118.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., K. Srinivasan, K. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using citrus sinensis peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79, 594-598.
- Keene, W.E., Sazie, E., Kok, J., Rice, D.H., Hancock, D.D., Balan, V.K., Zhao, T., Doyle, M.P. (1997). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. *Journal of the American Medical Association*, 277, 1229-1231.
- Kerch, G., Zicans, J., Meri, R.M. (2010). The effect of chitosan oligosaccharides on bread staling. *Journal of Cereal Science*, 52, 491-495.
- Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.C., Wingende, J. (2003). Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206, 563-573.
- Kim, J. W., Kim, Y. S., Kyung, K. H. (2004). Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *Journal of Food protection*, 67, 499-504.
- Kim, E.L., Choi, N.H., Bajpai, V.K., Kang, S.C. (2008). Synergistic effect of nisin and garlic shoot jouse against *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Chemistry*, 110, 375-382.
- Knarreborg, A., Miquel, N., Granli, T., Jensen, B.B. (2002). Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science Technology*, 99, 131-140.
- Koluman, A., Akan, L.S., Qakiroglu, F.P. (2009). Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*, 20, 281-283.
- Kondyli, E., Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P. (2008). Chemical and sensory characteristics of Galotyri-type cheese made using different procedures. *Food Control*, 19, 301-307.

- Kos, B.E., Ozkan, M. (2011). Utilization of Chitosan in Food Industry (Turkish with English Abstract). *GIDA*, 36, 161-168 (<http://www.gidadernegi.org/EN/Genel/BelgeGoster.aspx?17A16AE30572D3137A2395174CFB32E1A460CD2CF61B18D3>)
- Kotsianis, I.S., Giannou, V., Tzia, C. (2002). Production and packaging of bakery products using MAP technology. *Food Science and Technology*, 13, 319-324.
- Kotzekidou, P., Giannakidis, P., & Boulamatsis, A. (2007). Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food-borne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT — Food Science and Technology*, 41, 119—127.
- Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K., Nychas, G.J.E. (1999). A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 63-74.
- Kubheka, L. C., Mosupye, F. M., von Holy, A. (2001). Microbiological survey of street-vended salad and gravy in Johannesburg city, South Africa. *Food Control*, 12, 127-131.
- Kuehn, H.H. και Millard F. Gunderson, M.F. (1962). Psychrophilic and Mesophilic Fungi in Fruit-Filled Pastries. *Applied and Environmental Microbiology*, 10, 354-358.
- Kumar, M., Berwal, J.S. (1998). Sensitivity of food pathogen to garlic (*Allium sativum*). *Journal of Applied Microbiology* 84, 213-215.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, - 285 --63.
- Kure, F.C., Skaar, I., Brendehaug, J. (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 41-49.
- Kykkidou, S., Pournis, N., Kostoula, O.K., Savvaidis I.N. (2007). Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4 °C. *International Dairy Journal*, 17, 1254-1258.

- Kywano, K., Tanaka, N., Shimizu, T., Nagatoshi, K., Nou, S., Sonomoto, K. (2005). Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 396-402.
- Lahmer, R.A., Williams, A.P., Townsend, S., Baker, S., Jones, D.L. (2012). Antibacterial action of chitosan-arginine against *Escherichia coli* O157 in chicken juice. *Food Control*, 26, 206-211.
- Latou E., Mexis S.F., Badeka A.V., Kontominas M.G. (2010). Shelf life extension of sliced wheat bread using either an ethanol emitter or an ethanol emitter combined with an oxygen absorber as alternatives to chemical preservatives. *Journal of Cereal Science*, 52, 457-465.
- Lee, Y.S., Rhee, C.O. (1999). Change of free sugars, lipoxygenase activity and effects of chitosan treatment during cultivation of soybean sprouts. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 31, 115-121.
- Lee, J.W., Lee, H.H., Rhim, J.M. (2000). Shelf life extension of white rice cake and wet noodle by the treatment with chitosan. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 32, 828-833.
- Lee, K.S., No, H.K., Meyers, S.P. (2001). Effect of chitosan as a coagulant on shelf-life of tofu prepared in commercial-scale. *Food Science and Biotechnology*, 10, 529-533.
- Lee, M.H., No, H.K. (2001). Effect of chitosan on shelf-life and quality of buckwheat starch jelly. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 30, 865-869.
- Lee, H.Y., Kim, S.M., Kim, J.Y., Youn, S.K., Choi, J.S., Park, S.M., Ahn, D.H. (2002). Effect of addition of chitosan on improvement for shelf life of bread. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31, 445-450.
- Lee, M.H., No, H.K. (2002). Effect of chitosan on shelf life and quality of wet noodle. *J. Chitin Chitosan*, 7, 14-17.
- Lee, M.J., Park, S.Y., Ha, S.D. (2007). Reduction of coliforms in rice treated with sanitizers and disinfectants. *Food Control*, 18, 1093-1097.
- Legan, J.D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 32, 33-53.
- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. *Applied Technology*, 25, 151-158.

- Lekkas, C., Kakouri, A., Paleologos, E., Voutsinas, L.P., Kontominas, M.G., Samelis J. (2006). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. *Food Microbiology*, 23, 268-276.
- Leleu, S., Herman, L., Heyndrickx, M., De Reu, K., Michiels, C.W., De Baerdemaeker, J., Messens, W. (2011). Effects on *Salmonella* shell contamination and trans-shell penetration of coating hens' eggs with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 43-48.
- Lammerding, A.M., Doyle, M.P. (1989) Evaluation of enrichment procedures for recovering *Listeria monocytogenes* from dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 9, 249-268.
- Leuschner R.G.K., Zamparini J. (2002). Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. *Food Control*, 13, 399-404.
- Levantesi, C., Bonadonna, L., Briancesco, R., Grohmann, E., Toze, S., Tandoi, V. (2012). *Salmonella* in surface and drinking water: Occurrence and water-mediated transmission. *Food Research International*, 45, 587-602.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W., Abadias, M., Kurtzman, C.P., Camp, M.C. (2006). Biocontrol of the Food-Borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Poona on Fresh-Cut Apples with Naturally occurring Bacterial and Yeast Antagonists. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1135-1140.
- Li, M., Zhu, K., Guo, X., Peng, W., Zhou, H. (2011). Effect of water activity ( $a_w$ ) and irradiation on the shelf-life of fresh noodles. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 12, 526-530.
- Li, M., Luo, L.J., Zhu, K.X., Guo, X.N., Peng, W., Zhou, H.M. (2012). Effect of vacuum mixing on the quality characteristics of fresh noodles. *Journal of Food Engineering*, 110, 525-530.
- Li, X.F., Feng, X.Q., Yang, S., Fu, G.Q., Wang, T.P., Su, Z.X. (2010). Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers*, 79, 493-499.

- Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N., Foster, J.W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 3094-3100.
- Lin, K.W., Chao, J.Y. (2001). Quality characteristics of reduced-fat Chinese-style sausage as related to chitosan's molecular weight. *Meat Science*, 59, 343-351.
- Liu, S.Q., Tsao, M. (2009a). Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control*, 20, 852-855.
- Liu S.Q., Tsao M. (2009b). Enhancement of survival of probiotic and non-probiotic lactic acid bacteria by yeasts in fermented milk under non-refrigerated conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 34-38.
- Liu, X.D., Jang, A., Kim, D.H., Lee, B.D., Lee, M., Jo, C. (2009). Effect of combination of chitosan coating and irradiation on physicochemical and functional properties of chicken egg during room-temperature storage. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 589-591.
- Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li Z., Yao, K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79, 1324-1335.
- Loncarevic, S., Danielsson-Tham, M. L., Tham, W. (1995). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 245-250.
- López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Pérez-Mateos, M., Montero, P. (2005). A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloids*, 19, 303-311.
- Losso, J.N., Nakai, S., Charter, E.A. (2000). Lysozyme in Natural Food Antimicrobial Systems. Naidu, A.S. (ed.), CRC Press LLC, Florida, 185-210.
- Lund B.M., Baird-Parker C., Gould G.W. (2000). The microbial safety and quality of food. Aspen publishers Inc, USA. pp 175-199, 252-268, 535-589, 1029-1037, 1136-1300
- Lungu, B., Ricke, S.C., Johnson, M.G. (2009). Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe. Food Microbiology*, 15, 7-17.



- Mahakarnchanakul, W., Beuchat, L.R. (1999). Influence of temperature shifts on survival, growth, and toxin production by psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* in potatoes and chicken gravy. *International Journal of Food Microbiology*, 47, 179-187.
- Mann, D.A., Beuchat, L.R. (2008). Combinations of antimycotics to inhibit the growth of molds capable of producing 1,3-pentadiene. *Food Microbiology*, 25, 144-153.
- Mante, E.S., Sakyi-Dawson, E., Amoa-Awua, W.K. (2003). Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 41-50.
- Maragkoudakis, P.A., Miaris, C., Rojez, P., Manalis, N., Magkanari, F., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou E. (2006). Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. *International Dairy Journal*, 16, 52-60.
- Marin, S., Vinaixa, M., Brezmes, J., Llobet, E., Vilanova, X., Correig, X., Ramos, A.J., Sanchis, V. (2007). Use of a MS-electronic nose for prediction of early fungal spoilage of bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 10 - 16.
- Marques, A., Encarnacao, S., Pedro, S., Nunes, M.L. (2008). In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2357-2360.
- Marth, E.M., Capp, C.M., Hasenzahl, L., Jackson, H.W., Hussong, R.V. (1996). Degradation of potassium sorbate by *Penicillium* species. *Journal of Dairy Science*, 49, 1197-1205.
- Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V., De Pace, R. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 °C. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 347-350.
- Mataragas, M., Dimitriou, V., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H. (2011). Quantifying the spoilage and shelf-life of yoghurt with fruits. *Food Microbiology*, 28, 611-616.
- Mathur, N.K., Narang, C.K (1990). Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, 67, 938-942.

- McDonnell, R.J., Rampling, A., Crook, S., Cockcroft, P.M., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Stuart, J. (1997). An outbreak of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection associated with takeaway sandwiches. *CDR Wkly*, 7, 201-205.
- McIntyre, L., Bernard, K., Beniac, D., Isaac-Renton, J.L., Naseby D.C. (2008). Identification of *Bacillus cereus* Group Species Associated with Food Poisoning Outbreaks in British Columbia, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7451-7453.
- McLauchlin, J., Greenwood, M. H., Pini, P. N. (1990). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from manufacturer associated with a case of listeriosis. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 255-262.
- McLauchlin, J. (1991). The epidemiology of listeriosis in Britain. In: A. Amgar (Ed.) *Proceeding of the International Conference: Listeria and Food Safety*. 13-14 June 1991, Laval, A.S.E.P.T., France, pp. 38-47.
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92,15—33.
- McNamee, C., Noci, F., Cronin, D.A., Lyng, J.G., Morgan, D.J., Scannell A.G.M. (2010). PEF based hurdle strategy to control *Pch*ia fermentants, *Listeria innocua* and *Escherichia coli* k12 in orange juice. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 13-18.
- Mecitoglu, H., Yemenicioglu, A., Arslanoglu, A., Elmaci, Z.S., Korel, F., Cetin, A.E. (2006). Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International*, 39, 12-21.
- Medina, A., Jimenez, M., Mateo, R., Magan, N. (2007). Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2234—2239.
- Mejlholm O., Dalgaard P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 27-31 .
- Meldrum, R.J., Little, C.L., Sagoo, S., Mithani, V., McLauchlin, J., Pinna, E. and the Food, Water and Environmental Surveillance Network (2009). Quality of Salad

- Vegetables and Sauces from Kebab Takeaway Restaurants. <http://www.natwestmentor.co.uk/news/articles/2009-04/kebabsaladandsaucequality.aspx>; [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/1236155255969](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1236155255969).
- Malek, R., El-Attar, A., Mohamed, M., Anwar, S., El-Soda, M., Beal, C. (2012). Technological and safety properties display biodiversity among enterococci isolated from two Egyptian cheeses, "Ras" and "Domiat". *International Journal of Food Microbiology*, 153, 314-322.
- Mellegard, H., From, C., Christensen, B.E., Granum, P.E. (2011). Inhibition of *Bacillus cereus* spore outgrowth and multiplication by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 218-225.
- Meng, J., Doyle, M.P. (1998). Emerging and evolving foodborne pathogens. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 96, 151-164.
- Mermin, J., Hilborn, E., Voetsch, A., Swartz, M., Laambert-Fair, M.A., Farrar, J., Vugia, D., Hadler, J., Slutsker, L. (1997). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating mesclun mix lettuce, abstr V74/I in VTEC '97 3rd International Symposium and Workshop on Shiga toxin (Vero cytotoxin)-producing *E. coli* infections. Baltimore, MD, USA.
- Marques A., Encarnacao S., Pedro S., Nunes M.L. (2008). In vitro antimicrobial activity of garlic, oregano and chitosan against *Salmonella enterica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 2357-2360.
- Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Riviere, J., Cerf, O. (2003). Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 1-15.
- Mexis, S.F., Chouliara, E., Kontominas, M.G. (2009a). Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4° C. *Food Microbiology*, 26, 598-605.
- Mexis, S.F., Chouliara, E., Kontominas, M.G. (2009b). Combined effect of an O<sub>2</sub> absorber and oregano essential oil on shelf- life extension of Greek cod roe paste (tarama salad) stored at 4° C. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 572-579.

- Mexis, S.F., Chouliara, E., Kontominas, M.G. (2012). Shelf life extension of ground chicken meat using an oxygen absorber and a citrus extract. *LWT - Food Science and Technology*, 49, 21-27.
- Michard, J., Jardy, N., Audiger, M.T. and Gey. J.L. (1986). Coliformes et coliformes fecaux dans les patisseries. *Microbiologie Aliment Nutrition*, 4, 205-216.
- Miller, L.G., Kaspar, C.W. (1994). *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection* 57, 460-464.
- Minervini, F., Montagna, M.T., Spilotros, G., Monaci, L., Santa-croce, M.P., Visconti, A. (2001). Survey on mycoflora of cow and buffalo dairy products from Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 141-146.
- Mohamed, M.A.N., Ranjard, L., Catroux, C., Catroux, G., Hartmann, A. (2005). Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 31-40.
- Montville, R., Chen, Y. H., & Schaffner, D. W. (2001). Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *Journal of Food Protection*, 64, 845-849.
- Moon, C.S., Kim, B.S., Park, K.S., Hur, J.W., 1997. Preservatives effects of chitosan on acorn starch gels. *Food Engineering Program*, 1, 91-97.
- Moosavy, M.H., Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A.E., Alipour, M., Razavi, N.E., Gandomi, H., Noori, N. (2008). Effect of Zatzria multiflora Boiss, essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membrans. *Food Research International*, 41, 1050-1057.
- Moreira, M. R., Ponce, A. G., del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT — Food Science and Technology*, 38, 565—570.
- Moreira, M.R., Roura, S.I., Ponce, A. (2011). Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2335–2341.
- Morente, E.O., Abriouel, H., Lopez, R.L., Omar, N.B., Galvez, A. (2010). Antibacterial activity of carvacrol and 2-nitro-1-propanol against single and mixed populations

- of foodborne pathogenic bacteria in corn flour dough. *Food Microbiology*, 27, 274-279.
- Morgan, D., Newman, C.P., Hutchinson, D.N., Walker, A.M., Rowe, B., Majid, F. (1993). Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yoghurt. *Epidemiology and Infection*, 111, 181-187.
- Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M.P., Perrin, G. (2001). Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 217-221.
- Mosupye, F., von Holy, A. (2000). Microbiological hazard identification and exposure assessment of street food vending in Johannesburg, South Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 137-145.
- Mufandaedza, J., Viljoen, B.C., Feresu, S.B., Gadaga, T.H. (2006). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 147-152.
- Mullan, M. and McDowell, D. (2003). Modified atmosphere packaging in food packaging technology, Blackwell Pyb., London, pp 303-339
- Nadarajah, D., Han, J.H., Holley, R.A. (2005). Use of mustard flour to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 257-267.
- Najgebauer-Lejko, D., Sady, M., Grega, T., Walczycka M. (2011). The impact of tea supplementation on microflora, pH and antioxidant capacity of yoghurt. *International Dairy Journal*, 21, 568-574.
- Nakamura, H., & Hoshino, J. (1983). Techniques for the preservation of food and employment of an oxygen absorber. In *Technical information* (pp. 1—45). Tokyo: Mitsubishi Gas Chemical Co., Ageless Division.
- Nauta, M. J., Litman, S., Bahker, G. C., & Carlin, F. (2003). A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 205-218.
- Nitisinprasert, S., Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K., Sonomoto, K. (2000). Screening and Identification of Effective Thermotolerant Lactic Acid Bacteria

- Producing Antimicrobial Activity Against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. Resistant to Antibiotics. *Kasetsart Journal (Natural Sciences)*, 34, 387-400.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., Xu, Z. (2007). Application of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science*, 72,100-187.
- No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Hwang H.J., Meyers S.P. (2002). Antibacterial Activities of Chitosans and Chitosan Oligomers with Different Molecular Weights on Spoilage Bacteria Isolated from Tofu. *Journal of Food Science*, 67, 1511-1514.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Alonso, L., Reyes-Gavilan, C.G. (2003). Inhibition of *Bacillus cereus* growth in carbonated fermented bifidus milk. *Food Microbiology*, 20, 519-526.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., Giffel, M. T., & Weem, P. P. (1997). A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiology*, 14, 143-151.
- Nyatoti,V.N., Mtero, S.S., Rukure, G. (1997). Pathogenic *Escherichia coli* in traditional African weaning foods. *Food Control*, 8, 51-54.
- Ogwaro, B.A., Gibson, H., Whitehead, M., Hill D.J. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 105-112.
- Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., Igimi, S. (2004). Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 131-140.
- Oliveira M., Usall J., Solsona C., Alegre I., Vinas I., Abadias M. (2010). Effects of packaging type and storage temperature on the growth of foodborne pathogens on shredded 'Romaine' lettuce. *Food Microbiology*, 27, 375 – 380.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2, 115-129.
- Olsvik, O., Wasteson, Y., Lund, A., Homes, E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *International Journal of Food Microbiology*, 12 , 103-114.

- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., Holley R.A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139–148.
- Oyeleke, S. B. (2009). Microbial assessment of some commercially prepared yoghurt retailed in Minna, Niger State. *African Journal of Microbiology Research*, 3, 245-248.
- Papazoglou, S., Tsiraki, M., Savvaidis, I.N. (2012). Effect of thyme oil on the preservation of Vacuum- Packaged chicken liver, *Journal of Food Science*, 77, 473-480.
- Parish, E. P., Baum, D., Kryger, R., Goodrich, R., Baum, R. (2003). Fate of *Salmonellae* in citrus oils and aqueous aroma. *Journal of Food Protection*, 66, 1704—1707.
- Park, S.I., Daeschel, M.A., Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme- chitosan composite films. *Journal of Food Science*, 69, 215- 221.
- Park, S., Stan, S., Daeschel, M., Zhao, Y. (2005). Antifungal coatings on fresh strawberries to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science*, 74, 202–207.
- Penney, V., Henderson, G., Blum, C., Johnson-Green P. (2004). The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 369-375.
- Peressini, D., Peighambardoust, S.H., Hamer, R.J., Sensidoni, A. van der Goot, A.J. (2008). Effect of shear rate on microstructure and rheological properties of sheared wheat doughs. *Journal of Cereal Science*, 48, 426—438.
- Peterkin, P.I., Conley, D., Foster, R., Lachapelle, G., Milling, M., Purvis, U., Sharpe, A.N., Malcolm, S. (1989). A comparative study of total coliform recovery from foods by most probable number and hydrophobic grid membrane filter methods. *Food Microbiology*, 6, 79-84.
- Phillips, C.A., Laird, K., Allen S.C. (2012). The use of Citri-V™® — An antimicrobial citrus essential oil vapour for the control of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Alternaria alternata* in vitro and on food. *Food Research International*, 47, 310-314.

- Piccinin, D. M., Shelef, L. A. (1995). Survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Journal of Food Protection*, 58, 128-131.
- Pintado, M. E., Macedo, A. C., Malcata, F. X. (2001). Review: Technology, Chemistry and Microbiology of whey cheeses. *Food Science and Technology International*, 7, 105-116.
- Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S., Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21, 240-246.
- Pirkul, T., Temiz, A., Erdem Y.K. (1997). Fortification of Yoghurt with Calcium Salts and its Effect on Starter Microorganisms and Yoghurt Quality. *International Dairy Journal*, 7, 547-552.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. *Fungi and Fungi Spoilage*. Academic Press, London.
- Ponce A.G., Roura S.I., del Valle C.E., Moreira M.R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 294-300.
- Pranoto, Y., Salokhe, V. M., & Rakshit, S. K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 38, 267-272.
- Pugazhenti, T.R., Dhanalaksmi, B., Narasimhan, S.A., Madhan S. (1999). Effect of antimycotic agents on *Penicillium citrinum* in cheese. *Indian Veterinary Journal*, 76, 537-541.
- Quilez, J., Ruiz, J.A., Romero, M.P. (2006). Relation between sensory flavor evaluation and volatile and nonvolatile compounds in commercial wheat bread type baguette. *Journal of Food Science* 71, 423—427.
- Quintavalla, S., Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62, 373-380.
- Raccach, M., Baker, R.C., Regenstein, J.M. and Mulnix, E.J. (1979) Potential application of microbial antagonism to extended storage stability of a flesh type food. *Journal of Food Science*, 44, 43-46.
- Radford, S.A., Board, R.G. (1993). Review: Fate of pathogens in homemade mayonaisse and related products. *Food Microbiology*, 10, 269-273.



- Raeuuri, M., Genigeorgis, C. (1975). Effect of pH and Sodium Chloride on Growth of *Bacillus cereus* in Laboratory Media and Certain Foods. *Applied Microbiology*, 29, 68-73.
- Ragaert P., Devlieghere F., Debevere J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 185–194.
- Rasmaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M. W. (1997). Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheeses. *Journal of Dairy Science*, 81, 1810-1817.
- Raybaudi-Massilis, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Martin-Belloso, O. (2006). Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 69, 1579—1586.
- Razzaghi-Abyaneh M., Shams-Ghahfarokhi, M Rezaee, M.B., Jaimand, K., Alinezhad, S., Saberi, R., Yoshinari, T. (2009). Chemical composition and antiaflatoxic activity of *Carum carvi* L., *Thymus vulgaris* and *Citrus aurantifolia* essential oils. *Food Control*, 20, 1018-1024.
- Reed, B. A., Grivetti, L. E. (2000). Controlling on-farm inventories of bulk-tank raw milk: an opportunity to protect public health. *Journal of Dairy Science*, 83, 2988-2991.
- Reps, A., Jedrychowski, L., Tomasik, J., Wisniewska, K. (2002). Natamycin in ripening cheeses. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1, 243—247.
- Restuccia D., Spizzirri U.G., Parisi O.I., Cirillo G., Curcio M., Iemma F., Puoci F., Vinci G., Picci N. (2010). New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. *Food Control*, 21, 1425-1435.
- Ribeiro, S.H.S., Carminati, D. (1996). Survival of *Listeria monocytogenes* in fermented milk and yogurt: effect of pH, lysozyme content and storage at 4°C. *Dairy Science Abstracts*, 58, 612.
- Roberts, R.F., Zottola, E.A., McKay, L.L. (1992). Use of Nisin-Producing Starter Culture Suitable for Cheddar Manufacture. *Journal of Dairy Science*, 75, 2353-2363.
- Robertson, L.G. (1993). *Food Packaging: principles and practice*. Marcel Dekker, New York. pp 524-563

- Robinson, R.K. (2004). Fermented Milks/ Yoghurt. Encyclopedia of Food Microbiology. Elsevier Ltd, Academic Press, Washington, USA, pp. 784-791
- Rocha J.M., Malcata F.X. (2012). Microbiological profile of maize and rye flours, and sourdough used for the manufacture of traditional Portuguese bread. Food Microbiology, 31, 72-88.
- Rogga, K.J., Samelis, J., Kakouri, A., Katsiari, M.C., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2005). Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. International Dairy Journal, 15, 59-67.
- Rohani R.M.S., Moradi M., Mehdizadeh T., Saei-Dehkordi S.S., Mansel W. Griffiths W.M. (2011). The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Science and Technology, 44, 2260-2265.
- Roller S., Covill N. (2000). The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. Journal of Food Protection, 63, 212-209.
- Rosenkvist, H., Hansen, A. (1995). Contamination profiles and characterization of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. International Journal of Food Microbiology, 26, 353—363.
- Rosenquist, H., Hansen, A (1995). Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. International Journal of Food Microbiology, 26, 353—363.
- Rosenquist H., Smidt, L., Andersen, S.R., Jensen, G.B., Wilcks A. (2005). Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food . FEMS Microbiology Letters, 250, 129–136.
- Rudolf, M., Scherer, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. International Journal of Food Microbiology, 63, 91-98.
- Rukure,G. and Bester B.H. (2001). Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. Food Control, 12, 31-36.
- Rusul, G., Marth, E.H. (1988). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium at different pH values and with or without pimaricin. European Food Research and Technology, 187, 436—439.

- Rusul, G., Yaacob, N.H. (1995). Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA, *International Journal of Food Microbiology*, 25, - 299 --139.
- Rybka- Rodgers, S. (2001). Improvement of food safety design of cook- chill foods. *Food Research International*, 34, 449- 455.
- Ryser, E. T. (1999). Foodborne listeriosis. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis and food safety*. New York: Marcel Dekker.
- Ryu, S.H., Lee, J.H., Park, S.H., Song, M.O., Park, S.H., Jung, H.W., Park, G.Y., Choi, S.M., Kim, M.S., Chae, Y.Z., Park, S.G., Lee, Y.K. (2012). Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 263-266.
- Sabatini, N., Marsilio, V. (2008). Volatile compounds in table olives (*Olea europaea* L., Nocellara del Belice cultivar). *Food Chemistry*, 107, 1522—1528.
- Sagoo, S., Board, R., Roller, S. (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, 19, 175-182.
- Sallam K.I., Ishioroshi M., Samejima K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 849-855.
- Salvador, A., Fiszman, S.M. (2004). Textural and Sensory Characteristics of Whole and Skimmed Flavored Set-Type Yogurt During Long Storage. *Journal of Dairy Science*, 87, 4033-4041.
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., Devlieghere, F. (2011). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 34-41.
- Samar, M., Resnik, S.L., Gonzalez, H.H.L., Pacin, A.M., Castillo, M.D. (2007). Deoxynivalenol reduction during the frying process of turnover pie covers. *Food Control*, 18, 1295-1299.
- Samelis, J., Kakouri, A., Rogga, K. J., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2003). Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros a traditional Greek whey cheese stored at 4°C in vacuum packages. *Food Microbiology*, 20, 661-669.

- Scannell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W., Arendt, E.K. (2000). Development of bioactive food packaging materials using immobilizer bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 241-249.
- Schillinger, U., Becker, B., Vignolo, G., Holzapfel, W.H. (2001). Efficiency of nisin in combination with protective culture against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 159-168.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V. (1983). Epidemic listeriosis. Evidence of transmission by food. *New England Journal of Medicine*, 308, 203-206.
- Seideman, S.C. and Durand, P.R. (1983). Vacuum packaging of fresh beef: A review. *Journal of Food Quality*, 6, 29-47.
- Sekwati-Monang, B., Ganzle, M.G. (2011). Microbiological and chemical characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 115-121.
- Septin, D.R. (2008). Daya antimicroba berbagai konsentrasi yogurt terhadap bakteri *Salmonella typhi* secara in vitro. Universitas Muhammadiyah Malang, Department of Biology - student-research.umm.ac.id. <http://www.general-files.com/download/g509e7cd0h32i0/doc.pdf.html>.
- Settanni, L., Palazzolo, E., Guarrasi, V., Aleo, A., Mammina, C., Moschetti, G., Germana, M.A. (2012). Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, 26, 326-330.
- Seydim, A.C., Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39, 639-644.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M.A., Christiansson, A., Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*, 27, 347-355.
- Shahidi, F., Vidana-Arachchi, J.K., Leon Y.-J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 17-51.

- Shelef, L. A., Jyothi, E. K., & Bulgarelli, M. A. (1984). Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *Journal of Food Science*, 49, 737-740.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., et al. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 296—305.
- Silveira, M.F.A., Soares, N.F.F., Geraldine, R.M., Andrade, N.J., Botrel, D.A., Gongalves, M.P.J. (2007). Active film incorporated with sorbic acid on pastry dough conservation, *Food Control*, 18, 1063-1067.
- Sims, G.R., Glenister, D.A., Brocklehurst, T.F., Lund, B.M. (1989). Survival and growth of food poisoning bacteria following inoculation into cottage cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, 9, 173-195.
- Simsek, B., Sagdic, O., Sami Ozcelik, S. (2007). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage of Ayran produced with different spices. *Journal of Food Engineering*, 78, 676-680
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., Catalan, C. (2005). Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52. *Journal of Food Science*, 70, 208-215.
- Singh, G., Muthukumarappan, K. (2008). Influence of calcium fortification on sensory, physical and rheological characteristics of fruit yogurt, *LWT*, 41, 1145-1152.
- Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P.K., Dubey, N.K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1734-1740.
- Skalina L., Nikolajeva V. (2010). Growth potential of *Listeria monocytogenes* strains in mixed ready-to-eat salads. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 317-321.
- Skandamis N.P., Tsigarida E., Nychas G.-J.E. (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19, 97-103.

- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 118—122.
- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463–470.
- Smittle, R.B. (2000). Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the United States: a review. *Journal of Food Protection*, 63, 1144-1153.
- Simpson, B.K., Gagne, N., Ashie, I.N.A., Noroozi, E. (1997). Utilization of chitosan for preservation of raw shrimp (*Pandalus borealis*). *Food Biotechnology*, 11, 25–44.
- Soultos, N., Tzikas, Z., Abraham, A., Georgantelis, D., Amvrosiadis, I. (2008). Chitosan effects on quality properties of Greek-style fresh pork sausages. *Meat Science*, 80, 1150-1156.
- Srikumar, S., Fuchs, T.M. (2011). Ethanolamine Utilization Contributes to Proliferation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Food and in Nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 281-290.
- Stark, J. (2004). Preservatives/ Permitted preservatives- Natamycin. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1776-1781.
- Stecchini, M.L., Sarais, I., Bertoldi, M. (1991). The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 99-110.
- Subba, M. S., Southmithri, T. C., Suryanarayana, R. (1967). Antimicrobial action of citrus oils. *Journal of Food Science*, 32, 225—227.
- Suloff, E.C., Marcy, J.E., Hackney, C.R., Sumner, S.S., Bishop, J.R. (2003). Comparative study of a semisynthetic derivative of natamycin and the parent antibiotic on the spoilage of shredded cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, 66, 1499-1502.
- Suriyarachchi, V.R., Fleet, G.H. (1981). Occurrence and growth of yeasts in yogurts. *Applied Environmental Microbiology*, 42, 574—579.
- Szabo, E.A., Simous, L., Coventry, M.J., Cole, M.B. (2003). Assessment of control measures to achieve a Food Safety Objective of less than 100 cfu of *Listeria*

- monocytogenes* per gram at the point of consumption for fresh pre-cut iceberg lettuce. *Journal of Food Protection*, 66, 256-264.
- Szczawinska M.E., Thayer D.W., Phillips J.G. (1991). Fate of unirradiated *Salmonella* in irradiated mechanically deboned chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 313-324.
- Szczawinska, M.E., Szczawinski, J. (2011). Effect of storage temperature on survival rate of *Salmonella enteritidis* in yogurt. <http://agronomie.administrativ.ucv.ro/aamc/index.php/aamc/article/view/606>.
- Talon, R., Walter, D., Viallon, C., Berdague, J.L. (2002). Prediction of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* populations in yoghurt by Curie point pyrolysis-mass spectrometry, *Journal of Microbiological Methods*, 48, 271-279.
- Tamagnini, L.M., Sousa, G.B., Gonzalez, R.D., Revelli, J., Budde C.E. (2005). Behavior of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 129-134.
- Tamagnini, L.M., Sousa, G.B., Gonzalez, R.D., Budde C.E. (2008). Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: Influence of fluctuating storage temperature. *Small Ruminant Research*, 76, 177-182.
- Tan, H.z., Li, Z.G., Tan, B. (2009). Starch noodles: History, classification, materials, processing, structure, nutrition, quality evaluating and improving. *Food Research International*, 42, 551-576.
- Taskila, S., Tuomola, M., Ojamo, H. (2012). Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*, *Food Control*, 26, 369-377.
- Tassou, C., Drosinos, E. H., Nychas, G.-J. E. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593-600.
- Tassou, C.C., Samaras, F.J., Arkoudelos, J.S., Mallidis, C.G. (2009). Survival of acid-adapted or non-adapted *Salmonella Enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, in traditional Greek salads. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 279-287.
- Telloke, G.W. (1988). Understanding puff pastry: Part 3. *FMBRA Bulletin*. Chipping

Campden, UK.

- Telloke, G.W. (1988). Microstructure of puff paste and pastry of different qualities. (In German), Getreide Mehl Brot. UK.
- Telloke, G.W. (1991). Puff pastry I: Process and dough ingredient variables, FMBRA Report No. 144, January, CCFRA, Chipping Campden, UK.
- Telloke, G.W. (1991). Puff pastry II: fats, margarines and emulsifiers, FMBRA Report No.146, CCFRA, Chipping Campden, UK.
- Thomas, L.V., Delves-Broughton J. (2003). Natamycin. Danisco Innovation, Beaminster, Dorset, UK Copyright, Elsevier Science Ltd.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J., Wang, Y. (2011). In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens L.*) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 22, 1992-1999.
- Tim Cushnie, T. P., Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343—356.
- Tripathi, S., Mehrotra, G.K., Dutta, P.K. (2009). Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 372-376.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M. (2007). *Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review*. *Food Chemistry*, 104, 466- 479.
- Trovatelli L.D., Schiesser A., Massa S., Cesaroni D., Poda G.(1988). Microbiological quality of fresh pasta dumplings sold in Bologna and the surrounding district. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 19-24.
- Tsai, Y., Ingham, S.C. (1997). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. *Journal of Food Protection*, 60, 751-755.
- Tsai, G.J., Tsai, M.-T., lee, J.-M., Zhong, M.-Z. (2006). Effects of chitosan and a low-molecular-weight chitosan on *Bacillus cereus* and application in the preservation of cooked rice. *Journal of Food Protection*, 69, 2168-2175.
- Tsai, G.J., Su, W.H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 62, 239-243.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., & Nychas, G.-J.E. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum



- and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 901–909.
- Tsiligianni, M., Papavergou, E., Soultos, N., Magra, T., Savvaidis, I.N. (2012). Effect of chitosan treatments on quality parameters of fresh refrigerated swordfish (*Xiphias gladius*) steaks stored in air and under vacuum conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 101–106.
- Tsiraki, M., Savvaidis, I.N. (2013). Effect of packaging and basil essential oil on the quality characteristics of Whey Cheese ‘Anthotyros’. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 124-132.
- Tufail, M., Hussain, S., Malik, F., Mirza, T., Parveen, G., Shafaat, S., Wajid, A., Mahmood, R., Channa, R.A., Sadiq, A. (2011). Isolation and evaluation of antibacterial activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus* from yogurt. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 3842-3847.
- Uhtil S., Jaksic S., Petrak T., Medic H., Gumhalter-Karolyi L. (2004). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. *Food Control*, 15, 213-216.
- Uyttendaele, M., De Troy, P., Debevere, J., 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 75-80.
- Valerio, F., De Bellis, P., Di Biase, M., Lonigro, S.L., Giussani, B., Visconti<sup>a</sup>, A., Lavermicocca, P., Sisto A. (2012). Diversity of spore-forming bacteria and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* as a species frequently associated with the ropy spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology*, 156, 278-285.
- Valero, M., Fernández, P.S., Salmerón, M.C. (2003). Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 71–79.
- Valero, M., Herniandez-Herrero, L.A., Giner, M.J. (2007). Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Food Microbiology*, 24, 671-67.
- Van, T.T.H., Nguyen, H.N.K., Smooker, P.M., Coloe, P.J. (2012). The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-

- producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 98-106.
- Var, I., Erginkaya, Z., Guven M., Kabak, B. (2006). Effects of antifungal agent and packaging material on microflora of Kashar cheese during storage period. *Food Control*, 17, 132-136.
- Vasilopoulou, E., Trichopoulou, A. (2011). Green pies: The flavonoid rich Greek snack. *Food Chemistry*, 126, 855-858.
- Veit, P. (1984) *Aliment Service et hygiene alimentaire. Contribution a l'etude de la contamination microbienne des plats cuisines a l'avance. These Doctorat, Universite de Caen*, pp. 11-17.
- Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiarolo, F., Scolari, G. (1996). Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. *Journal of Applied Microbiology*, 81, 113-119.
- Viedma, P.M., Abriouel, H., Omar, N.B., Lopez, R.L., Galvez, A. (2011). Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control*, 22, 756-761.
- Viljoen, B.C., Lourens-Hattingh, A., Ikalafeng, B., Peter G. (2003). Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. *Food Research International*, 36, 193-197.
- Vinderola, C.G., Bailo, N., Reinheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.
- Vishu Kumar, A.B., Varadaraj, M.C., Gowda, L.G., Tharanathan, R.N. (2007). Low molecular weight chitosan-Preparation with the aid of pronase, characterization and their bactericidal activity towards *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 495-505.
- Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, Y., J. Fernandez-Lopez, J., J. Perez-Alvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19, 1130-1138.
- Vivar-Quintana, A.M., Beneitez De La Mano, E., Revilla, I. (2006). Relationship between somatic cell counts and the properties of yoghurt made from ewes' milk. *International Dairy Journal*, 16, 262-267.

- Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. (2010). Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control*, 21, 136-142.
- Voutsinas, L.P., Katsiari, M.C., Pappas, C.P., Mallatou H. (1996). Production of yoghurt from sheep's milk which had been concentrated by reverse osmosis and stored frozen. 2. Compositional, microbiological, sensory and physical characteristics of yoghurt. *Food Research International*, 29, 411-416.
- Voysey, P.A., J. Legan D. (1999). *Encyclopedia of Food Microbiology*, 474-480.
- Wang, G. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan, *Journal of Food Protection*, 55, 916-919.
- Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., Hu, Y. (2005). Chitosan-metal complexes as antimicrobial agents: Synthesis, characterization, and structure-activity studies. *Polymer Bulletin*, 55, 105-113.
- Weagant, S. D., Bryant, M. L., Park, D. H. (1994). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *Journal of Food Protection*, 57, 629-631.
- Whyte, R., Wong, T.L. (2004). Microbiological safety of meat/*Bacillus cereus*. ESR Ltd, Christchurch, New Zealand.
- Yang, T.C., Li, C.F., Chou, C.C. (2007). Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to water-soluble maltose chitosan derivative. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 258-262.
- Yang, Y., Tao, W.Y., Liu, Y.J., Zhu, F. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* by lactic acid bacteria starter cultures in rice fermentation. *Food Control*, 19, 159-161.
- Yazici, F., Akgun, A. (2004). Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural, and sensory properties of strained yoghurt. *Journal of Food Engineering*, 62, 245-254.
- Yesillik, S., Yildirim, N., Dikici, A., Yildiz, A., Yesillik, S. (2011). Antibacterial Effects of Some Fermented Commercial and Homemade Dairy Products and 0.9% Lactic Acid against Selected Foodborne Pathogens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 189-195.

- Yingyuad, B.S., Ruamsin, S., Reekprkhon, D., Douglas, S., Pongamphai, S., Siripatrawan, U. (2006). Effect of chitosan coating and vacuum packaging on the quality of refrigerated grilled pork. *Packaging Technology and Science*, 19, 149-157.
- Yokoigawa, N., Takikawa, A., Okubo, Y., Umesako S. (2003). Acid tolerance and *gad* mRNA levels of *Escherichia coli* O157:H7 grown in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 203-211.
- Zaika, L.L., Phillips, J.G. (2005). Model for the combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on survival of *Shigella flexneri* strain 5348 under aerobic conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 101, 179-187.
- Zhao, T., Doyle, M. P., Besser, R. E. (1993). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2526-2530.
- Zhao, T., Doyle, M.P., (1994). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 57, 780-783.
- Zhao, P., Zhao, T., Doyle, M. P., Rubino, J. R., & Meng, J. (1998). Development of a model for evaluation of microbial cross-contamination in the kitchen. *Journal of Food Protection*, 61, 960-963.
- Zivanovic S., Chi S., Draughon A.A.E. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70, 45-51.
- Zwietering, M.H., Wit, J.C., Notermans, S. (1996). Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 55-70.

---

### Βιβλιογραφία Ελληνική

---

- Ανυφαντάκης, Ε.Μ., (2004). Τυροκομία, Χημεία, Φυσικοχημεία, Μικροβιολογία. Εκδόσεις Σταμούλης, Πειραιάς, σελ. 186-220, 481-492, 535-570
- Αρβανιτογιάννης, Σ.Ι., Μποσνεα, Α.Α. (2001). Στοιχεία Τεχνολογίας, Μεταποίησης και Συσσκευασίας Τροφίμων. Εκδόσεις Universal Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 173-251.

- Βουδούρης, Ε.Κ., Κοντομηνάς, Μ.Γ. (2009). Εισαγωγή στην Χημεία Τροφίμων. Οργανισμός Εκδόσεων Διδακτικών Βιβλίων, Αθήνα, σελ. 219-236, 257-270
- Επίσημη εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης. (2008). Αρ. φύλλου L 253/17, 18.
- Ζερφυρίδης, Γ. Κ. (1998). Διατροφή του Ανθρώπου. Εκδόσεις Γιαχούδη-Παπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ. 187-226
- Ζερφυρίδης, Γ. Κ. (2001). Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος. Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη, σελ. 12-132, 318-319
- Καλλιντέρη, Λ. (2011). Διατριβή μεταπτυχιακής εκπαίδευσης: Μελέτη της επιμέρους ή /και της συνδυαστικής επίδρασης των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, νισίνης και ναταμυκίνης, στο χρόνο ζωής φρέσκου Γαλοτυριού, συντηρημένου στον αέρα και σε θερμοκρασία ψύξης (4°C). Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.
- Καλογρίδου-Βασιλειάδου, Δ. (1995). Παραδόσεις και Ασκήσεις στη Γενική Μικροβιολογία. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη, σελ. 52-80
- Κοντομηνάς, Μ., Ρηγανάκος, Κ. (2007). Συσκευασία Τροφίμων. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, σελ. 84-106
- Κοτζεκίδου-Ρουκά, Π. (1993). Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ. 23-97
- Κοτζεκίδου- Ρουκά, Π. (2000). Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Γιαχούδη, Θεσσαλονίκη, σελ. 15-40, 117-131, 223-258
- Λιτοπούλου- Τζανετάκη, Ε. (2003). Μικροβιολογία Γάλακτος. Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, , σελ. 11-185, 351-362
- Ματσούκας, Ν. (2003). Τεχνολογία Δημητριακών. Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, σελ. 1-256
- Μπλούκας, Ι.Γ. (2001). Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Εκδόσεις Γιαχούδη- Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη, σελ. 137-158, 291-307
- Μπλούκας, Ι.Γ. (2004). Συσκευασία Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 67-150, 275-310
- Μπλούκας, Ι.Γ. (2005). Ζυμώσεις. Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, σελ. 1-30
- Μπόσκος, Δ. (1997). Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, σελ. 49-267

- Ντόγρας, Κ. (2004). Καλλιέργεια Λαχανικών στο Θερμοκήπιο. Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, σελ. 72-88
- Ντόγρας, Κ. (2003). Ειδική Λαχανοκομία ΙΙ. Εκδόσεις Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη, σελ. 15-23
- Πολυχρονιάδου – Αληχανίδου, Α. (1996). Ανάλυση Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, σελ. 13-35, 171-180
- Πρακτικά Ημερίδας Ελληνικά Παραδοσιακά Τρόφιμα: Δυνατότητες αξιοποίησης και προοπτικές. (30/08/2007). Τεχνολογικό πάρκο Θεσσαλίας, Α ΒΙΠΕ, Βόλος .
- Τασιούλα, Μ., Κοντομηνάς, Μ. (2003). Ποιοτικός έλεγχος και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Ιωάννινα, σελ. 1-209

---

#### Πηγές από το Διαδίκτυο

---

<http://www.balkansec.com>

[www.danisco.com](http://www.danisco.com)

<http://www.cdc.gov>

<http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/Listeria-monocytogenes.pdf>

<http://www.cdc.gov>

[www.cfsan.fda.gov](http://www.cfsan.fda.gov)

[www.efet.gr](http://www.efet.gr)

[http://fsrio.nal.usda.gov/document\\_fsheets.php?product\\_id=223](http://fsrio.nal.usda.gov/document_fsheets.php?product_id=223)

<http://www.hvms.gr/el/journal/volume-history/issues2010/1110-bacillus-cereus-ena-simantiko-trofimogenes-pathogono.html?catid=135%3Avolume61-issue2>

<http://www.citrox.net>

<http://www.biokimkimya.com/content.asp?id=14&v=c&d=p&pid=1119&l=EN>

<http://www.polypan.gr/products.cfm?catID=102>

<http://www.vortechsys.com/citrox.php>

<http://www.citrox.org/references.htm>

<http://www.ciriscience.org>

<http://www.picsearch.com/pictures/science/bacteria%20h/listeria%20bacteria.html>)

[http://www.goldenmag.gr/archives/23264#.T61\\_RVLzpMQ](http://www.goldenmag.gr/archives/23264#.T61_RVLzpMQ)

<http://www.dietup.gr/antras/diatrofi/2598.html>

<http://www.prepac.gr>

[http://portokalis.blogspot.com/2008/07/blog-post\\_6479.html](http://portokalis.blogspot.com/2008/07/blog-post_6479.html)

<http://foodquality.wfp.org/FoodSafetyandHygiene/TestingCommodities/MicrobiologicalTests/tabid/316/Default.aspx?PageContentMode=1>

<http://www.livepedia.gr/index.php?title=%CE%91%CE%BB%CE%B5%CF%8D%CF%81%CE%B9>

<http://aroma-herbs.com/gr/objects/view/187>; <http://www.glikiazoi.gr>

[https://www.google.gr/search?q=%CE%B6%CF%85%CE%BC%CF%89%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%B9%CE%BF&espv=210&es\\_sm=93&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=PJBzUoWVC8fUtQb88YCQBw&ved=0CCwQsAQ&biw=1366&bih=667](https://www.google.gr/search?q=%CE%B6%CF%85%CE%BC%CF%89%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%B9%CE%BF&espv=210&es_sm=93&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=PJBzUoWVC8fUtQb88YCQBw&ved=0CCwQsAQ&biw=1366&bih=667)

[http://www.news-medical.net/health/Listeria-What-is-Listeria-\(Greek\).aspx](http://www.news-medical.net/health/Listeria-What-is-Listeria-(Greek).aspx)