



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

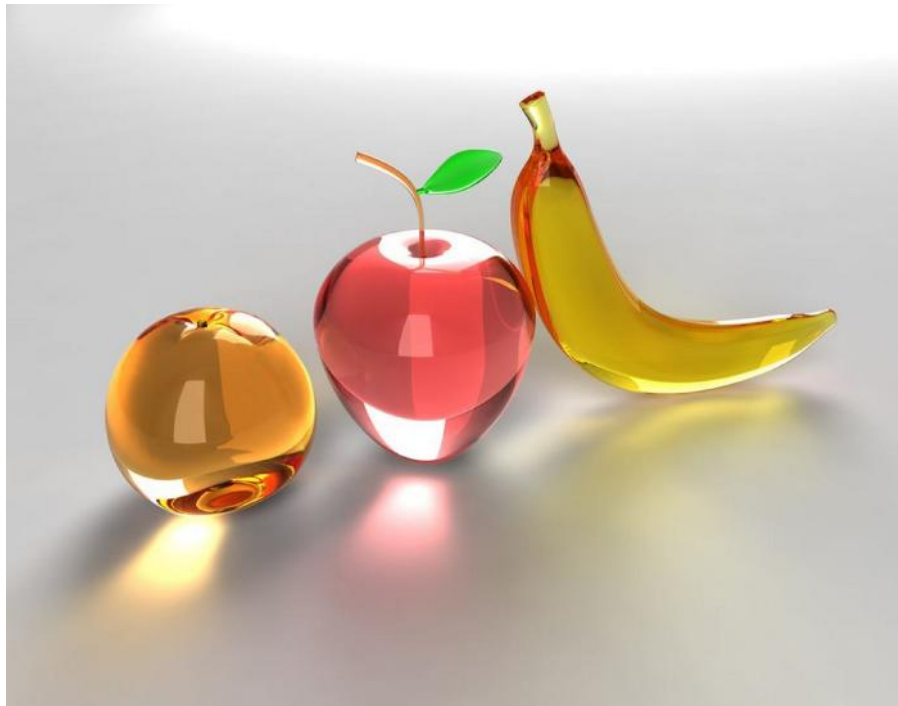
Π.Μ.Σ. ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

“ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ”

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Χρήση βιοδραστικών αιθερίων ελαίων για την ανάπτυξη καινοτόμων υλικών συσκευασίας τροφίμων»



ΓΡΗΓΟΡΑΚΗ ΙΩΑΝΝΑ

ΑΘΗΝΑ, 2012



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ. ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

“ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ”

ΚΛΑΔΟΣ ΠΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της

Γρηγοράκη Ιωάννας

**«Χρήση βιοδραστικών αιθερίων ελαίων για την ανάπτυξη καινοτόμων υλικών
συσκευασίας τροφίμων»**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Σέρκο Χαρουτουνιάν, Καθηγ. (επιβλέπων)

Παναγιώτης Σκανδάμης, Επίκ. Καθηγ.

Πέτρος Ταραντίλης, Επίκ. Καθηγ.

ΑΘΗΝΑ, 2012

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο: "Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία", Κλάδος ΙΙΙ: "Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων".

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον Καθηγητή Σέρκο Χαρουτουγιάν του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, επιβλέποντα αυτής της μελέτης, για την σημαντική συμβολή του ιδιαίτερα στη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή Παναγιώτη Σκανδάμη υπεύθυνο του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελεγχου Τροφίμων για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκτελέσω το πειραματικό κομμάτι της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο του οποίου προϊσταται, αλλά και την εν γένει βοήθεια και συνεισφορά επί σειρά ετών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ευαγγελία Ζιλελίδου διδάκτορα Γ.Π.Α, καθώς και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για την σημαντική συμβολή τους στην διενέργεια της παρούσας μελέτης.

Πίνακας περιεχομένων

<u>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</u>	3
<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>	6
<u>ABSTRACT</u>	8
1. <u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	11
1.1 Γενικά	11
1.2 Συντήρηση τροφίμων	12
1.3 Αντιμικροβιακά συστατικά φυτικής προέλευσης	14
1.4 Αιθέρια έλαια	15
1.4.1 Παραλαβή αιθερίων ελαίων απο φυτά	17
1.4.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων	19
1.4.3 Αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων	20
1.5 Αιθέριο έλαιο κανέλας	24
1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά του φυτού κανέλας (Cinnanomum)	24
1.5.2 Χημικά χαρακτηριστικά	26
1.5.3 Αντιβακτηριακή και μυκητοκτόνος δράση	28
1.6 Αιθέριο έλαιο μαστίχας	28
1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά του φυτού της μαστίχας	28
1.6.2 Το μαστιχόδενδρο	29
1.6.3 Προϊόντα της μαστίχας	30
1.6.4 Χημική σύσταση του μαστιχέλαιου	31
1.6.5 Αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας	33
1.7 Εδώδιμες επικαλύψεις στην συντήρηση φρούτων και λαχανικών	33
1.7.1 Ιστορικό	33
1.7.2 Σύσταση και ιδιότητες των εδώδιμων επικαλύψεων που χρησιμοποιούνται για επικάλυψη φρούτων και λαχανικών	34
1.7.2.1 Είδη εδώδιμων επικαλύψεων	34
1.7.2.2 Προβλήματα που προκύπτουν στην εφαρμογή των εδώδιμων επικαλύψεων	36
1.7.2.3 Επιδράσεις των εδώδιμων επικαλύψεων στην ποιότητα φρούτων και λαχανικών	36
1.7.2.4 Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φράγμα στην κίνηση αερίων-δημιουργία τροποποιημένης ατμόσφαιρας	36
1.7.2.5 Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φράγμα στην κίνηση υδρατμών-μείωση απώλειας υγρασίας	37
1.7.2.6 Επίδραση των εδώδιμων επικαλύψεων στην εκδήλωση φυσιολογικών ανωμαλιών	37
1.7.2.7 Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φράγμα στην είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών	38
1.7.2.8 Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φορείς ουσιών για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών στα νωπά φρούτα (φρούτα και λαχανικά)	38
1.7.2.9 Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φορείς πρόσθετων ουσιών βελτίωσης ποιότητας	38
1.8 Εδώδιμες επικαλύψεις απο εναλλακτικές πηγές (φυσικά συστατικά)	39
1.9 Παθογόνοι μικροοργανισμοί	43

1.9.1	Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i> O157:H7	43
1.9.1.1	Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία	43
1.9.1.2	Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του	45
1.9.1.3	Συσχετισμός με τα τρόφιμα	46
1.9.2	Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>	48
1.9.2.1	Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία	48
1.9.2.2	Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του	49
1.9.2.3	Συσχετισμός με τα τρόφιμα	50
1.10	Στόχοι της εργασίας	51
2.	<u>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	54
2.1	Αιθέρια έλαια και ποτά	54
2.2	Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας	54
2.3	Μεταχείριση δειγμάτων φρούτων	56
2.4	Παρασκευή εμβολίων	56
2.5	Εμβολιασμός δειγμάτων	57
2.6	Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών	57
2.7	Διαδικασία εμβάπτισης	58
2.8	Συσκευασία δειγμάτων	59
2.9	Καταμέτρηση μικροβιακού πληθυσμού	60
2.10	Προσδιορισμός pH	62
3.	<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	64
3.1	Σύσταση αιθερίων ελαίων	64
3.1.1	Αιθέριο έλαιο κανέλας	64
3.1.2	Αιθέριο έλαιο μαστίχας	65
3.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις	66
3.2.1	Μελέτη της επίδρασης των εδώδιμων επικαλύψεων στα φρούτα στην επιβίωση/ανάπτυξη της <i>Listeria monocytogenes</i>	67
3.2.1.1	Μήλο	67
3.2.1.2	Αχλάδι	67
3.2.1.3	Μπανάνα	70
3.2.2	Μελέτη της επίδρασης των εδώδιμων επικαλύψεων στα φρούτα στην επιβίωση/ανάπτυξη της <i>Escherichia coli</i> O157:H7	72
3.2.2.1	Μήλο	75
3.2.2.2	Αχλάδι	76
3.2.2.3	Μπανάνα	78
4.	<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u>	80
4.1	Γενικά	84
4.2	Τροποποιημένες ατμόσφαιρες	84
4.3	Εδώδιμες μεμβράνες	85
5.	<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	91

Περίληψη

Η κατανάλωση νωπών κομμένων φρούτων έχει συνδεθεί με την παρουσία κάποιων τροφιμογενών μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή φυσικών εναλλακτικών προτάσεων, για παράδειγμα τα αιθέρια έλαια και τα αλκοολούχα ποτά μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης των παθογόνων παραγόντων στα προϊόντα αυτά.

Οι εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις με αντιμικροβιακούς παράγοντες μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των φρεσκοκομμένων φρούτων. Η επίδραση του αιθέριου ελαίου κανέλας, μαστίχας, ο συνδυασμός αυτών των δύο, τα αντίστοιχα λικέρ τους και η αιθανόλη ενσωματώθηκαν σε εδώδιμες επικαλύψεις και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην διάρκεια ζωής τριών φρούτων (μήλο, αχλάδι, μπανάνα). Τα επικαλυμμένα φρούτα συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 20%CO₂-80%N₂ σε μεμβράνη πολυπροπυλενίου.

Σκοπός είναι να μετρηθούν αλλαγές στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα, μείωση των πληθυσμών δύο παθογόνων βακτηρίων *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* O157:H7 και μείωση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά την διάρκεια συντήρησης για 20 ημέρες στους 10 °C. Επίσης να μελετηθούν κάποια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως η εμφάνιση και η οσμή των φρούτων.

Πιο αναλυτικά, φρέσκα κομμένα μήλα, αχλάδια και μπανάνες είχαν εμβολιαστεί (10^3 - 10^4 CFU/g) με μίγμα τριών στελεχών *L. monocytogenes* και *E. coli*. Τα φρούτα επικαλύφθηκαν με το 1% w/v αλγινικό νάτριο (EC) με 0,7% (v/v) αιθέριο έλαιο κανέλας (ECC), 0,7% (v/v) αιθέριο έλαιο μαστίχας (ECM), 0,7% (v/v) ECC+M (1:1), λικέρ μαστίχα (2 EC: 1 λικέρ) (ECML), λικέρ κανέλα (2:1) (ECCL), και 25% αιθανόλης (2 EC: 1 αιθανόλη) (ECE) (και τα δύο λικέρ είχαν 25% (v/v) αλκοόλη). Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (80%N₂:20%CO₂) και αποθηκεύθηκαν στους 10 °C. Εγινε καταμέτρηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* και του *E. coli* καθώς και της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX) που πραγματοποιήθηκε σε PALCAM και TSAYE (θρεπτικά υποστρώματα) για την *L. monocytogenes* και την ολική μικροβιακή χλωρίδα και SMAC και TSA (θρεπτικά υποστρώματα) για τον *E. coli*. Μελετήθηκαν επίσης το pH των δειγμάτων, η σύνθεση των αερίων στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα και οργανοληπτικές ιδιότητες (οσμή, εμφάνιση) των φρούτων.

Αποτελέσματα:

Η μέγιστη ανάπτυξη πληθυσμού της *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε κατά την 13^η ημέρα

συνήρησης για το μάρτυρα (7,1 log CFU/g για τα μήλα και 8,5 CFU/g για τα αχλάδια και μπανάνες). Η ECM δεν είχε σημαντική ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού, ούτε στην OMX, η ECCL διατήρησε τα επίπεδα της *L.monocytogenes* στο μήλο 2,5 log CFU/g χαμηλότερα από το μάρτυρα 13^η ημέρα, ενώ τα δείγματα με ECC και ECE, παρέμειναν 2 log CFU/g χαμηλότερα από το μάρτυρα για τα αχλάδια. Οι ECC, ECML και ECE ήταν οι πιο αποτελεσματικές για τις μπανάνες προκαλώντας (και στις τρεις περιπτώσεις), μια αναστολή περίπου 1,5 log CFU/g σε σύγκριση με το μάρτυρα. Οι τιμές του pH αυξήθηκαν ελαφρώς στα περισσότερα δείγματα (περίπου έως 0,8 μονάδες) μέχρι την 13^η ημέρα. Δεν υπάρχουν σημαντικές αλλαγές στην σύσταση του O₂ ή CO₂.

Η μέγιστη ανάπτυξη πληθυσμού της *E.coli* O157:H7 παρατηρήθηκε κατά την 20^η ημέρα συνήρησης για το μάρτυρα (6,3 log CFU/g για τα μήλα και 5,8 CFU/g για τα αχλάδια και 4,6 log CFU/g για τις μπανάνες). Η ECM δεν είχε σημαντική ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού, είχε όμως στην OMX κατά 2 log CFU/g σε σχέση με το μάρτυρα, η ECC διατήρησε τα επίπεδα του *E.coli* O157:H7 στο μήλο 4 log CFU/g χαμηλότερα από το μάρτυρα 20^η ημέρα, και στην OMX, ενώ το δείγμα με ECC, παρέμειναν 4 log CFU/g χαμηλότερα από το μάρτυρα για τα αχλάδια. Οι ECC, ECM, ECC+M και ECE ήταν οι πιο αποτελεσματικές για τις μπανάνες προκαλώντας (και στις τέσσερις περιπτώσεις), μια αναστολή περίπου 3 log CFU/g σε σύγκριση με το μάρτυρα. Οι τιμές του pH αυξήθηκαν ελαφρώς στα περισσότερα δείγματα (περίπου έως 0,6 μονάδες) μέχρι την 20^η ημέρα. Δεν υπάρχουν σημαντικές αλλαγές στην σύσταση του O₂ ή CO₂.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συνδυασμένη χρήση των αντιμικροβιακών εδωδιμων επικαλύψεων και της τροποποιημένης ατμόσφαιρας θα μπορούσε να είναι μια φυσική μέθοδος συντήρησης και ελέγχου της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* και *E. coli* O157:H7 σε φρέσκα φρούτα κομμένα.

Abstract

Introduction: Consumption of fresh cut fruits has been associated with foodborne outbreaks; therefore, the application of natural alternatives e.g., essential oils and alcoholic beverages may reduce the risk of pathogens growth and survival on these products.

The edible films and coatings with antimicrobial agents can prolong the shelf life of fresh cut fruit. The effect of essential oil of cinnamon, mastic, the combination of these two, their liquor and ethanol incorporated into edible coatings and studied their effect in shelf life of three fruits (apple, pear, banana). The coated fruit packed in modified atmosphere 20%CO₂-80%N₂ in polypropylene film.

Purpose: To evaluate the effect of sodium alginate coatings containing cinnamon and mastic gum essential oils (EOs)—alone or in mixtures— and their flavored liqueurs, on inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 growth on cut fruits under modified atmosphere packaging (MAP).

Methods: In the first section, fresh cut apples, pears and bananas were inoculated (10^3 - 10^4 CFU/g) with 3-strain *L. monocytogenes* mixed culture and in the second section fresh cut apples, pears and bananas were inoculated (10^3 - 10^4 CFU/g) with 3-strain *E.coli* O157:H7 mixed culture . Fruits were coated with 1% w/v sodium alginate (EC) with 0.7% (v/v) cinnamon EO (ECC); 0.7% (v/v) mastic gum EO (ECM), 0.7% (v/v) ECC+M (1:1); mastic gum liqueur (2 EC:1 liqueur) (ECML); cinnamon liqueur (2:1) (ECCL), and 25% ethanol (2 EC: 1 Ethanol) (ECE) (both liqueurs had 25% (v/v) alcohol) or left uncoated C. Samples were packaged under MAP (80%N₂: 20% CO₂) and stored at 10 °C. Enumeration of *L. monocytogenes* and total viable counts (TVC) were carried out on PALCAM and TSAYE, respectively, (n=4). Enumeration of *E. coli* O157:H7 and total viable counts (TVC) were carried out on SMAC and TSA, respectively, (n=4). PH, gas composition of package headspace and sensory properties (odor, appearance) of fruits were recorded.

Results:

Maximum growth populations of *L. monocytogenes* were obtained at 13th storage day for controls (7.1 log CFU/g on apples and 8.5 CFU/g on pears and bananas). ECM had no significant inhibitory effect on pathogen growth, nor in TVC, ECCL maintained the levels of *L.monocytogenes* on apple 2.5 log CFU/g lower than the respective control on day 13, while ECC and ECE samples, remained

2 log CFU/g lower than the control on pears. ECC, ECML and ECE were the most effective for banana causing (all three of them) an inhibition of approx. 1.5 log CFU/g compared to control). PH values slightly increased in most samples (ca up to 0.8 pH units) until 13th day. No significant changes in O₂ or CO₂ content were observed.

Maximum growth populations of *E.coli* O157:H7 were obtained at 20th storage day for controls (6.3 log CFU/g on apples and 5.8 CFU/g on pears and 4.6 log CFU/g on bananas). ECM had no significant inhibitory effect on pathogen growth, although obtained decrease of pathogen 2 log CFU/g inTVC, ECC maintained the levels of *E.coli* O157:H7 on apple 4 log CFU/g lower than the respective control on day 20, while ECC sample, remained 3 log CFU/g lower than the control on pears. ECC, ECM, ECC+M and ECE were the most effective for banana causing (all three of them) an inhibition of approx. 3 log CFU/g compared to control). PH values had no significant changes in most samples until 20th day. No significant changes in O₂ or CO₂ content were observed.

Significance: The combined use of antimicrobial edible coatings and MAP could be a natural preservation method to control growth of *L. monocytogenes* and *E.coli* O157:H7 on fresh cut fruits.

1ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Εισαγωγή

1.1Γενικά

Η φύση υπήρξε πάντοτε πλούσια πηγή χημικών ενώσεων με ποικίλες βιολογικές δράσεις, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν (και χρησιμοποιούνται) από τον άνθρωπο για την επίλυση διαφόρων καθημερινών προβλημάτων και την κάλυψη ποικίλων ζωτικών του αναγκών.

Παρόλο που ετυμολογικά ο όρος φυσικά προϊόντα παραπέμπει σε όλες τις χημικές ενώσεις που απαντούν στη φύση, ανόργανες και οργανικές, έχει καθιερωθεί η έννοια αυτή να προσδιορίζει μόρια που υπάρχουν στους ζώντες οργανισμούς. Για παράδειγμα, το πετρέλαιο δεν θεωρείται φυσικό προϊόν παρότι η δημιουργία του οφείλεται στην επίδραση υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων σε ουσίες που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς (*Ραγκούση 1996*).

Η φύση που περιβάλλει τον άνθρωπο με τα προϊόντα της, αποτέλεσε το βασικό ερέθισμα για την ανάπτυξη της Χημείας, με απώτερο στόχο την εκμετάλλευση του τεράστιου (ποιοτικά και ποσοτικά) πλούτου των φυσικών χημικών ενώσεων. Η απομόνωση χρωστικών, αρωμάτων, φαρμακευτικών και άλλων ουσιών από εύκολα προσβάσιμες πηγές, όπως για παράδειγμα τα φυτά, είναι μια πρακτική που ανάγεται στα πρώτα χρόνια της ανθρώπινης ιστορίας. Παρόλη την πρόοδο της συνθετικής Χημείας ακόμα και σήμερα πολλές από τις ενώσεις που καθημερινά χρησιμοποιεί ο άνθρωπος είναι φυσικής προέλευσης.

Μια ταξινόμηση των φυσικών προϊόντων μπορεί να γίνει στα:

- α) θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά όλων των οργανισμών, δηλαδή τα προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού όπως είναι οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα, τα λίπη, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα κλπ, και
- β) προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού όπως τα φαινολικά παράγωγα, τα τερπένια, τα στεροειδή, τα αλκαλοειδή και ποικίλα άλλα οργανικά μόρια.

Στο χημικό μονοπάτι μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού παρεμβάλλονται και άλλα μόρια που δρουν ως πρόδρομα των δευτερογενών μεταβολιτών. Σήμερα, ο όρος φυσικά προϊόντα εστιάζεται κυρίως στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού (*Ραγκούση 1996*).

Η εμφάνιση με το πέρασ του χρόνου διαφόρων προβλημάτων τόσο στο περιβάλλον (ρύπανση,

εξάντληση φυσικών πόρων, κλπ), όσο και στη ζωή του ανθρώπου (προβλήματα υγείας διατροφής, κλπ) έχει οδηγήσει σε νέα δεδομένα που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την απρόσκοπτη συνέχεια της ζωής. Η προσπάθεια για εξεύρεση λύσης σε προβλήματα όπως η διαχείριση των απορριμμάτων, η παραγωγή βιολογικών προϊόντων, η αντικατάσταση των μη συμβατών, φιλικών και αφομοιώσιμων από το περιβάλλον ουσιών, περνά κατά ένα μεγάλο μέρος μέσα από την περαιτέρω ανάπτυξη και διεύρυνση της χρήσης των φυσικών προϊόντων.

Η Ελλάδα ως χώρα είναι από πολλές απόψεις σε πλεονεκτική θέση, αφού διαθέτει πολύ μεγάλη βιοποικιλότητα με μακρά παράδοση από την οποία δεν έχει τελείως αποκοπεί. Τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν πολλές φορές με σημαντικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα στον τομέα των τροφίμων όπου ο παραπάνω συγκερασμός είναι ιδιαίτερα εμφανής. Η μεσογειακή διατροφή, της οποίας τα πλεονεκτήματα όλο και περισσότερο αναγνωρίζονται (κυρίως όσον αφορά τις ευεργετικές τις δράσεις στην υγεία του ανθρωπίνου οργανισμού), αποτελεί το τέλειο παράδειγμα για την αρμονική συνύπαρξη του φυσικού με το παραδοσιακό.

Επιπλέον, στην εποχή της παγκοσμιοποίησης η αξιοποίηση της φύσης και της παράδοσης αποτελεί πράξη μείζονος σημασίας για τη διατήρηση της εθνικής ταυτότητας και την αύξηση της προστιθέμενης αξίας και ανταγωνιστικότητας των ελληνικών προϊόντων.

Παράλληλα, συμβάλλει στη διατήρηση της τοπικής κουλτούρας και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη και κοινωνικο-οικονομική άνθηση περιοχών που μέχρι πρότινος είχαν οδηγηθεί στο μαρασμό.

Στην διατριβή αυτή διερευνήθηκε η χρήση δυο πολύ γνωστών φυσικών προϊόντων, των αιθερίων ελαίων της κανέλλας και της μαστίχας (και του συνδυασμού τους), όπως και δυο παραδοσιακά ελληνικά προϊόντα το λικέρ τεντούρα και το λικέρ μαστίχας, ως συντηρητικών σε τρία διαφορετικά είδη φρούτων (μήλο, αχλάδι, μπανάνα).

1.2 Συντήρηση Τροφίμων

Τα τρόφιμα αποτελούν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, στο οποίο η συμπεριφορά των μικροοργανισμών (ανάπτυξη/επιβίωση/θάνατος) είναι αποτέλεσμα της επίδρασης πολλών παραγόντων. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία, η απουσία/παρουσία οξυγόνου, η υγρασία, το pH, η επάρκεια θρεπτικών συστατικών και η παρουσία τοξικών προϊόντων μικροβιακού μεταβολισμού,

είναι μερικοί από τους κυρίαρχους ρυθμιστικούς παράγοντες της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών.

Οι μικροοργανισμοί διακρίνονται, ανάλογα με το βαθμό επικινδυνότητάς τους, στις παρακάτω δύο μεγάλες κατηγορίες,:

(α) **παθογόνοι**, οι οποίοι είτε με την παρουσία τους ή/και την παραγωγή τοξινών προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις, και

(β) **αλλοιογόνοι**, οι οποίοι είναι συνήθως αβλαβείς για τον άνθρωπο, προκαλούν όμως ανεπιθύμητες αλλαγές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Το πρόβλημα της αλλοίωσης των τροφίμων έχει απασχολήσει τον άνθρωπο από τα αρχαία χρόνια. Αρχικά, η συντήρηση των τροφίμων εξασφαλιζόταν αποκλειστικά με τη χρήση φυσικών προϊόντων, όπως ο υποκαπνισμός, η προσθήκη ζάχαρης, άλατος, καρυκευμάτων, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της προστασίας που παρείχαν στα τρόφιμα (*Dziezak, 1989*). Σήμερα, το θέμα της συντήρησης των τροφίμων είναι πολύπλοκο αφού στην αγορά εμφανίζονται συνεχώς νέα τρόφιμα για τα οποία οι καταναλωτές απαιτούν να

- είναι απολύτως ασφαλή από μικροβιολογικούς κινδύνους
- έχουν δεχθεί όσον το δυνατόν μικρότερη επεξεργασία
- περιέχουν όσο το δυνατόν λιγότερα συντηρητικά, και
- είναι υψηλής διατροφικής και οργανοληπτικής αξίας.

Οι μέθοδοι συντήρησης αποσκοπούν στον έλεγχο των παθογόνων και τη διατήρηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο. Στη βιομηχανία τροφίμων, η παραγωγή προϊόντων με υψηλό επίπεδο υγιεινής και ποιότητας εξασφαλίζεται αφενός με τη λήψη προληπτικών μέτρων κατά την παραγωγική διαδικασία και αφετέρου με τη διεξαγωγή τακτικού μικροβιακού ελέγχου στις πρώτες ύλες, την διαδικασία παραγωγής και το τελικό προϊόν. Οι φυσικοχημικές παράμετροι (π.χ pH, aw) και η θερμοκρασία αποθήκευσης των τροφίμων είναι μερικοί από τους κυρίαρχους παράγοντες που καθορίζουν ποιοι μικροοργανισμοί από την αρχική χλωρίδα του τροφίμου θα επιβιώσουν και θα αναπτυχθούν. Παράλληλα, οι εφαρμοζόμενες κατεργασίες κατά τη διαδικασία παραγωγής (αποστείρωση, παστερίωση, ακτινοβόληση, συσκευασία) επιδρούν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τροφίμων εντείνοντας τη δράση των παραγόντων που περιορίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Οι παραπάνω παράγοντες αποτελούν τα λεγόμενα «εμπόδια» (*Leistner, 1985*). Επομένως, η μικροβιακή κατάσταση ενός τροφίμου μετά την παραγωγή του, είναι ανά πάσα στιγμή συνάρτηση του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού, των εφαρμοζόμενων διεργασιών συντήρησης και των συνθηκών αποθήκευσης (*Roberts, 1989*).

Οι χρησιμοποιούμενες κατεργασίες συνήθως παρέχουν μία πρόσκαιρη μικροβιακή προστασία, η οποία εάν δεν συνοδεύεται από τις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης μειώνεται σταδιακά με την έκθεση του τροφίμου στον αέρα. Με απώτερο σκοπό την αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων, η ανάγκη εύρεσης δραστικότερων μεθόδων καταστροφής, περιορισμού ή παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών αποτελεί επιτακτική ανάγκη για τους χώρους παραγωγής τροφίμων, υπό την προϋπόθεση βέβαια ότι χρησιμοποιούνται πρώτες ύλες υψηλής ποιότητας με χαμηλό μικροβιακό φορτίο (Roberts, 1989). Η έρευνα προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση κατέληξε στην επιλογή ποικίλων φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, που είτε μόνα ή σε συνδυασμό με τις κλασικές μεθόδους συντήρησης, εξασφαλίζουν υψηλή προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς και μεγαλύτερη αντοχή στη δράση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Gould, 1996). Η χρήση των αντιμικροβιακών πρόσθετων εξαρτάται άμεσα από:

- (α) το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή την παρεμπόδιση ή τη θανάτωση των μικροοργανισμών
- (β) το είδος του μικροοργανισμού για τον οποίο προορίζεται
- (γ) το μέγεθος και το εύρος της παρεμπόδισης που διαθέτει το αντιμικροβιακό συστατικό
- (δ) τις νομοθετικές ρυθμίσεις που αφορούν τη χρήση των προσθέτων στα τρόφιμα.

1.3 Αντιμικροβιακά συστήματα φυτικής προέλευσης

Τον τελευταίο διάστημα έχει ενταθεί σε μεγάλο βαθμό το ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίηση "φυσικών" συντηρητικών που θα αντικαταστήσουν τα έως σήμερα χρησιμοποιούμενα που κρίνονται είτε ως ύποπτα (όσον αφορά την επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό) ή δεν είναι πλέον αποδεκτά από τον καταναλωτή. Βασικό κριτήριο για την επιλογή-χρήση τους είναι η αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή τους δράση, σε σχέση με τη θανάτωση των παθογόνων και την παρεμπόδιση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Στο πλαίσιο αυτό, πολλά μόρια φυτικής προέλευσης διαθέτουν αποδεδειγμένη ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με αποτέλεσμα να είναι ενδεχομένως ικανά να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται πολλά φυσικά ή συνθετικά φαινολικά παράγωγα (φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, ανθοκυάνες, τανίνες), οργανικά οξέα (οξικό, γαλακτικό, κιτρικό) και ποικίλα αιθέρια έλαια φυτών. Τα τελευταία λαμβάνονται μέσω υδροαπόσταξης ή εκχύλισης από καρυκεία, βότανα ή άλλα φυτά.

Η δράση όλων των αντιμικροβιακών συστημάτων κινείται στους παραπάνω τρεις άξονες:

- (α) επίδραση στην κυτταρική μεμβράνη με επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητάς της,
- (β) αδρανοποίηση ενζύμων, και
- (γ) καταστροφή ή λειτουργική αδρανοποίηση του γενετικού υλικού (*Davidson and Branen, 1981; Denyer and Hugo, 1991; Sikkema et al., 1995*).

1.4 Αιθέρια έλαια

Τα φυτά αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή από την οποία αντλεί ο άνθρωπος τα χρήσιμα για αυτόν φυσικά προϊόντα. Εκτός από τα φαινολικά παράγωγα που έχουν σημαντικές αντιμικροβιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες, μια επιπλέον κατηγορία φυτικών προϊόντων, τα καρυκείματα και τα βότανα, εκτός από το φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων τους, προσφέρουν δύο ξεχωριστά κλάσματα πτητικών ουσιών με έντονη αντιμικροβιακή δράση, τα αιθέρια έλαια και τις ελαιορητίνες.

Για την καλύτερη διάκριση μεταξύ καρυκευμάτων και βότανων είναι απαραίτητη η παράθεση των ορισμών τους. Έτσι, ως καρυκείματα ορίζονται τα τμήματα των αρωματικών φυτών (μπουμπούκια, άνθη, καρποί, ρίζες, σπόροι ή εκκρίματα) που ευδοκιμούν σε τροπικά και ημιτροπικά κλίματα, ενώ ως βότανα ορίζονται τα φύλλα και οι χλωροί (μη ξυλοποιημένοι) βλαστοί των ποωδών φυτών των οποίων ο κύριος βλαστός νεκρώνεται και απλώνεται στο έδαφος μετά το πέρας της βλαστικής περιόδου. Τα βοτανοφόρα φυτά ευδοκιμούν σε ήπια κλίματα και διακρίνονται σε ετήσια, διετή και πολυετή, ενώ επιπλέον των κλασσικών φυτών με τρυφερό βλαστό, υπάρχουν είδη με ημιξυλοποιημένο ή πλήρως ξυλοποιημένο κορμό, τα οποία δίνουν επίσης βότανα όπως το δενδρολίβανο, η δάφνη και το θυμάρι.

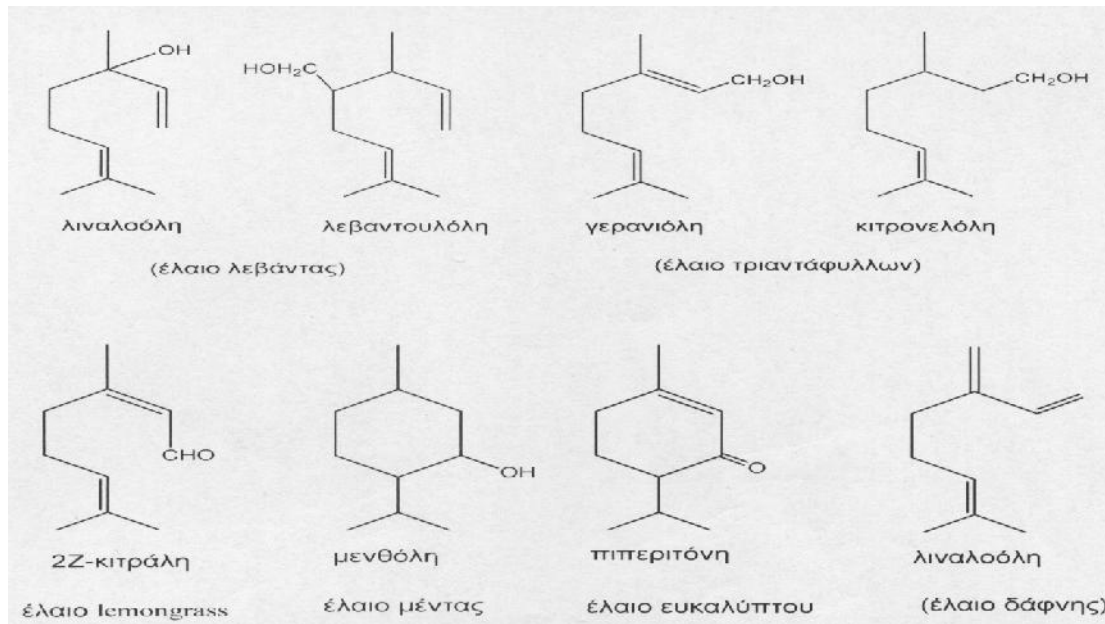
Από τα καρυκείματα και τα βότανα λαμβάνονται συνολικά 3 διαφορετικά κλάσματα. Το συνολικό τους βάρος δεν ξεπερνά το 0,5-1% του συνολικού βάρους του φυτού και διακρίνονται σε: αιθέρια έλαια και ελαιορητίνες. Τα καρυκείματα διαθέτουν υψηλότερο ποσοστό αιθερίων ελαίων σε σχέση με τα βότανα, ενώ το άρωμα τους οφείλεται στα αιθέρια έλαια που περιέχουν.

Τα αιθέρια έλαια είναι υγρά μίγματα πτητικών συστατικών με ευχάριστη οσμή, που ανήκουν κυρίως στην ομάδα των τερπενίων (κατά βάση μονοτερπένια και σεσκιτερπένια) αλλά και των εστέρων, αλδευδών και κετονών (φαινυλοπροπανοειδή, θειούχες ή αζωτούχες ενώσεις,

αλεικυκλικούς υδρογονάνθρακες κλπ). Όλα τα μόρια αυτά είναι ευδιάλυτα στην αλκοόλη και λιγότερο διαλυτά στο νερό (Hargreaves et al 1975).

Τα τερπένια είναι οργανικά μόρια με τεράστια ποικιλομορφία στη δομή τους, αφού σήμερα είναι γνωστή η δομή χιλιάδων τερπενίων τα οποία είναι είτε υδρογονάνθρακες ή περιέχουν και άτομα οξυγόνου σε μόρια ανοιχτής αλυσίδας ή δακτυλίων.

Εικόνα 1. Αιθέρια έλαια



Η παραγωγή των αιθερίων ελαίων στα φυτά γίνεται από ειδικευμένους εκκριτικούς σχηματισμούς, όπως είναι τα ελαιοφόρα δοχεία, τα αδενώδη τοιχώματα, οι ελαιοφόροι πόροι και τα ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα. Ο πραγματικός ρόλος των αιθερίων ελαίων στα φυτά δεν είναι ακόμη γνωστός, παρότι υπάρχει μια πληθώρα από εικασίες για τη σημασία και το ρόλο τους. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι τα αιθέρια έλαια είναι πρόδρομες ουσίες δραστικών μεταβολιτών που μειώνουν την απώλεια του νερού με την διαπνοή. Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια προσελκύουν τα έντομα, που μαζεύουν τη γύρη βοηθώντας έτσι στην αναπαραγωγή και επικονίαση.

Οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν πολλά αρωματικά φυτά είτε ως αρτύματα ή για τον αρωματισμό του κρασιού. Η εμπορία των αιθερίων ελαίων ξεκίνησε από την Ασία (πριν από 6000-7000 χρόνια) από τους Κινέζους και συνεχίστηκε από τους Άραβες οι οποίοι τη μετέφεραν στην Ευρώπη. Για την παραγωγή και απομόνωση των αιθερίων ελαίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της απόσταξης, η οποία αναπτύχθηκε από ανατολικούς λαούς, κυρίως Ινδούς, Πέρσες και

Αιγύπτιους. Το πρώτο αιθέριο έλαιο που αποστάχθηκε (με πρωτόγονο τρόπο) ήταν το τερεβινθέλαιο από το ρετσίνι των κωνοφόρων δένδρων. Για να εκχυλίσουν τα αιθέρια έλαια από τα άνθη, τα φύλλα και τις ρίζες, τοποθετούσαν τα φυτικά αυτά τμήματα μέσα σε δοχεία που περιείχαν λίπος εκλεκτής ποιότητας και τα άφηναν στον ήλιο για κάποιο χρονικό διάστημα. Με την αφαίρεση του λίπους, το προϊόν που παρέμενε ήταν μια αρωματική αλοιφή.

Η πρώτη λεπτομερής περιγραφή απόσταξης αιθερίου ελαίου ανήκει στον γιατρό *Arnald de Villanova* (1235-1311). Η απόσταξη ως μέθοδος παραλαβής του αιθερίου ελαίου από φυτά, με τη βοήθεια της θερμότητας πραγματοποιήθηκε από τον Ελβετό *Bombastus Paracalsus von Honhehheim* (1493-1541). Έως τον 18ο αιώνα αρκετοί ερευνητές, κυρίως φαρμακοποιοί, ασχολήθηκαν και περιέγραψαν ποικίλες μεθόδους παραλαβής και την φύση των αιθερίων ελαίων.

Σήμερα, τα αιθέρια έλαια παραλαμβάνονται κυρίως με τη μέθοδο της απόσταξης με υδρατμούς (*steam distillation*) και ενίοτε με ψυχρή, ξηρή ή υπό κενό εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Η μέθοδος της απόσταξης με πτητικούς διαλύτες (π.χ. οξικό οξύ, αιθανόλη, γλωριούχο αιθυλένιο) συμβάλλει στην παραλαβή από τα φυτά ενός προφίλ φυσικών ουσιών πλουσιότερων σε άρωμα και αντιμικροβιακές ιδιότητες, σε σύγκριση με την μέθοδο της απόσταξης με υδρατμούς με την οποία λαμβάνεται αποκλειστικά το κλάσμα των αιθερίων ελαίων (*Dziezak, 1989*). Η σύσταση των αιθερίων ελαίων ποικίλλει ανάλογα με το είδος, τη γεωγραφική τοποθεσία και τη χρονική περίοδο της συλλογής των φυτικών ιστών.

1.4.1 Παραλαβή αιθερίων ελαίων απο φυτά

Οι κυριότερες μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων από τους φυτικούς ιστούς είναι:

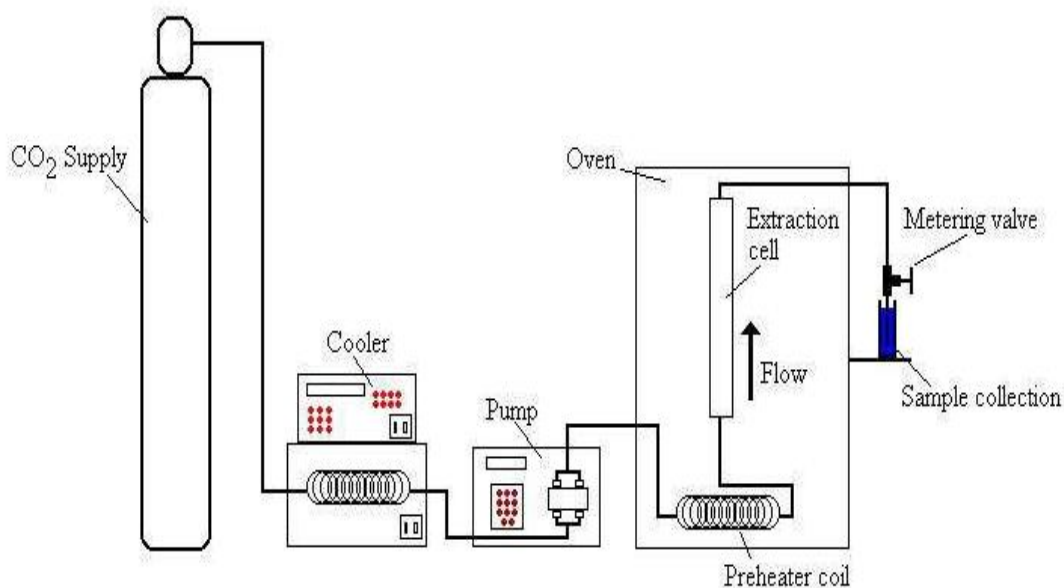
1. Εκχύλιση με τη χρήση οργανικού πτητικού διαλύτη, όπως για παράδειγμα αιθανόλης 80% (0,1% HCl) η οποία χρησιμοποιείται για την εκχύλιση της σκόνης που προέρχεται από τη ξήρανση του φυτικού ιστού με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Για τον ίδιο σκοπό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο οξικός αιθυλεστέρας υπό βρασμό και πίεση.

2. Υδροαπόσταξη με συσκευή τύπου Clevenger. Κατά την υδροαπόσταξη το φυτικό μέρος (νωπό, κατεψυγμένο ή ξηρό) μεταφέρεται σε δοχείο που πληρώνεται με νερό και τοποθετείται σε θερμαινόμενη εστία. Οι υδρατμοί που παράγονται συμπυκνώνονται και συλλέγονται σε ένα δοχείο στο οποίο ξεχωρίζουν δυο φάσεις (ανώτερη = καθαρό αιθέριο έλαιο και κατώτερη = μείγμα

αιθέριου ελαίου/νερού). Η υδροαπόσταξη είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως σε βιομηχανική κλίμακα, λόγω του χαμηλού κόστους, της εύκολης μεταφοράς, της απλότητας και της δυνατότητας απόσταξης ολόκληρων τμημάτων φυτικού ιστού η οποία με άλλη μέθοδο θα ήταν αδύνατη. Κύρια μειονεκτήματά της είναι ο μεγαλύτερος χρόνος, η μικρή απόδοση σε αιθέριο έλαιο και τέλος η κακή ποιότητα του αιθέριου ελαίου λόγω της αποσύνθεσης που λαμβάνει χώρα κατά την θέρμανση.

3. Απόσταξη με υδατμούς του νεπού φυτικού υλικού. Τα πλεονεκτήματά της είναι η παραλαβή καλής ποιότητας αιθέριου ελαίου, η ικανότητα απόσταξης μεγάλων ποσοτήτων από όλα σχεδόν τα αρωματικά φυτά, εκτός από τα άνθη και τα κονιοποιημένα υλικά.

4. Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical Fluid Extraction, SFE). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή (Εικόνα 2) το διοξείδιο του άνθρακα βρίσκεται στον κύλινδρο ο οποίος τροφοδοτεί τη συσκευή, περνώντας από το σύστημα ψύξης για να αποκτήσει την απαιτούμενη θερμοκρασία.



Εικόνα 2. Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά

Το διοξείδιο του άνθρακα συμπιέζεται με τη βοήθεια μιας εμβολοφόρου αντλίας υψηλής πίεσης (σε προεπιλεγμένη πίεση 68, 102, ή 306 atm) και διοχετεύεται σε έναν κλίβανο, έτσι ώστε να αποκτήσει τη θερμοκρασία των 5, 27, ή 40 °C και να ρεύσει μέσω ενός κάθετα τοποθετημένου εξολκέα.

Ένας υδροθάλαμος βοηθά στη διατήρηση της καθορισμένης θερμοκρασίας, ενώ το CO₂ περνώντας

μέσα από τον εξολκέα που περιέχει το δείγμα παρασύρει το αιθέριο έλαιο και το κατευθύνει σε ειδική στήλη όπου εξατμίζεται το CO₂ με αποτέλεσμα το αιθέριο έλαιο να παραμένει και να συλλέγεται. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι, η μικρή της διάρκεια (1-2 ώρες), η ευελιξία της και η αποτελεσματικότητα αφού ρυθμίζοντας τις τιμές της πίεσης και της θερμοκρασίας του CO₂ μπορεί να αυξηθεί η απόδοση. Το υπερκρίσιμο υγρό απομακρύνεται εύκολα από την εκχυλιζόμενη ουσία ως αέριο σε ΚΣ, ενώ οι χρησιμοποιούμενοι “διαλύτες” είναι μη τοξικοί, αδρανείς και φιλικοί προς το περιβάλλον. Έτσι, η μέθοδος αυτή αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για την παρασκευή προϊόντων που θα χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα. Μειονεκτήματα αποτελούν το κόστος της συσκευής και το εξειδικευμένο προσωπικό που απαιτείται για τη χρήση της.

5. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME). Χαρακτηριστικές ίνες για την SPME που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων είναι:

(i) πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (100μm, PDMS), πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο/διβινυλοβενζόλιο (65μm, PDMS/DVB),

(ii) διβινυλοβενζόλιο/Carboxen™/πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο(50/30μm StableFlex, DVB/CAR/PDMS), και

(iii) Carbowax/ διβινυλοβενζόλιο (65 μm, CW/DVB).

Πριν από την ανάλυση εφαρμόζεται ένας ελαφρύς θερμικός καθαρισμός των ινών σε GC (πχ 30 min σε 250 °C) και επίσης πραγματοποιείται η ανάλυση ενός μάρτυρα. Για τη μέθοδο χρησιμοποιούνται φιαλίδια των 10 mL που καθαρίζονται με τη χρήση υπερήχων και ακετόνης. Στη συνέχεια 1 gr φρέσκου (ή κατεψυγμένου) ή 0,5 gr ξηρού δείγματος τοποθετούνται στα φιαλίδια και αφού προσαρμοστεί το ειδικό κάλυμμα PTFE/silicon septa, θερμαίνονται για 10 min στους 30 °C και στη συνέχεια εφαρμόζεται η μέθοδος SPME για 5 min στους 30 °C.

1.4.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων

Το αιθέριο έλαιο που προκύπτει με κάποια από τις παραπάνω μεθόδους αποτελεί μείγμα πολλών και διαφορετικών συστατικών με αποτέλεσμα να είναι συχνά αναγκαίος η ταυτοποίηση η/και ο διαχωρισμός τους.

Η ταυτοποίηση των συστατικών γίνεται με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας, κυρίως όμως την αέρια χρωματογραφία. Σε αυτήν υπάρχει μια στατική φάση (τριχοειδής στήλη), η οποία στη

συγκεκριμένη περίπτωση είναι υγρό σε στερεό φορέα και μια κινητή φάση που είναι το φέρον αέριο, το οποίο πρέπει να είναι αδρανές για να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν. Ως φέρουσα αέρια φάση συνήθως χρησιμοποιούνται το άζωτο (N₂), το ήλιο (He) ή το αργό (Ar) ανάλογα με τον ανιχνευτή. Επειδή η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό προσροφημένο σε στερεό, η χρωματογραφία καλείται αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC). Ο διαχωρισμός των συστατικών γίνεται μέσω της κατανομής των μορίων των διαφορετικών συστατικών στο προσροφημένο υγρό της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες οι οποίες εξαρτώνται από τις διαφορετικές τάσεις ατμών και αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση.

Οι σημαντικότεροι παράμετροι στη αέρια χρωματογραφία είναι:

- Η θερμοκρασία του εισαγωγέα. Ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας στη στήλη. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης η λειτουργία του φούρνου του χρωματογράφου μπορεί να είναι ισόθερμη ή αυξομειούμενης θερμοκρασίας. Η δεύτερη περίπτωση εφαρμόζεται συνήθως όταν το προς διαχωρισμό μείγμα αποτελείται συγχρόνως από συστατικά και υψηλού σημείου ζέσεως.
- Η ροή του φέροντος αερίου. Η ροή του φέροντος αερίου παίζει καθοριστικό ρόλο στο διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος. Η πολύ ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη επειδή οι χρόνοι συγκράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα.
- Το είδος της στήλης. Συνήθως χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες στις οποίες η υγρή στατική φάση μπορεί να ταξινομηθεί σε πολικές, σχετικά πολικές και μη πολικές.
- Το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Συνήθως χρησιμοποιούνται ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (FID) ή φασματοφωτομετρίας μαζών (MS).

Η ποσοτική και ποιοτική ταυτοποίηση των συστατικών του αιθερίου ελαίου γίνεται με τη χρησιμοποίηση του δείκτη συγκράτησης Kovats (σύγκριση του χρόνου συγκράτησης t_{Rx} της άγνωστης ουσίας με το t_{RA} αλκανίων), του χρόνου συγκράτησης και τέλος των φασμάτων μάζας, με σύγκριση είτε με τα πρότυπα των ουσιών ή με τη χρήση κάποιας αξιόπιστης βιβλιοθήκης.

1.4.3 Αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων όσον αφορά τη χρήση τους από τη βιομηχανία τροφίμων. Δεν χρωματίζουν το προϊόν στο οποίο προστίθενται, προσδίδουν άρωμα στα τρόφιμα, είναι απαλλαγμένα από ένζυμα και τανίνες, αλλά ακόμη σημαντικότερη είναι η αντιμικροβιακή δράση τους, μέσω της οποίας συμβάλλουν στη συντήρηση των τροφίμων. Από τα πανάρχαια χρόνια, τα καρυκεύματα και τα βότανα χρησιμοποιούνταν χάρη στις αρωματικές,

φαρμακευτικές, συντηρητικές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας και της ασφάλειας των τροφίμων.

Δομικά, οι δραστικές ουσίες των αιθερίων ελαίων εμφανίζουν ομοιότητες με τα φαινολικά συστατικά, αλλά ανήκουν στην τάξη των πτητικών τερπενοειδών. Ενδεικτικά αναφέρονται τα μόρια θυμόλη, καρβακρόλη, π-κυμένιο, σιναμική αλδεύδη, λιμονένιο, ευγενόλη, βορνεόλη, σινεόλη, πευκίνη, καμφίνη, καμφορά θουγιόνη, κλπ. (Sofos et al., 1998).

Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί ο τρόπος δράσης των αιθερίων ελαίων έναντι των μικροοργανισμών, έχουν όμως προταθεί αρκετές θεωρίες οι οποίες άλλοτε τεκμηριώνονται πειραματικά και άλλοτε όχι. Σχετικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η παρεμποδιστική δράση των αιθερίων ελαίων οφείλεται στις επιπλοκές που προκαλούν σε ένα εύρος ενζυμικών συστημάτων, τα οποία εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό και στα μονοπάτια βιοσύνθεσης των δομικών υλικών της κυτταρικής μεμβράνης (Conner and Beuchat, 1984). Η συσχέτιση μεταξύ της χημικής δομής των συστατικών των αιθερίων ελαίων και της αντιμικροβιακής τους δράσης οδήγησε στην υπόθεση ότι οι φαινόλες αντιδρούν με τα ενεργά σημεία των ενζύμων σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Σε πειράματα σε κύτταρα ζύμης έχει βρεθεί ότι οι ουσίες α -πινένιο, β -πινένιο και λεμονένιο καταστρέφουν την κυτταρική δομή παρεμποδίζοντας τη λειτουργία της αναπνοής στα μιτοχόνδρια. Ειδικότερα, το β -πινένιο παρεμποδίζει την αναπνοή τόσο σε ανέπαφα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* όσο και σε μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από αυτή τη ζύμη. Επιπλέον μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του προκαλούν παρεμπόδιση στη μεταφορά των πρωτονίων και ιόντων καλίου, χωρίς να παρατηρείται επίδραση στη δραστηριότητα της ATPάσης. Ανάλογα συμπεράσματα προέκυψαν και για το λεμονένιο, όχι όμως για άλλα υδρόφοβα μόρια. Η επίδραση στην αναπνοή θα μπορούσε να αποδοθεί στη δράση στην περιοχή του συμπλόκου III της κυτοχρωμικής αλυσίδας. Μελέτες επιβεβαίωσαν ότι οι κυκλικοί τερπενικοί υδρογονάνθρακες συσσωρεύονται στη μεμβράνη, προκαλώντας διαταραχή των ημιπερατών ιδιοτήτων της και παρεμπόδιση του μηχανισμού της μετακίνησης των πρωτονίων.

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την ανιμικροβιακή δράση που διαθέτουν τα αιθέρια έλαια που προέρχονται από το πιπέρι, τη ρίγανη, το δενδρολίβανο, το κρεμμύδι, το σκόρδο, την κανέλλα, το γαρύφαλλο, τον άνηθο, το μαϊντανός, τη μέντα, το φασκόμηλο κ.α., έναντι διαφόρων (κυρίως παθογόνων) μικροοργανισμών των τροφίμων όπως *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*. Ο βαθμός ευαισθησίας έκαστου μικροοργανισμού ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Paster et al., 1990, Stecchini et al., 1993) και την αντίδραση στη χρώση Gram (Farag et al., 1989). Γενικά, τα

Gram (+) βακτήρια, λόγω της απουσίας του λιποπρωτεϊνικού στρώματος, είναι περισσότερο ευαίσθητα σε σύγκριση με τα Gram (-) (Nychas, 1995). Αντίστοιχα τα Gram (-) βακτήρια διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ευαισθησία στην παρεμποδιστική δράση των αιθερίων ελαίων. Συγκεκριμένα, το *Escherichia coli* είναι λιγότερο ανθεκτικό από το *Pseudomonas fluorescense* και το *Serratia marcescens* στα αιθέρια έλαια δάφνης, δενδρολίβανου, κύμινου, κανέλλας και θυμαριού (Farag et al., 1989). Οι *Salmonella enteritidis* και *S.typhimurium* είναι ανθεκτικότερες από το *Pseudomonas fragi* στα αιθέρια έλαια δάφνης και μαστίχας.

Ωστόσο, η μελέτη αιθερίων ελαίων από 50 φυτά έναντι 25 γενών βακτηρίων κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει διαφορά ως προς το βαθμό παρεμπόδισης μεταξύ των Gram (+) και των Gram (-) βακτηρίων (Deans and Ritchie, 1987).

Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια είναι ευαίσθητα σε φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονται από βότανα ή άλλους φυτικούς ιστούς. Η αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων έναντι του *Staphylococcus aureus* έχει εξεταστεί επανειλημμένα και έχει βρεθεί ότι σχεδόν όλα τα αιθέρια έλαια ασκούν παρεμποδιστική δράση τόσο στην ανάπτυξη του όσο και στην παραγωγή εντεροτοξίνης. Τα αιθέρια έλαια γαρύφαλλου και κορίανδου αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Aeromonas hydrophila* (Stecchini et al., 1993), ενώ εξίσου δραστικά μειώνεται ο πληθυσμός του ίδιου βακτηρίου, όταν εμβολιαστούν με αυτό δείγματα βρασμένου χοιρινού κρέατος συσκευασμένα υπό κενό ή αέρα στους 2 και 10 °C. Η βακτηριοκτόνος δράση των δύο αιθερίων ελαίων ήταν εντονότερη σε δείγματα που συσκευάστηκαν υπό κενό (Stecchini et al., 1993). Μεταξύ 32 διαφορετικών αιθερίων ελαίων που εξετάστηκαν έναντι 13 αλλοιογόνων βακτηρίων και βιομηχανικών ζυμών, διαπιστώθηκε ότι το έλαιο της κανέλλας και του γαρύφαλλου ήταν τα δραστικότερα (Conner and Beuchat, 1984). Το αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου σε συγκεντρώσεις 0.2% παρεμπόδισε την ανάπτυξη του *Bacillus subtilis* και σε ποσοστό 0,02% ανέστειλε τον *St. aureus*.

Τα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού περιέχουν την τερπενεόλη, μια δραστική ουσία η οποία επιμηκύνει στους 4°C το χρόνο ζωής του παστεριωμένου άπαχου, χαμηλής λιποπεριεκτικότητας και πλήρους γάλακτος, κατά τουλάχιστον 56 ημέρες (Dabbah et al, 1970). Εξίσου ευεργετικά δρα το συνολικό κλάσμα των αιθερίων ελαίων των εσπεριδοειδών. Έτσι, τα γαλακτοκομικά προϊόντα που είναι αρωματισμένα με φρούτα, εκτός από το ευχάριστο άρωμα, διαθέτουν επιπλέον μια φυσική αντιμικροβιακή προστασία.

Το φασκόμηλο και το δενδρολίβανο είναι δύο βότανα που πολλές φορές προστίθενται σε κρέας, λουκάνικα, κοτόπουλο, ψάρι και άλλα τρόφιμα. Η αντιμικροβιακή τους δράση τόσο στο τεχνητό

θρεπτικό υλικό όσο και σε τρόφιμα επιβεβαιώθηκε έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium botulinum* και *Pseudomonas* sp. Συγκέντρωση 0,3% αιθερίου ελαίου απο φασκόμηλο ή δενδρολίβανου σε στερεό υπόστρωμα ανάπτυξης, εμφανίζει ζώνες αναστολής σε 20 περιπτώσεις παθογόνων Gram (+) βακτηρίων. Η δράση τους στα τρόφιμα αυξάνεται ανάλογα με την περιεκτικότητα του τροφίμου σε νερό και αλάτι και αντιστρόφως ανάλογα με το περιεχόμενο σε λίπος και πρωτεΐνη.

Η αλλυσίνη είναι η ισχυρά αντιμικροβιακή ουσία που περιέχεται στα αιθέρια έλαια των ειδών του γένους *Allium spp.* όπως το σκόρδο (*Allium sativum*) και το κρεμμύδι (*Allium cepa*). Η αλλυσίνη δρα ανασταλτικά σε πολύ μικρές ποσότητες έναντι ενός μεγάλου αριθμού Gram (+), και Gram (-) βακτηρίων και μυκήτων. Τα αιθέρια έλαια του σκόρδου και του κρεμμυδιού είναι άχρωμα, ιδιαίτερα καυστικά, η δε δράση τους έχει μελετηθεί ως επί το πλείστον σε τεχνητά θρεπτικά υλικά, που είχαν εμβολιαστεί με μικροοργανισμούς όπως οι *S.aureus*, *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*

Με δεδομένη την αποτελεσματικότητα των αιθερίων ελαίων στα μη σποριογόνα παθογόνα βακτήρια η μελέτη της αντιμικροβιακής τους δράσης επεκτάθηκε και στα σποριογόνα βακτήρια, *Clostridium botulinum*, *Cl.sporogenes* και *Cl. Perfringens* (Hall and Maurer 1985; Paster et al, 1990). Από τα αιθέρια έλαια που δοκιμάστηκαν αποτελεσματικότερα αποδείχθηκαν τα προερχόμενα από σκόρδο, κρεμμύδι, κανέλλα, θυμάρι, ρίγανη, γαρύφαλλο, μέντα και μαύρο πιπέρι. Αντίθετα, πρέπει να σημειωθεί ότι η παρεμπόδιση των ελαίων στη σπορογονία ήταν ελάχιστη (Ismael and Pierson, 1990). Τα έλαια από μαύρο πιπέρι και γαρύφαλλο άσκησαν μεγαλύτερη παρεμπόδιση στην κυτταρική ανάπτυξη από τα υπόλοιπα, ενώ κανένα αιθέριο έλαιο δεν είχε αξιοσημείωτη δράση στην εκβλάστηση των σπορίων του γένους *Clostridium spp.* Παρατηρήθηκε όμως μείωση τόσο στο ρυθμό όσο και την έκταση σπορογονίας του *Bacillus subtilis* παρουσία γαρυφάλλου και καθαρής ευγενόλης (Blank et al., 1986). Τέλος, σε πειράματα με προσθήκη αιθερίων ελαίων σε ποσότητες 1500 μg/g κρέατος, παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του *C. botulinum* και την παραγωγή τοξίνης τύπου A, ενώ δεν επηρεάστηκε καθόλου η παραγωγή των τοξινών τύπου B και D (DeWit et al., 1979).

Επιπλέον, πολλές φορές παρατηρείται το φαινόμενο της ελάττωσης της *in vivo* αντιμικροβιακής δράσης των αιθερίων, όπως για παράδειγμα στο κρέας. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στην υψηλή συγκέντρωση των πρωτεϊνών και το λίπος του κρέατος που ανταγωνίζονται τη δράση τους (Shelef, 1983). Γενικεύοντας την παρατήρηση, η αποτελεσματικότητα των αιθερίων ελαίων σε γενικές γραμμές αναμένεται να είναι μικρότερη, κατά την εφαρμογή τους στα τρόφιμα (*in vivo*), σε σύγκριση με τα τεχνητά θρεπτικά υλικά (*in vitro*).

1.5 Αιθέριο έλαιο κανέλας

1.5.1 Γενικές χαρακτηριστικά του φυτού της κανέλας (*Cinnamomum*)

Το γένος *Cinnamomum* περιλαμβάνει πάνω από 300 είδη που αναπτύσσονται σε τροπικές περιοχές. Το *Cinnamomum verum*, η γνωστή μας κανέλα, είναι ιθαγενές φυτό της Σρί Λάνκα (Κεϋλάνης) και αναπτύσσεται στα τροπικά δάση μέχρι υψόμετρο 500 μέτρων. Η επιστημονική του ονομασία *Cinnamomum verum* προέρχεται από την ελληνική λέξη κιννάμωμον και εμφανίζεται στη βοτανολογική πραγματεία «Περί Φυτών Ιστορίας» του Θεόφραστου του Λέσβιου (371-287 π.Χ.), και σημαίνει 'γλυκό ξύλο'. Το *Cinnamomum zeylanicum* είναι συνώνυμο και προέρχεται από το Ceylon ή Κεϋλάνη. Στη Σρί Λάνκα είναι γνωστή ως *kurundu*.

Ετυμολογικά, η λέξη κανέλα προέρχεται από την αρχαία ελληνική κάννα, την οποία δανείσαμε στην ιταλική γλώσσα και προσαρμοσμένη στο φωνολογικό της σύστημα, πήρε τη σημερινή μορφή *cannella*, την οποία κατόπιν και υιοθετήσαμε. Το *Cinnamomum cassia* είναι είδος πολύ συγγενές με το *zeylanicum* και προέρχεται από διαφορετικές πηγές με πιο σημαντικά δέντρα το *Chinese cassia* ή *Cinnamomum aromaticum* ιθαγενές της Κίνας, το *Saigon cinnamon* ή αλλιώς *Vietnamese cinnamon* (c.loureiroi) ιθαγενές του Βιετνάμ και το *Indonesian cinnamon* (c.burmannii) που αναπτύσσεται στη Σουμάτρα της Ινδονησίας και τέλος το *Malabathrum* (c.tamala) της βόρειας Ινδίας (*Ravindran et al. 2004*).

Το *cinnamomum zeylanicum* και το *aromaticum* ανήκουν στην οικογένεια των *Laureaceae* είναι πολυετή, θαμνώδη και αειθαλή δέντρα. Το *cinnamomum verum* που φτάνει σε ύψος 8-18 μέτρων έχει καφεκόκκινο φλοιό, με λογχοειδή δερματώδη φύλλα μήκους 7-18cm και κίτρινόλευκα άνθη που εμφανίζονται το καλοκαίρι, ακολουθούμενα από αυγοειδείς, πορφυρούς καρπούς (*Chevallier, 1996, Κάτσης, 2001*)



Εικόνα 3. Cinnamomum verum

Το *cinnamomum cassia* αναπτύσσεται σε υψόμετρο 100-300 μέτρων, έχει ύψος 10-15 μέτρα, σκληρά επιμήκη φύλλα 10-15cm λεία στο πάνω μέρος και ελαφρώς τριχώδη στο κάτω με χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα σε νεαρή ηλικία. Τα χαρακτηριστικά των ανθών είναι παρόμοια με αυτά του *C.verum*. Το φρούτο είναι ωσειδές και σαρκώδες και βρίσκεται μέσα σ' ένα μεγενθυμένο περιανθικό κύπελλο με κομμένους περιανθικούς λοβούς. (Ravindran et al. 2004)

Εικόνα 4. Cinnamomum cassia



Η κανέλα αναπαράγεται με μοσχεύματα και κάθε δεύτερο χρόνο, κατά τη περίοδο των βροχών, τα νεαρά δέντρα κλαδεύονται μέχρι λίγο επάνω από το επίπεδο του εδάφους. Ο φλοιός συλλέγεται από τα πολλά εναπομείναντα, από το κλάδεμα κομμάτια βλαστών και αφήνεται για 24 ώρες να υποστεί ζύμωση. Κατόπιν αφαιρείται ο εξωτερικός φλοιός απελευθερώνοντας έτσι τον εσωτερικό και ο οποίος ξεραίνεται. Στη συνέχεια ο φλοιός τυλίγεται σε ρολά για τη διευκόλυνση της αποθήκευσης και της μεταφοράς του. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται τα γνωστά ξυλάκια κανέλας. (Chevallier, 1996, Ravindran et al. 2004)

Σήμερα η παραγωγή του *Cinnamomum verum* φτάνει τους 80.000-100.000 τόνους το χρόνο με το 80-90% να προέρχεται από τη Σρι Λάνκα, ενώ το *Cinnamomum aromaticum* φτάνει τους 20.000-25.000 τόνους ετησίως εκ των οποίων τα 2/3 καλλιεργούνται στην Ινδονησία.

Τα χρησιμοποιούμενα μέρη του φυτού είναι ο εσωτερικός φλοιός, τα φύλλα και το αιθέριο έλαιο του. Ο φλοιός υπό μορφή κυλίνδρων ή ημικυλίνδρων και η σκόνη που προκύπτει από το θρυμμάτισμα του φλοιού του *C.verum* χρησιμοποιείται ευρέως στη ζαχαροπλαστική και τη μαγειρική. Επίσης τα άνθη του *C.cassia* χρησιμοποιούνται στην Ινδία σαν μπαχαρικό, κάτι που ήταν πολύ διαδεδομένο και στην αρχαία Ρώμη. (Chevallier, 1996, Κάτσης, 2001)

Το αιθέριο του έλαιο παράγεται με απόσταξη με υδρατμούς. Το έλαιο που παραλαμβάνεται είναι υπεύθυνο για το χαρακτηριστικό ζεστό άρωμα της κανέλας και είναι χρώματος κιτρινόχρυσου που με το χρόνο σκουραίνει λόγω της οξειδωσής του (Krishnamurthy, 2009). Μπορεί να προκύψουν διάφορα αιθέρια έλαια, ανάλογα με το μέρος του φυτού που χρησιμοποιείται και το τόπο προέλευσης. Υψηλότερης ποιότητας αιθέριο έλαιο θεωρείται εκείνο του φλοιού του *C.verum*. Όσο το αιθέριο έλαιο είναι πλουσιότερο σε κινναμαλδεΐδη, τόσο και ακριβότερο είναι. Το αιθέριο έλαιο του *C.cassia* είναι αποτέλεσμα του μείγματος των φύλλων, του φλοιού και των κλαδιών και συνήθως χρησιμοποιείται στη ζαχαροπλαστική, στον αρωματισμό αναψυκτικών και ποτών αλλά όχι στην αρωματοποιία λόγω των πιθανών δερματίτιδων που μπορεί να προκαλέσει (Ravindran et al. 2004).

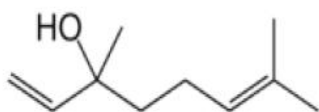
1.5.2 Χημικά χαρακτηριστικά

Η χρωματογραφική ανάλυση του αιθέριου ελαίου των φύλλων, του φλοιού και της ρίζας του *Cinnamomum verum* και του *C.cassia* έδειξε 72 διαφορετικά συστατικά σε μεταβλητές αναλογίες. Οι συγκεντρώσεις των δραστικών συστατικών εξαρτώνται από τη μέθοδο εκχύλισης του αιθέριου ελαίου. Η ανάλυση του αιθέριου ελαίου (1%-4% του ν.β.) πιστοποίησε την παρουσία της

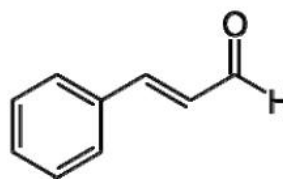
κινναμαλδεΐδης (60%-80%), ευγενόλης (έως 10%), *trans*-κινναμωμικού οξέος (5%-10%), β -καρυοφυλενίου (1%-4%), λιναλόλης (1%-3%) και 1,8 κινεόλης (1%-2%).

Επίσης πιστοποίησε την παρουσία φαινολικών συστατικών (4%-10%), όπως συμπυκνωμένων τανινών, κατεχινών και προανθοκυανιδινών, μονοτερπενίων (β -πινένιο) και σεσκιτερπενίων, πολυσακαριτών (άμυλο) και κουμαρινών. (Dugoua et al. 2007)

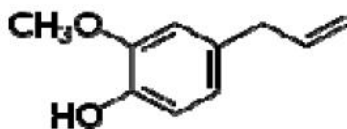
Εικόνα 5. Κύρια συστατικά αιθερίου ελαίου κανέλας



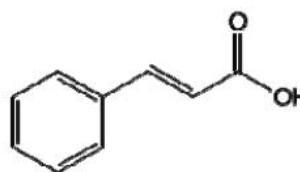
Εικόνα 1 Λιναλόλη



Εικόνα 2 Κινναμαλδεΐδη



Εικόνα 3 Ευγενόλη



Εικόνα 4 Κινναμωμικό οξύ

Η χημική ανάλυση του *Cinnamomum verum* έδειξε ότι περιέχει υγρασία 10,7 mg/100gr, πρωτεΐνες 12,5 mg/100gr, λίπος 1,1 mg/100gr, ίνες 28,5 mg/100gr, υδατάνθρακες 45,5 mg/100gr, ασβέστιο 341,3 mg/100gr, φώσφορο 99,8 mg/100gr και σίδηρο 9,0 mg/100gr, ενώ διαθέτει ενέργεια 241 θερμίδες/100gr.

Το εύρος των συστατικών του *C.verum* και του *C.cassia* αποδεικνύει και της ποικιλόμορφης δράσης τους. Η κινναμαλδεΐδη είναι ισχυρό μυκητοκτόνο και εντομοαπωθητικό, η ευγενόλη βακτηριοκτόνο, μυκητοκτόνο, ιοκτόνο και παρασιτοκτόνο καθώς επίσης αναισθητικό και αναλγητικό. Η λιναλόλη έχει επίσης βακτηριοκτόνο και ιοκτόνο δράση. Το β -καρυοφυλένιο υποθερμική δράση ενώ η 1,8 κινεόλη ή αλλιώς ευκαλυπτόλη έχει βρογχοπνευμονική δράση, αποχρεπτική, βλεννολυτική και αποσυμφορητική. Οι προανθοκυανιδίνες έχουν αντιοξειδωτική δράση, ευεργετική στην αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών, οι ταννίνες στυπτική και

φλεβοτονωτική.

1.5.3 Αντιβακτηριακή και μυκητοκτόνος δράση

Σε διάφορες *in vitro* μελέτες έχει αναγνωριστεί η ευρέως φάσματος αντιβακτηριακή και μυκητοκτόνος δράση και των δύο ειδών της κανέλας. Οι δράσεις αυτές αποδίδεται κυρίως στην παρουσία της κινναμαλδεΐδης, παρότι συστατικά όπως η ευγενόλη, το β-καρυοφυλλένιο και η 1,8-κινεόλη επίσης εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η κινναμαλδεΐδη παρουσιάζει ευρέως φάσματος αντιβακτηριδιακή δράση έναντι των Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων (Ooi *et al.* 2006), με αποτέλεσμα να αναστέλλει την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων.

Το *C.verum* έδειξε δραστηριότητα έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας βακτηρίων και μυκήτων όπως: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisia*, *Candida albicans*, *L.monocytogenes* και *Salmonella enterica* (Braun Lesley, 2007).

Τα εκχυλίσματα του *C.cassia* ανέστειλαν σημαντικά *in vitro* την ανάπτυξη του *Helicobacter pylori* παράγοντας ακόμα μεγαλύτερες ζώνες αναστολής όταν χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με αντιβιοτικά. Το αιθέριο έλαιο του *C.cassia* έδειξε ισχυρές *in vitro* αντιμυκητιακές ιδιότητες όταν μελετήθηκε σε συνδυασμό με την αμφοτερικίνη, με αποτελέσματα να απαιτείται μειωμένη ποσότητα φαρμάκου. Η αντιβακτηριακή δράση του ελαίου έχει επίσης πιστοποιηθεί σε ανθεκτικά στελέχη του *E.coli* και του *Staphylococcus aureus* (Braun Lesley, 2007).

1.6 Αιθέριο έλαιο μαστίχας

1.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά του φυτού της μαστίχας

Η μαστίχα Χίου είναι η ρητινώδης έκκριση του Μαστιχοφόρου Σχίνου ή αλλιώς μαστιχόδενδρου (*Pistacia Lentiscus var. Chia, Anacardiaceae*). Πρόκειται για φυσική, αρωματική ρητίνη, που εκκρίνεται σαν δάκρυ και ρέει κατά σταγόνες στο χώμα, από τις επιφανειακές τομές που προκαλούνται με αιχμηρά εργαλεία στον κορμό και τα μεγάλα κλαδιά των μαστιχόδενδρων (Εικόνα 6). Η ανάπτυξή του ευνοείται από τις εδαφολογικές και τις κλιματολογικές συνθήκες μόνο στο νότιο τμήμα του νησιού. Το γεγονός της αποκλειστικής παραγωγής της μαστίχας στη Χίο, προκάλεσε από την αρχαιότητα τη διεκδίκηση του νησιού από πολλούς λαούς.



Εικόνα 6. α,β. Το δάκρυ της μαστίχας

Η μαστίχα της Χίου αναγνωρίστηκε από τα αρχαία χρόνια, τόσο για το ιδιαίτερο άρωμά της, όσο και για τις θεραπευτικές της ιδιότητες. Έχει καταγραφεί ως η πρώτη φυσική τσίκλα του αρχαίου κόσμου, που χρησιμοποιούνταν για τον καθαρισμό των δοντιών και τη φρεσκάδα της αναπνοής. Από τον 5^ο αιώνα π.Χ. ο Ηρόδοτος αναφέρει χαρακτηριστικά ότι στην αρχαία Ελλάδα μασούσαν το αποξηραμένο ρητινώδες υγρό που ρέει από τον φλοιό του μαστιχόδενδρου (Σαββίδης, 2000). Ήδη από τα ρωμαϊκά χρόνια οι κυρίες της Ρώμης χρησιμοποιούσαν οδοντογλυφίδες από ξύλο μαστιχόδενδρου για την καλύτερη υγιεινή του στόματος. Η μαστίχα αναφέρεται και στα έργα άλλων αρχαίων συγγραφέων όπως ο Ιπποκράτης και ο Διοσκουρίδης που την αποκαλούν «σχινική ρητίνη» και δίνουν έμφαση στις θεραπευτικές της ιδιότητες. Συγκεκριμένα ο Διοσκουρίδης, ο πατέρας της φαρμακολογίας, στο έργο του «περί ύλης ιατρικής» (*de material medica*), αναφέρει τις ευεργετικές ιδιότητες της ρητίνης στη δυσπεψία και στην αναπαραγωγή του αίματος και τις θεραπευτικές ιδιότητες του μαστιχελαιίου στα καρκινώματα στομάχου και στις δυσεντερικές παθήσεις. Τη χρησιμοποιούσαν ακόμη στην κοσμετολογία για τον καθαρισμό του προσώπου και του σώματος. Επιπρόσθετα στα κείμενα του Ηροδότου και του Διόδωρου η μαστίχα αναφέρεται ως μέσο ταρίχευσης του ανθρωπίνου σώματος. Η μαστίχα Χίου έχει από το 1997 χαρακτηριστεί ως «Προϊόν Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης -Π.Ο.Π.».

1.6.2 Το μαστιχόδενδρο

Το μαστιχόδενδρο είναι ένας αειθαλής θάμνος ύψους 2-3 μέτρων που συχνά φτάνει τα 5 μέτρα στα ηλικιωμένα φυτά (Σαββίδης). Όλα τα όργανα του μαστιχόδενδρου (βλαστός, φύλλα, ρίζες, άνθη, καρποί) διατρέχονται από τους ρητινοφόρους αγωγούς (σύστημα αγωγών). Είναι δίοικο είδος,

εμφανίζει δηλαδή άρρενες και θήλειες ταξιανθίες σε διαφορετικά άτομα. Τα άρρενα άτομα, που καλούνται και «καρπόσκινα», είναι εκείνα που καλλιεργούνται κυρίως καθώς αποδίδουν περισσότερη και πιο ποιοτική μαστίχα. Το μαστιχόδενδρο αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς και ολοκληρώνει την ανάπτυξή του στα 40-50 χρόνια. Η παραγωγή μαστίχας ξεκινά τον 5ο ή 6ο χρόνο, ενώ από το 12ο μέχρι το 15ο έτος παρουσιάζεται η μέγιστη απόδοση. Η μέση ετήσια απόδοση ανά δένδρο είναι 150-180 g μαστίχας ενώ υπάρχουν και σπάνιες περιπτώσεις δένδρων που παράγουν δύο κιλά αλλά και δένδρα που βγάζουν μόνο 10 g. Το μαστιχόδενδρο ζει πάνω από 100 χρόνια, αλλά αρχίζει να παρακμάζει από το 70^ο έτος της ηλικίας του.



Εικόνα 7. Μαστιχόδενδρα

Το αξιοπρόσεκτο είναι ότι ενώ σχίνοι υπάρχουν σε όλο το νησί η παραγωγή της μαστίχας γίνεται μόνο στο νότιο τμήμα της Χίου, στα Μαστιχώχωρα, όπου το κλίμα είναι ιδιαίτερα θερμό και ξηρό. Ο σχίνος είναι φυτό ανθεκτικό και έχει ελάχιστες απαιτήσεις, γι' αυτό ευδοκimeί σε άγονα, πετρώδη και φτωχά εδάφη. Επειδή οι ρίζες του απλώνονται στην επιφάνεια του εδάφους, μπορεί να επιβιώσει σε συνθήκες απόλυτης ξηρασίας.

1.6.3 Προϊόντα της μαστίχας

Η μαστίχα χρησιμοποιείται ως συστατικό σε οδοντόκρεμες και διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή τσίχλας. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην οδοντιατρική χρησιμοποιείται ως συστατικό του σφραγίσματος των δοντιών και των εκμαγείων οδοντοστοιχιών (Σαββίδης, 2000). Στην ορθοδοντική βοηθάει στη βελτίωση των ατελειών της οδοντοστοιχίας και στη λειτουργική ικανότητα των μασητήριων μυών. Επίσης, χρησιμοποιείται στην ιατροφαρμακευτική σε αλοιφές για εγκαύματα, κρυοπαγήματα, δερματικές παθήσεις και στην παρασκευή εμπλάστρων, όπως και σε διάφορες μελέτες που γίνονται σε διάφορα πανεπιστήμια στην Ελλάδα και στο εξωτερικό για την ευεργετική δράση της μαστίχας στο ζαχαρώδη διαβήτη, τη χολιστερίνη και τα τριγλυκερίδια. Ένας άλλος κλάδος που χρησιμοποιείται ευρέως η μαστίχα είναι η αισθητική, όπου χρησιμοποιούν το μαστιχέλαιο, λόγω της ιδιότητάς του να καθαρίζει το δέρμα και να του δίνει λάμψη. Γι' αυτό το

λόγο χρησιμοποιείται στην παρασκευή πολλών καλλυντικών.

Η μαστίχα διατίθεται ως χονδρή, μεσαία και ψιλή. Ακόμη διατίθεται στο εμπόριο με τη μορφή σκόνης είτε μαγειρικής είτε διατροφικής.

Μαστιχέλαιο: Είναι το αιθέριο έλαιο, το οποίο λαμβάνεται από την απόσταξη της μαστίχας (Σαββίδης, 2000). Το μαστιχέλαιο χρησιμοποιείται από εταιρείες καλλυντικών και αρωμάτων τόσο ως άρωμα ως και ως σταθεροποιητής αρώματος. Ταυτόχρονα αυξάνεται ολοένα και περισσότερο η χρήση του στη μαγειρική, στη ζαχαροπλαστική και στην παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής. Η ποιότητα της μαστίχας καθορίζει και την απόδοση σε μαστιχέλαιο.

Μαστιχόνερο: Παραλαμβάνεται από τη μαστίχα μέσω απλής απόσταξης με ατμό. Το μαστιχόνερο αποστάζει μαζί με το φυσικό μαστιχέλαιο και διαχωρίζεται από την ελαιώδη φάση με απλή διαδικασία διαχωρισμού φάσεων. Είναι φυσικά αρωματισμένο νερό το οποίο μεταφέρει το αυθεντικό άρωμα μαστίχας και όλες τις ευεργετικές της ιδιότητες, καθώς είναι διαλυμένη σε αυτό μικρή ποσότητα μαστιχελαίου. Χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό, την ενυδάτωση και την περιποίηση του προσώπου, ενώ προτείνεται και για χρήση στη μαγειρική, ζαχαροπλαστική, αρτοποιία και ποτοποιία.

Κολοφώνιο: Είναι η ρητινώδης ουσία που απομένει μετά την απομάκρυνση του αιθέριου ελαίου από την μαστίχα (Σαββίδης, 2000). Χρησιμοποιείται για την παρασκευή χειρουργικών νημάτων (ράμματα), τα οποία απορροφώνται από τον οργανισμό. Επίσης, χρησιμοποιείται στην παρασκευή συνθετικού καουτσούκ, ελαστικών πλαστικών, τεχνητών δερμάτων, βερνικιών, χρωμάτων κλπ.

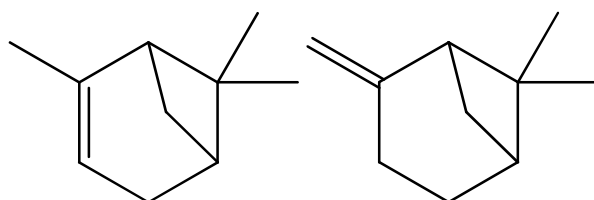
1.6.4 Χημική σύσταση του μαστιχέλαιου

Κατά την έκκρισή της η περιεκτικότητα της μαστίχας σε μαστιχέλαιο είναι 17-20%, ενώ τρεις μέρες μετά τη συλλογή της η παραπάνω περιεκτικότητα μειώνεται στο 14% (Σαββίδης, 2000). Περαιτέρω αύξηση του χρόνου παραμονής ελαττώνει την περιεκτικότητα, παρότι το φαινόμενο αυτό μπορεί να καθυστερήσει με την ψύξη του προϊόντος.

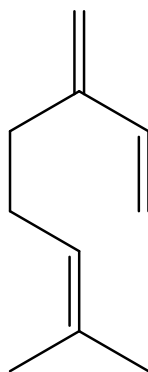
Το μαστιχέλαιο παρεμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και αναστέλλει τη διαδικασία της αγγειογένεσης *in vitro* και *in vivo* (Loutrari et al, 2006). Ακόμη, πρόσφατη έρευνα των Moulos et al. το 2009 στο μοριακό μηχανισμό της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε ότι η έκθεση καρκινωμάτων του πνεύμονα Lewis

σε μαστιχέλαιο προκαλεί αλλαγή στην έκφραση 925 γονιδίων.

Τα κυριότερα συστατικά του μαστιχέλαιου είναι το α -πινένιο (περιεκτικότητα 77%) και το β -μυρκένιο (12%), τα οποία είναι υπεύθυνα για τα κύρια χαρακτηριστικά του το έντονα διαπεραστικό άρωμα της μαστίχας. Σε πολύ μικρότερα ποσοστά περιέχονται διάφορες αλκοόλες (λιναλοόλη 0,48%, περιλλυλ-αλκοόλη 0,84% και α -τερπινεόλη 0,35%) και αλδεΐδες που συμβάλλουν στη διαμόρφωση του αρώματος του ελαίου (Skouridou, 2001)



Εικόνα 8. (α) α -πινένιο, (β) β -πινένιο



Εικόνα 9. β -μυρκένιο

Ωστόσο περιέχει και πολλά ακόμη συστατικά τα οποία είναι τα εξής: α -θουαγένιο, α -πινένιο, φενχένιο, καμφένιο, εξανάλη, β -ινένιο, σαμπινένιο, βερμπενένιο, βήτα-μυρσένιο, δ -3-καρένιο, α -φελλανδρένιο, 1,4-κινεόλη, α -τερπινένιο, λεμονένιο, 1,8-κινεόλη, β -φελλανδρένιο, 2-πεντυλοφουράνιο, *cis*-οκιμένιο, εποξειδίο του οκιμενίου, γ -τερπινένιο και *trans*-οκιμένιο, 2-βινυλο-3,5-διμεθυλοφουράνιο, π -κυμένιο, τερπινολένιο και 2-οκτανόλη, οκτανάλη, *o*-κυμένιο, 6-μεθυλο-5-επτεν-2-όνη, 2-εννεανόνη, εννεανάλη, μεθυλο-*o*-κρεσόλη, καμφοραλδεΐδη, περιλλένιο, δευδρο- π -κυμένιο, α -κοπαένιο, καμφόρα, πινοκαμφόρα, λιναλοόλη, οξικός λιναλυλεστέρας, δ -καδινένιο, οξικός βορνυλεστέρας, β -καρνοφυλλένιο, τερπινεν-4-όλη, 2-ενδεκανόνη, μυρτενάλη, *trans*-σαμπινόλη, *trans*-περιλλυλική αλκοόλη, *trans*- π -μενθα-2,8-διεν-1-όλη, οξικός χρυσανθενυλεστέρας, α -διυδρο- π -κυμεν-8-όλη, α -χουμουλένιο, καρβόνη, σαντανόλη, νεράλη, *cis*-περιλλυλική αλκοόλη, βερμπενόνη, γ -μουουρολένιο, α -τερπινεόλη, βορνεόλη, πιπεριτόνη. (Magiatis et al., 1999)

1.6.5 Αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας

Η μαστίχα Χίου φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό αντιμικροβιακό, αντινεοπλασματικό, αντιοξειδωτικό και αντιφλεγμονώδη ρόλο. Η αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών. Σε ό,τι αφορά τη στοματική υγιεινή, η μάζη της συμβάλλει στην αντισηψία του στόματος (Topitsoglou-Themeli et al., 1984). Η ομάδα των Aksoy et al., το 2006 δείχνει την αντιμικροβιακή δράση της μαστίχας έναντι του *Streptococcus mutans* που προκαλεί τερηδόνα. Ακόμη έχει βρεθεί ότι αφαιρεί ή περιορίζει σημαντικά το σχηματισμό των μικροβιακών πλακών και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ενάντια στην κακοσμία του στόματος και την ουλίτιδα (Sterer, 2006). Ωστόσο έχουν μελετηθεί και οι αντιμικροβιακές δράσεις της μαστίχας σε όλη τη γαστρεντερική οδό. Αρκετές είναι οι μελέτες που αφορούν στη δράση της ρητίνης εναντίον του *Helicobacter pylori*, ενός gram (-) και αερόβιου βακτηρίου που ευθύνεται για την εμφάνιση χρόνιας ενεργούς γαστρίτιδας (Peek and Crabtree, 2006). Η μαστίχα Χίου φαίνεται να έχει ευεργετικές επιδράσεις στην καταπολέμηση του *H. Pylori* (Marone et al, 2001), αν και τα αποτελέσματα άλλων ερευνών είναι αντικρουόμενα και δε συνάδουν με αυτά των Marone et al (Louhglin et al, 2003; Bebb et al, 2003). Τελευταία μελέτη των Paraschos et al., (2007) αναφέρουν μείωση στις αποικίες του *Helicobacter pylori* σε μύες και την αποδίδουν πιθανώς στα τριτερπένια του όξινου κλάσματος της μαστίχας. Το μαστιχέλαιο χαρακτηρίζεται επίσης από αντιμικροβιακές ιδιότητες. Εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς του σε μονοτερπένια καταπολεμά in vitro βακτήρια, όπως τα *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis* (Koutsoudaki et al, 2005).

1.7 Εδώδιμες επικαλύψεις στη συντήρηση φρούτων και λαχανικών

1.7.1 Ιστορικό

Ο ορισμός ‘εδώδιμη επικάλυψη’ σημαίνει μια λεπτή στρώση εδώδιμης ουσίας που εφαρμόζεται πάνω σε τρόφιμα και δημιουργεί ένα φράγμα στη μετακίνηση αερίων και υδρατμών, προστατεύοντας με αυτό το τρόπο το προϊόν από απώλειες υγρασίας και μολύνσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς (Baldwin, 1994, Guilbert et al., 1996). Στην Κίνα οι πρώτες εδώδιμες επικαλύψεις εφαρμόστηκαν πριν από 800 χρόνια σε πορτοκάλια και σε λεμόνια (Hardenburg, 1967b). Οι επικαλύψεις αυτές είχαν προκαλέσει αναερόβια αναπνοή. Στην Αμερική η εμπορική χρήση των συνθετικών κηρωτικών στα φρούτα και λαχανικά άρχισε τη δεκαετία του 1930, με σκοπό τη μείωση της απώλειας νερού και τη βελτίωση της εμφάνισης (Kaplan, 1986).

Σχετικά πρόσφατα, η χρήση των εδώδιμων επικαλύψεων άρχισε να αποκτά και άλλες διαστάσεις και η δράση τους επεκτάθηκε στην τροποποίηση των φυσιολογικών διεργασιών, όπως της αναπνοής. Με αυτό το τρόπο, οι εδώδιμες επικαλύψεις βρίσκουν εφαρμογή στην επιμήκυνση της μετασυλλεκτικής ζωής φρούτων και λαχανικών με τον ίδιο τρόπο με τον οποίον δρουν οι συσκευασίες με ημιπερατή μεμβράνη για τη δημιουργία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (TA) (Kester and Fennema, 1986). Σήμερα οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες, όπως και διάφοροι συνδυασμοί τους βρίσκουν χρήση τόσο στα φρούτα και τα λαχανικά, όσο και σε άλλου είδους τροφές, όπως για παράδειγμα φουντούκια και κρέατα (Kester and Fennema, 1986). Βρέθηκε ότι οι ουσίες αυτές δρουν ως φράγματα στη διαπερατότητα των αερίων δια μέσου του φλοιού των μήλων και των αχλαδιών, μειώνοντας με αυτό το τρόπο την αναπνοή (Smock, 1935).

Επίσης, οι εδώδιμες επικαλύψεις μπορούν να διατηρήσουν αναλλοίωτη την υφή και τη τραγανότητα διαφορετικών συστατικών μερών που υπάρχουν σε τρόφιμα, όπως για παράδειγμα στην πίτσα. Άλλο πλεονέκτημα των εδώδιμων επικαλύψεων είναι ότι παρεμποδίζουν τη μετακίνηση των λιπαρών από ένα συστατικό μέρος των τροφίμων σε άλλο (Nelson and Fennema, 1991). Οι επικαλύψεις αυτές μπορούν να βελτιώσουν τις μηχανικές ιδιότητες των τροφίμων όπως επίσης και να παρέχουν επιπλέον προστασία από τους τραυματισμούς στα φρούτα και τα λαχανικά. Επιπρόσθετα, μπορούν να ενσωματώσουν διάφορες ουσίες που βελτιώνουν την ποιότητα και την εμφάνιση, όπως χρωστικές, αρωματικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και άλλες ουσίες (Donhowe and Fennema, 1994).

1.7.2 Σύσταση και ιδιότητες των εδώδιμων επικαλύψεων που χρησιμοποιούνται για επικάλυψη φρούτων και λαχανικών

Τα συστατικά των εδώδιμων επικαλύψεων μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες ουσιών: υδροκολλοειδή, λιπαρές και σύνθετες. Στα υδροκολλοειδή ανήκουν διάφοροι πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες. Οι λιπαρές ουσίες είναι κηροί, ακυλογλυκερόλες και λιπαρά οξέα. Οι σύνθετες επικαλύψεις περιέχουν ουσίες από τις δύο προηγούμενες ομάδες και μπορούν να εφαρμοστούν σε μια ή δύο στρώσεις (Donhowe and Fennema, 1994).

1.7.2.1 Είδη εδώδιμων επικαλύψεων

A. Υδροκολλοειδή

Τα υδροκολλοειδή είναι πολυμερή με μακρά αλυσίδα που διαλύονται ή διασκορπίζονται στο νερό

αυξάνοντας το ιξώδες του διαλύματος. Συγκεκριμένα, για τη βιομηχανία τροφίμων, είναι σημαντικό το γεγονός ότι οι πολυσακχαρίτες είναι διαθέσιμοι σε μεγάλες ποσότητες, συνήθως χαμηλού κόστους και δεν είναι τοξικοί (*Donhowe and Fennema, 1994*). Οι επικαλύψεις που έχουν αυτές τις ουσίες ως βάση, δεν παρέχουν προστασία από τις απώλειες υγρασίας λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα τους αλλά έχουν πολύ καλές ιδιότητες στην παρεμπόδιση της περατότητας των αερίων (*Gennadios et al., 1994; Baldwin et al., 1997*). Ωστόσο, η προσθήκη ενός πλαστικοποιητή ή η προσρόφηση του νερού από το υδρόφιλο πολυμερές αυξάνει την κινητικότητα της αλυσίδας του πολυμερούς και οδηγεί στην αύξηση της περατότητας των αερίων (*Banker, 1966*). Οι πολυσακχαρίτες που εφαρμόστηκαν μέχρι τώρα σε νωπά φρούτα και λαχανικά είναι η κυτταρίνη και τα παράγωγά της, οι πηκτίνες, το άμυλο, η χιτοσάνη και το κόμμι (*Nisperos-Carriedo, 1994*). Οι ουσίες TAL Pro-long, Semperfresh και Nature Seal είναι εμπορικά σκευάσματα που έχουν ως βάση την κυτταρίνη, ενώ το Nutri Save παρασκευάζεται από χιτοσάνη.

Οι πρωτεΐνες που έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν μεμβράνες είναι η ζεΐνη του καλαμποκιού, η γλουτένη του σιταριού, η πρωτεΐνη της σόγιας, η καζεΐνη του γάλακτος, οι πρωτεΐνες του ορού γάλακτος και άλλες. Οι περισσότερες από αυτές δοκιμάστηκαν και σε τρόφιμα. Οι επικαλύψεις που έχουν ως βάση τις πρωτεΐνες έχουν καλές ιδιότητες ως παρεμποδιστές της περατότητας των αερίων αλλά δεν παρέχουν προστασία από τις απώλειες υγρασίας λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα τους (*Gennadios et al., 1994; Gennadios and Weller, 1990; McHugh and Krochta, 1994a, b*).

B. Λιπαρά

Η χρήση των λιπαρών ουσιών βασίζεται στις υδρόφοβες ιδιότητές τους οι οποίες τις καθιστούν καλούς παρεμποδιστές στη μετακίνηση της υγρασίας. Επίσης, οι ουσίες αυτές προσδίδουν σε πολλές περιπτώσεις γυαλάδα στους καρπούς. Ο *Hernandez (1994)* αναφέρεται σε πολλές λιπαρές ουσίες που κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν σε τρόφιμα, όπως: τα carnauba, candelilla και το κερί των μελισσών. Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα – που παράγονται από φυτικά έλαια, όπως και τα μονογλυκερίδια - παράγωγα της γλυκερίνης - που χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Τέλος, οι ρητίνες, όπως το shellac και η ρητίνη πεύκου, προσφέρονται ως φράγμα στη μετακίνηση αερίων και παρέχουν μέτρια προστασία στη μετακίνηση υγρασίας (*Hagenmaier and Baker, 1995; Hagenmaier and Shaw, 1991, 1992*).

Γ. Σύνθετες επικαλύψεις

Οι επικαλύψεις αυτές μπορούν να εφαρμοστούν σε μια ή δύο στρώσεις και συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των υδρόφοβων λιπαρών ουσιών που μειώνουν την απώλεια υγρασίας και των υδρόφιλων πολυσακχαριτών ή πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από καλές ιδιότητες στην

παρεμπόδιση της περατότητας των αερίων (*Hernandez, 1994*). Οι *Vargas et al.* (2006) εφάρμοσαν στις φράουλες διάλυμα χιτοσάνης και ολεϊκού οξέος και παρατήρησαν ότι αυτός ο συνδυασμός βελτίωσε τη συνεκτικότητα της σάρκας, διατήρησε το χρώμα, μείωσε τις απώλειες από τη σήψη και τροποποίησε την εσωτερική ατμόσφαιρα των καρπών. Οι *Nisperos-Carriedo et al.* (1990) δημιούργησαν γαλακτώματα με κερί μελισσών ή φυτικά έλαια σε συνδυασμό με το σκεύασμα TAL Pro-Long και η εφαρμογή τους σε πορτοκάλια είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρηση ή ακόμα και την αύξηση των πτητικών ουσιών στο χυμό.

1.7.2.2 Προβλήματα που προκύπτουν στην εφαρμογή εδώδιμων επικαλύψεων

Η εφαρμογή των εδώδιμων επικαλύψεων μπορεί να έχει και αρνητικά αποτελέσματα στην ποιότητα των νωπών προϊόντων (φρούτων και λαχανικών). Η τροποποίηση της εσωτερικής ατμόσφαιρας των καρπών μπορεί να επιδεινώσει την εμφάνιση των ανωμαλιών που σχετίζονται με την υψηλή συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα και τη χαμηλή συγκέντρωση του οξυγόνου, ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες (*Hagenmaier and Shaw, 1992*). Από την έρευνα του *Smock* (1940), παρατηρήθηκε ότι η χρήση των επικαλύψεων στα μήλα και τα αχλάδια είχε κατασταλτική δράση στην ωρίμανση και στην αναπνοή με αποτέλεσμα τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών.

1.7.2.3 Επιδράσεις των εδώδιμων επικαλύψεων στην ποιότητα φρούτων και λαχανικών

Οι εδώδιμες επικαλύψεις δρουν ως φράγματα στη μετακίνηση των αερίων και υδρατμών, βοηθάνε στη διατήρηση ή ακόμα και στην αύξηση των πτητικών ουσιών, μειώνουν τις απώλειες υγρασίας, ενώ ταυτόχρονα περιορίζουν την ανταλλαγή των αερίων ανάμεσα στο προϊόν και το περιβάλλον δημιουργώντας με αυτό το τρόπο συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Οι συνθήκες αυτές (μειωμένη συγκέντρωση οξυγόνου και αυξημένη συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα) επιβραδύνουν το ρυθμό αναπνοής και την παραγωγή αιθυλενίου (*Sisler and Wood, 1988*).

1.7.2.4. Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φράγμα στην κίνηση αερίων – δημιουργία τροποποιημένης ατμόσφαιρας

Ο μηχανισμός με τον οποίον οι επικαλύψεις διατηρούν την ποιότητα των φρούτων και λαχανικών βασίζεται στη τροποποίηση της ατμόσφαιρας στο εσωτερικό του καρπού. Με αυτό το τρόπο, η επικάλυψη περιορίζει τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου, αυξάνει την εσωτερική συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα και προκαλεί μείωση του ρυθμού αναπνοής (*Kester nad Fennema, 1986*;

Smith et al., 1987). Εκτός από το ρυθμό αναπνοής, η μειωμένη συγκέντρωση του οξυγόνου (κάτω του 8%) και η αυξημένη συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα (πάνω από 5%) αναστέλλουν την παραγωγή αιθυλενίου και συνεπώς, την ωρίμανση (*Kader, 1986*). Με αυτό το τρόπο παρατείνεται η ‘ζωή στο ράφι’ των καρπών. Στις πιπεριές για παράδειγμα, η αυξημένη εσωτερική συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα (προϊόν αναπνοής που εγκλωβίστηκε στο εσωτερικό του καρπού εξαιτίας της επικάλυψης) και η μειωμένη εσωτερική συγκέντρωση του οξυγόνου είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση της αναπνοής και την επιβράδυνση της γήρανσης (*Lerdthanangkul and Krochta, 1996*).

1.7.2.5 Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φράγμα στην κίνηση υδρατμών–μείωση απώλειας υγρασίας

Στα λαχανικά, όπως και στα φρούτα, παρατηρείται απώλεια υγρασίας κατά τη φυσιολογική διεργασία που ονομάζεται διαπνοή. Τα περισσότερα νωπά προϊόντα έχουν στην επιφάνειά τους μια φυσική προστατευτική επικάλυψη – την εφυμενίδα, που αποτελείται από κηρούς και ρητίνες με χαμηλή περατότητα στην υγρασία. Αυτή η επικάλυψη συχνά απομακρύνεται με το πλύσιμο (*Hagenmaier and Baker, 1993*) ή με άλλες μεταχειρίσεις στα συσκευαστήρια, αυξάνοντας με αυτό το τρόπο τις απώλειες υγρασίας. Ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη μείωση των απωλειών αυτών είναι η χρησιμοποίηση των εδώδιμων επικαλύψεων (*Kester and Fennema, 1986*). Πολύ καλά αποτελέσματα στη μείωση της απώλειας υγρασίας σε πολλά νωπά προϊόντα έδειξαν διάφορα λιπαρά και έλαια, μέτρια αποτελέσματα παρουσίασαν οι λιγότερο υδρόφοβες ουσίες όπως το shellac, ενώ οι υδρόφιλες ουσίες, όπως οι υδατάνθρακες και οι πρωτεΐνες, δεν παρέχουν σημαντική προστασία από την απώλεια υγρασίας (*Hagenmaier and Shaw, 1990*). Η περατότητα των επικαλύψεων στους υδρατμούς εξαρτάται όχι μόνο από τα συστατικά τους αλλά και από τους παράγοντες του περιβάλλοντος, όπως η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία, και επομένως οι επικαλύψεις πρέπει να δοκιμάζονται σε συνθήκες του περιβάλλοντος όπου διατηρείται το προϊόν.

1.7.2.6. Επίδραση των εδώδιμων επικαλύψεων στην εκδήλωση φυσιολογικών ανωμαλιών

Η τροποποίηση της εσωτερικής ατμόσφαιρας των καρπών μπορεί να έχει επίδραση και στην εκδήλωση φυσιολογικών ανωμαλιών. Πολύ υψηλή συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα και χαμηλή συγκέντρωση του οξυγόνου μπορούν να επιδεινώσουν την εκδήλωση της εσωτερικής κατάρρευσης της σάρκας του μήλου, όπως παρατηρήθηκε στα μήλα ποικιλίας ‘*Breaburn*’ επικαλυμμένα με shellac (*Bai et al., 2003b*), αλλά μπορούν επίσης να περιορίσουν το επιφανειακό έγκαυμα (*Miszczak, 1994*).

1.7.2.7. Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φράγμα στην είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών

Οι εδώδιμες επικαλύψεις παρέχουν ένα φράγμα στην είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών και ειδικότερα καλύπτουν τις ουλές αποκοπής των ποδίσκων, των φύλλων κλπ., τις αμυγές και τις πληγές που τυχόν δημιουργούνται με τις διάφορες εργασίες της συγκομιδής, διαλογής και συσκευασίας και κάνουν την επιφάνεια των καρπών πιο λεία μειώνοντας την πιθανότητα τραυματισμού (*Hardenburg, 1967b*). Με τον τρόπο αυτό περιορίζονται και τα σημεία εισόδου των παθογόνων μικροοργανισμών.

1.7.2.8. Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φορείς ουσιών για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών στα νωπά προϊόντα (φρούτα και λαχανικά)

Η εφαρμογή των εδώδιμων επικαλύψεων σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να μειώσει το ποσοστό σήψης σε σύγκριση με το μάρτυρα. Συγκεκριμένα, από την έρευνα των *Baldwin et al.* (1996), βρέθηκε πως η επικάλυψη αγγουριών με *capnauba* μείωσε την εμφάνιση της σήψης σε σύγκριση με τους καρπούς χωρίς επικάλυψη. Επίσης, οι *Ju and Curry* (2000) μείωσαν την εμφάνιση της σήψης σε καρπούς αχλαδιάς ποικιλίας 'd'Anjou' καλύπτοντάς τους με έλαιο καλαμποκιού. Η χιτοσάνη, εκτός από την ιδιότητά της να δημιουργεί μεμβράνη, δρα και κατά των μυκήτων, όπως αναφέρεται στις εργασίες των *Stossel and Leuba* (1984) και *Romanazzi et al.* (2003). Εκτός των παραπάνω, οι εδώδιμες επικαλύψεις μπορούν με επιτυχία να συνδυαστούν με ζύμες ή βακτήρια που δρουν ανταγωνιστικά προς τους παθογόνους μύκητες. Ένα παράδειγμα είναι η μείωση της σήψης όταν χρησιμοποιήθηκε ο μύκητας *Candida saitoana* σε συνδυασμό με γλυκολη της χιτοσάνης σε μήλα και εσπεριδοειδή (*El Ghaouth et al., 2000*).

1.7.2.9. Οι εδώδιμες επικαλύψεις ως φορείς πρόσθετων ουσιών βελτίωσης της ποιότητας

Πρόσθετες ουσίες, που έχουν ως στόχο τη βελτίωση της εμφάνισης του προϊόντος (του χρώματος, της γεύσης, της υφής), όπως και τη βελτίωση των μηχανικών χαρακτηριστικών των ίδιων των επικαλύψεων (αντοχή, ελαστικότητα, προσκόλληση) ενσωματώνονται με επιτυχία στις επικαλύψεις. Ένα παράδειγμα είναι και η πρόσθεση δύο συντηρητικών, του σορβικού καλίου και του βενζοϊκού νατρίου σε διάλυμα του σκευάσματος Nature Seal σε κομμένες πατάτες (*Baldwin et al., 1996*). Οι ουσίες αυτές διατήρησαν καλύτερα το χρώμα και μείωσαν το μικροβιακό πληθυσμό απ' ότι όταν εφαρμόστηκαν ως υδατικό διάλυμα. Άλλες ουσίες, όπως αντιοξειδωτικά (*Baker et al., 1994*), ανόργανα στοιχεία όπως το ασβέστιο (*García et al., 1996*) και φυτοορμόνες όπως αυξίνες, γιββερελίνες και πολυαμίνες (*Salunkhe and Wu, 1974*) μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν μαζί με

τις εδώδιμες επικαλύψεις.

1.8 Εδώδιμες επικαλύψεις από εναλλακτικές πηγές (φυσικά συστατικά)

A. Χιτοσάνη

Μια αρκετά δοκιμασμένη υδροκολλοειδής επικάλυψη είναι η χιτοσάνη. Παράγεται με αποακετυλίωση της χιτίνης, ενός πολυσακχαρίτη που βρίσκεται σε αφθονία στη φύση και ειδικότερα στα οστρακοειδή, και επομένως θεωρείται ότι η χιτοσάνη είναι ήδη μέρος της διατροφικής αλυσίδας μας. Είναι κατάλληλη ως συστατικό τροφίμων (Arai *et al.*, 1968) και τοποθετείται στο ίδιο επίπεδο κινδύνου με το αλάτι και τη ζάχαρη. Ως πολυμερές, η χιτοσάνη δημιουργεί εύκολα μεμβράνες με καλές μηχανικές ιδιότητες, οι οποίες είναι ημιπερατές σε αέρια, γεγονός που σημαίνει πως η χιτοσάνη μπορεί να τροποποιεί την εσωτερική ατμόσφαιρα των καλυμμένων φρούτων και λαχανικών και να μειώνει την αναπνοή (Arai *et al.*, 1968; García *et al.*, 2004). Οι μεμβράνες αυτές έχουν σχετικά υψηλή περατότητα σε υδρατμούς (Vargas *et al.*, 2006). Η χιτοσάνη ως μεμβράνη έχει δοκιμαστεί σε τομάτες (El Ghaouth *et al.*, 1992b), ροδάκινα, ασιάτικα αχλάδια, ακτινίδια (Du *et al.*, 1997), φράουλες (El Ghaouth *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2004; Hernández-Muñoz *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006), longan (Jiang and Li, 2001) και litchi (Dong *et al.*, 2004). Από τις έρευνες αυτές προέκυψε πως η χιτοσάνη προκαλεί μείωση της αναπνοής και της παραγωγής αιθυλενίου, αύξηση της εσωτερικής συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα, μείωση της εσωτερικής συγκέντρωσης του οξυγόνου, διατήρηση της σκληρότητας των καρπών, της τιτλοδοτούμενης οξύτητας και του βασικού χρώματος, μείωση των απωλειών βάρους και μείωση της φθοράς από παθογόνους μικροοργανισμούς. Η χιτοσάνη έχει επίσης και αντιμυκητιακή δράση (Hirano and Nagao, 1989; El Ghaouth *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2004) και μπορεί να προκαλέσει τη βιοσύνθεση ενός αμυντικού ένζυμου, της χιτινάσης (Mauch *et al.*, 1984). Οι Benhamou *et al.* (1994) διαπίστωσαν ότι η χιτοσάνη επάγει αμυντική αντίδραση του φυτού της τομάτας κατά την σήψη λαιμού και ριζών που προκαλεί ο μύκητας *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

B. Πουλουλάνη

Η πουλουλάνη είναι μια υδροκολλοειδής ουσία που χάρη στις ιδιότητες που διαθέτει αναμένεται να βρει ευρύτερα εφαρμογή στη συντήρηση τροφίμων. Η ουσία αυτή είναι ένας υδατοδιαλυτός εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης ο οποίος παράγεται από άμυλο κατά την καλλιέργεια του μύκητα *Aureobasidium pullulans*. Ο καθαρός πολυσακχαρίτης είναι μια λευκή, άμορφη, μη υγροσκοπική σκόνη η οποία διαλύεται τόσο σε ζεστό όσο και σε κρύο νερό. Η πιο σημαντική ιδιότητα της πουλουλάνης είναι η ικανότητά της να δημιουργεί μεμβράνες πολύ μικρής περατότητας σε

οξυγόνο. Οι μεμβράνες της πουλουλάνης έχουν και πολλά άλλα πλεονεκτήματα - είναι άχρωμες, άγευστες, άοσμες, διαφανείς και εύκαμπτες (ελαστικές). Επίσης, η πουλουλάνη είναι ακίνδυνη για τον άνθρωπο (Yuen, 1974). Στην Ιαπωνία έχει βρει χρήση ως εδώδιμη συσκευασία για έτοιμα τρόφιμα (noodles) (Kimoto et al., 1997), ενώ στις ΗΠΑ είναι συστατικό των ειδών στοματικής υγιεινής 'Listerine Pocket Packs' (Shingel, 2004). Όταν η πουλουλάνη είναι βασικό συστατικό του διαλύματος, αναστέλλεται η δράση οποιουδήποτε μύκητα (Yuen, 1974; Yoneyama et al., 1990). Η πουλουλάνη έχει χρησιμοποιηθεί ως γαλάκτωμα μαζί με στεαρικό οξύ και πρωτεΐνες σόγιας για επικάλυψη ακτινιδίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (Xu et al., 2001), όπως και σε φράουλες και ακτινίδια σε θερμοκρασία 25 °C (Diab et al., 2001). Στα ακτινίδια προκάλεσε αύξηση της εσωτερικής συγκέντρωσης του αιθυλενίου και των διαλυτών στερεών συστατικών και μείωση της αντίστασης της σάρκας στην πίεση, ενώ στις φράουλες είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της εσωτερικής συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα, τη μείωση της εσωτερικής συγκέντρωσης του οξυγόνου και τη διατήρηση του χρώματος και της σκληρότητας (Diab et al., 2001).

Γ. Κερί μελισσών

Το κερί μελισσών αποτελείται από 71% εστέρες, 15% υδρογονάνθρακες, 8% λιπαρά οξέα και 6% απροσδιόριστες ουσίες (Tulloch, 1970) και χρησιμοποιείται στα τρόφιμα σε συγκέντρωση από 0,1% (στις καραμέλες) μέχρι 0,002% (άλλες τροφές). Επίσης, η πέψη του κεριού μελισσών δεν πέπτεται από τον άνθρωπο και τα άλλα θηλαστικά, επειδή τα συστατικά του δεν υπόκεινται σε υδρόλυση από τα ένζυμα του πεπτικού συστήματος, και η υψηλή θερμοκρασία τήξης του κεριού εμποδίζει τη διάλυσή του σε θερμοκρασία σώματος (Fennema et al., 1994). Για αυτό το λόγο η αύξηση της κατανάλωσης του κεριού μελισσών δεν εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία. Το κερί μελισσών μαζί με την παραφίνη είναι οι πιο αποτελεσματικοί παρεμποδιστές της κίνησης των υδρατμών (Fennema et al., 1994; Baldwin, 2003). Το κερί μελισσών χρησιμοποιήθηκε τόσο σε πείραμα με πράσινο λεμόνι (lime) όσο και ως σύνθετη μεμβράνη μαζί με το candelilla (Bosquez-Molina et al., 2003) αλλά και με Na-καζείνες και πρωτεΐνες γάλακτος, σε πείραμα με κεράσια (Certel et al., 2004). Οι επικαλύψεις κερασιών που περιείχαν μεγαλύτερο ποσοστό κεριού μελισσών μείωσαν και σε μεγαλύτερο βαθμό την απώλεια βάρους, ενώ διατήρησαν σε πιο χαμηλά επίπεδα τα διαλυτά στερεά συστατικά και το pH, και σε πιο υψηλά επίπεδα τη τιτλοδοτούμενη οξύτητα. Επιπρόσθετα, το κερί μελισσών έχει χρησιμοποιηθεί ως σύνθετη μεμβράνη με πρωτεΐνες ορού γάλακτος για επικάλυψη μήλων τεμαχισμένων σε φέτες (Perez-Gago et al., 2006). Από όλες τις λιπαρές ουσίες που δοκιμάστηκαν, το κερί μελισσών βελτίωνε με τον καλύτερο τρόπο τις ιδιότητες των σύνθετων μεμβρανών σε ότι αφορά τη μείωση της περατότητας σε υδρατμούς (Gontard et al., 1994).

Δ. Shellac

Το shellac είναι ένα μίγμα αλειφατικών αλεικυκλικών πολυμερισμένων ύδροξυλοξέων που εκκρίνεται από το έντομο *Laecifer lacca*. Χρησιμοποιείται εμπορικά ως επικάλυψη στα κόκκινα μήλα και σε ορισμένα είδη εσπεριδοειδών (Baldwin, 2003). Ο Saftner (1999) αναφέρει πως το shellac αναστέλλει προσωρινά την παραγωγή των πτητικών ουσιών στα μήλα ποικιλίας 'Golden Delicious' αλλά όχι στα μήλα ποικιλίας 'Gala'. Και στις δύο ποικιλίες προκάλεσε αύξηση της εσωτερικής συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα και του αιθυλενίου και μείωση της εσωτερικής συγκέντρωσης του οξυγόνου, ωστόσο στα μήλα 'Golden Delicious' η μείωση του οξυγόνου κάτω από 3% προκάλεσε αναερόβια αναπνοή. Τέλος η χρήση του shellac προκάλεσε αναερόβια αναπνοή και σε πεπόνια ποικιλίας 'Malika' (Fallik et al., 2005)

Ε. Πρόπολη

Η πρόπολη είναι ρητινώδης ουσία που συλλέγουν οι μέλισσες από διάφορα είδη φυτών και φυτικών οργάνων και ειδικά από το φλοιό και τους οφθαλμούς των δένδρων. Η λεύκη είναι η κύρια πηγή της ρητίνης, αλλά οι μέλισσες συλλέγουν και άλλες ουσίες, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα, όπως για παράδειγμα ρητίνη πεύκου (Schmidt and Buchmann, 1993). Η τελική μορφή αλλά και η πλήρης χημική σύνθεση της πρόπολης ολοκληρώνεται ύστερα από κατεργασία των υλικών από τις μέλισσες, οι οποίες προσθέτουν σε αυτά σημαντικές ποσότητες κεριού αλλά και αδενικές τους εκκρίσεις (Υφαντίδης, 2005). Ο Burdock (1998) αναφέρει ότι η σύσταση της πρόπολης αποτελείται από 50% ρητίνες, 30% κεριό, 10% αιθέρια έλαια, 5% γύρη και 5% λοιπές ουσίες συμπεριλαμβανομένων και των οργανικών. Στις οργανικές ουσίες κυρίαρχη είναι η συμμετοχή τόσο των φλαβονοειδών όσο και των φαινολών. Η χημική σύσταση της πρόπολης δεν παρουσιάζει μεγάλες μεταβολές μεταξύ δειγμάτων από διάφορες περιοχές (Schmidt and Buchmann, 1993). Οι πλέον γνωστές και απόλυτα τεκμηριωμένες δράσεις της πρόπολης είναι αντιμικροβιακές, αντιμυκητικές καθώς επίσης δρα και εναντίον ιών (Lindenfelser, 1967; Ghisalberti, 1979; Grange and Davey, 1990; Hegazi et al., 2000; Sforcin et al., 2000; Kujumgiev et al., 1999). Η μυκητοκτόνος δράση της διαπιστώθηκε σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτως των χημικών της χαρακτηριστικών (Kujumgiev et al., 1999). Επιπλέον η πρόπολη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Nagai et al., 2003; Sun et al., 2000; Hegazi et al., 2002; Wang et al., 2004; Nagai et al., 2001) αλλά το μέγεθος της ισχύος της εξαρτάται από την προέλευση του δείγματος (Hegazi et al., 2002). Οι Nagai et al. (2003) αναγνώρισαν πάνω από 150 πολυφαινολικές ουσίες, ανάμεσά τους διάφορα φλαβονοειδή, το κινναμικό οξύ και παράγωγά του. Η αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδης δράση της πρόπολης οφείλεται στα φλαβονοειδή. Η πρόπολη δεν είναι τοξική για τους ανθρώπους και τα θηλαστικά εκτός από την περίπτωση υπερβολικής κατανάλωσής της (Ghisalberti, 1979). Η πρόπολη, εκτός από ιατρικούς σκοπούς, χρησιμοποιείται

για κατασκευή βιολιών, σε ανάμιξη με τον καπνό (τσιγάρα) ή διαλυμένη σε κρασιά, σε μπράντυ, ακόμη και σε ξύδι. Επίσης, χρησιμοποιείται για τη θεραπεία παθήσεων αγροτικών και κατοικίδιων ζώων (Υφαντίδης, 2005). Τέλος, σε ένα προκαταρκτικό πείραμα, ο ίδιος συγγραφέας ανέφερε ότι κατάφερε να μειώσει σημαντικά τις απώλειες βάρους σε σχέση με το μάρτυρα, εμβαπτίζοντας στιγμιαία σε αλκοολικό διάλυμα πρόπολης καρπούς τριών ποικιλιών μήλου (Υφαντίδης, 2005).

ΣΤ. Ρητίνη πεύκου

Η ρητίνη πεύκου αποτελείται από μία ομάδα όξινων ουσιών, από τις οποίες οι περισσότερες δημιουργούνται ως αντίδραση του φυτού σε τραυματισμό. Οι ουσίες αυτές συνήθως είναι χαμηλής περατότητας σε αέρια και μέτριας περατότητας σε υδρατμούς. Η ρητίνη πεύκου βρίσκει χρήση και ως επικάλυψη για τα νωπά προϊόντα (Baldwin, 2003) και έχει χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το shellac για τη διατήρηση του αρώματος και της γεύσης των μανταρινιών (Hagenmaier, 2002). Ωστόσο, ο τελευταίος συνδυασμός είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της εσωτερικής συγκέντρωσης του οξυγόνου και υποβάθμιση της γεύσης και εμφάνισης.

Η. Μαστίχα Χίου

Η μαστίχα Χίου είναι ρητίνη που εκκρίνεται από το φυτό *Pistacia lentiscus* L. var. Chia (μαστιχόδεντρο), αποτελείται από μία ομάδα όξινων ουσιών και είναι πλούσια σε αιθέρια έλαια. Η μαστίχα περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες παρόμοιας ισχύος με εκείνη της βουτυλιωμένης υδροξυανισόλης (Abdel-Rahman and Youssef, 1975). Επίσης, το εκχύλισμα της μαστίχας έδειξε σε έρευνα *in vitro* αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση.

Θ. Pro-long

Μια από τις εμπορικές επικαλύψεις που έδειξε επανειλημμένως καλά αποτελέσματα στην επιμήκυνση της συντήρησης διαφόρων φρούτων και λαχανικών είναι το σκεύασμα Pro-long, ένα μίγμα της Na-καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης, ποικίλων μονο- και διγλυκεριδίων και εστέρων λιπαρών οξέων με σακχαρόζη. Η επικάλυψη αυτή έχει δοκιμαστεί με επιτυχία σε πολλά είδη φρούτων και λαχανικών, όπως: αχλάδια (Meheriuk and Lau, 1988), μήλα (Banks, 1984b; Miszczak, 1994), μπανάνες (Banks, 1984a), μάνγκο (Dhalla and Hanson, 1988) και πράσινο λεμόνι-lime (Motlagh and Quantick, 1988) και φαίνεται πως στις περισσότερες περιπτώσεις η επικάλυψη αυτή προκαλεί αύξηση της εσωτερικής συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα, μείωση της εσωτερικής συγκέντρωσης του οξυγόνου και βελτίωση στη διατήρηση της σκληρότητας της σάρκας, του βασικού χρώματος και της τιτλοδοτούμενης οξύτητας. Φαίνεται ότι το Pro-long δεν εισχωρεί στην επιδερμίδα του καρπού αλλά δημιουργεί μεμβράνη πάνω από τα στομάτια. Ο Banks (1984b) αναφέρει πως το Pro-long μειώνει την περατότητα των στοματίων ως προς τα τρία αέρια (CO₂, O₂,

αιθυλένιο) αλλά έχει μικρή επίδραση στη διάχυση του διοξειδίου του άνθρακα μέσω της εφυμενίδας. Οι *Meheriuk and Lau* (1988) και ο *Miszczak* (1994) αναφέρουν πως η εφαρμογή του Pro-long περιόρισε το επιφανειακό έγκκαυμα σε δύο ποικιλίες αχλαδιών και μια ποικιλία μήλων.

I. Πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες, όπως η πουτρεσκίνη, η σπερμίνη και η σπερμιδίνη είναι ενώσεις που βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα των φυτών και ειδικά σε αναπτυσσόμενους ιστούς. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως οι πολυαμίνες παίρνουν μέρος σε διάφορες διεργασίες στα φυτά, από την οργανογένεση μέχρι την προστασία από της συνθήκες καταπόνησης. Ειδικότερα, δρουν κατά της γήρανσης μειώνοντας τις αλλαγές του χρώματος, αυξάνοντας τη σκληρότητα των καρπών, αναστέλλοντας την παραγωγή του αιθυλενίου και μειώνοντας το βαθμό της αναπνοής (*Valero et al.*, 2002). Η βιοσύνθεσή τους συνδέεται με τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου, καθώς έχουν μια κοινή πρόδρομο ουσία, την S-αδενοσυκομεθειονίνη, και ένα υποπροϊόν, την μεθυλοθειο-αδενοσίνη (*Kushad and Dumbroff*, 1991). Η εφαρμογή των πολυαμινών υπό πίεση προκάλεσε άμεση αύξηση της αντίστασης της σάρκας στην πίεση στα μήλα των ποικιλιών 'Golden Delicious' και 'McIntosh' αλλά δεν είχε επίδραση στην παραγωγή του αιθυλενίου (*Kramer et al.*, 1991). Το ίδιο αποτέλεσμα βρέθηκε και μετά την εφαρμογή πουτρεσκίνης υπό πίεση σε μήλα ποικιλίας 'Golden Delicious' (*Wang et al.*, 1993). Φαίνεται πως οι ουσίες αυτές δρουν μέσω της σκλήρυνσης των κυτταρικών τοιχωμάτων και όχι μέσω αλληλεπιδράσεων με τον μεταβολισμό του αιθυλενίου. Οι πολυαμίνες εφαρμόστηκαν και με συνθήκες μειωμένης πίεσης. Συγκεκριμένα, οι *Ponappa et al.* (1993) εφάρμοσαν πολυαμίνες με μειωμένη πίεση (127mmHg) για 8 λεπτά σε κομμένες φράουλες και βρήκαν ότι η σπερμίνη και η σπερμιδίνη προκάλεσαν αύξηση της σκληρότητας σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι η πουτρεσκίνη. Οι *Valero et al.* (1998) επίσης εφάρμοσαν την πουτρεσκίνη υπό συνθήκες μειωμένης πίεσης (200mmHg) για 8 λεπτά στα λεμόνια και παρατήρησαν αύξηση της αντίστασης της σάρκας στην πίεση, μείωση της απώλειας του βάρους και αναστολή των αλλαγών του χρώματος. Η εφαρμογή πουτρεσκίνης (1mM) με εμβάπτιση υπό πίεση σε ακτινίδια μείωσε αισθητά αυτοκαταλυτική παραγωγή αιθυλενίου και βελτίωσε τη συντηρησιμότητα των καρπών (*Petkou et al.*, 2003).

1.9 Παθογόνοι Μικροοργανισμοί

1.9.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Escherichia Coli*

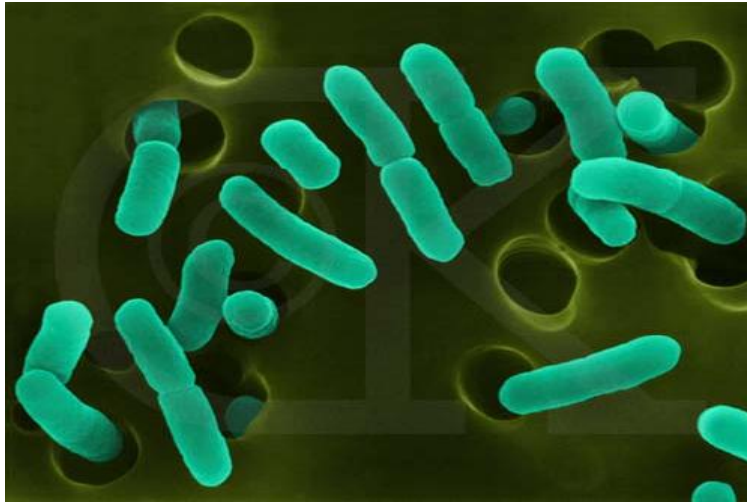
1.9.1.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Από το 1885 που απομονώθηκε αρχικά από τα παιδικά περιττώματα και περιγράφηκε από το

γερμανό μικροβιολόγο Theodor Escherich, η επιστημονική προσοχή έχει υπερεστιαστεί στο μικροοργανισμό *Escherichia coli* σε τέτοιο βαθμό ώστε σήμερα να θεωρείται πιθανώς ο πιο μελετημένος μικροοργανισμός. Η *E. Coli* είναι σχεδόν μόνιμος κάτοικος του εντέρου των ανθρώπων και άλλων θερμόαιμων ζώων όπου παρότι αποτελεί μόνο ένα μικρό μέρος της συνολικής μικροχλωρίδας είναι ο κυρίαρχος προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός. Παρά το γεγονός ότι ως συμβιώτης είναι γενικά αβλαβής, μπορεί να είναι ένα καιροσκοπικό παθογόνο προκαλώντας διάφορες μολύνσεις όπως Gram (-) σηψαιμία, μολύνσεις μέρους της ουροδόχου κύστεως, πνευμονία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και μηνιγγίτιδα στα νεογνά. Το κοινό φαινόμενο της παρουσίας της στα περιττώματα, ο γενικά μη παθογηνής χαρακτήρας της, και τα χαρακτηριστικά επιβίωσης της στο νερό οδήγησαν στην υιοθέτηση του μικροοργανισμού *E. coli* ως δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης και πιθανής παρουσίας εντερικών παθογόνων όπως το βακτήριο *Salmonella typhi* στο νερό. Αυτή η χρήση έχει μεταφερθεί στα τρόφιμα όπου μεγαλύτερη προσοχή απαιτείται στην ερμηνεία της σημασίας των θετικών αποτελεσμάτων. Στελέχη *E. coli* αναγνωρίστηκαν αρχικά ως αίτια της γαστρεντερίτιδας στα νήπια της Αγγλίας στη διάρκεια του θέρους του 1940. Έως το 1982, τα στελέχη που ευθύνονται για τη διάρροια ταξινομήθηκαν σε τρεις τύπους βασισμένους στην ικανότητά τους για πρόκληση ασθενειών (virulence):

1. Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (enteropathogenic *E. coli* - EPEC),
2. Εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E. coli* (enteroinvasive *E. coli* - EIEC), και
3. Εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (enterotoxigenic *E. coli* - ETEC).

Δεν είναι πολύ κοινές αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας στις αναπτυγμένες χώρες, αλλά σίγουρα αποτελούν μια σημαντική αιτία παιδικής διάρροιας στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες. Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη *E. coli* (ETEC) συχνά συνδέονται με την αποκαλούμενη διάρροια του ταξιδιώτη. Επιπλέον από το 1982, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) και ιδιαίτερα ο ορότυπος O157:H7 έχει αναγνωριστεί ως αίτιο επιδημιολογικών εξάρσεων αιμορραγικής κολίτιδας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (hæmolytic-uremic syndrome - HUS), ιδιαίτερα στη Βόρεια Αμερική, όπου τρόφιμα όπως ο μη επαρκώς ψημένος κιμάς, το νωπό γάλα και οι φρέσκοι χυμοί έχουν εμπλακεί.



Εικόνα 10. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που απεικονίζει τους βακίλους του βακτηρίου *E. coli*

Μια εκθετική άνοδος των κρουσμάτων του ορότυπου O157:H7 αναφέρθηκε στον Καναδά μεταξύ 1982 και 1986 και μια σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο μεταξύ 1985 και 1988 έδειξε ότι η αύξηση αυτή αποτελούσε πραγματικό γεγονός και εκεί (118 στην Αγγλία και την Ουαλία και 86 στη Σκωτία). Ο αριθμός των κρουσμάτων στο Ηνωμένο Βασίλειο συνέχισε να αυξάνεται έως το 1997 και έκτοτε κυμαίνεται μεταξύ 600 και 1000 κρουσμάτων το χρόνο. Δύο ακόμα τύποι του βακτηρίου *E. coli* αναγνωρίστηκαν ως διαρροϊκές αιτίες πρωτίστως στα παιδιά (Entero-aggregative *E. coli* – EaggEC και diffusely adherent *E. coli* - DAEC) (Giron *et al.*, 1991; Nataro και Kaper, 1998) και δρουν μέσω προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Η εμφάνιση αυτών των οροτύπων της *E. coli* απεικονίζει με μεγάλη άνεση την «ευπλαστικότητα» του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Η απόκτηση, η απώλεια ή η αναδιοργάνωση των γενετικών στοιχείων εισάγουν νέα χαρακτηριστικά παθογένειας και ικανότητας για προσβολή.

1.9.1.2 Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του

Το βακτήριο *E. coli* είναι ένα Gram (-) προαιρετικά αναερόβιο και μη σποριογόνο βακτήριο το οποίο ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Είναι θετικό στην καταλάση και αρνητικό στο τεστ της οξειδάσης ενώ τα κύτταρα έχουν μήκος περίπου 2 μικρόμετρα (μm) και 0.5 μm διάμετρο και όγκο 0.6 - 0.7 μm^3 (Kubitschek 1990) και η κίνησή τους υποβοηθείται από περίτριχα μαστίγια που διαθέτουν γύρω από το κύριο σώμα του βακίλου. Μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε μια πληθώρα υποστρωμάτων ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Λόγω του ότι πολλά μεταβολικά μονοπάτια απελευθερώνουν υδρογόνο ο μικροοργανισμός *E. Coli* συμβιώνει με μεθανογενετικούς μικροοργανισμούς ή θειοαναγωγικά βακτήρια προκειμένου οι δεύτεροι να μειώνουν τα επίπεδα υδρογόνου (Madigan

και Martinko 2006) και να καθιστούν το περιβάλλον πιο ευνοϊκό για την ανάπτυξη της *E.coli*.

Το βακτήριο *E. coli* μπορεί να διαφοροποιηθεί από άλλα μέλη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* στη βάση βιοχημικών δοκιμών. Παραδοσιακά μια σημαντική ομάδα δοκιμών χρησιμοποιούμενων για αυτόν το λόγο είναι γνωστή από το αρκτικόλεξο IMViC. Αυτό το τεστ εξετάζει τη δυνατότητα των μικροοργανισμών να:

- (i) παράγουν ινδόλιο από τρυπτοφάνη
- (ii) παράγουν επαρκή ποσότητα οξέος για να μειωθεί το pH του μέσου κάτω από 4.4 που είναι και το ισοδύναμο σημείο του δείκτη ερυθρό του μεθυλίου,
- (iii) παράγουν ακετοΐνη (ακετυλομεθυλοκαρβινόλη, και
- (iv) να χρησιμοποιήσουν το κιτρικό οξύ.

Ο μικροοργανισμός *E. coli* είναι ένα χαρακτηριστικό μεσόφιλο βακτήριο με ανάπτυξη από 7-10 °C μέχρι 50 °C με βέλτιστο περίπου στους 37 °C, αν και έχουν υπάρξει αναφορές για μερικά εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC) που αυξάνονται ακόμα και σε θερμοκρασίες της τάξης των 4 °C. Δεν παρουσιάζει καμία αξιοσημείωτη θερμοανθεκτικότητα (D_{60} ισούται με 0.1 min.) και μπορεί να επιζήσει υπό κατάλυση για εκτεταμένες περιόδους. Το βέλτιστο pH ανάπτυξής του είναι κοντά στο ουδέτερο αλλά η αύξηση είναι δυνατή ακόμα και κάτω από το pH 4.4 υπό ειδικά βέλτιστες συνθήκες. Ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού (aw) για την αύξηση είναι το 0.95. Ένα σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο για την *E.coli* βασισμένο στο σωματικό λιποπολυσακχαρίτη O, μαστίγιο H, και πολυσακχαρίτη καψιδίου αντιγόνου K προτάθηκε από τον *Kauffman* τη δεκαετία του '40. Στις μέρες μας εφαρμόζεται το O:H σύστημα κατά το οποίο οι κύριες οροομάδες καθορίζονται από τα αντιγόνα O και υποδιαιρούνται έπειτα σε ορότυπους βάσει των αντιγόνων H. Οπότε τα διάφορα στελέχη του παθογόνου *E. coli* τείνουν να εμπίπτουν σε κάποιο από τους ορότυπους O:H, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται το έργο της ταυτοποίησης και ανίχνευσης των παθογόνων καθώς επίσης και οι διάφορες επιδημιολογικές έρευνες.

1.9.1.3 Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Η κοπρανώδης μόλυνση των παροχών νερού καθώς και η επιμόλυνση που προκύπτει από μη ορθή βιομηχανική πρακτική ή χειρισμό τροφίμων είναι κάποιες από τις κύριες αιτίες που κατά καιρούς έχουν οδηγήσει σε ξεσπάσματα μαζικών τροφο-δηλητηριάσεων που προκαλούνται από στελέχη EPEC, EIEC και ETEC. Μια πληθώρα τροφίμων έχουν εμπλακεί σε τέτοιου είδους περιστατικά συμπεριλαμβανομένου ενός υποκατάστατου καφέ στη Ρουμανία το 1961, διαφόρων λαχανικών, πουρέ πατάτας αλλά και σούσι. Στις Ηνωμένες Πολιτείες κάποια μαλακά τυριά είναι αρμόδια για τις τροφο-δηλητηριάσεις του 1971 που συνδέθηκαν με EIEC κατά τις οποίες περισσότεροι από 387

άνθρωποι νόσησαν καθώς και το 1983 με εμπλοκή στελεχούς ETEC (με ανθεκτική στη θέρμανση τοξίνη). Ο μικροοργανισμός *E. coli* δεν αναμενόταν να επιβιώσει με ευκολία σε ένα ζυμούμενο γαλακτοκομικό προϊόν με pH κάτω από 5 αλλά η τοπική αύξηση του pH λόγω της διαδικασίας της ωρίμανσης διαμέσου χρήσης από τους μύκητες του γαλακτικού οξέος, έχει ως συνέπεια την παραγωγή αμινών και δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για ανάπτυξη του βακτηρίου. Τα περιστατικά που προκαλούνται από EHEC με ορότυπο O157:H7 περιλαμβάνουν κυρίως τα ελλιπώς ψημένα προϊόντα από κιμά και περιστασιακά το απαστερίωτο γάλα. Τα βοοειδή φαίνονται να είναι μια σημαντική πηγή μόλυνσης και το στέλεχος O157:H7 έχει απομονωθεί από ποσοστό 0.9 - 8.2% των υγιών βοοειδών στο Ηνωμένο Βασίλειο. Άλλες έρευνες έχουν απομονώσει το συγκεκριμένο ορότυπο από το 3.7% των δειγμάτων (6/164 δείγματα) του φρέσκου βόειου κρέατος του λιανικού εμπορίου και από ένα σημαντικό ποσοστό (1-2%) άλλων προϊόντων φρέσκου κρέατος όπως το χοιρινό κρέας, τα πουλερικά και το αρνί. Έχουν υπάρξει κάποια πολύ μεγάλου εύρους περιστατικά ανά τον κόσμο και ο δημόσιος αντίκτυπός τους ήταν συχνά δραματικός. Εξακόσιοι άνθρωποι νόσησαν και τέσσερα παιδιά πέθαναν σε μια επιδημική έκρηξη στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1993 που προκλήθηκε από τα ελλιπώς ψημένα χάμπουργκερ βόειου κρέατος. Αυτό προκάλεσε μια σημαντική δημόσια επίκριση για την υγιεινή του κρέατος και οδήγησε, μεταξύ άλλων, στην εισαγωγή νέων κανονισμών σήμανσης του κρέατος. Τον Αύγουστο του 1997, μια σωρεία περιπτώσεων στο Κολοράντο οδήγησε στη μεγαλύτερη ανάκληση τροφίμων στην αμερικανική ιστορία όταν ανακλήθηκαν περισσότεροι από 12.000 τόνοι βόειου κιμά. Ένα μεγάλο ξέσπασμα στη Σκωτία το 1996 άσκησε παρόμοια επίδραση στο Ηνωμένο Βασίλειο. Σχεδόν 500 άτομα νόσησαν και 20 ηλικιωμένοι ασθενείς απεβίωσαν. Η αιτία ήταν πιθανότατα διασταυρούμενη επιμόλυνση (crosscontamination) έτοιμων προς κατανάλωση μαγειρευμένων κρεάτων από ακατέργαστο κρέας σε ένα κρεοπωλείο και η επακόλουθη έρευνα οδήγησε σε πιο αυστηρούς κανονισμούς. Οι αποτυχίες που οδήγησαν σε αυτές τις επιδημικές εξάρσεις ήταν παραλείψεις των βασικών κανόνων υγιεινής στα τρόφιμα. Στην περίπτωση του απαστερίωτου γάλακτος και των προϊόντων από βόειο κρέας η πρωταρχική αιτία είναι μια αποτυχία στο να υποστεί το τελικό προϊόν επαρκή θερμική επεξεργασία/ψήσιμο. Από την άλλη είναι αλήθεια ότι ολόκληρα τεμάχια κρέατος όπως οι μπριζόλες μπορούν συχνά να καταναλωθούν ακίνδυνα ακόμα και όταν το εσωτερικό δεν είναι επαρκώς ψημένο αφού η μικροβιακή μόλυνση είναι συνήθως ένα φαινόμενο επιφάνειας. Ο τεμαχισμός του κρέατος, εντούτοις, θα διασπείρει τους μολυσματικούς παράγοντες επιφάνειας σε όλη τη μάζα των προϊόντων και επομένως θα χρειαστούν τη διεύθυνση της θερμότητας προκειμένου να εξασφαλιστεί μικροβιακή ασφάλεια. Εδώ να σημειωθεί ότι το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (USDA) έχει εκπονήσει κανονισμούς που διευκρινίζουν ότι το κέντρο των χάμπουργκερ βόειου κρέατος πρέπει να φθάσει στο ψήσιμο τους 71.1 °C (160 °F) στιγμιαία στην περίπτωση των καταναλωτών και τους 68.3 °C (155 °F) για 16 δευτερόλεπτα στις περιπτώσεις μαζικής εστίασης.

Περιστατικά κρουσμάτων με EHEC έχουν αναφερθεί και με άλλα τρόφιμα. Το μαρούλι έχει εμπλακεί κι αυτό σε διάφορες περιπτώσεις όπως επίσης και ο απαστερίωτος χυμός μήλων ο οποίος ήταν ο «υπαίτιος» σε ένα μεγάλο ξέσπασμα τροφο-δηλητηριάσης στις ΗΠΑ. Το καλοκαίρι του 1996, σε μια επιδημία στην Ιαπωνία πάνω από 9000 άτομα νόσησαν και 12 παιδιά πέθαναν. Η μεγαλύτερη έξαρση κατά τη διάρκεια της επιδημίας, στην πόλη Sakai περιελάμβανε 5700 ανθρώπους και ήταν συνέπεια μολυσμένων βλαστών ραδικιών και το ίδιο προϊόν ενεπλάκη σε νέα κρούσματα το επόμενο έτος. Τα περιστατικά που προκαλούνται από όξινα τρόφιμα όπως ο χυμός μήλων αλλά και τα ζυμούμενα λουκάνικα μας υπενθυμίζουν την ικανότητα των βακτηρίων να επιζήσουν για παρατεταμένες περιόδους στις χαμηλές τιμές pH που δεν επιτρέπουν την αύξηση, ειδικά όταν το προϊόν καταψύχεται. Στελέχη EHEC εμφανίζεται να έχουν μια χαρακτηριστική ικανότητα να επιζούν σε χαμηλές τιμές pH από άλλα βακτήρια και αυτό μπορεί επίσης να δικαιολογήσει και τη σχετικά χαμηλή μολυσματική δόση που έχει καταγραφεί σε διάφορα κρούσματα και κυμαίνεται από 2 έως 2000 κύτταρα.

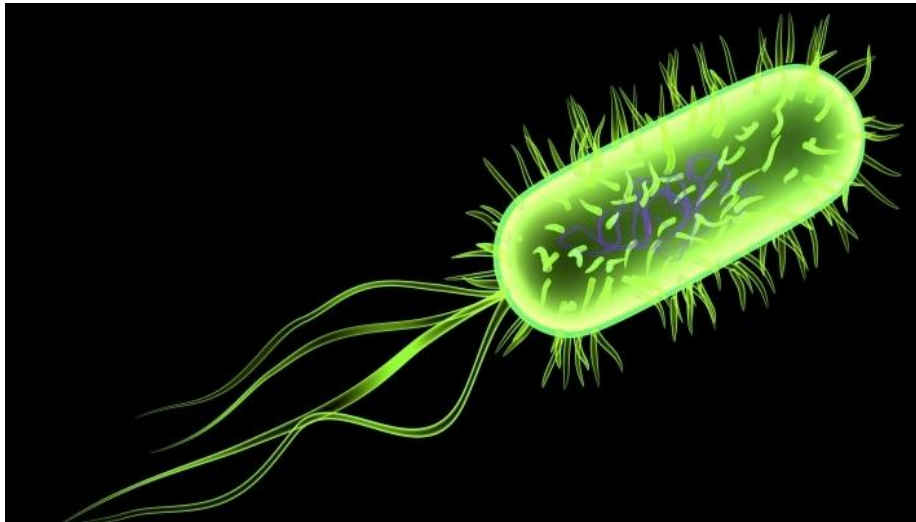
1.9.2 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

1.9.2.1 Εισαγωγή και ιστορικά στοιχεία

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, αιτία για την ανθρώπινη και ζωϊκή λιστερίωση, είναι ένας από τους πιο μελετημένους μικροοργανισμούς των τελευταίων 20 ετών. Αν και είχε γίνει αναφορά στο μικροοργανισμό από το 1891, πρώτος ο *Murray* περιέγραψε αυτό το μικροοργανισμό ως αιτία για τη ζωϊκή ασθένεια το 1926. Λόγω του ότι το παθογόνο προκαλούσε μονοκύτωση ως ένα από τα συμπτώματα, έλαβε την ονομασία *bacterium monocytogenes* η οποία στην πορεία άλλαξε σε *Listerella monocytogenes* προς τιμή του Λόρδου Lister. Η ονομασία *Listeria monocytogenes* έγινε αποδεκτή τελικά το 1940 ενώ η πρώτη απομόνωση στελέχους της *Listeria* έγινε το 1929. Εντούτοις, το ενδιαφέρον για αυτόν τον οργανισμό αυξήθηκε γρήγορα μετά από μια σειρά τροφικών κρουσμάτων κατά τη δεκαετία του '80. Το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας μεταξύ αυτών των κρουσμάτων έχει επιστήσει την προσοχή των ανθρώπων που συμμετέχουν στην υγιεινή και ασφάλεια των τροφίμων. Τεράστια ποσά γνώσης έχουν συσσωρευθεί στον τομέα της λιστερίωσης αλλά και για τον ίδιο το μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν δημοσιευθεί έρευνες σε βάθος σχετικά με τη λιστέρια και τη λιστερίωση (*Lovett, 1989; Farber και Peterkin, 1991; Roccourt και Cossart, 1997; Schlech III, 2000*).

1.9.2.2 Ο μικροοργανισμός και τα χαρακτηριστικά του

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι Gram (+), μικροαερόφιλος, μη-σποριογόνος βάκιλος, με διαστάσεις 0,4-0,5 μm διάμετρο και 0,5-2 μm μήκος. Σε καλλιέργειες 3 έως 5 ημερών απαντώνται νηματώδεις κατασκευές. Το βακτήριο *L. monocytogenes* είναι πολύ κινητικό με τη βοήθεια τεσσάρων περίτριχων μαστιγίων και χαρακτηριστικό της είναι η περιστροφική κίνηση που χρησιμοποιείται συχνά ως συμβατικός δείκτης για τον προσδιορισμό της. Ο βαθμός της κινητικότητας της εξαρτάται από τη θερμοκρασία και είναι μέγιστος όταν η θερμοκρασία αύξησης κυμαίνεται μεταξύ 20 και 25 °C. Πάνω από 37 °C η παραγωγή μαστιγίων μειώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα μείωση της κινητικότητας (Lovett, 1989; Farber και Peterkin, 1991). Αναπτύσσεται καλά στα περισσότερα κοινά θρεπτικά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου του Brain Heart Infusion broth (BHI), του Tryptic-Soy Broth με 0,6% Yeast Extract (TSBYE), το Luria broth (LB) κ.λπ.



Εικόνα 11. Τρισδιάστατη απεικόνιση του βακίλλου της *Listeria monocytogenes*.

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της είναι οι 35-37 °C αν και αυξάνεται αρκετά καλά και σε θερμοκρασίες κοντά στους 4 °C, ενώ ο ρυθμός αύξησης μειώνεται καθώς η θερμοκρασία μειώνεται. Το βέλτιστο εύρος pH είναι 5-9. Σε υποστρώματα με βάση το άγαρ οι αποικίες του βακτηρίου είναι διαφανείς με μια χαρακτηριστική γαλαζοπράσινη γυαλάδα όταν αντικρίζονται υπό κλίση. Στο Blood Sheep agar στους 37 °C, οι αποικίες είναι ελαφρώς μικρότερες σε σύγκριση με τα TSBYE ή BHI άγαρ και παράγουν μια αδύνατη ζώνη αιμόλυσης. Η *L. monocytogenes* μπορεί επίσης να αναπτυχθεί σε ορισμένα συνθετικά και ημισυνθετικά μέσα, αλλά οι ρυθμοί ανάπτυξης είναι πολύ αργότεροι σε σχέση με τα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά υποστρώματα (Lovett, 1989; Farber και Peterkin, 1991). Ο μικροοργανισμός *L. Monocytogenes* παράγει μια β-αιμολυσίνη

μοριακού βάρους 58 kDa, την λιστεριολυσίνη O, η οποία ενεργεί συνεργιστικά με την αιμολυσίνη που παράγεται από το *Staphylococcus aureus* για να προκαλέσει αυξημένη αιμόλυση στο Blood άγαρ. Αυτή η αντίδραση αποτελεί τη βάση μιας χρήσιμης διαγνωστικής δοκιμής για τη διάκριση των *L. monocytogenes* και *L. innocua*, και είναι γνωστό ως δοκιμή CAMP από τα αρχικά των Christie, Atkins, και Munch-Peterson που περιέγραψαν αρχικά το φαινόμενο με τους στρεπτοκόκκους Β ομάδας.

1.9.2.3 Συσχετισμός με τα τρόφιμα

Περιπτώσεις λιστερίωσης έχουν αναφερθεί σε σχεδόν όλα τα μέρη του κόσμου. Η τρέχουσα εκτίμηση της συχνότητας λιστεριώσεων είναι 2-15 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού (Mead *et al.*, 1999). Αυτοί οι αριθμοί περιλαμβάνουν σποραδικές αλλά και ομαδικές περιπτώσεις. Είναι σαφές ότι η ακρίβεια της εκτίμησης εξαρτάται από την ακρίβεια της διάγνωσης και την υποβολή έκθεσης συμβάντος. Η εκτίμηση των σποραδικών περιπτώσεων στις Ηνωμένες Πολιτείες γίνεται από ένα ολοκληρωμένο σύστημα επιτήρησης, το αποκαλούμενο FoodNet. Το σύστημα καλύπτει 20,5 εκατομμύρια ανθρώπους σε διάφορες Πολιτείες. Τα αποτελέσματα από τις πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες του FoodNet υπολογίζουν 2518 περιπτώσεις λιστερίωσης το χρόνο, με ένα θανατηφόρο περιστατικό περίπου 500 ασθενείς. Αυτός ο αριθμός είναι περίπου 10 περιπτώσεις ανά ένα εκατομμύριο πληθυσμού (Mead *et al.*, 1999). Η συντριπτική πλειοψηφία των σποραδικών περιπτώσεων λιστερίωσης συνδέεται με την κατανάλωση προϊόντων κρέατος και τυριών χαμηλής οξύτητας (Pinner *et al.*, 1992). Αντίθετα οι περιπτώσεις ομαδικών λιστεριώσεων συνδέθηκαν με αρκετά είδη τροφίμων. Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί ουσιαστικά από όλα τα είδη τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων φυτικής και ζωικής προέλευσης. Λόγω του ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί να επιζήσει σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι απομονώνεται από το χόμα, το νερό, και από χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Εντούτοις, για να είναι σε θέση να προκαλέσει ασθένεια, θα πρέπει τα διάφορα τρόφιμα και οι συνθήκες αποθήκευσής τους να παρέχουν ένα κατάλληλο περιβάλλον για την επιβίωση και κατά περιόδους, την ανάπτυξη της. Από διάφορα περιστατικά γίνεται σαφές ότι όλα τα τρόφιμα που συνδέθηκαν κατά το παρελθόν με πρόκληση λιστερίωσης καταναλώθηκαν χωρίς περαιτέρω επεξεργασία ή μετά από ελάχιστη θερμική επεξεργασία (π.χ. hot dog) και ότι πολλά από αυτά τα τρόφιμα παρέχουν ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (π.χ. μαλακό τυρί). Αν και όλοι οι ορότυποι *L. monocytogenes* θεωρούνται εν δυνάμει παθογόνοι, οι έρευνες δείχνουν ότι κυρίαρχοι ορότυποι είναι οι 1/2a, 1/2b και 4b κάτι το οποίο φαίνεται να ισχύει και για τις σποραδικές περιπτώσεις. Μόνο η περίπτωση λιστερίωσης ασθενών σε πτέρυγα νοσοκομείου στη Φινλανδία (1998-99) περιελάμβανε ορότυπο διαφορετικό

των 1 ή 4 (ορότυπος 3a). Δεν είναι σαφές γιατί οι άλλοι ορότυποι δεν έχουν διάδοση και δεν απομονώνονται από ασθενείς αλλά υπάρχει περίπτωση να μην καθίσταται δυνατή η επιβίωσή τους εντός των τροφίμων ή εντός του ξενιστή. Είναι επίσης πιθανό ότι τα στελέχη που ανήκουν σε αυτούς τους ορότυπους στερούνται κάποιας ουσιαστικής λειτουργίας που απαιτείται για να δημιουργήσει μόλυνση. Από την άλλη μεριά υπάρχουν διάφορες βασικές αρχές που μπορούν να υιοθετηθούν προκειμένου να μειωθεί η έκθεση στο επικίνδυνο αυτό παθογόνο. Τα αγροτικά προϊόντα θα πρέπει να παράγονται υπό συνθήκες που ελαχιστοποιούν την παρουσία *L. monocytogenes* σε αυτά και να ακολουθούνται αυστηρά οι κανόνες ορθής γεωργικής πρακτικής (GAP) καθώς και οι κανόνες ορθής βιομηχανικής πρακτικής (GMP) προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης των εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων. Η εφαρμογή του συστήματος HACCP και ορισμένων μέτρων ελέγχου επί της παραγωγικής διαδικασίας θα ήταν επίσης χρήσιμη αφού θα μείωνε περαιτέρω την πιθανότητα μόλυνσης στους χώρους παραγωγής και διάθεσης τροφίμων.

1.10 Στόχος της εργασίας

Τα επεξεργασμένα φρούτα περνούν από κάποιες διαδικασίες όπως το ξεφλούδισμα, το κόψιμο ή το κόψιμο σε λεπτές φλοίδες, με αποτέλεσμα να έχουν μεγαλύτερη λειτουργικότητα όσον αφορά την αγορά αλλά να διατηρούν και την ποιότητά τους. Η επεξεργασία των φρούτων, ωστόσο, οδηγεί στον τραυματισμό και την αλλοίωσή τους. Επίσης, η παρουσία μικροοργανισμών στη επιφάνεια τους μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ασφάλεια των κομμένων φρούτων (*Del Rosario και Beuchat, 1995; Thunberg et al., 2002*). Έτσι, ο έλεγχος της ποιότητας των φρούτων και η αποτροπή της ανάπτυξης των αλλοιογόνων και παθογόνων βακτηρίων είναι μία πρόκληση που πρέπει να αντιμετωπίσει σήμερα η βιομηχανία τροφίμων.

Στο πλαίσιο αυτό, οι εδώδιμες επικαλύψεις οι οποίες περιέχουν αντιμικροβιακές ουσίες, αποκτούν ιδιαίτερη σημασία αφού μπορούν να εφαρμοστούν στα κομμένα φρούτα και να μειώσουν τα επιβλαβή αποτελέσματα. (*Alzamora and Guerrero, 2003; Burt and Reinders, 2003*). Η χρήση των εδώδιμων επικαλύψεων για ένα ευρύ φάσμα προϊόντων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των μεταποιημένων φρούτων, έχει μεγάλο ενδιαφέρον, γιατί οι επικαλύψεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα τροφίμων με παράλληλη δράση ως χρωστικά, αρωματικά, ή θρεπτικά συστατικά, μπαχαρικά και διαφόρων αντιμικροβιακά τα οποία μπορούν να επεκτείνουν το χρόνο ζωής και να μειώσουν την ανάπτυξη παθογόνων στη επιφάνεια των τροφίμων. (*Baldwin et al., 1996; Wong et al., 1996; Cargi et al., 2004; Pranoto et al., 2005*).

Η ενσωμάτωση αντιμικροβιακών ουσιών σε εδώδιμες μεμβράνες ή επικαλύψεις αποτελεί ένα σύγχρονο τρόπο βελτίωσης της ασφάλειας και διάρκειας ζωής των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (*Cargi et al., 2004*). Μερικές από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες –για το σκοπό αυτό– αντιμικροβιακές ουσίες είναι το βενζοϊκό οξύ, το σορβικό οξύ, η λυσοζύμη, οι βακτηριοσίνες και δευτερογενείς μεταβολίτες φυτικής προέλευσης, όπως τα αιθέρια έλαια και οι φυτοαλεξίνες.

Τα αιθέρια έλαια έχουν, επίσης, αξιολογηθεί για την ικανότητά τους να προστατεύουν από παθογόνα βακτήρια μολυσμένο χυμό μήλου (*Friedman et al., 2004; Raybaudi-Massila et al., 2006*) και άλλα τρόφιμα (*Burt, 2004*). Τα αιθέρια έλαια αυτά χαρακτηρίζονται ως GRAS (*Burt, 2004*) και χρησιμοποιούνται ως ενισχυτές γεύσης σε μαγειρεμένα τρόφιμα, γλυκά, παγωτά, ποτά, τσίχλες (*Fenaroli, 1995*). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να προστεθούν σε εδώδιμες μεμβράνες και να τροποποιήσουν την γεύση, το άρωμα και την οσμή καθώς και να προσφέρει και αντιμικροβιακές ιδιότητες (*Cargi et al., 2004*). Τα αιθέρια έλαια θεωρούνται ως εναλλακτικές λύσεις στα χημικά συντηρητικά, και η χρήση τους στα τρόφιμα ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των καταναλωτών, όπως αναφέρει ο *Burt* (2004).

Η μελέτη ενσωμάτωσης των αιθερίων ελαίων είναι ένας τομέας που τώρα αρχίζει να μελετάται, με αποτέλεσμα να είναι λίγες οι σχετικές μελέτες σε τεμαχισμένα φρούτα. Ο *McHugh et al.* (1996) ανακάλυψαν την πρώτη εδώδιμη μεμβράνη από πουρέ μήλων ως ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ποιότητα και την επικίνδυνη του χρόνου ζωής των τεμαχισμένων φρούτων. Ο *Rojas-Grau* και οι συν. (2006) ανακάλυψε την επίδραση των αιθερίων ελαίων στις αντιμικροβιακές και φυσικές ιδιότητες των εδώδιμων μεμβρανών από πουρέ μήλου.

Οι μεμβράνες από αλγινικά άλατα, που περιέχουν αιθέρια έλαια, έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να αξιολογηθούν οι επιδράσεις δύο φυσικών αντιμικροβιακών (αιθέρια έλαια κανέλας και μαστίχας) ενσωματωμένα σε εδώδιμες επικαλύψεις από αλγινικά άλατα. Ως στόχοι έχουν επιλεγεί δύο βακτήρια (*Listeria monocytogenes* και *Echerichia coli*) η αναστολή ανάπτυξης των οποίων διερευνήθηκε σε τεμάχια μήλου, αχλαδιού και μπανάνας. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η επίδραση της ενσωμάτωσης δύο ποτών (λικέρ τεντούρα και μαστίχα) σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών αλάτων στα ίδια βακτήρια που είχαν εμβολιστεί σε κομμάτια μήλου, αχλαδιού και μπανάνας και συντηρηθεί στους 10 °C σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (80%N₂, 20%CO₂) .

2ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.ΥΑΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1Αιθέρια έλαια και ποτά

Τα αιθέρια έλαια κανέλας και μαστίχας που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αγοράστηκαν από ειδικό κατάστημα με καρκεύματα βότανα και μπαχαρικά της Αθήνας.

Τα ποτά είναι λικέρ Τεντούρα και λικέρ Μαστίχα αγοράστηκαν από κατάστημα με ποτά της Αθήνας. Η περιεκτικότητά τους σε αλκοόλη είναι 25%.

2.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών των αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας

Η αέρια χρωματογραφία είναι μία καλά εδραιωμένη τεχνική διαχωρισμού για την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση των συστατικών ενός δείγματος που μπορεί να υπάρχουν σε πτητική μορφή χωρίς να αποσυντεθούν. Η έκλυση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μίας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια αδρανούς στερεού.

Όταν η αέρια χρωματογραφία συνδυαστεί με φασματομετρία μαζών (MS) τότε η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης πολύπλοκων δειγμάτων. Το υπό εξέταση δείγμα αφού διαχωρισθεί στα συστατικά του εξέρχεται από τον χρωματογράφο και εισέρχεται σε αέρια κατάσταση στο MS όπου βομβαρδίζεται από ηλεκτρόνια μεγάλης κινητικής ενέργειας. Με αυτό τον τρόπο προκαλείται ιονισμός των μορίων που οδηγεί σε διάσπαση ώστε να δημιουργηθούν ιόντα μικρότερης μάζας. Μόλις αυτά δημιουργηθούν, επιταχύνονται υπό την επίδραση μαγνητικού πεδίου και ακολούθως αποκλίνουν της αρχικής τους πορείας, ανάλογα με το λόγο m/e (μάζα/φορτίο) . Το ρεύμα το οποίο παράγεται μετράται με τη βοήθεια κατάλληλου ανιχνευτή. Το διάγραμμα το οποίο θα προκύψει από την ένταση του μετρούμενου ρεύματος συναρτήσει του λόγου m/e , αποτελεί το φάσμα μαζών. Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας έναντι των άλλων τεχνικών διαχωρισμού είναι η μεγάλη ευαισθησία, η ταχύτητα και η απλότητα.

Για την ανάλυση των πτητικών συστατικών των αιθερίων ελαίων χρησιμοποιήθηκε η φάση του πετρελαϊκού αιθέρα. Τα συστατικά αυτά των αφεψημάτων αναλύθηκαν με αέριο χρωματογράφο

Hewlett Packard 5890 II ο οποίος ήταν εφοδιασμένος με τριχοειδή στήλη Rtx-5MS (30m X 0,25 mm, πάχος film 0,25 μm) και έναν ανιχνευτή φασματομέτρο μαζών Hewlett Packard 5972 (70 eV). Η θερμοκρασία στο σύστημα εισαγωγής δείγματος και στο φασματομέτρο μαζών ρυθμίστηκε στους 220 °C και στους 270 °C, αντίστοιχα. Η θερμοκρασία της στήλης αρχικά παραμένει στους 50 °C για 3 min, στη συνέχεια αυξάνεται βαθμιαία στους 180 °C με ρυθμό 3 °C/min και τελικά αυξάνεται στους 270 °C με ρυθμό 15 °C/min όπου παρέμεινε για 5 min. Ο ρυθμός ροής του ηλίου ήταν 1 mL/min. Δείγματα του 1μL εισήχθησαν χειροκίνητα με ένεση. Η αβέβαιη αναγνώριση των συστατικών βασίστηκε στη σύγκριση των σχετικών δεικτών συγκράτησης και των φασμάτων από το MS, με αυτών των βιβλιοθηκών Adams07, Wiley275, NBS75K με δεδομένα του συστήματος GC-MS και από δεδομένα της βιβλιογραφίας. Τα σχετικά % ποσοστά των συστατικών προκύπτουν ηλεκτρονικά από τα δεδομένα της % περιοχής.

Πίνακας 1. Πρότυπες ενώσεις κανέλας

α/α	Ένωση	Χρόνος κατακράτησης (min)	Εμβαδόν (%)
1	Κινναμαλδεΐδη	20,34	68,59
2	Οξικός εστέρας της 3-φαινυλό-2-προπενάλης	27,45	6,16
3	Καρυφυλλένιο	26,1	4,36
4	Ευγενόλη	23,6	3,97
5	β-Φαιλαδρένιο	9,57	2,48
6	Βενζύλιο	9,4	1,3
7	α-καρυφυλλένιο	27,45	0,85
8	Οξείδιο του καρυφυλλενίου	32,53	0,85

Πίνακας 2. Πρότυπες ενώσεις μαστίχας

α/α	Ένωση	Χρόνος κατακράτησης (min)	Εμβαδόν (%)
1	α-Πινένιο	6,5	58,49
2	β-Μυρκένιο	8,37	15,48
3	δ-Λεμονένιο	9,59	1,9
4	β-Πινένιο	12,46	1,62
5	Ουλαγένιο	24,05	0,13
6	Καρυφυλλένιο	26,05	0,9
7	Οξείδιο του καρυφυλλενίου	32,52	0,62

8	Καμφένιο	6,95	1,7
9	β-Φαιλανδρένιο	9,45	0,69

2.3 Μεταχείριση δειγμάτων φρούτων

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν μήλα, αχλάδια και μπανάνες. Τα φρούτα αγοράστηκαν από το εμπόριο. Τα μήλα ήταν ‘Red Delicious’, τα αχλάδια ήταν ‘κρυστάλλια’ και οι μπανάνες ‘Chiquita’.

Τα φρούτα τεμαχίστηκαν σε μη ασηπτικές συνθήκες και θερμοκρασία δωματίου 25 °C σε μικρά κομμάτια των 5-10g λίγο πριν εμβολιαστούν.

2.4 Παρασκευή εμβολίων

Για τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μίγμα τριών στελεχών *Escherichia coli* O157:H7 τα οποία έχουν απομονωθεί από ανθρώπινα περιττώματα και τριών στελεχών *Listeria monocytogenes*. Οι καθαρές καλλιέργειες συντηρούνταν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα (Tryptic Soy Agar, TSA) στους 4 °C και ανανεώνονταν μηνιαίως. Η ανανέωση των καλλιεργειών πραγματοποιήθηκε με αιώρηση του κάθε στελέχους σε 10 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (Tryptone Soy Broth), προκειμένου οι μικροοργανισμοί να βρίσκονται στην καλύτερη δυνατή κατάσταση από πλευράς ζωτικότητας. Για την περίπτωση της *Escherichia coli* η επώαση έγινε στους 37 °C ενώ η *Listeria monocytogenes* επώαστηκε στους 30 °C για 24 και 18 ώρες.

Έπειτα από τις 2 ανανεώσεις ακολούθησε το στάδιο του καθαρισμού του εμβολίου ενοφθαλμίσματος με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης (3600 rpm, 4 °C, 15 sec). Η μικροβιακή καλλιέργεια τοποθετήθηκε ασηπτικά σε πλαστικούς σωλήνες όγκου 10 mL και φυγοκεντρήθηκε. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος ακολούθησε έκπλυση της παραμένουσας βιομάζας με αποστειρωμένο διάλυμα Ringer, ανάδευση προς επαναιώρηση και επανάληψη της φυγοκέντρησης. Η παραπάνω διαδικασία διενεργήθηκε άλλη μια φορά προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως τα υπολείμματα θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα του μικροοργανισμού.

Ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων σε όγκο Ringer 10 mL. Τα τρία διαφορετικά στελέχη του κάθε μικροοργανισμού αναμίχθηκαν σε ίσους όγκους σε αποστειρωμένο περιέκτη χωρητικότητας 100 ml και προέκυψε τελικό εμβόλιο της τάξης των 10^8 - 10^9 cfu/ml. Με κατάλληλες αραιώσεις το

εμβόλιό μας είχε τελικό πληθυσμό 10^5 - 10^6 cfu/ml.

2.5 Εμβολιασμών δειγμάτων

Όγκος 30mL από το εμβόλιο προστέθηκε σε 2L Ringer υπο ασηπτικές συνθήκες. Ο εμβολιασμός έγινε με τη μέθοδο της εμβάπτισης των φρούτων στο Ringer με το εμβόλιο για 2 min. και ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία 4 °C για 30 min έτσι ώστε να επιτευχτεί προσκόλληση/απορρόφηση του εμβολίου.

2.6 Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών

Για την προετοιμασία των εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου ογκομετρήθηκαν 300 mL απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε θέρμανση στους 60-70 °C και προσθήκη υπό ανάδευση σκόνης αλγινικού νατρίου συγκέντρωσης 1%. Όταν διαλυτοποιήθηκε όλη η ποσότητα αλγινικού νατρίου και το διάλυμα απέκτησε κολλώδη μορφή διακόπηκε η θέρμανση και παρέμεινε έως ότου αποκτήσει θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Στη συνέχεια προστέθηκε γλυκερόλη 1% για βελτίωση των φυσικών και των μηχανικών ιδιοτήτων της μεμβράνης (αύξηση ελαστικότητας, μείωση ευθραυστότητας) καθώς και τα αιθέρια έλαια σε συγκέντρωση 0,7%, τα λικέρ και η αιθανόλη σε αναλογία 2:1 (Πίνακας 3). Ακολούθησε ομογενοποίηση σε συσκευή Ultra Turrax προκειμένου να γίνει η ενσωμάτωση του αιθέριου ελαίου και των ποτών στο διάλυμα αλγινικού νατρίου.

Παράλληλα με την παρασκευή των αντιμικροβιακών εδώδιμων μεμβρανών παρασκευάστηκαν και μεμβράνες στις οποίες δεν ενσωματώθηκε αιθέρια έλαια ή ποτά.

Πίνακας 3. Αντιμικροβιακοί παράγοντες

Εδώδιμες επικαλύψεις	Αντιμικροβιακοί Παράγοντες
A	Μάρτυρας (Control)
B	0% (Ef)
C	0,7% Αιθέριο έλαιο κανέλας (Efc)
D	0,7% Αιθέριο έλαιο μαστίχας (Efm)
E	0,7% Αιθέριο έλαιο κανέλας+Αιθέριο έλαιο μαστίχας (Efc+m)

F	25% λικέρ Μαστίχα (Efliq.1) (2:1)
G	25% λικέρ Τεντούρα (Efliq.2) (2:1)
H	25% αιθανόλη (Efa) (2:1)

Επίσης, παρασκευάστηκε χλωριούχο ασβέστιο 2% για να σταθεροποιήσει τους πολυμερές υδατάνθρακες.

2.7 Διαδικασία εμφύπτισης

1. Σε κάθε διάλυμα αλγινικού νατρίου εμφύπτιστηκαν 20 κομμάτια φρούτου για 1 min.
2. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ένα ταψί για 1 min, χωρίς να ακουμπά το ένα με το άλλο, για να είναι δυνατή η απομάκρυνση του διαλύματος.
3. Εμφύπτιστηκαν σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου 2% για 1 min.
4. Τοποθετήθηκαν για 1 min σε απορροφητικό χαρτί, χωρίς να έρχονται σε επαφή μεταξύ, έτσι ώστε να στεγνώσουν.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα τρία διαφορετικά φρούτα (μήλο, αχλάδι, μπανάνα).

Εικόνα 12. Διαδικασία εμφάνισης



2.8 Συσκευασία δειγμάτων

Μετά το πέρας της διαδικασίας της εμφάνισης των φρούτων ακολούθησε η συσκευασία των δειγμάτων. Κατά τη συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες τα δείγματα συσκευάστηκαν ανα 2 σε πλαστικούς περιέκτες διαστάσεων 250mm x 100mm, με χαρακτηριστικά υλικού: πάχος 90 mm, διαπερατότητα αερίων στους 20 °C, 25, 90 και 6cm αντίστοιχα για τα αέρια CO₂, O₂ και N₂, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (20%CO₂- 80%N₂) και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασίες συντήρησης (10 °C). Η συσκευασία των δειγμάτων έγινε με μηχανήμα συσκευασίας προϊόντων Hencovac 1700 (Hectongen-Bosch), σύμφωνα με τα παρακάτω 3 διαδοχικά στάδια: (α) εκκένωση του περιέκτη από τον περιεχόμενο αέρα, (β) διοχέτευση του μίγματος της τροποποιημένης ατμόσφαιρας και (γ) διπλή θερμοκόλληση των περιεκτών. Η αναλογία δείγματος προς όγκο αέρας ατμόσφαιρας της συσκευασίας ήταν κατά μέσο όρο 1:3. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στις θερμοκρασίες συντήρησης (10 °C). Ένας αριθμός εμβολιασμένων δειγμάτων συσκευάστηκε σε αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συντηρήθηκε στις ίδιες θερμοκρασίες για να αποτελέσει τους μάρτυρες του πειράματος.

Εικόνα 13. Δείγματα προς συσκευασία



2.9 Καταμέτρηση μικροβιακού πληθυσμού

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση κάθε σταδίου του πειράματος (ενοφθαλμισμός, εμφάνιση σε διάλυμα αλγινικού νατρίου, συσκευασία) πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία προκειμένου να προσδιοριστεί ο μικροβιακός πληθυσμός σε κάθε στάδιο.

Κατά τη δειγματοληψία κάθε δείγμα ζυγίστηκε ασηπτικά και προστέθηκε κατάλληλος όγκος διαλύματος Ringer. Το δείγμα ομογενοποιήθηκε για 60 sec σε συσκευή Stomacher σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με μεταφορά 1 mL δείγματος της προηγούμενης αραιώσης σε 9 mL ορού Ringer. Οι κατάλληλες κατά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό διπλής σειράς τρυβλίων (2 επαναλήψεις) με επιλεκτικό ή μη θρεπτικό υπόστρωμα με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης.

Escherichia coli O157:H7

Για τα στελεχών του *E. coli* έγινε εμβολιασμός 0.1 mL σε επιλεκτικό υπόστρωμα SMAC (Sorbitol MacConkey Agar) με προσθήκη αντιβιοτικού που καθιστά το υπόστρωμα επιλεκτικότερο για τα στελέχη *E. Coli* O157:H7. Ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Tryptone Soy Agar) και επώαση στους 30 °C για 48 ώρες. Στη συνέχεια καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες ενώ τα τρυβλία με το επιλεκτικό υπόστρωμα του *E.Coli* επώαστηκαν στους 37 °C και η καταμέτρηση των χαρακτηριστικών κόκκινων αποικιών έγινε μετά από 24 ώρες.

Listeria monocytogenes

Όγκος 0.1 mL από τη δεκαδική αραιώση κάθε δείγματος που μελετήθηκε ενοφθαλμίστηκε σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα PALCAM με προσθήκη Palcam Listeria Selective Supplement. Ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας(OMX) έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA με προσθήκη εκχυλίσματος ζύμης 0,6% (yeast extract) προκειμένου να είναι περισσότερο ευδιάκριτες οι αποικίες της *Listeria monocytogenes*. Τα τρυβλία και των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων επώαστηκαν στους 30 °C για 48 ώρες. Ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών. Οι αποικίες της *Listeria monocytogenes* στο επιλεκτικό υπόστρωμα εμφανίστηκαν ως γαλάζιες αποικίες με χαρακτηριστική μαύρη ζώνη περιμετρικά των αποικιών.

Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των δύο επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου για την καταμέτρηση έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Τα τρυβλία που επιλέχθηκαν είχαν περισσότερες από 30 αποικίες και λιγότερες από 300 (*Meynel and Meynel, 1970*). Στην περίπτωση που δύο αραιώσεις έδιναν κατάλληλο αριθμό αποικιών, τότε επιλεγόταν αυτή με τον μεγαλύτερο αριθμό αποικιών (*Meynel and Meynel, 1970*). Στην περίπτωση που τα τρυβλία περιείχαν πολύ μεγάλο αριθμό αποικιών, η καταμέτρηση γινόταν με το διαχωρισμό τους σε ίσα μέρη. Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των βακτηρίων ανά γραμμάριο φρούτων ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιαζόταν με την αραιώση που χρησιμοποιήθηκε.

2.10 Προσδιορισμός pH

Το pH κάθε δείγματος μετρήθηκε με pHμετρό (Multical WTW 526 pH meter). Η μέτρηση έγινε με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο ομογενοποιημένο φρούτο μετά το τέλος κάθε μικροβιολογικής ανάλυσης.

3ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Σύσταση αιθερίων ελαίων

3.1.1 Αιθέριο έλαιο κανέλας

Ο προσδιορισμός της σύστασης του αιθερίου ελαίου, έγινε με τη χρήση της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μαζών (GC-MS). Η σύσταση παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα, Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου κανέλας

α/α	Ενωση	RT (min)	Peak Area (%)
1	Δίκυκλο[3.1.0] εξάνιο, 4-μέθυλο-1-(1-μεθυλαιθυλ)-, διδευδρο παράγωγο	6,14	0,1
2	α-Πινένιο	6,35	0,33
3	Καμφένιο	6,81	0,14
4	Βενζαλδεϋδη	7,14	0,18
5	β-Πινένιο	8,65	0,12
6	α-Φαιλανδρένιο	8,65	0,57
7	(+)-4-Καρένιο	9,09	0,5
8	Βενζόλιο, 1-μέθυλο-4-(1-μεθυλ)-	9,4	1,3
9	β-Φαιλανδρένιο	9,57	2,48
10	3-Φαινυλοπροπαν-1-ολη (υδροκινναμινική αλκοόλη)	15,04	0,61
11	Τερπινέν-4-ολη	15,69	0,55
12	2-Προπενάλ, 3-φαινυλ-	17,51	0,66
13	Κινναμαλδεϋδη	20,34	68,59
14	Φαινολ, 2-μέθυλ-5-(1-μεθυλεθυλ)-	20,8	0,11
15	Θυμόλη	21,2	0,61
16	2-προπεν-όλη, 3-φαινυλ-	21,32	0,45
17	Ευγενόλη	23,6	3,97
18	3-Φαινυλ-1-προπανολη, acetate	24,06	0,15
19	Κοπαένιο	24,26	0,21
20	Καρυοφυλλενιο	26,11	4,36
21	2-προπεν-όλη, 3-φαινυλ-	27,24	6,16
22	α-καρυοφυλλένιο	27,45	0,85

23	2-προπεναλη, 3-(2-μεθοξυφαινόλη)-	30,48	0,65
24	Οξείδιο του καρνοφυλλενίου	32,53	0,85
25	Βενζοϊκό οξύ	39,13	2,04
26	Δίκυκλο[3.1.0]εξ-2-ένιο, 2-μέθυλ-5-(1-μεθυλέθυλ)-	46,79	0,26
SUM			96,8

Από τα παραπάνω δεδομένα μαρτυρονται ότι τα κύρια συστατικά του συγκεκριμένου αιθερίου ελαίου της κανέλας είναι η κινναμαλδεΐδη και ακολουθούν το η κυνναμική αλκοόλη, η ευγενόλη και τέλος το καρνοφυλλένιο. Το φυσικό προϊόν είναι trans-κινναμαλδεΐδη. Το μόριο αποτελείται απο μια φαινυλική ομάδα που συνδέεται με μια ακόρεστη αλδεΐδη. Ως εκ τούτου το μόριο μπορεί να θεωρηθεί ως παράγωγο της ακρολεΐνης. Σε μελέτη του *Ali A. Shareef (2011)* παρατηρήθηκε ότι το κύριο συστατικό της κανέλας ήταν η κινναμαλδεΐδη, όπως επίσης και σε αντίστοιχη μελετη του *G. S. El-Baroty et al. (2010)*. Από τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό φαίνεται η επικράτηση της κινναμαλδεΐδης σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά και στη δική μας ανάλυση.

3.1.2 Αιθέριο έλαιο μαστίχας

Ο προσδιορισμός της σύστασης του αιθερίου ελαίου, έγινε με τη χρήση της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μαζών (GC-MS). Η σύσταση παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα, *Πίνακα 5*.

Πίνακας 5. Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου μαστίχας

α/α	Ενωση	RT(min)	Peak Area (%)
1	(1S)-(-)-β-Πινένιο	6	2,16
2	α-Πινένιο	6,5	58,49
3	Καμφένιο	6,95	1,7
4	β-Φαιλανδρένιο	7,65	0,69
5	β-Πινένιο	7,8	5,36
6	β-Μυρκένιο	8,37	15,48
7	Ανισόλη	8,89	1,03
8	π-Κυμένιο	9,41	0,29
9	δ-Λεμονένιο	9,59	1,9
10	Βενζόλιο, 1-μεθυλ-2-(1-μεθυλεθυλ)-	9,93	0,08
11	α-Τερπινολένιο	11,92	0,12

12	<i>cis</i> -Γερανιόλη	12,46	1,62
13	Ατρεμισεόλη	12,69	1,03
14	α -Καμφολενάλη	13,51	0,59
15	2(10)-Πινεν-3-όλη	14,03	0,68
16	(S)- <i>cis</i> -βερμπενόλη	14,14	0,19
17	Δίκυκλο[3.1.0]εξ-3-εν-2-όλη,2-μεθυλ-5-(1-μεθυλεθυλ)-(1 α ,2 α ,5 α)]-	14,34	1,88
18	2(10)-Πινέν-3-όνη	15,06	0,06
19	2-Φαινυλοπροπ-2-όλη	16,03	0,13
20	3-Κυκλοεξένιο-1-μεθανόλη, α , α 4-τριμεθυλενιο-	16,26	0,1
21	Μυρτενόλη	16,52	0,56
22	2-Πινεν-4-όνη	17,08	0,49
23	<i>cis</i> -Καρβεόλη	17,49	0,1
24	2-Ουντεκανόνη	20,8	0,11
25	Ylangene	24,05	0,13
26	Καρυοφυλλένιο	26,05	0,9
27	Οξειδίο του καρυοφυλλενίου	32,52	0,62
SUM			95,79

Από τα παραπάνω δεδομένα μαρτυρούνται ότι τα κύρια συστατικά του συγκεκριμένου αιθερίου ελαίου της μαστίχας είναι το α -πινένιο και ακολουθούν το β -μυρκένιο, β -πινένιο, η ευγενόλη και τέλος το λεμονένιο και το καρυοφυλλένιο. Το α -πινένιο περιέχει δύο ισοπρενικές μονάδες σε μια περίπλοκη κυκλική δομή. Το μυρκένιο περιέχει δύο ισοπρενικές μονάδες ενωμένες κεφαλή ουρά, σχηματίζοντας έτσι μια ανθρακική αλυσίδα από οκτώ άτομα άνθρακα με δύο διακλαδώσεις από ένα άτομο άνθρακα. Σε μελέτη της *Christina Koutsoudaki et al. (2005)* για την ανάλυση του αιθερίου ελαίου μαστίχας παρατηρήθηκε ότι τα συστατικά που βρισκόταν σε μεγαλύτερο ποσοστό ήταν το α -πινένιο και το β -μυρκένιο. Από τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό φαίνεται η επικράτηση του α -πινενίου και του β -μυρκενίου σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά και στη δική μας ανάλυση.

3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

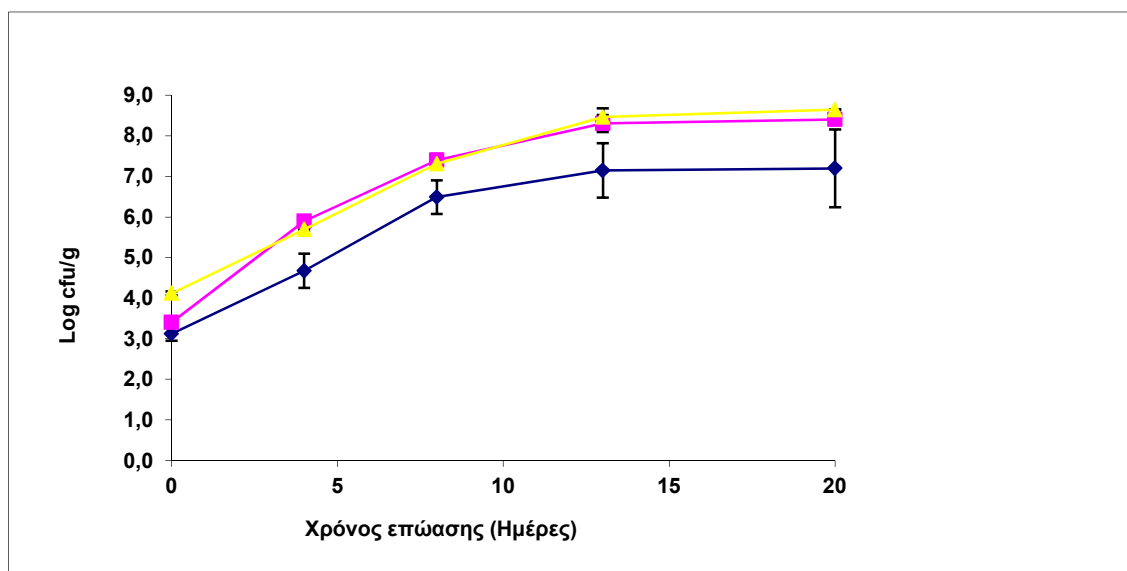
Η επίδραση των εδώδιμων μεμβρανών με ή χωρίς ενσωματωμένο αντιμικροβιακό παράγοντα στα βακτήρια εκφράζεται από τη λογαριθμική μείωση των βακτηρίων σε σύγκριση με το μάρτυρα.

3.2.1 Μελέτη της επίδρασης των εδώδιμων επικαλύψεων στα φρούτα στην επιβίωση/ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*

Στο πρώτο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η επίδραση των εδώδιμων επικαλύψεων (Πίνακας 3) σε φρούτα στην επιβίωση/ανάπτυξη του παθογόνου *Listeria monocytogenes* κατά την συντήρησή τους σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (80% N₂, 20% CO₂) στους 10 °C.

Σε σχέση με τα τρία φρούτα η μεγαλύτερη ανάπτυξη πληθυσμού παρατηρήθηκε στο αχλάδι και στην μπανάνα (8,5 log cfu/g) ενώ στο μήλο ο πληθυσμός αναπτύχθηκε μέχρι 7,1 log cfu/g κατά την 13^η ημέρα συντήρησης των δειγμάτων στους 10 °C, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.

Σχήμα 1. Ανάπτυξη παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε αμεταχειρίιστα δείγματα (-♦-) μήλου, (-■-) αχλαδιού και (-▲-) μπανάνας κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



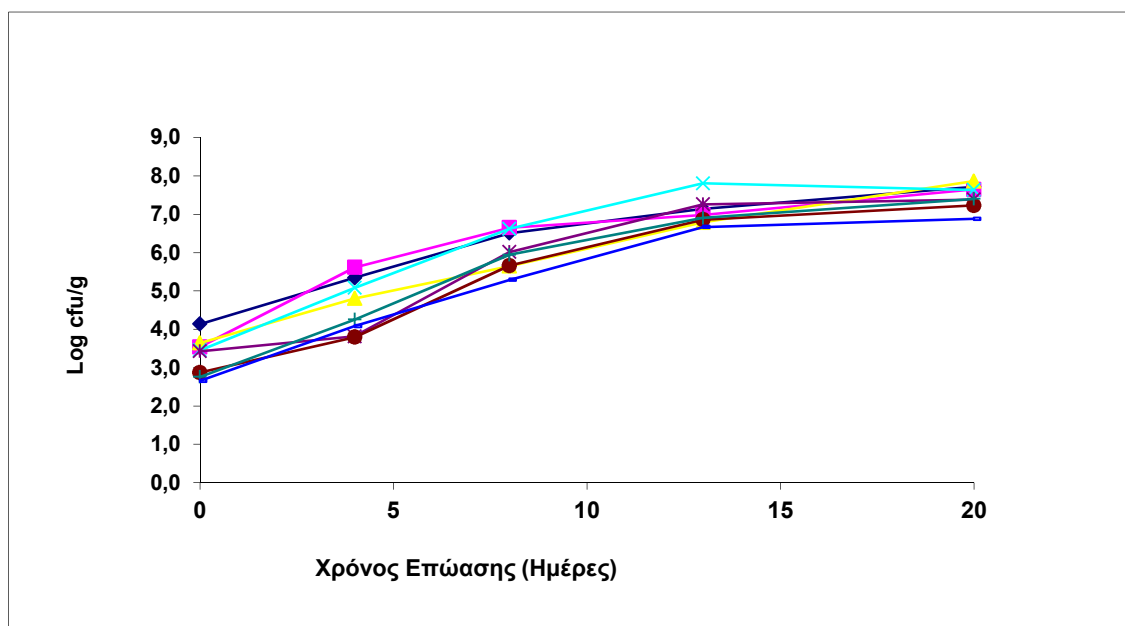
3.2.1.1 Μήλο

Στο μήλο η μέγιστη ανάπτυξη του πληθυσμού για το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* παρατηρήθηκε την 13^η ημέρα συντήρησής του στους 10 °C για το μάρτυρα (control) (7,1 log CFU/g). Το ίδιο ισχύει και για τα μήλα με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς την προσθήκη κάποιου αντιμικροβιακού (7,1 Log CFU/g). Οι επικαλύψεις με ενσωματωμένα τα δύο αιθέρια έλαια, κανέλα και μαστίχα, καθώς και ο συνδυασμός τους, δεν είχαν κάποια ιδιαίτερη επίδραση στην ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού. Όπως, επίσης και στο συνολικό αριθμό των βιώσιμων μικροοργανισμών. Στις εδώδιμες επικαλύψεις με ενσωματωμένο το λικέρ κανέλας (Τεντούρα) παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων του παθογόνου *L. monocytogenes* κατά 2,5 log CFU/g σε σχέση με το μάρτυρα (control) την 13^η ημέρα του πειράματος. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στις εδώδιμες επικαλύψεις με ενσωμάτωση αιθανολής. Ενώ μείωση των επιπέδων του παθογόνου κατά 1 log CFU/g περίπου, παρατηρήθηκε σε σχέση με το μάρτυρα την 13^η ημέρα στις επικαλύψεις με ενσωματωμένο το λικέρ μαστίχας (Σχήμα 2,3,4). Οι τιμές του pH μειώθηκαν ελαφρώς (εώς 0,4 μονάδες) μέχρι την 13^η ημέρα.

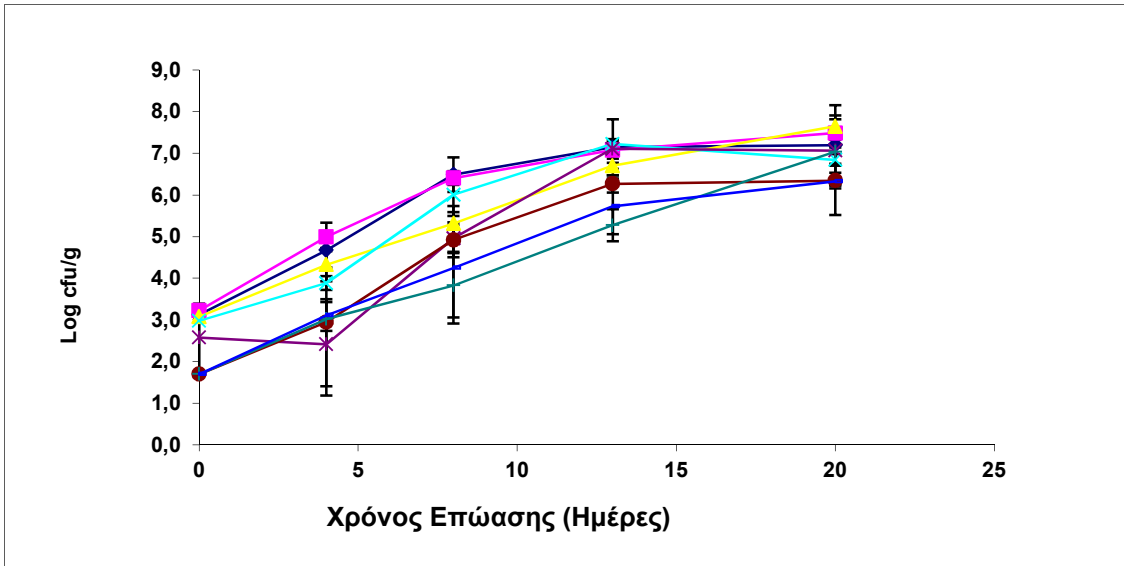
Καμία διαφορά στην αρχική σύσταση των αερίων (20% CO₂, 80% N₂) δεν παρατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Και οι τιμές του O₂ ήταν κάτω από 1% με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης του μικροοργανισμού λόγω αυτού του παράγοντα.

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των μήλων εξετάστηκαν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Παρατηρήθηκε, για τις εδώδιμες μεβράνες, χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα και με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο μαστίχας, αιθέριο έλαιο κανέλας και μαστίχας, λικέρ μαστίχας και αιθανόλη, ότι μέχρι την 20^η ημέρα του πειράματος δεν είχαμε αλλαγές στο χρώμα τους αφού διατηρήθηκε στο ίδιο χρώμα με την 0^η ημέρα (κίτρινο), με πολύ μικρές διαφορές σε κάποια δείγματα που εμφάνισαν κάποιες καφέ περιοχές. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο κανέλας και το λικέρ Τεντούρα λόγω του έντονου καφέ χρώματός τους παρατηρήθηκε ότι το χρώμα των μήλων ήταν πιο καφετί πράγμα το οποίο οφείλεται στις μεμβράνες και όχι στο ίδιο το φρούτο αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλοίωση στην επιφάνειά του. Ενώ στα δείγματά του μάρτυρα από την 13^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκαν αμαυρώσεις καθώς και εμφάνιση κάποιων αλλοιώσεων (σαν μούχλα). Η οσμή τους δεν αλλοιώθηκε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος παρά μόνο στα αιθέρια έλαια που μυρίζαν έντονα και κάλυπταν την μυρωδιά των μήλων.

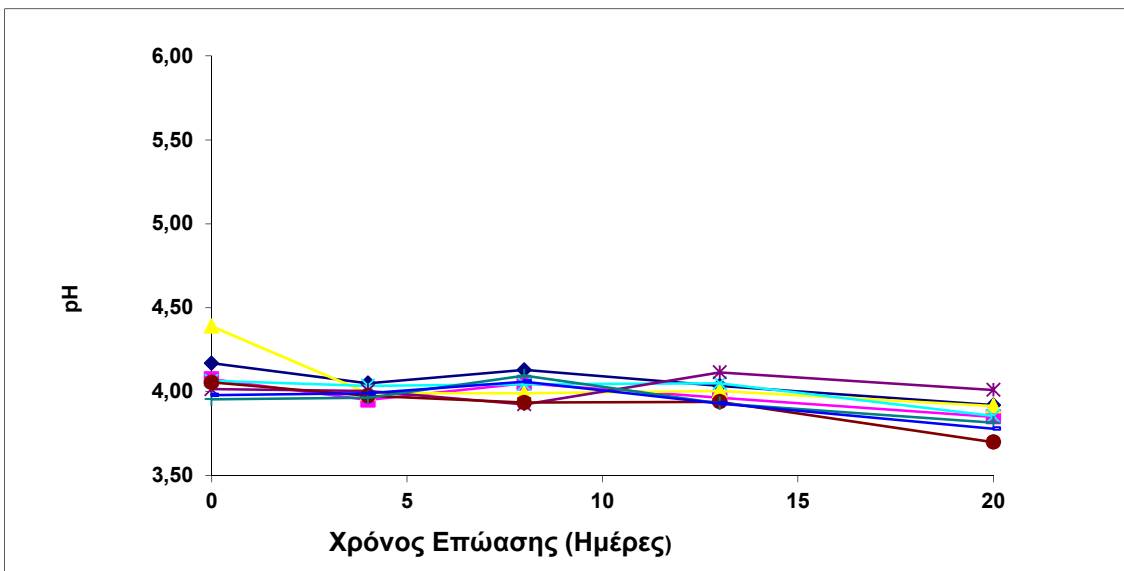
Σχήμα 2. Ανάπτυξη ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε εμβολιασμένα με παθογόνο *Listeria monocytogenes* δείγματα μήλου με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-✕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 3. Ανάπτυξη παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε δείγματα μήλου με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς ζπικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 4. Ανάπτυξη pH σε δείγματα μήλου με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς ζπικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



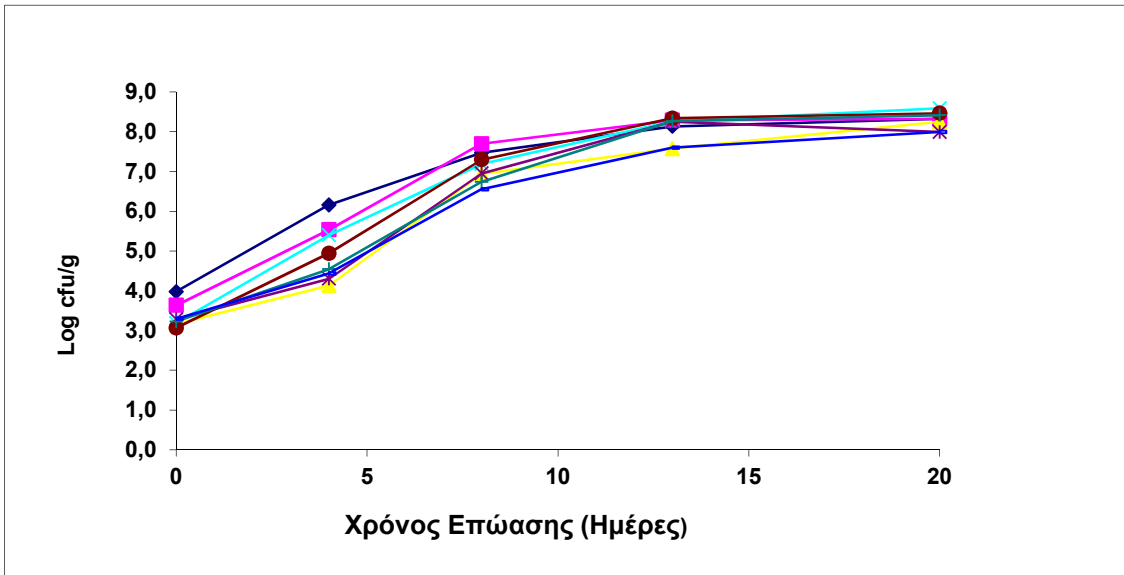
3.2.1.2 Αχλάδι

Στο αχλάδι η μέγιστη ανάπτυξη του πληθυσμού για το παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes* παρατηρήθηκε την 13^η ημέρα συντήρησής του στους 10 °C για το μάρτυρα (control) (8,5 log CFU/g). Δηλαδή ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου σχεδόν διπλασιάστηκε σε σχέση με το αρχικό μας εμβόλιο. Το ίδιο ισχύει και για τα αχλάδια με εδώδιμη επικάλυψη χωρίς την προσθήκη κάποιου αντιμικροβιακού (8,2 log CFU/g). Οι εδώδιμες επικαλύψεις με το αιθέριο έλαιο κανέλας και το λικέρ κανέλας (Efliq.1) μείωσαν το πληθυσμό του παθογόνου κατά 1 και 2 log CFU/g αντίστοιχα. Όπως, επίσης και στο συνολικό αριθμό των βιώσιμων μικροοργανισμών (ολική μικροβιακή χλωρίδα) όσον αφορά το αιθέριο έλαιο κανέλας. Στις εδώδιμες επικαλύψεις με ενσωματωμένο το αιθέριο έλαιο και το λικέρ μαστίχας δεν παρατηρήθηκε καμιά ιδιαίτερη μείωση των επιπέδων του παθογόνου *L. monocytogenes* σε σχέση με το μάρτυρα (control) την 13^η ημέρα του πειράματος. Ενώ οι εδώδιμες επικαλύψεις με ενσωματωμένη την αιθανόλη μας έδωσε την μεγαλύτερη μείωση του παθογόνου βακτηρίου κατά 2 log CFU/g σε σχέση με το μάρτυρα. Οι τιμές του pH αυξήθηκαν ελαφρώς (εώς 0,8 μονάδες) μέχρι την 13^η ημέρα για τις τρεις πρώτες μεταχειρήσεις (αιθεριο έλαιο κανέλας, μαστίχας και κανέλα με μαστίχα). Ωστόσο ελαφριά μείωση του pH παρατηρήθηκε (εώς 0,7 μονάδες) όσον αφορά το λικερ κανέλας, λικέρ μαστίχας και αιθανόλη (Σχήμα 5,6,7).

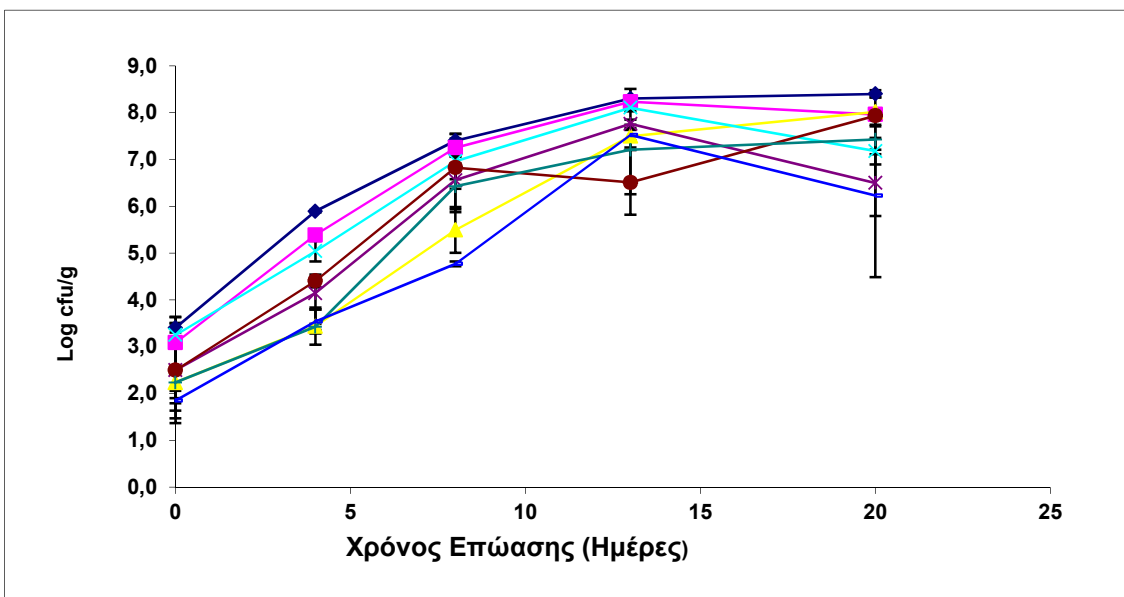
Καμία διαφορά στην αρχική σύσταση των αερίων (20% CO₂, 80% N₂) δεν παρατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Και οι τιμές του O₂ ήταν κάτω από 1% με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης του μικροοργανισμού λόγω αυτού του παράγοντα.

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αχλαδιών εξετάστηκαν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Παρατηρήθηκε, για τις εδώδιμες μεμβράνες, χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα και με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο μαστίχας, αιθέριο έλαιο κανέλας και μαστίχας, λικέρ μαστίχας και αιθανόλη, ότι μέχρι την 13^η ημέρα του πειράματος δεν είχαμε αλλαγές στο χρώμα τους αφού διατηρήθηκε στο ίδιο χρώμα με την 0^η ημέρα (ελαφρύ κίτρινο), με πολύ μικρές διαφορές σε κάποια δείγματα που εμφάνισαν κάποιες καφέ περιοχές. Κατά την 20^η ημέρα παρατηρήθηκαν έντονες αλλαγές στο χρώμα τους (καφέ) και στη εμφάνισή τους. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο κανέλας και το λικέρ Τεντούρα λόγω του έντονου καφέ χρώματός τους παρατηρήσαμε ότι το χρώμα των αχλαδιών ήταν πιο καφετί πράγμα το οποίο οφείλεται στις μεμβράνες και όχι στο ίδιο το φρούτο αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλοίωση στην επιφάνειά του καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Ενώ στα δείγματά του μάρτυρα από την 13^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκαν αμαυρώσεις καθώς και εμφάνιση κάποιων αλλοιώσεων (σαν μούχλα). Η οσμή τους δεν αλλοιώθηκε καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος παρά μόνο στα αιθέρια έλαια που μυρίζουν έντονα και κάλυπταν την μυρωδιά των αχλαδιών.

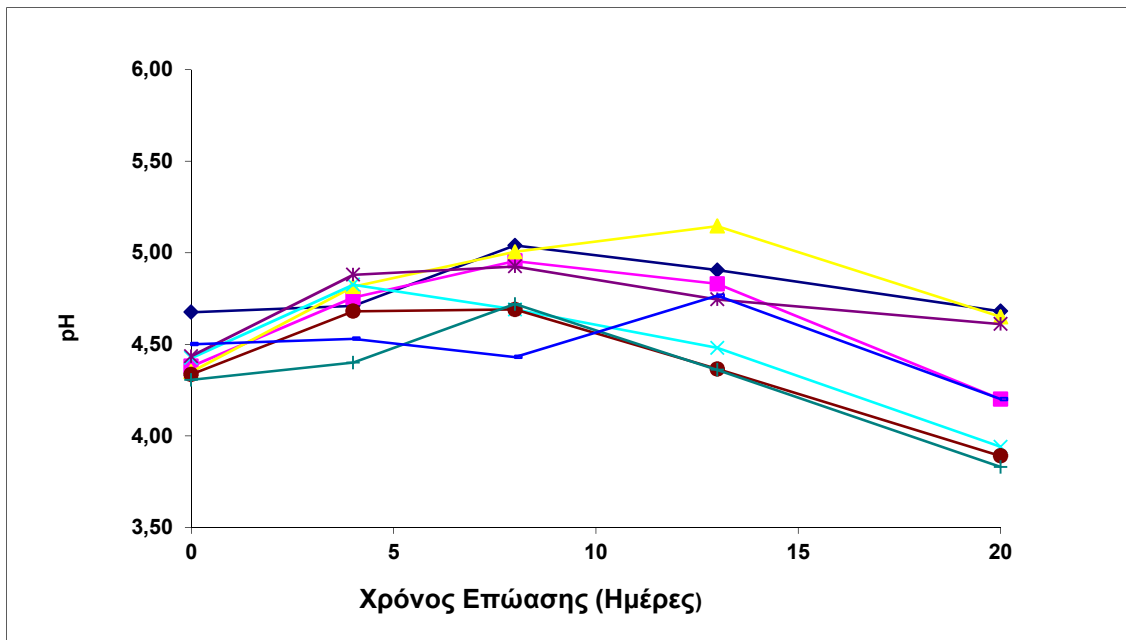
Σχήμα 5. Ανάπτυξη ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε εμβολιασμένα με παθογόνο *Listeria monocytogenes* δείγματα αχλαδιού με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °.



Σχήμα 6. Ανάπτυξη παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε δείγματα αχλαδιού με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 7. Ανάπτυξη pH σε δείγματα αχλαδιού με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-ж-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς ζπικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



3.2.1.3 Μπανάνα

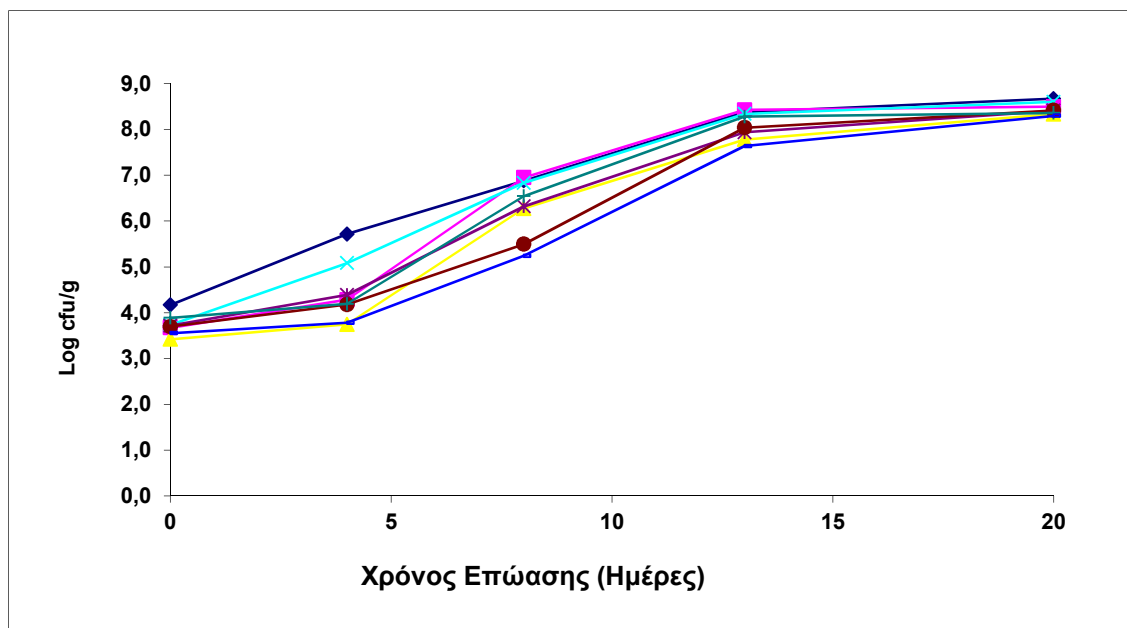
Κατά τη μελέτη της μπανάνας η μέγιστη ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* για τον μάρτυρα παρατηρήθηκε την 13^η ημέρα του πειράματος. Η αύξησή του έφτασε την διπλάσια τιμή του αρχικού εμβολίου και ήταν 8,5 log CFU/g. Οι μεμβράνες με ενσωματωμένο το αιθέριο έλαιο κανέλας, το λικέρ μαστίχας και την αιθανόλη ήταν τα πιο αποτελεσματικά προκαλώντας και τα τρία μία μείωση του περίπου 1,5 log CFU/g σε σχέση με τον μάρτυρα. Κατα τη 13^η ημέρα, στις μεμβράνες με ενσωματωμένο το αιθέριο έλαιο της μαστίχας, και την μίξη των δύο αιθερίων ελαίων δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη επίδραση στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην ολική μικροβιακή χλωρίδα. Στις μετρήσεις του pH της μπανάνας δεν παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα σημαντικές αυξομειώσεις (Σχήμα 8,9,10).

Καμία διαφορά στην αρχική σύσταση των αερίων (20% CO₂, 80% N₂) δεν παρατηρήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Και οι τιμές του O₂ ήταν κάτω από 1% με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης του μικροοργανισμού λόγω αυτού του παράγοντα.

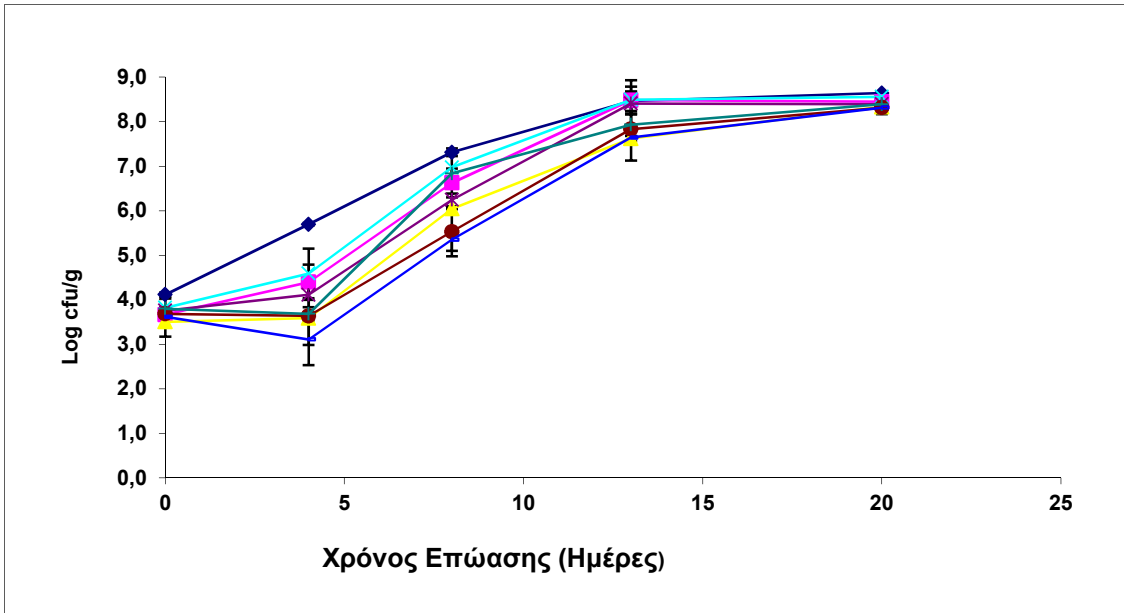
Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπανάνας εξετάστηκαν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Παρατηρήθηκε, για τις εδωδιμες μεμβράνες, χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα και με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο μαστίχας, αιθέριο έλαιο κανέλας και μαστίχας, λικέρ μαστίχας και αιθανόλη, ότι μέχρι την 8^η ημέρα του πειράματος δεν είχαμε αλλαγές στο χρώμα τους αφού διατηρήθηκε στο ίδιο χρώμα με την 0^η ημέρα (έντονο κίτρινο), με πολύ μικρές διαφορές σε κάποια δείγματα που εμφάνισαν κάποιες καφέ-κόκκινες περιοχές. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο κανέλας και το λικέρ Τεντούρα λόγω του έντονου καφέ χρώματός τους παρατηρήσαμε ότι το χρώμα της μπανάνας ήταν πιο καφετί πράγμα το οποίο οφείλεται στις μεμβράνες και όχι στο ίδιο το φρούτο αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλοίωση στην επιφάνειά του μέχρι την 8^η ημέρα. Κατα την 13^η και 20^η ημέρα παρατηρήσαμε έντονες αλλαγές του χρώματος (σκούρο καφέ) σε όλες τις περιπτώσεις και η εμφάνιση τους δεν ήταν καθόλου καλή. Ενώ στα δείγματά του μάρτυρα απο την

8^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκαν αμαυρώσεις καθώς και εμφάνιση έντονων αλλοιώσεων (γλιστερή υφή). Η οσμή τους αλλοιώθηκε ελαφρά κατά την 20^η ημέρα του πειράματος κυρίως στα λικέρ και στην αιθανόλη.

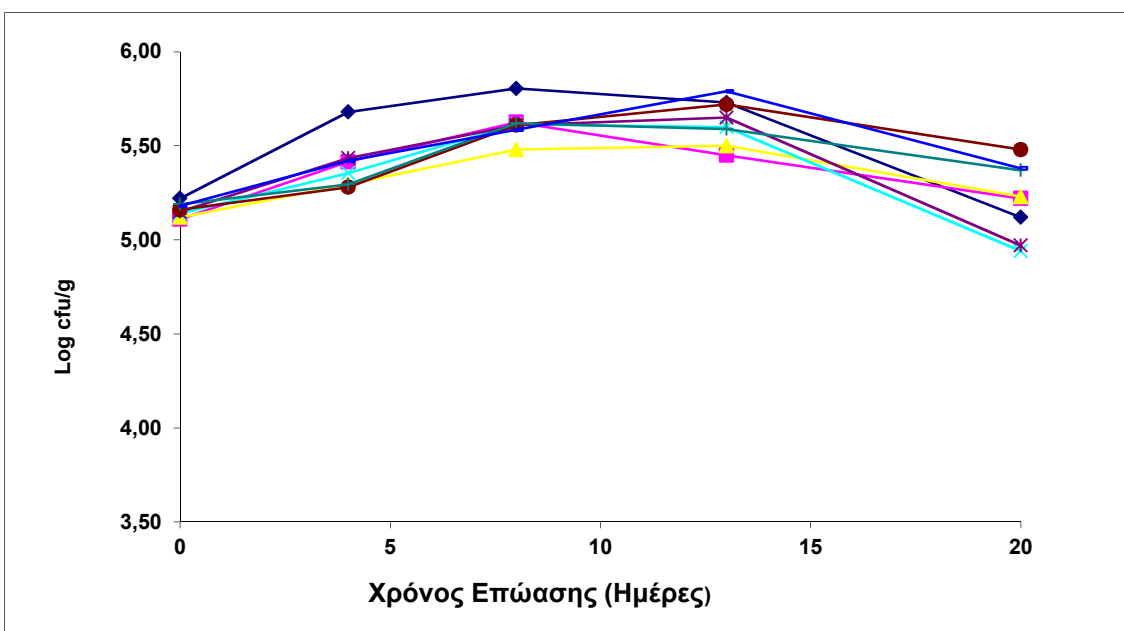
Σχήμα 8. Ανάπτυξη ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε εμβολιασμένα με παθογόνο *Listeria monocytogenes* δείγματα μπανάνας με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-Ж-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 9. Ανάπτυξη παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε δείγματα μπανάνας με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς ζπικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 10. Ανάπτυξη pH σε δείγματα μπανάνας με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς ζπικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.

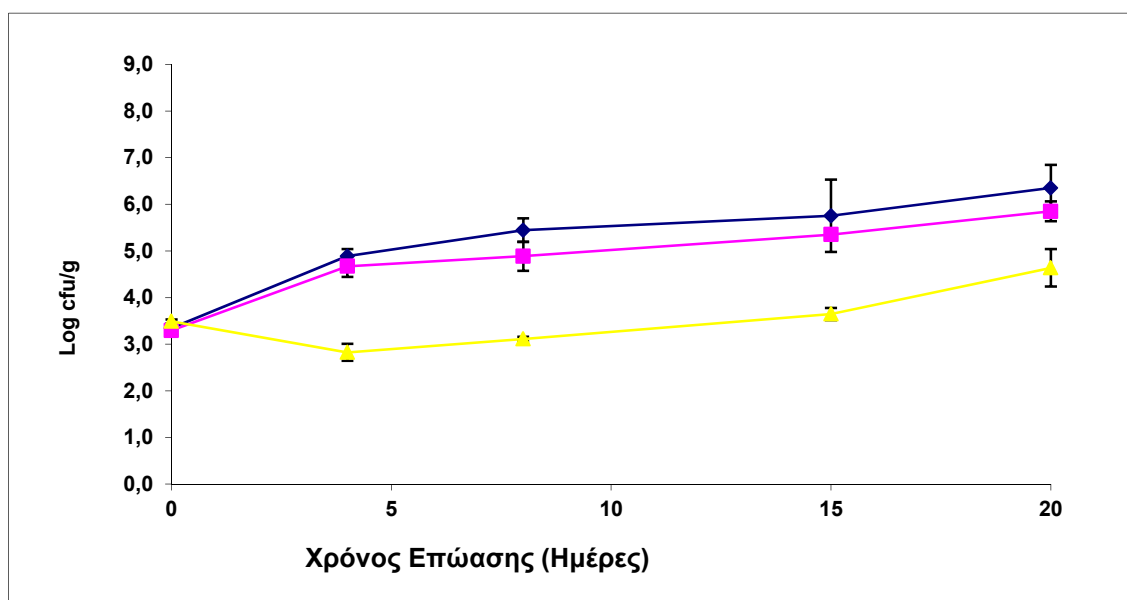


3.2.2 Μελέτη της επίδρασης των εδώδιμων επικαλύψεων στα φρούτα στην επιβίωση/ανάπτυξη της *Escherichia coli*

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η επίδραση των εδώδιμων επικαλύψεων (Πίνακας 3) σε φρούτα στην επιβίωση/ανάπτυξη του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 κατά την συντήρησή τους σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (80% N₂, 20% CO₂) στους 10 °C.

Σε σχέση με τα τρία φρούτα την μεγαλύτερη ανάπτυξη πληθυσμού του παθογόνου παρατηρήσαμε στο μήλο (6,3 log cfu/g), ακολούθησε το αχλάδι (5,8 log cfu/g) και η μπανάνα (4,6 log cfu/g) κατά την 20^η ημέρα συντήρησης των δειγμάτων στους 10 °C, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 11.

Σχήμα 11. Ανάπτυξη παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 σε αμεταχειρίιστα δείγματα (-♦-) μήλου, (-■-) αχλαδιού και (-▲-) μπανάνας κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



3.2.2.1 Μήλο

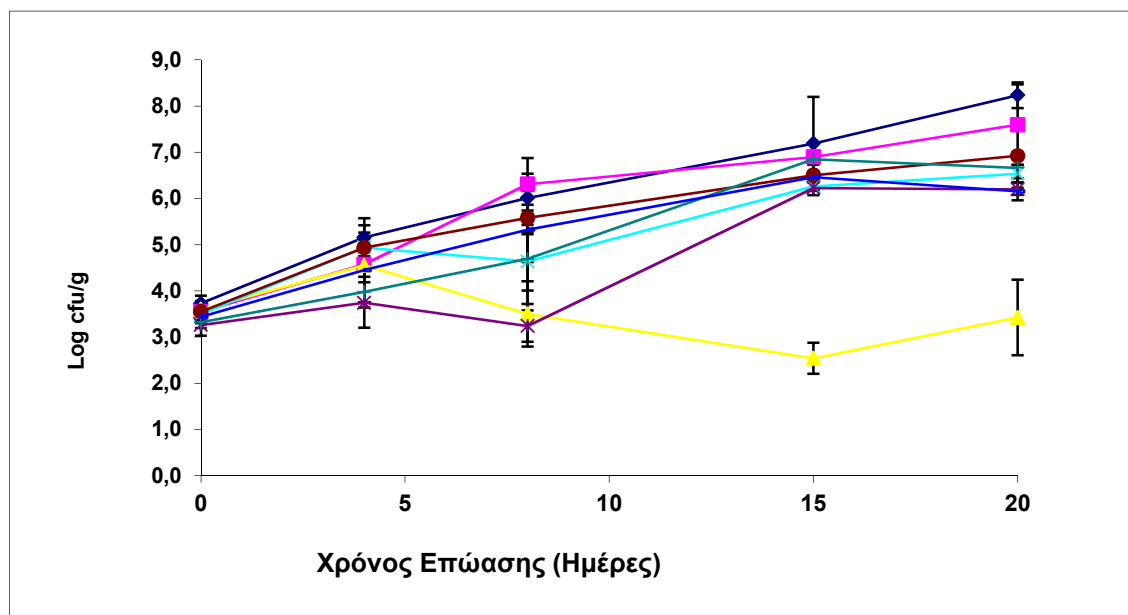
Ο μέγιστος πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* στα κομμένα μήλα παρατηρήθηκε την 20^η ημέρα συντήρησης στους 10 °C σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (20% CO₂-80% N₂) για το μάρτυρα (6,3 log CFU/g). Η εδώδιμη μεμβράνη χωρίς την προσθήκη κάποιου αντιμικροβιακού δεν έδειξε κάποια επίδραση στην μείωση του παθογόνου βακτηρίου (7,0 log CFU/g) κατά την 20^η ημέρα συντήρησής τους. Οι εδώδιμες μεμβράνες με το αιθέριο έλαιο της μαστίχας σε συγκέντρωση 1% δεν έδειξε κάποια ιδιαίτερη μείωση στον πληθυσμό του παθογόνου, ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση σχεδόν 2 log CFU/g κατά την 20^η ημέρα συντηρησής των μήλων για την ολική μικροβιακή χλωρίδα. Από την άλλη, οι εδώδιμες μεμβράνες με το αιθέριο έλαιο κανέλας είχαν πολύ δραστηρικά αποτελέσματα, αφού ο πληθυσμός του παθογόνου *E. coli* μειώθηκε κατά 4 log CFU/g. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για την ολική μικροβιακή χλωρίδα (μειώθηκε στους 3.4 log CFU/g σε σχέση με το μάρτυρα που ο πληθυσμός του την 20^η ημέρα ήταν 8,4 log CFU/g). Επίδραση στην μείωση του παθογόνου βακτηρίου και στην ολική μικροβιακή χλωρίδα κατά 2 log CFU/g παρατηρήθηκε με την χρήση εδώδιμων μεμβρανών με ενσωματωμένα το συνδυασμό των

δύο αιθερίων ελαίων σε ποσοστό 0,7% (1:1). Τέλος οι εδώδιμες μεμβράνες με τα ποτά και την αιθανόλη δεν είχαν καμία επίδραση στον παθογόνο, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά 2 log CFU/g και στις τρεις περιπτώσεις. Οι τιμές του pH δεν είχαν ιδιαίτερα σημαντικές αυξομειώσεις (Σχήμα 12,13,14).

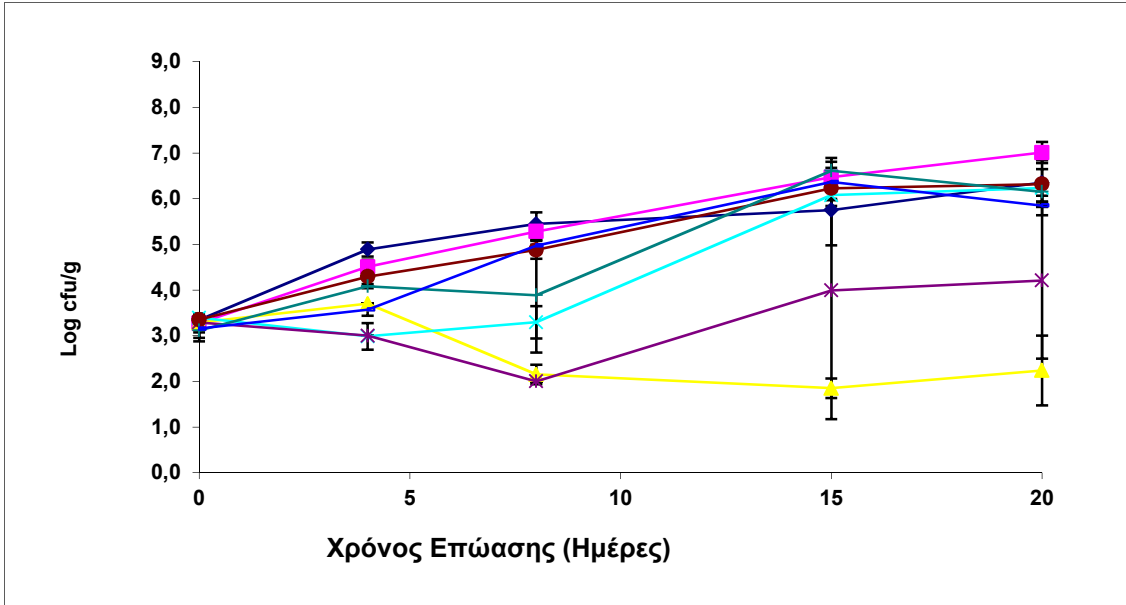
Ενδεικτικές μετρήσεις έγιναν για τον έλεγχο των αερίων στη συσκευασία καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Καμία διαφορά στην αρχική σύσταση των αερίων (20% CO₂, 80% N₂) δεν παρατηρήθηκε. Και οι τιμές του O₂ ήταν κάτω από 1% με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης του μικροοργανισμού λόγω αυτού του παράγοντα.

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του μήλου εξετάστηκαν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Παρατηρήθηκε, για τις εδώδιμες μεμβράνες, χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα και με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο μαστίχας, αιθέριο έλαιο κανέλας και μαστίχας, λικέρ μαστίχας και αιθανόλη, ότι μέχρι την 20^η ημέρα του πειράματος δεν είχαμε αλλαγές στο χρώμα τους αφού διατηρήθηκε στο ίδιο χρώμα με την 0η ημέρα (κίτρινο), με πολύ μικρές διαφορές σε κάποια δείγματα που εμφάνισαν κάποιες ελαφριά καφέ περιοχές. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο κανέλας και το λικέρ Τεντούρα λόγω του έντονου καφέ χρώματός τους παρατηρήσαμε ότι το χρώμα του μήλου ήταν πιο καφετί πράγμα το οποίο οφείλεται στις μεμβράνες και όχι στο ίδιο το φρούτο αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλοίωση στην επιφάνειά του μέχρι και την 20^η ημέρα. Ενώ στα δείγματα του μάρτυρα από την 13^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκαν αμαυρώσεις καθώς και εμφάνιση έντονων αλλοιώσεων (σαν μουχλα) σε κάποια δείγματα. Η οσμή τους δεν αλλοιώθηκε μέχρι και την 20^η ημέρα του πειράματος.

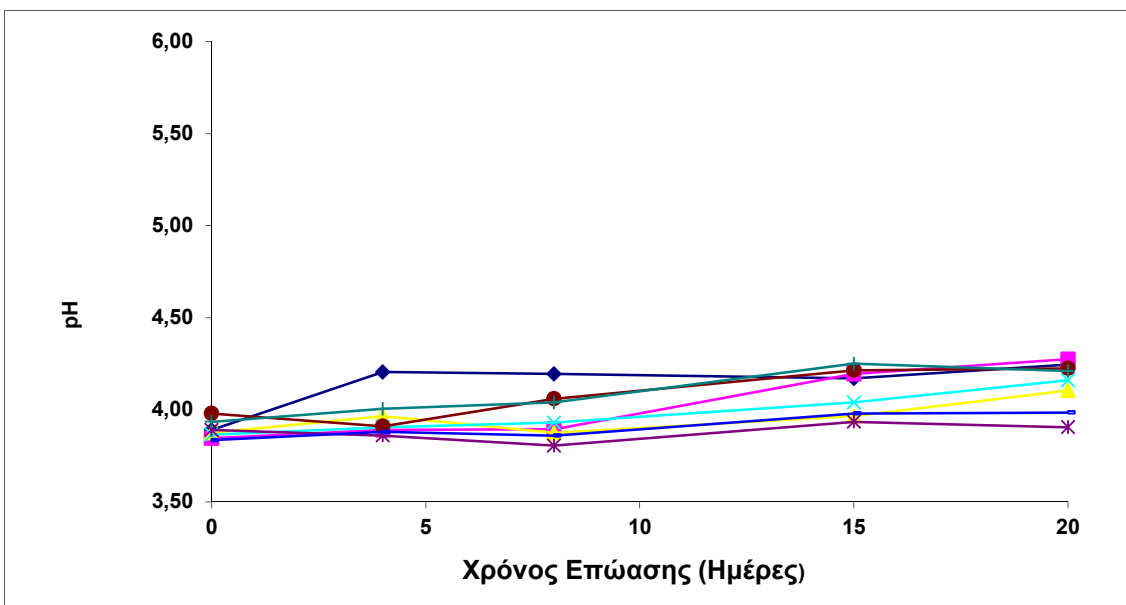
Σχήμα 12. Ανάπτυξη ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε εμβολιασμένα με παθογόνο *Escherichia coli* O157:H7 δείγματα μήλου με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊖-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 13. Ανάπτυξη παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε δείγματα μήλου με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⋈-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 14. Ανάπτυξη pH σε δείγματα μήλου με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⋈-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



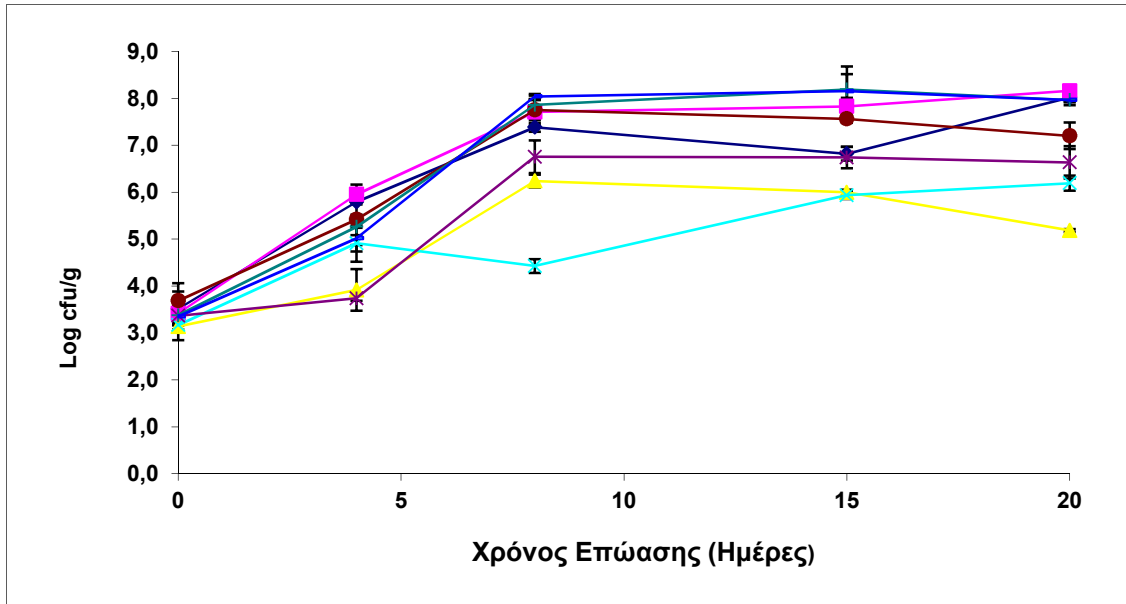
3.2.2.2 Αχλάδι

Ο μέγιστος πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* στα αχλάδια παρατηρήθηκε την 20^η ημέρα συντήρησης στους 10 °C σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (20% CO₂-80% N₂) για το μάρτυρα (5,8 log CFU/g). Η εδώδιμη μεμβράνη χωρίς την προσθήκη κάποιου αντιμικροβιακού δεν έδειξε κάποια επίδραση στην μείωση του παθογόνου βακτηρίου (6,0 log CFU/g) κατά την 20^η ημέρα συντήρησής τους. Οι εδώδιμες μεμβράνες με το αιθέριο έλαιο της μαστίχας σε συγκέντρωση 0,7% έδειξε μείωση στον πληθυσμό του παθογόνου κατά 1 log CFU/g, ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση σχεδόν 2 log CFU/g κατά την 20^η ημέρα συντήρησής των αχλαδιών για την ολική μικροβιακή χλωρίδα. Από την άλλη, οι εδώδιμες μεμβράνες με το αιθέριο έλαιο κανέλας 0,7% είχαν πολύ δραστικά αποτελέσματα, αφού ο πληθυσμός του παθογόνου *E. coli* μειώθηκε κατά 4 log CFU/g. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για την ολική μικροβιακή χλωρίδα (μειώθηκε στους 5,2 log CFU/g σε σχέση με το μάρτυρα που ο πληθυσμός του την 20^η ημέρα ήταν 8,0 log CFU/g). Επίδραση στην μείωση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά 2 log CFU/g περίπου παρατηρήθηκε με την χρήση εδωδιμων μεμβρανών με ενσωματωμένα το συνδυασμό των δύο αιθερίων ελαίων σε ποσοστό 0,7% (1:1), ενώ δεν είχε καμία μείωση στον πληθυσμό του παθογόνου. Τέλος οι εδωδιμες μεμβρανες με τα ποτά και την αιθανόλη δεν είχαν καμία σχεδον επίδραση στον παθογόνο μικροοργανισμό και στην ολική μικροβιακή χλωρίδα. Οι τιμές του pH δεν είχαν ιδιαίτερα σημαντικές αυξομειώσεις (Σχήμα 15,16,17).

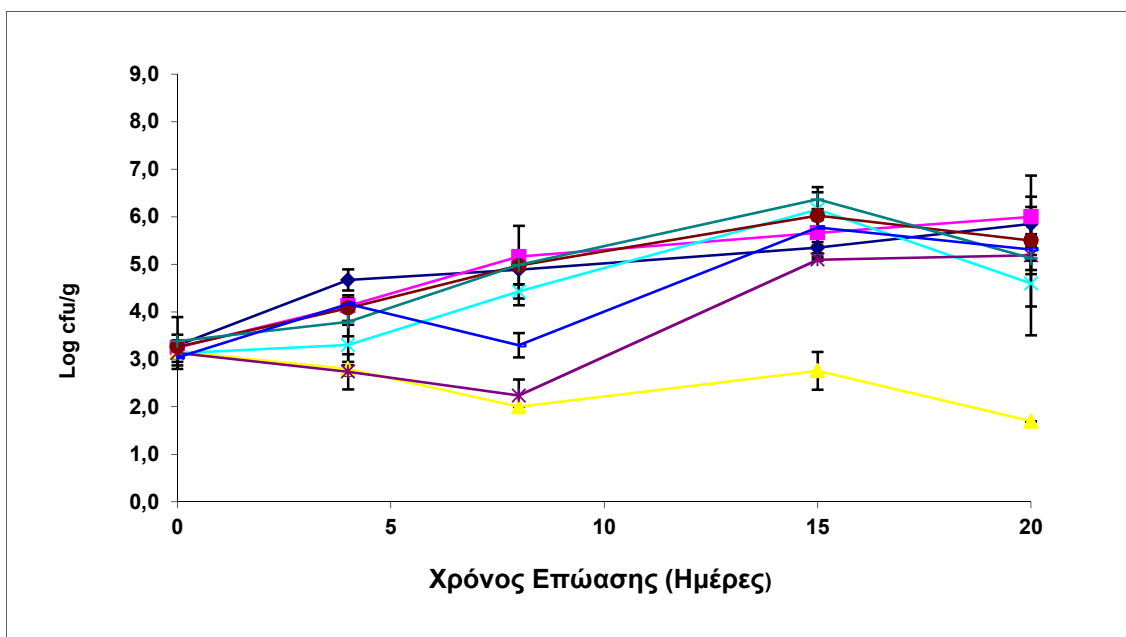
Ενδεικτικές μετρήσεις έγιναν για τον έλεγχο των αερίων στη συσκευασία καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Καμία διαφορά στην αρχική σύσταση των αερίων (20% CO₂, 80% N₂) δεν παρατηρήθηκε. Και οι τιμές του O₂ ήταν κάτω από 1% με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης του μικροοργανισμού λόγω αυτού του παράγοντα.

Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του αχλαδιού εξετάστηκαν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Παρατηρήθηκε, για τις εδωδιμες μεμβρανες, χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα και με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο μαστίχας, αιθέριο έλαιο κανέλας και μαστίχας, λικέρ μαστίχας και αιθανόλη, ότι μέχρι την 20^η ημέρα του πειράματος δεν είχαμε αλλαγές στο χρώμα τους αφού διατηρήθηκε στο ίδιο χρώμα με την 0^η ημέρα (ελαφρύ κίτρινο), με πολύ μικρές διαφορές σε κάποια δείγματα που εμφάνισαν κάποιες ελαφριά καφέ περιοχές. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο κανέλας και το λικέρ Τεντούρα λόγω του έντονου καφέ χρώματός τους παρατηρήσαμε ότι το χρώμα του αχλαδιού ήταν πιο καφετί πράγμα το οποίο οφείλεται στις μεμβράνες και όχι στο ίδιο το φρούτο αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλοίωση στην επιφάνειά του μέχρι και την 20^η ημέρα. Ενώ στα δείγματα του μάρτυρα από την 13^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκαν αμαυρώσεις καθώς και εμφάνιση αλλοιώσεων (σαν μουχλα) σε κάποια δείγματα. Η οσμή τους δεν αλλοιώθηκε μέχρι και την 20^η ημέρα του πειράματος.

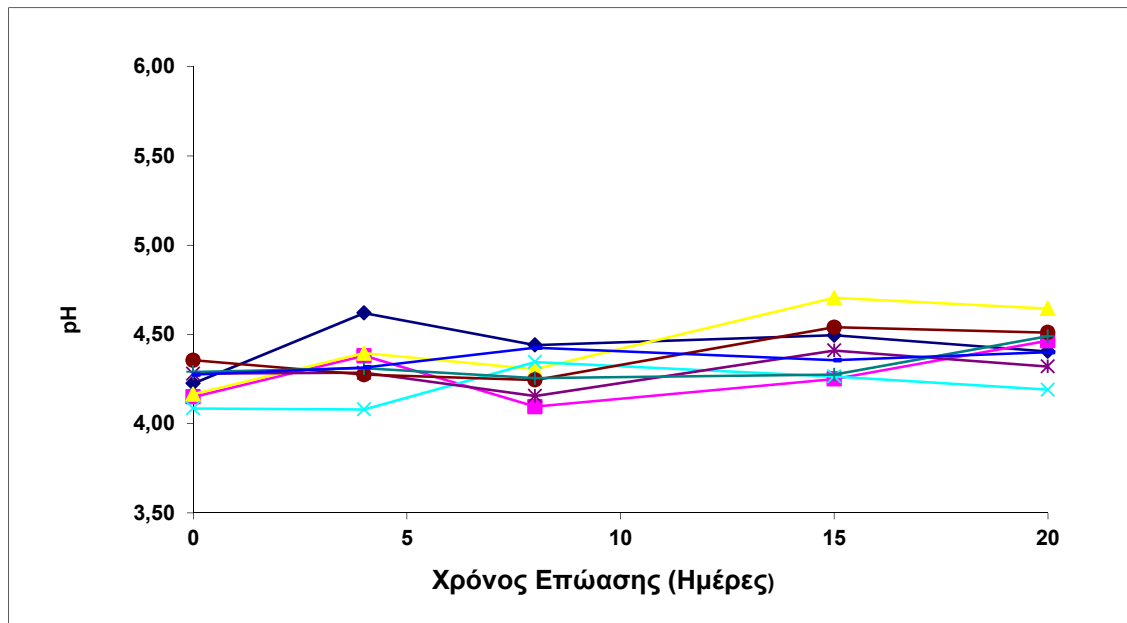
Σχήμα 15. Ανάπτυξη ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε εμβολιασμένα με παθογόνο *Escherichia coli* O157:H7 δείγματα αχλαδιού με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⋈-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 16. Ανάπτυξη παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 δείγματα αχλαδιού με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⋈-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 17. Ανάπτυξη pH σε δείγματα αχλαδιού με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-Ж-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



3.2.2.3 Μπανάνα

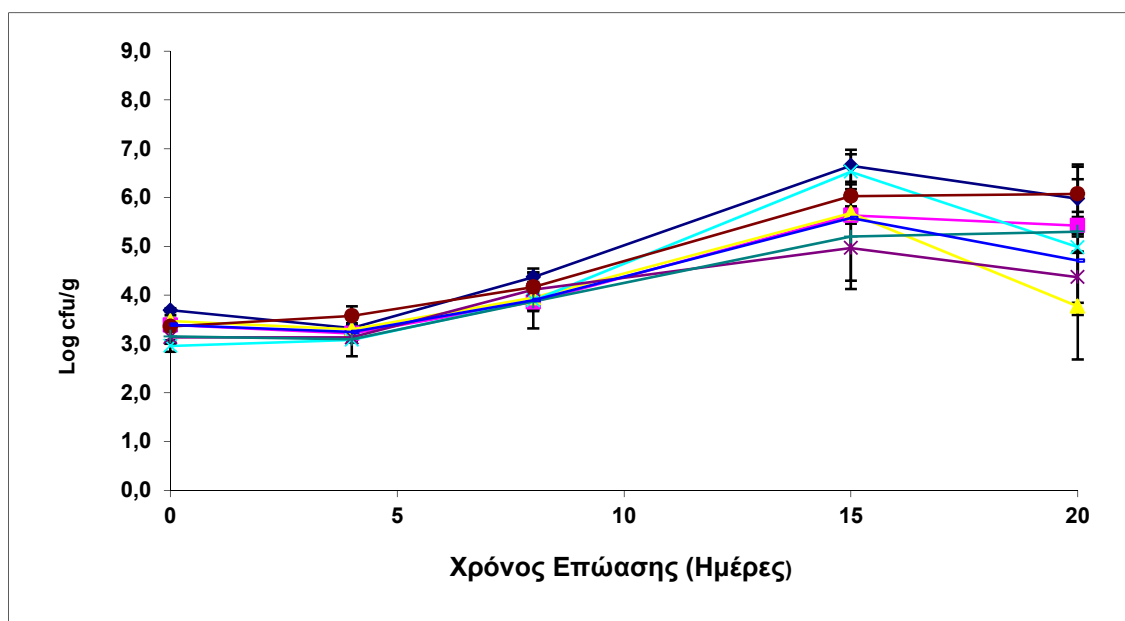
Η μπανάνα είχε την μικρότερη αύξηση του πληθυσμού σε σχέση με το μήλο και το αχλάδι. Ο μέγιστος πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* στις κομμένες μπανάνες παρατηρήθηκε την 20^η ημέρα συντήρησης στους 10 °C σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (20% CO₂-80% N₂) για το μάρτυρα (4,6 log CFU/g). Σε αντίθεση με τα άλλα δύο φρούτα, η εδώδιμη μεμβράνη χωρίς την προσθήκη κάποιου αντιμικροβιακού έδειξε επίδραση στην μείωση του παθογόνου βακτηρίου (2,5 log CFU/g) κατά την 20^η ημέρα συντήρησής τους. Οι εδώδιμες μεμβράνες με το αιθέριο έλαιο της μαστίχας σε συγκέντρωση 1% έδειξε ιδιαίτερη μείωση στον πληθυσμό του παθογόνου (3 log CFU/g). Επίσης, παρατηρήθηκε μείωση σχεδόν 1 log CFU/g κατά την 20^η ημέρα συντηρησής της μπανάνας για την ολική μικροβιακή χλωρίδα. Οι εδώδιμες μεμβράνες με το αιθέριο έλαιο κανέλας είχαν πολύ δραστικά αποτελέσματα τόσο στον πληθυσμό του παθογόνου *E. coli* που μειώθηκε κατά 3 log CFU/g, όσο και στην ολική μικροβιακή χλωρίδα (μειώθηκε στους 3,8 log CFU/g σε σχέση με το μάρτυρα που ο πληθυσμός του την 20^η ημέρα ήταν 6,0 log CFU/g). Επίδραση στην μείωση του παθογόνου βακτηρίου και στην ολική μικροβιακή χλωρίδα κατά 3 log CFU/g παρατηρήθηκε με την χρήση εδώδιμων μεμβρανών με ενσωματωμένα το συνδυασμό των δύο αιθερίων ελαίων σε ποσοστό 0,7% (1:1). Τέλος οι εδώδιμες μεμβράνες με τα ποτά και την αιθανόλη είχαν μικρότερη επίδραση στον παθογόνο (1-2,5 log CFU/g) σε σχέση με τα αιθέρια έλαια, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά 1,3 log CFU/g στην περίπτωση της αιθανόλης. Οι τιμές του pH δεν είχαν ιδιαίτερα σημαντικές αυξομειώσεις (Σχήμα 18,19,20).

Ενδεικτικές μετρήσεις έγιναν για τον έλεγχο των αερίων στη συσκευασία καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Καμία διαφορά στην αρχική σύσταση των αερίων (20% CO₂, 80% N₂) δεν παρατηρήθηκε. Και οι τιμές του O₂ ήταν κάτω από 1% με αποτέλεσμα την αποφυγή ανάπτυξης του μικροοργανισμού λόγω αυτού του παράγοντα.

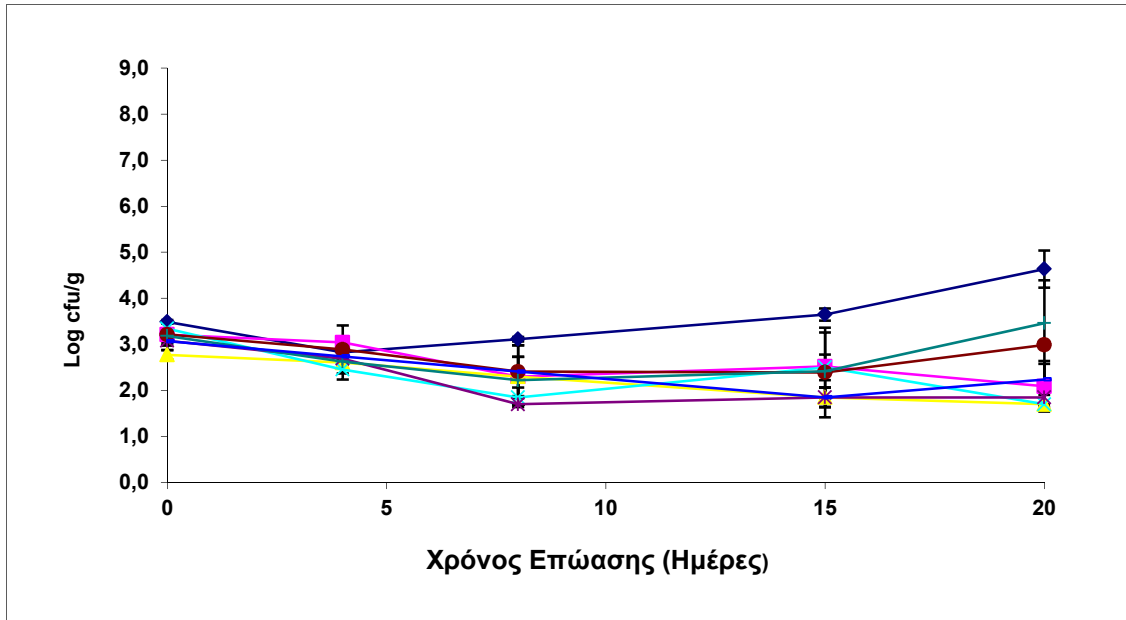
Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της μπανάνας εξετάστηκαν καθ' όλη την διάρκεια του

πειράματος. Παρατηρήθηκε, για τις εδώδιμες μεμβράνες, χωρίς αντιμικροβιακό παράγοντα και με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο μαστίχας, αιθέριο έλαιο κανέλας και μαστίχας, λικέρ μαστίχας και αιθανόλη, ότι μέχρι την 13^η ημέρα του πειράματος δεν είχαμε αλλαγές στο χρώμα τους αφού διατηρήθηκε στο ίδιο χρώμα με την 0^η ημέρα (έντονο κίτρινο), με μικρές διαφορές σε κάποια δείγματα που εμφάνισαν κάποιες ελαφριά καφέ-κόκκινες περιοχές. Όσον αφορά το αιθέριο έλαιο κανέλας και το λικέρ Τεντούρα λόγω του έντονου καφέ χρώματός τους παρατηρήσαμε ότι το χρώμα του αχλαδιού ήταν πιο καφετί πράγμα το οποίο οφείλεται στις μεμβράνες και όχι στο ίδιο το φρούτο αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλοίωση στην επιφάνειά του μέχρι και την 13^η ημέρα. Ωστόσο έντονες αλλαγές του χρώματος και τις εμφανίσεις είδαμε κατά την 20^η ημέρα συντήρησής τους αφού τα δείγματα είχαν έντονο καφε χρώμα και υφή γλιστερή. Ενώ στα δείγματα του μάρτυρα απο την 8^η ημέρα και μετά παρατηρήθηκαν αμαυρώσεις καθώς και εμφάνιση αλλοιώσεων (γλιστερη υφή) σε κάποια δείγματα. Η οσμή τους αλλοιώθηκε κατά την 20^η ημέρα του πειράματος κυρίως στα λικέρ και στην αιθανόλη.

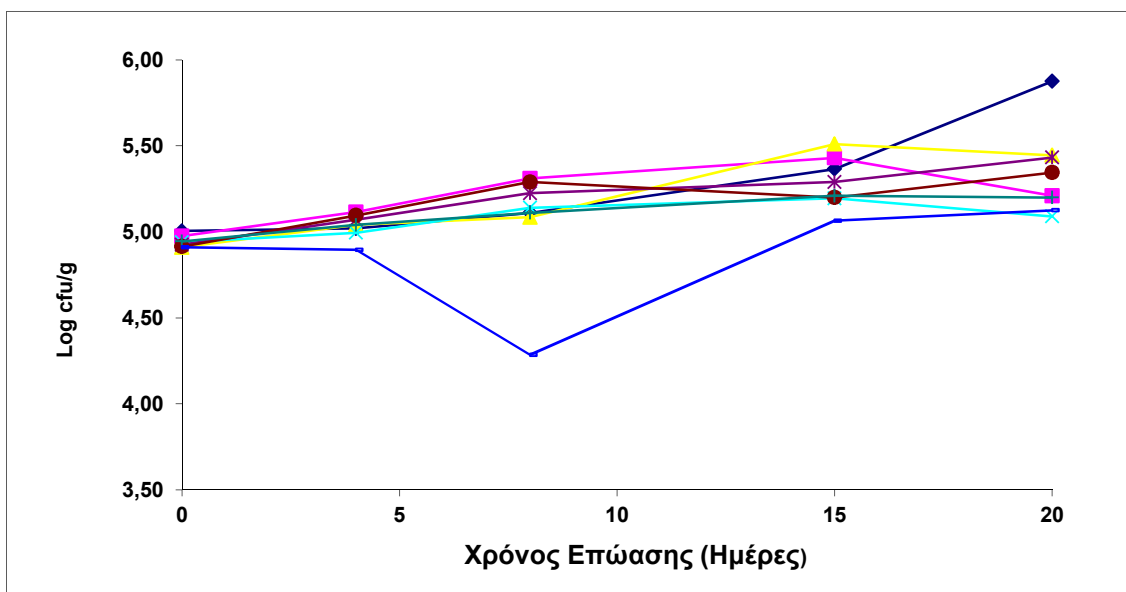
Σχήμα 18. Ανάπτυξη ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε εμβολιασμένα με παθογόνο *Escherichia coli* O157:H7 δείγματα μπανάνας με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-) εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-✕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-) εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυψη, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 19. Ανάπτυξη παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 δείγματα μπανάνας με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυση, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



Σχήμα 20. Ανάπτυξη pH σε δείγματα μπανάνας με (-■-) εδώδιμη επικάλυψη, (-▲-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο κανέλας, (-×-)εδώδιμη επικάλυψη με αιθέριο έλαιο μαστίχας, (-⊕-) εδώδιμη επικάλυψη με μίγμα αιθερίων ελαίων κανέλας και μαστίχας, (-●-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ κανέλας, (-|-) εδώδιμη επικάλυψη με λικέρ μαστίχας, (-)εδώδιμη επικάλυψη με διάλυμα αιθανόλης 25% (κ.ο) και (-◆-) χωρίς επικάλυση, κατά τη συντήρηση στους 10 °C.



4° ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Γενικά

Η μικροβιακή οικολογία των τροφίμων εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων, η σημασία των οποίων είναι μεγάλη για την κατανοήση της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στο τρόφιμο (*Body and Wimpenny, 1992*).

Πολλές από αυτές (π.χ. τροποποιημένες ατμόσφαιρες, φυσικά αντιμικροβιακά συστήματα) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών ή μεθόδων ελέγχου της αλλοίωσης και στην ασφάλεια των τροφίμων. Ειδικότερα, πολλοί ενδογενείς (pH, aw, δυναμικό οξειδοαναγωγής θρεπτικά συστατικά) ή εξωγενείς, (λόγος O₂/CO₂, θερμοκρασία, προσθήκη χημικών ή φυσικών συντηρητικών) παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρεμπόδιση της *L. monocytogenes* και *Escherichia coli* σε ποικίλα τρόφιμα (*Chen and Shelef, 1992; Grau and Vanderlinde, 1992; Harmayani et al., 1993; Wijtzes et al., 1993; Farber et al., 1996; George et al., 1996*).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση στην συμπεριφορά του παθογόνου *L. monocytogenes* και *E. Coli* των παρακάτω παραμέτρων συντήρησης:

- θερμοκρασία συντήρησης (10 °C)
- σύσταση της ατμόσφαιρας συντήρησης (τροποποιημένη ατμόσφαιρα 20% CO₂-80% N₂)

και μεθόδων επεξεργασίας:

- Εδώδιμες μεμβράνες με ενσωματωμένους αντιμικροβιακούς παράγοντες (*Πίνακας 3*) σε κομμένα μήλα, αχλάδια και μπανάνες και συντήρηση στην παραπάνω θερμοκρασία και σύσταση ατμόσφαιρας.

Η *Listeria monocytogenes* και ο *Escherichia coli* O157:H7 αποτελούν παθογόνους μικροοργανισμούς με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και πρόκλησης επιδημικών φαινομένων. Χαρακτηρίζονται μάλιστα από υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, ειδικά σε συγκεκριμένες ευπαθείς ομάδες. Η προσπάθεια αντιμετώπισής τους στα φρούτα αποτέλεσε έναν από τους στόχους της παρούσας μελέτης.

4.2 Τροποποιημένες Ατμόσφαιρες

Οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη ασφάλειας σε φρεσκοκομμένα φρούτα και παρατείνει τη διάρκεια ζωής τους.

Τα φρέσκα φρούτα συνεχίζουν να αναπνέουν, να καταναλώνουν οξυγόνο και να παράγουν διοξείδιο του άνθρακα και υδρατμούς. Λόγω της μεγάλης μεταβλητότητας των φρούτων από άποψη σύνθεσης, συστατικών, φυσικής μικροχλωρίδας, pH, υφή και χρώμα είναι αδύνατον να καθοριστεί ένα μείγμα αερίων. Έτσι για κάθε είδος φρούτου η κατάλληλη τροποποιημένη ατμόσφαιρα που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να μελετηθεί πρώτα, λαμβάνοντας υπόψιν τον κίνδυνο ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών. Πολύ πετυχημένες εφαρμογές τροποποιημένης ατμόσφαιρας έχουν αναφερθεί για φρέσκα κομμάτια ανανά (*Marrero και Kader, 2006, Rocculi et al., 2009*), μήλα (*Rocculi et al., 2004*), ακτινίδια (*Rocculi et al., 2005*), πεπόνι (*Bai J, Saftner RA, Watada AE, 2003*) και μπανάνες (*Vilas-Boas et al., 2006*). Γενικά χαμηλά επίπεδα O₂ και υψηλά επίπεδα CO₂ χρησιμοποιούνται για να μειώσουν το ρυθμό αναπνοής των φρούτων και να αυξήσουν

την διάρκεια ζωής του προϊόντος. Ατμόσφαιρες με χαμηλά επίπεδα O₂ αναστέλλουν την ανάπτυξη των πιο αερόβιων αλλοιογόνων μικροοργανισμών, ενώ η αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών, ιδιαίτερα οι αναεροβικοί ψυχροτροφικοί μπορεί να διεγερθούν.

Η αντιμικροβιακή δράση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας και συγκεκριμένα του CO₂ σε σχέση με την *L. monocytogenes* έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών με αντικρουόμενα αποτελέσματα παρότι η βασική επίδραση του CO₂ στο βακτήριο *L. monocytogenes* είναι βακτηριοστατική (μείωση ρυθμού ανάπτυξης, αύξηση φάσης προσαρμογής) (Farber et al, 1996). Αριθμός μελετών έχει δείξει ότι ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται στις θερμοκρασίες 1-5 °C σε διάφορα είδη τροφίμων και περιβάλλον 100% CO₂ (Hart et al., 1991, Gill and Reichel, 1989, Sheridan et al., 1992). Αντίθετα σε περιβάλλον CO₂/N₂ (50/50) παρατηρείται ανάπτυξη σε εύρος θερμοκρασιών 4-10 °C (Nychas, 1994, Kramer and Baumgart, 1992, Manu-Tawiah et al., 1993). Προηγούμενη έρευνα αναφέρει ότι ατμόσφαιρα χαμηλή σε περιεκτικότητα οξυγόνου δεν είχε καμία επίδραση στον πληθυσμό της *Listeria monocytogenes* που βρίσκεται πάνω σε κομμάτια μήλου, αλλά εμφανισιακά τα κομμάτια μήλου βελτιώθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας σε σύγκριση με την αποθήκευσή τους σε αέρα (Conway et al., 2000). Σε αντίθεση, η ανάπτυξη του *E. coli* O157: H7 αναστάλθηκε στα κομμάτια μήλου που αποθηκεύθηκαν σε συνθήκες χαμηλού O₂ (1%) και υψηλές συγκεντρώσεις CO₂ (0, 15, 30%) σε σύγκριση με τον αέρα (Gunes και Hotchkiss, 2002). Αυτό παρατηρήσαμε και εμείς στην μελέτη μας, αφού ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* και στα τρία φρούτα, στο μάρτυρα του καθενός (λίγο πιο αργά στο μήλο), αυξήθηκε και η φάση προσαρμογής μειώθηκε. Αυτό ίσως έχει να κάνει με την θερμοκρασία αποθήκευσης (10 °C) των φρούτων αφού σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και εύρος θερμοκρασίας 4-10 °C ενοείται η ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Ωστόσο δεν είδαμε τα ίδια αποτελέσματα στο παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli* αφού η αναπτυξή του ήταν μικρότερη κατά 1,5 log cfu/g κατά την 13^η ημέρα της συντήρησής του στους 10 °C σε σχέση με τη *L. monocytogenes*. Οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες μειώνουν την ανάπτυξη των μυκήτων και της μούχλας, και έτσι η διάρκεια ζωής των φρούτων αυξάνεται.

Στην περίπτωση του μάρτυρα, δηλαδή του δείγματος στο οποίο ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* εμβολιάστηκε σε κομμάτια φρούτων (10³-10⁴ log cfu/g) και στη συνέχεια συντηρήθηκε χωρίς την εδωδιμη μεμβράνη παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασία 10 °C και συντήρηση σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (20%CO₂-80%N₂), η φάση προσαρμογής ήταν μικρή με σχετικά μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης με αποτέλεσμα ο τελικός πληθυσμός να προσεγγίσει το 7,2 log cfu/g για τα κομμένα μήλα, το 8,4 log CFU/g για τα αχλάδια και το 8,6 log CFU/g για τις μπανάνες μετά από 20 μέρες συντήρησης στους 10 °C (Σχήμα 1) ενώ στον παθογόνο *E.coli* ο ρυθμός ανάπτυξης του πληθυσμού ήταν πιο αργός με αποτέλεσμα μετά από 20 ημέρες συντήρησης στην ίδια θερμοκρασία οι τελικοί πληθυσμοί να είναι 6,3 log cfu/g για τα μήλα, 5,8 log cfu/g για τα αχλάδια και 4,6 log cfu/g για τις μπανάνες (Σχήμα 11). Πιθανότατα η ανάπτυξη μικροβιακής χλωρίδας να ενεργοποίησε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Αντίστοιχες έρευνες έχουν γίνει και σε άλλα είδη μήλων (Raybaudi-Massilia et al., 2008).

Παράλληλα, οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες αναστέλλουν τη δράση της πολυφαινολικής οξειδάσης και μειώνουν την αλλαγή του χρώματος στα κομμένα φρούτα. Ως εκ τούτου, μαζί με τη χρήση εδωδιμων μεμβρανών και χαμηλές συνθήκες συντήρησης, οι τροποποιημένες ατμόσφαιρες μπορούν με τη σωστή χρήση τους να αυξήσουν τη διάρκεια ζωής των φρούτων και λαχανικών.

4.3 Εδωδιμες Μεμβράνες

Τα φρεσκοκομμένα φρούτα είναι πιο ευπαθή σε σχέση με τα ολόκληρα λόγω τραυματισμού κατά την διάρκεια της προετοιμασίας τους (Brecht, 1995). Οι φυσικοί και χημικοί παρεμποδιστές της επιδερμίδας των φρούτων, οι οποίοι αποτρέπουν την ανάπτυξη των μικροβίων στην επιφάνεια των φρούτων, αφαιρείται με το κόψιμο των φρούτων (Martí'n-Belloso, Soliva-Fortuny και Oms-Oliu,

2006). Η εμφάνιση σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι ο πιο πρακτικός τρόπος για να επεκταθεί η μικροβιολογική σταθερότητα στα φρεσκοκομμένα φρούτα. Ωστόσο η εφαρμογή των αντιμικροβιακών ουσιών απευθείας στη επιφάνεια του φρούτου μπορεί να έχει περιορισμένα οφέλη γιατί οι δραστικές ουσίες εξουδετερώνονται ή διαχέονται στην επιφάνεια του τροφίμου, περιορίζοντας έτσι την δράση της αντιμικροβιακής ένωσης (Min & Krochta, 2005).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι εδώδιμες επικαλύψεις και μεμβράνες με ενσωμάτωση αντιμικροβιακού παράγοντα μπορούν να έχουν ανασταλτικές ιδιότητες κατά της αλλοίωσης του φρούτου και των παθογόνων βακτηρίων που προσβάλλουν αυτά, διατηρώντας αποτελεσματικές συγκεντρώσεις του δραστικού αντιμικροβιακού παράγοντα στις επιφάνειες των τροφίμων (Gennadios & Kurth, 1997).

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες αντιμικροβιακών που μπορούν να ενσωματωθούν στις εδώδιμες μεμβράνες και συμπεριλαμβάνονται σε αυτά τα οργανικά οξέα (οξικό, βεζοϊκό, γαλακτικό, προπιονικό), τα λιπαρά οξέα (γλυκερόλη), τα πολυπεπτίδια (λυσοζύμη, υπεροξειδάση, νισίνη), νιτρώση και θειώδη άλατα και αιθέρια έλαια (κανέλα, ρίγανη, λεμονόχορτο) μεταξύ άλλων (Franssen & Krochta, 2003). Γι' αυτό και εμείς στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήσαμε αιθέρια έλαια κανέλας και μαστίχας μιας και τα βασικά τους συστατικά (κινναμαλδεύδη και α-πινένιο αντίστοιχα) έχουν αντιμικροβιακή δράση.

Αν και ο πραγματικός μηχανισμός δράσης τους δεν είναι κατανοητός, η αντιβακτηριακή δράση των οργανικών οξέων προέρχεται από το γεγονός ότι τα πρωτονιωμένα οξέα διαλύονται στην μεμβράνη και μπορούν να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα με απλή διάχυση (Ricke, 2003). Οι Lee, Park, Lee, και Choi (2003) ανέφεραν ότι φέτες μήλου καλυμμένες με καραγεννάνη που περιέχει ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ και οξαλικό οξύ επέκτεινε τη διάρκεια ζωής του κατά 2 βδομάδες σε θερμοκρασία 3 °C. Οι Garcia, Martino, και Zaritzky (2001), μείωσαν την μικροβιακή ανάπτυξη κάτω των 6 log cfu/g κατά τη μέγιστη διάρκεια διατήρησης του προϊόντος (28 ημέρες) και επέκτεινε την διάρκεια ζωής των φρέσκων φραουλών χρησιμοποιώντας μία μεμβράνη από άμυλο που περιείχε σορβικό κάλιο και κιτρικό οξύ.

Ωστόσο τα τελευταία χρόνια υπάρχει σημαντική πίεση των καταναλωτών για μείωση η εξάλειψη των σύνθετων χημικών προσθέτων στα τρόφιμα.

Τα αιθέρια έλαια είναι μία εναλλακτική λύση και ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις των καταναλωτών για φυσικά προϊόντα, όπως αναφέρθηκε από τον Burt (2004) και αυτός είναι ο λόγος που χρησιμοποιήσαμε δύο αιθέρια έλαια με αντιμικροβιακή δράση. Το αιθέριο έλαιο κανέλας το οποίο έχει μελετηθεί ευρύτατα αλλά και το αιθέριο έλαιο μαστίχας. Η δραστηριότητα των αιθερίων ελαίων και των ενεργών συστατικών τους έχει μελετηθεί ευρέως κατά πολλων μικροοργανισμών, και μερικών παθογόνων (Delaquis, Stanich, Girard, & Mazza, 2002; Karatzas, Bennik, Smid, & Kets, 2000; Va'zquez, Fente, Franco, Va'zquez, & Cepeda, 2001), αν και ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001). Στο πλαίσιο αυτό ο Burt (2004) ανέφερε ότι η υδροφοβικότητα είναι ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθερίων ελαίων, το οποίο τα καθιστά ικανά να περνούν μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες και εισέρχονται στα μιτοχόνδρια, διαταράσσοντας τις εσωτερικές δομές και καθιστώντας της μεμβράνες τους πιο διαπερατές.

Η εφαρμογή των αιθερίων ελαίων στα τρόφιμα είναι ακόμη περιορισμένη, λόγω των προβλημάτων που δημιουργούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους, τη μεταβλητότητα της σύνθεσής τους και την μεταβολή της δραστηριότητάς τους λόγω αλληλεπιδράσεων με τα συστατικά του τροφίμου (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008). Παρόλα αυτά, η χρήση των αιθερίων ελαίων, στον έλεγχο της μικροβιακής αύξησης στα τρόφιμα, έχει προταθεί για διάφορα προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων φρούτων και λαχανικών. Στη μελέτη μας παρατηρήσαμε ότι το αιθέριο

έλαιο κανέλας 0,7% με βασικό συστατικό του την κινναμαλδεΐδη ήταν δραστικό στην μείωση του παθογόνου *Listeria monocytogenes* και πολύ πιο δραστικό στην *Escherichia coli* καθώς και στην ολική μικροβιακή χλωρίδα στα αχλάδια και στις μπανάνες, αλλά λιγότερο αποτελεσματικά στα μήλα. Οι *Roller and Seedhar* (2002) παρατήρησαν σε μια παρόμοια μελέτη ότι η καρβακρόλη και η κινναμαλδεΐδη ήταν πολύ δραστικά στην μείωση της φυσικής χλωρίδας σε ακτινίδια, όταν χρησιμοποιήθηκε σε 0,15mL, αλλά λιγότερο αποτελεσματικά ήταν σε πεπόνι, πιθανών λόγω της διαφοράς μεταξύ του pH στα δύο φρούτα. Επιπλέον, οι *Min and Krochta* (2005) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή των αντιμικροβιακών απευθείας στο φρούτο είχε μειωμένα οφέλη γιατί η δραστική ουσία του αντιμικροβιακού μπορούσε να εξουδετερωθεί σε άμεση επαφή με το φρούτο.

Πολλοί παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψιν για την ανάπτυξη μιας αντιμικροβιακής εδώδιμης μεμβράνης, συμπεριλαμβανομένων των ιδιοτήτων των τροφίμων, την επικάλυψη και την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων σε συνδυασμό με την μεμβράνη. Γι' αυτό το λόγο πρέπει να γίνουν προκαταρκτικές μελέτες για να αξιολογηθεί η αντιμικροβιακή επίδραση ενός συστατικού σε συνδυασμό με μια εδώδιμη μεμβράνη στην επιφάνεια ενός πραγματικού τροφίμου. Οι *Rojas-Grau, Avena-Bustillos* (2006) και *Rojas-Grau, Olsen* (2007) μελέτησαν τις επιδράσεις του αιθερίου ελαίου της ρίγανης, της κανέλας και του λεμονόχορτου και των ενεργών συστατικών τους (καρβακρόλη, κινναμαλδεΐδη και citral) τα οποία ενσωματώθηκαν σε μεμβράνη από αλγινικά άλατα κατά του βακτηρίου *Escherichia coli* O157:H7. Η αποτελεσματικότητα αυτών των αντιμικροβιακών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των μεμβρανών. Σε αυτές τις μελέτες, το αιθέριο έλαιο ρίγανης και το ενεργό συστατικό του, καρβακρόλη, έδειξε την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα κατά του *E. coli* O157:H7. Και οι δύο μελέτες έδειξαν ότι οι μεμβράνες που φτιάχνονται από φρούτα και αλγινικά άλατα έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιούνται ως φορείς αντιμικροβιακών ουσιών σε συνδυασμό με τα αιθέρια έλαια σε κομμένες επιφάνειες τροφίμων. Σύμφωνα με αυτές τις προκαταρκτικές μελέτες του *Rojas-Grau, Raybaudi-Massilia* και συν. (2007) ο συνδυασμός των αλγινικών μεμβρανών με την αντιμικροβιακή επίδραση των αιθερίων ελαίων (λεμονόχορτο, κανέλα, ρίγανη) παρατείνει τη διάρκεια ζωής των φρεσκοκομμένων μήλων. Παρατήρησαν μείωση κατά 4 log cfu/g στον πληθυσμό της *Listeria innocua* σε κομμένα μήλα όταν η εδώδιμη μεμβράνη περιείχε κανέλα ή λεμονόχορτο. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στην δική μας μελέτη αφού η χρήση εδώδιμων μεμβρανών σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο κανέλας ανέστειλε τον πληθυσμό του παθογόνου βακτηρίου *E.coli* στα μήλα κατά 4 log cfu/g και 3 log cfu/g στα αχλάδια και στις μπανάνες. Ίδια σχεδόν πορεία ακολούθησε και η ολική μικροβιακή χλωρίδα. Ωστόσο, το αιθέριο έλαιο μαστίχας, που η δράση του δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής, δεν μας έδωσε τα ίδια αποτελέσματα παρά μόνο στη μπανάνα η οποία είχε αντίστοιχη μείωση του παθογόνου *E.coli* με την κανέλα. Ο συνδυασμός αυτών των δύο αιθερίων ελαίων δεν μας έδωσε καλύτερα αποτελέσματα όπως θα περιμέναμε. Οι εδώδιμες μεμβράνες με αιθέριο έλαιο κανέλας 0,7% δεν παρουσίασε την ίδια αποτελεσματικότητα στο παθογόνο *Listeria monocytogenes*, αφού προκάλεσε αναστολή στην αύξηση του πληθυσμού του κατά 2,5 log cfu/g για τα μήλα και 1-1,5 log cfu/g για τα αχλάδια και τις μπανάνες. Στο αιθέριο έλαιο της μαστίχας 0,7% παρατηρήθηκε ότι ούτε εδώ είχε ιδιαίτερη επίδραση στη μείωση του παθογόνου και της ολικής μικροβιακής χλωρίδας.

Τα αχλάδια και οι μπανάνες διατηρήθηκαν κατά 2 βδομάδες περίπου καλύτερα όταν στις εδώδιμες μεμβράνες προστέθηκε αιθέριο έλαιο κανέλας 0,7% και αύξησε την αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών με αποτέλεσμα να μειώσει τον πληθυσμό του *E.coli* O157:H7 κατά 3 log cfu/g. Οι *Raybaudi-Massilia, Rojas-Grau, Mosqueda-Melgar, και Marti'n-Belloso* (2008) έδειξαν σε μελέτη τους ότι η προσθήκη αιθερίου ελαίου κανέλας, γαρίφαλου ή λεμονόχορτου σε ποσοστό 0,7% (v/v) ή τα ενεργά συστατικά τους (κινναμαλδεΐδη, ευγενόλη, citral) σε ποσοστό 0,5% (v/v) σε εδώδιμες μεμβράνες από αλγινικά άλατα, αύξησε την αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών με αποτέλεσμα να μειώσει τον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 περισσότερο από 4 log cfu/g και επέκτεινε την διάρκεια ζωής των μήλων "Fuji" για τουλάχιστον 30 ημέρες. Ωστόσο, παρατήρησαν ότι το

λεμονόχορτο και το ενεργό συστατικό του citral ενήργησε πιο γρήγορα κατά του *E.coli* O157:H7 την 0^η ημέρα σε σχέση με τα υπόλοιπα αντιμικροβιακά που χρησιμοποιήθηκαν, γεγονός που υποδηλώνει ότι το αιθέριο έλαιο εισήχθει στο βακτήριο πιο εύκολα (υψηλότερο ποσοστό διάχυσης), προκαλώντας ανεπανόρθωτες βλάβες και θανάτωση των κυττάρων. Αργότερα, οι ίδιοι συγγραφείς αξιολόγησαν την επίδραση της αλγινικής μεμβράνης με ενσωματωμένο μηλικό οξύ και αιθέρια έλαια (κανέλα, λεμονόχορτο και palmarosa) για τη επέκταση της διάρκειας ζωής του φρεσκοκομμένου πεπονιού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, η ενσωμάτωση 0,3% v/v αιθέριου ελαίου palmarosa δείχνει πολλά υποσχόμενη, αφού ανέστειλε την ανάπτυξη της ολικής μικροβιακής χλωρίδας και μείωσε τον πληθυσμό της *Salmonella Enteritidis* (Raybaudi-Massilia, Mosqueda-Melgar, & Marti'n-Belloso, 2008).

Στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε, χρησιμοποιήσαμε αλκοολούχα αποστάγματα στην ενσωμάτωση των αλγινικών μεμβρανών για την περαιτέρω έρευνα των βασικών συστατικών της κανέλας (κινναμαλδεΐδη) και της μαστίχας (α -πινένιο). Αυτά είναι το λικέρ Τεντούρα (περιέχει κανέλα) και το λικέρ Μαστίχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη σε εδώδιμες αλγινικές μεμβράνες, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες των ποτών. Σκοπός αυτής της επιλογής ήταν να μελετήσουμε την επίδραση αυτών των δύο ποτών στην μείωση του πληθυσμού των δύο παθογόνων καθώς και της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, όπως επίσης και την επέκταση της διάρκειας ζωής των φρούτων.

Όσον αφορά τα ποτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες στις εδώδιμες μεμβράνες παρατηρήσαμε διαφοροποιήσεις στα τρία διαφορετικά φρούτα για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *L. monocytogenes*. Στο μήλο η μεμβράνη με το λικέρ κανέλας 25% (2:1) μείωσε τον πληθυσμό του βακτηρίου κατά δύο λογάριθμους, ενώ το λικέρ μαστίχας 25% (2:1) προκάλεσε μείωση ενός λογαρίθμου κατά την 13^η ημέρα συντήρησης στους 10 °C. Το ίδιο συνέβη και με τη μεμβράνη με ενσωματωμένη την αιθανόλη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για τα δύο λικέρ και προκάλεσε μείωση κατά δύο λογάριθμους. Επομένως παρατηρήθηκε ότι η μείωση που προκάλεσαν τα δύο λικέρ, ίσως να μην οφείλεται στα δραστικά συστατικά τα οποία περιέχουν (κινναμαλδεΐδη και α -πινένιο) αλλά στην ύπαρξη της αιθανόλης, η οποία έχει την ικανότητα να καταστρέφει τον μικροοργανισμό γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται σαν απολυμαντικό. Στο αχλάδι παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου κατά 2 λογάριθμους τόσο με τη χρήση μεμβρανών με αιθανόλη όσο και με το λικέρ κανέλας. Ενώ το αντίθετο συνέβη με τη μπανάνα αφού η πιο αποτελεσματική μεμβράνη στη μείωση του βακτηρίου κατά 1,5 λογάριθμο ήταν αυτή με την αιθανόλη.

Στο μήλο οι μεμβράνες με τα αλκοολούχα αποστάγματα και την αιθανόλη δεν είχαν σχεδόν καμία επίδραση στη μείωση του πληθυσμού του *E.coli* αφού ο πληθυσμός του δεν μειώθηκε σχεδόν καθόλου κατά την 2^η ημέρα της συντήρησής του στους 10 °C. Το ίδιο παρατηρήσαμε και για το αχλάδι αφού δεν μειώθηκε σχεδόν καθόλου ούτε ο πληθυσμός του βακτηρίου αλλά ούτε και ο πληθυσμός της ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Το μόνο φρούτο που έκανε τη διαφορά σε αυτή την περίπτωση, είναι η μπανάνα στην οποία παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου κατά 1,5 log cfu/g για το λικέρ Τεντούρα, 1 log cfu/g για το λικέρ Μαστίχας και 2.4 log cfu/g για την αιθανόλη. Αντίστοιχη μείωση παρατηρήθηκε και για την ολική μικροβιακή χλωρίδα στην περίπτωση της αιθανόλης (Σχήμα 6, 7, 8).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα που προκύπτουν από την μικροβιακή ανάλυση των δειγμάτων δείχνουν ότι ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* ήταν μικρότερος στα μήλα σε σχέση με τα αχλάδια και της μπανάνες. Αυτό ίσως οφείλεται στο ελαφρώς πιο χαμηλό pH των μήλων που επιβραδύνουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού αφού το κατάλληλο pH για ανάπτυξη της *L. monocytogenes* είναι 5-9. Επίσης, συμπεραίνουμε ότι το αιθέριο έλαιο της κανέλας δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα, αφού σε άλλες έρευνες που είδαμε παραπάνω είχε πολύ μεγαλύτερη δράση, ιδιαίτερα στα μήλα (μείωση ως και 4 log cfu/g). Από τα δύο λικέρ το πιο

αποτελεσματικό ήταν αυτό της κανέλας, ενώ γενικά η μαστίχα είτε σε αιθέριο έλαιο είτε σε λικέρ δεν μας έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα όσον αφορά τη μείωση του παθογόνου βακτηρίου αλλά και τις ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Στην περίπτωση του *E.coli* είδαμε μεγαλύτερη πληθυσμιακή ανάπτυξη στα μήλα, ακολούθησαν τα αχλάδια και οι μπανάνες. Στην μπανάνα παρατηρήσαμε ότι όλες οι μεταχειρήσεις είχαν θετικά αποτελέσματα με αποτέλεσμα να επεκταθεί ο χρόνος ζωής τους. Στο αχλάδι και στο μήλο οι πιο αποτελεσματικές μεταχειρήσεις που χρησιμοποιήσαμε ήταν αυτή του αιθερίου ελαίου κανέλας που προκάλεσε μείωση και στον παθογόνο και στην ολική μικροβιακή χλωρίδα.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (10 °C) και τροποποιημένης ατμόσφαιρας (20%CO₂-80%N₂) τη μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα είχαν οι εδώδιμες μεμβράνες με ενσωματωμένο το αιθέριο έλαιο κανέλας 0,7% και κατ' επέκταση, το κύριο συστατικό του η κινναμαλδεΰδη, και στις δύο περιπτώσεις παθογόνων και ακολούθησαν οι μεμβράνες με την αιθανόλη σε ποσοστό 25%. Η μαστίχα και το λικέρ μαστίχας δεν παρουσίασε μεγάλη αποτελεσματικότητα και τα αποτελέσματα που περιμέναμε δεν ήταν τα επιθυμητά.

Παρά τα καλά αποτελέσματα που επιτεύχθηκαν μέχρι τώρα, με την ενσωμάτωση αιθερίων ελαίων σε εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις, το μεγαλύτερο μειονέκτημα είναι η έντονη γεύση τους, η οποία σε πολλές περιπτώσεις αλλάζει την αυθεντική γεύση των φρούτων. Οι επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των φρεσκοκομμένων φρούτων θα πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των εδώδιμες μεμβρανών και επικαλύψεων είναι ένα σημαντικό ζήτημα για μελλοντική έρευνα. Προς το παρόν, οι περισσότερες μελέτες σε εφαρμογές τροφίμων έχουν γίνει σε εργαστηριακή κλίμακα. Ωστόσο, περαιτέρω έρευνα θα πρέπει να επικεντρώνεται σε εμπορική κλίμακα με σκοπό την παροχή πιο ρεαλιστικών πληροφοριών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εμπορευματοποίηση φρεσκοκομμένων φρούτων επικαλυμμένα με εδώδιμες μεμβράνες ή επικαλύψεις. Παρά τους περιορισμούς, οι βιομηχανίες τροφίμων ψάχνουν για εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων και θα αποκτήσουν μεγαλύτερη αξία, ενώ θα αυξήσουν τη διάρκεια ζωής τους.

Τέλος, περισσότερες μελέτες είναι απαραίτητες για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δραστικών συστατικών και των υλικών των μεμβρανών κατά την ανάπτυξη νέων εφαρμογών στις εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις. Ότα τα ενεργά συστατικά (αντιμικροβιακές ουσίες, αντιοξειδωτικά, θρεπτικά συστατικά) προστίθενται στις εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις, μηχανικές, αισθητικές και λειτουργικές ιδιότητες, μπορούν να επηρεαστούν δραματικά. Οι μελέτες για το θέμα αυτό είναι μάλλον περιορισμένες, και απαιτούνται περισσότερες πληροφορίες προκειμένου να αναπτυχθούν νέες μεμβράνες με βελτιωμένη λειτουργικότητα και υψηλή απόδοση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του φρούτου.

5° ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

5.Βιβλιογραφία

Alzamora, S.M., Guerrero, S., 2003. Plant antimicrobials combined with conventional preservatives for fruit products. In: Roller, S. (Ed.), *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing Foods*. CRC Press, Florida, pp. 235–249.

Arai, L, Kinumaki, Y. and Fujita, T., 1968. Toxicity of chitosan. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* 56: 89.

Bai J, Saftner RA, Watada AE. Characteristics of fresh-cut honeydew (*Cucumis x melo* L.) available to processors in winter and summer and its quality maintenance by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*. 2003;28:349–359.

Bai, J.; Hagenmaier, R.D. and Baldwin, E.A. 2003b. Coating selection for ‘Delicious’ and other apples. *Postharvest Biology and Technology* 28: 381-390.

Baker, R.A., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O. 1994. Edible coatings and films for processed foods, p. 89-104. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic, Lancaster, USA.

Baldwin, E.A. 1994. Edible coatings for fresh fruit and vegetables: Past, present and future, p. 25-64. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic, Lancaster, USA.

Baldwin, E.A.; Nisperos, M.O.; Chen, X. and Hagenmaier, R.D. 1996. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology* 9: 151-163.

Baldwin, E.A. 2003. Coatings and other supplemental treatments to maintain vegetable quality. In: *Postharvest physiology and pathology of vegetables* (p. 413-435). Eds. Bartz, J.A. and Brecht, J.K., Marcel Dekker, USA.

Bebb J.R., Bailey-Flitter N., Ala’Aldeen D. and Atherton J.C. Mastic gum has no effect on *Helicobacter pylori* load in vivo. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 522-23.

Benhamou, N.; Lafontaine, P.J. and Nicole, M. 1994. Induction of systemic resistance to *Fusarium Crown and Root Rot* in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84 (12): 1432-1443.

Braun Lesley, *Herbs and natural supplements an evidence based guide, 2nd Edition*, Elsevier Australia:238-241; 2007.

Body, L. and Wimpenny, J.W.T. (1992) Ecological concepts in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.*, 73, 23-38.

Bosquez-Molina, E.; Guerrero-Legarreta, I. And Vernon-Carter, E.J. 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International* 36: 885-893.

Brecht, J. K. (1995). Physiology of lightly processed fruits and vegetables’ in lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, 30, 18-22.

- Burt, S.A., Reinders, R.D., 2003.** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 36, 162–167.
- Burt, S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.
- Cagri, A., Uspunol, Z., Ryser, E., 2004.** Antimicrobial edible films and coating. *J. Food Prot.* 67, 833–848.
- Certel, M., Uslu, M.K. and Ozdemir, F. 2004.** Effects of sodium caseinate- and milk protein concentrate-based edible coatings on the postharvest quality of Bing cherries. *J. Sci. Food. Agric.* 84: 1229-1234.
- Chen, N. and Shelef, L.A. (1992)** Relationship between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J. Food Protect.*, 55, 574-578.
- Chevallier A.** Βοτανοθεραπεία, Μεγάλη Εγκυκλοπαίδεια Θεραπευτικών Φυτών. New Εκδόσεις Δομική. Αθήνα; 1999:80
- Conner, D.E. and Beuchat, L.R. (1984)** Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, 49, 429-34.
- Davidson, M.P. and Branden L.A., (1981)** Antimicrobial activity of nonhalogenated phenolic compounds. *J. Food Protect.*, 44, 623-632.
- Denyer, S.P. and Hugo, W.B. (1991).** Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In *Mechanisms of action of chemical biocides; their study and exploitation. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series 27.* Eds. Denyer, S.P, and Hugo, W.B. pp.171-188. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- 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.
- Dabbah, R., Edwards, V.M. and Moats, W.A. (1970)** Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl. Microbiol.*, 19, 27-31.
- Deans, S.G. and Ritchie, G (1987)** Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, 5, 165-180.
- Del Rosario, B.A., Beuchat, L.R., 1995.** Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *J. Food Prot.* 58, 105–107.
- DeWit, J.C., Notrmans, S., Gorin, N. and Kampelamacher, E.H. (1979)** Effect of garlic oil or onion oil on toxin production of *Clostridium botulinum* in meat slurry. *J. Food Protect.*, 42, 222-224.
- Diab, T., Biliaderis, C.G., Gerasopoulos, D. and Sfakiotakis, E. 2001.** Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruits preservation. *J. Sci. Food. Agric.* 81: 988-1000.

- Dziezak, J.D. (1989)** *Spices. Food Technol.*, 43, 102-116.
- Donhowe, I.G and Fennema, O. 1994.** *Edible films and coatings: Characteristics, formation, definition and testing methods*, p. 1-24. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible coatings and films to improve food quality*. Technomic, Lancaster, USA.
- Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K. and Jiang, Y. 2004.** *Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. Journal of Food Engineering* 64: 355-358.
- Du, J., Gemma, H. and Iwahori, S. 1997.** *Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear and kiwifruit. J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 66 (1): 15-22.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalan, R. and Boulet, M. 1991.** *Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. J. Food Science* 56: 1618-1620.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Grenier, J., Asselin, A. 1992b.** *Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology* 82: 398-402.
- El Ghaouth, A.; Smilanick, J.L. and Wilson, C.L. 2000.** *Enhancement of the performance of Candida saitoana by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. Postharvest Biology and Technology* 19: 103-110.
- Fallik, E., Shalom, Y., Alkalai-Tuvia, S., Larkov, O., Brandeis, E. and Ravid, U. 2005.** *External, internal and sensory traits in Galia-type melon treated with different waxes. Postharvest Biology and Technology* 36: 69-75.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991).** *Listeria monocytogenes, a foodborne pathogen. Microbiol Rev* 55: 476-511.
- Farber, J.M., Cai, Y. and Ross, W.H. (1996)** *Predictive modeling of the growth of Listeria monocytogenes in CO2 environments. Int. J. Food Microbiol.*, 32, 133-144.
- Farrag, S.A. and Marth, E.H. (1989)** *Growth of Listeria monocytogenes in the presence of Pseudomonads fluorescens at 7 or 13oC in skim milk. J. Food Protect.*, 52, 852-855.
- Fenaroli, G (Ed.), 1995.** *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients*. CRC Press, Florida.
- Franssen, L. R., & Krochta, J. M. (2003).** *Edible coatings containing natural antimicrobials for processed foods. In S. Roller (Ed.), Natural antimicrobials for minimal processing of foods (pp. 250-262). Boca Raton: CRC Press.*
- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., Mandrell, R.E., 2004.** *Antibacterial activities of plant essential oils and their components against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica in apple juice. J. Agric. Food Chem.* 52, 6042-6048.
- García, J.M., Herrera, S. and Morilla, A. 1996.** *Effects of postharvest dips in calcium chloride on strawberry. J. Agr. Food Chem.* 44: 30-33.
- Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2001).** *Composite starch-based coatings applied to strawberries (Fragaria ananassa). Nahrung/Food*, 45, 267-272.
- Garcia, M.A., Pinotti, A., Martino, M.N. and Zaritsky, N.E. 2004.** *Characterization of composite*

hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers* 56: 339-345.

Gennadios, A. and Weller, C.L. 1990. *Edible films and coatings from wheat and corn proteins. Food Technology* 44: 63-69.

Gennadios, A., McHugh T.H., Weller C., and Krochta, J.M. 1994. *Edible coatings and films based on proteins. Pages 201-277. In: Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. J.M. Krochta, E.A. Baldwin, and M. Nisperos-Carriedo (Eds.), Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, Pennsylvania, USA.*

Gennadios, A., & Kurth, L. B. (1997). *Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 30, 337-350.*

George, S.M., Richardson, L.C.C. and Peck, M.W. (1996) *Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of Listeria monocytogenes. Int. J. Food Microbiol., 32, 73-90.*

Gill, C.O., Reichel, M.P., (1989). *Growth of cold tolerant pathogens Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophila and Listeria monocytogenes on high pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. Food Microbiology. 6, 223- 320.*

Gould, G W. (1996) *Methods for preservation and extension of shelf life. Int. J. Food Microbiol., 33, 51-64.*

Gontard, N.; Duchez, C.; Cuq, J. and Guilbert, S. 1994. *Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. International Journal of Food Science and Technology* 29: 39-50.

Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1992) *Occurrence, numbers and growth of Listeria monocytogenes on some vacuum-packaged processed meats. J. Food Protect., 55, 4-7*

Guilbert, S.; Gontard, N.; Gorris, L.G.M. 1996. *Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 29: 10-17.*

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). *The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology, 124, 91-97.*

Hagenmaier, R.D. and Shaw, P.E. 1991. *Permeability of shellac coatings to gases and water vapor. J. Agr. Food Chem. 39: 825-829.*

Hagenmaier, R.D. and Shaw, P.E. 1992. *Gas permeability of fruit coating waxes. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 117: 105-109.*

Hagenmaier, R.D. and Baker, R.A. 1993. *Cleaning method affects shrinkage rate of citrus fruit. HortScience* 28: 824-825.

Hagenmaier, R.D. and Baker, R.A. 1995. *Layered coatings to control weight loss and preserve gloss of citrus fruit. HortScience* 30: 296-298.

Hall, A.M. and Maurer, J.A. (1985) *Spice extracts, lauricidin, and propylene glycol as inhibitors of Clostridium botulinum in turkey frankfurter slurries. Spice Extracts, Lauricidin, Propylene Glycol.*

1167 – 1171.

Han, C., Zhao, Y., Leonard, S.W. and Traber, M.G. 2004. *Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology* 33: 67-78.*

Hardenburg, R.E. 1967b. *Wax and related coatings of horticultural products. A bibliography. Agr. Res. Bul. No. 51-15. Cornell University, Ithaca, NY, p. 1-15.*

Hargreaves, L.L., Jarvis, B., Rawlinson, A.P. and Wood, J.M. (1975) *The antimicrobial effects of spices, herbs and extracts from these and other food plants. The British Food Manufacturing Industries Research Association Scientific and Technical Surveys, 88.*

Harmayani, E., Sofos, J.N. and Schmidt, G.R. (1993) *Fate of *Listeria monocytogenes* in raw and cooked ground beef with meat processing additives. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 223-232.*

Hart, C.D., Mead, G.C. and Norris, A.P. (1991) *Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 40-46.*

Hernandez, E. 1994. *Edible coatings from lipids and resins, p. 279-303. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible coatings and films to improve food quality. Technomic, Lancaster, USA.**

Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M.J. and Gavara, R. 2006. *Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*). *Postharvest Biology and Technology* 39: 247-253.*

Hirano, S. and Nagao, N. 1989. *Effect of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.* 53: 3065-3066.*

Ismael A. Adnan, and Pierson D.M. (1990) *Inhibition of germination, outgrowth, and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. *J. Food Protect.*, 53, 755-758.*

Jiang, Y. and Li, Y. 2001. *Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry* 73: 139-143.*

Ju, Z. and Curry, E. 2000. *Stripped corn oil emulsion alters ripening, reduces superficial scald, and reduces core flush in 'Granny Smith' apples and decay in 'd'Anjou' pears. *Postharvest Biology and Technology* 20: 185-193.*

Krishnamurthy KY. *Daalchini (*C. zeylanica* and *C. cassia*), tejpat (*C. tamala*, Nees). *J. New Approaches to Medicine and Health*;17:60-72,2009.*

Kader, A.A. 1986. *Biochemical and physiological basis for effects for controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. *Food Technology* 40: 99-104.*

Kaplan, H.J. 1986. *Washing, waxing and color adding, p. 379. In: Wardowski, W.F., Nagy, S. and Grierson, W. (Eds.). *Fresh Citrus Fruits*, Westport, CT: AVI Publishing Co.*

Karatzas, A. K., Bennik, M. H. J., Smid, E. J., & Kets, E. P. W. (2000). *Combined action of *S* carvone and mild heat treatment on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied**

Microbiology, 89, 296-301.

Kester, J.J. and Fennema, O.R. 1986. *Edible films and coatings: A review. Food Technology* 40: 47-59.

Kimoto, T.; Shibuya, T. and Shiobara, S. 1997. *Safety studies of a novel starch, Pullulan: Chronic toxicity in rats and bacterial mutagenicity. Food and Chemical Toxicology* 35 (3-4): 323-329.

Koutsoudaki C., Krsek M. and Rodger A. *Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil and the gum of Pistacia lentiscus Var. chia. J Agric Food Chem*, 2005; 53: 7681-85.

Kramer, K.-H., Baumgart, J., (1992). *Bruhwurstaufschmitt. Hemmung von Listeria monocytogenes durch eine modifizierte atmosphere. Fleischwirtsch* 72, 666-668.

Kubitschek, H. E. (1990). *Cell volume increase in Escherichia coli after shifts to richer media. J. Bacteriol.* 172 (1): 94–101.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). *A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

Lee, J. Y., Park, H. J., Lee, C. Y., & Choi, W. Y. (2003). *Extending shelflife of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, 323-329.

Lerdthanankul, S. and Krochta, J.M. 1996. *Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. Journal of Food Science* 61: 176-179.

Loughlin M.F., Ala'Aldeen D.A. and Jenks P.J. *Monotherapy with mastic does not eradicate Helicobacter pylori infection from mice. J Antimicrob Chemother*, 2003; 51: 367-71.

Lovett J. (1989). *Listeria monocytogenes. In: MP Doyle, ed. Foodborne Bacterial Pathogens. New York: Marcel Dekker Inc., 1989, pp. 284–310.*

Madigan, M. T., and Martinko, J. M. (2006). *Brock Biology of microorganisms (11th Ed.). Pearson. ISBN 0-13-196893-9.*

Magiatis P., Melliou E., Skaltsounis A.L., et al. *Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. Chia. Plant Med*, 1999; 65: 749-52.

Manu-Tawiah, W., Myers, D.J., Olson, D.G., and Molins, R.A., (1993) *Survival and growth of Listeria monocytogenes and Yersinia enterocolitica in pork chops packaged under modified gas atmospheres. J. Food Sci..* 58, 475- 479.

Marone P., Bono L., Leone E., et al. *Bacterial activity of Pistacia lentiscus mastic gum against Helicobacter pylori. J Chemother*, 2001; 13: 611-14.

Marrero A., Kader AA. *Optimal temperature and modified atmosphere for keeping quality of fresh-cut pineapples. Postharvest Biology and Technology.* 2006;39:163–168.

Marti'n-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Oms-Oliu, G (2006). *Freshcut fruits. In Y. H. Hui (Ed.), Handbook of fruits and fruit processing (pp. 129-144). Iowa: Blackwell Publishing.*

- Mauch, F., Hadwiger, L.A. and Boller, R. 1984.** Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol.* 76: 607-611.
- McHugh, T.H. and Krochta, J.M. 1994a.** Milk-protein-based edible films and coatings. *Food Technology* 48: 97-103.
- McHugh, T.H. and Krochta, J.M. 1994b.** Permeability properties of edible films, p. 139-187. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O. (Eds.). *Edible coatings and films to improve food quality.* Technomic Publishing Co., Lancaster, Pa.
- McHugh, T.H., Huxsoll, C.C., Krochta, J.M., 1996.** Permeability properties of fruit puree edible films. *J. Food Sci.* 61, 88–91.
- Mead P. S., Slutsker L., Dietz V, McCaig L. F, Bresee J. S., Shapiro C., Griffin P. M., Tauxe R. V. (1999).** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607–625.
- Min, S., & Krochta, J. M. (2005).** Inhibition of *Penicillium commune* by edible whey protein films incorporating lactoferrin, lactoferrin hydrolysate, and lactoperoxidase systems. *Journal of Food Science*, 70, M87-M94.
- Miszczak, A. 1994.** Effect of Pro-long treatment on quality of stored apples. *Acta Horticulturae* 368: 552-557.
- Moulos P, Papadodima O, Chatziioannou A, Loutrari H, Roussos C, Kolisis FN.** A transcriptomic computational analysis of mastic oil-treated Lewis lung carcinomas reveals molecular mechanisms targeting tumor cell growth and survival. *BMC Med Genomics.* 2009 Dec 15;2:68
- Nelson, K. and Fennema, O. 1991.** Methylcellulose films to prevent lipid migration in confectionery products. *J. Food Sci.* 56: 504-508.
- Nisperos-Carriedo, M.O.; Shaw, P.E. and Baldwin, E.A. 1990.** Changes in volatile flavor components of pineapple orange juice as influenced by the application of lipid and composite films. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1382-1387.
- Nisperos-Carriedo, M.O. 1994.** Edible coatings and films based on polysaccharides, pp. 305-335. In: Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo, M.O. (eds.). *Edible coatings and films to improve food quality.* Technomic, Lancaster, USA.
- Nychas G.J.E (1994)** "Modified Atmosphere Packaging of Meats" In: *Minimal Processing of Foods and Process optimization, An Interface.* pp.417-436 Eds R.P. Singh, F.A.R Oliveira, CRC Press, London
- Nychas G.J.E (1995)** Chapter 4; *Natural Antimicrobials from plants.* In *New Methods of Food Preservation*, Ed G.W. Gould, pp. 58-89, Blackie Academic.
- Ooi LS, Li Y, Kam S, Wang H, Wong EL, Ooi VC.** Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia*. *Am J. Chin Med*;34:511-522,2006.
- Paster, N., Juven, B.J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., and Ravid U, (1990).** Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Let.*

Appl. Microbiol., 11, 33-37.

Peek R.M. Jr. and Crabtree J.E. *Helicobacter infection and gastric neoplasia. J Pathol*, 2006; 208: 233-48.

Perez-Gago, M.B., Serra, M. and del Rio, M.A. 2006. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology* 39: 84-92.

Pinner R.W., Schuchat A., Swaminathan B., Hayes P.S., Deaver K.A., Weaver R.E., Pilkaytis B.D., Reeves M., Broome C.V., Wengerand J. (1992). The *Listeria* study group. Roles of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. *JAMA* 267:2046–2050.

Pranoto, Y., Salokhe, V., Rakshit, K.S., 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Res. Int.* 38, 267–272.

Ravindran PN, Babu KN, Shylaja M. *Cinnamon and cassia: the genus Cinnamomum. Medicinal and Aromatic Plants*, CRC Press, 2004.

Raybaudi-Massilia, R., Mosqueda-Melgar, J., Mart'in-Belloso, O., 2006. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in fruit juices. *J. Food Prot.* 69, 1579–1586.

Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, 82, 632-639.

Roberts A.T., (1989) Combinations of antimicrobials and processing methods-models for predicting response of microorganisms to various factors could help us understand and control microbial growth in foods. *Food Technol.*, 156–163.

Rocourt J., Cossart P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville, eds. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. Washington, DC:ASM Press, pp. 337–352.

Rocculi P, Romani S, Dalla Rosa M. Evaluation of physicochemical parameters of minimally processed apples packed in nonconventional modified atmosphere. *Food Research International*. 2004;37:329–335.

Rocculi P, Cocci E, Romani S, Sacchetti G, Dalla Rosa M. Effect of 1-MCP treatment and N₂O MAP on physiological and quality changes of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*. 2009;51:371–377.

Rojas-Grau" , M. A., Avena-Bustillos, R., Friedman, M., Henika, P., Marti'n-Belloso, O., & McHugh, T. (2006). Mechanical, barrier and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9262-9267.

Rojas-Grau" , M. A., Olsen, C., Avena-Bustillos, R. J., Friedman, M., Henika, P. R., Marti'n-Belloso, O., et al. (2007). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginateapple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81, 634-641.

Rojas-Grau" , M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., & Marti'n-Belloso, O. (2007). Apple pureealginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology*

and Technology, 45, 254-264.

Romanazzi, G; Nigro, F. and Ippolito, A. 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology* 29: 73-80.

Rojas-Grañu, M.A., Avena-Bustillos, R., Friedman, M., Henika, P., Mart'in-Belloso, O., McHugh, T., 2006. Mechanical, barrier and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9262–9267.

Saftner, R.A. 1999. The potential of fruit coating and film treatments for improving the storage and shelf-life qualities of 'Gala' and 'Golden Delicious' apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124: 682-689.

Salunkhe, D.K. and Wu, M.T. 1974. Control of postharvest glycoalkaloid formation in potato tubers. *J. Food Protect.* 42: 519-525.

Schlech, W. F. III (2000). Foodborne listeriosis. *Clin Infect Dis* 31:770–775.

Shelef, L.A (1983). Antimicrobial effects of spices. *J.Food Safety.* 6, 29-44.

Sheridan, J.J., Doherty, A., Allen, P., McDowell, D.A., Blair, I.S. and Harrington, D. (1995) Investigations on the growth of *Listeria monocytogenes* on lamb under modified atmospheres. *Food Microbiol.*, 12, 259-266.

Shingel, K.I. 2004. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, Pullulan. *Carbohydrate Research* 339: 447-460.

Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology reviews* 59, 201-222

Sisler, E.C. and Wood, C. 1988. Interaction of ethylene and CO₂. *Physiol. Plant.* 73: 440-444.

Smith, S.; Geeson, J. and Stow, J. 1987. Production of modified atmospheres in deciduous fruits by the use of films and coatings. *HortScience* 22 (5): 772-776.

Smock, R.M. 1935. Certain effects of wax treatments on various varieties of apples and pears. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 33: 284-289.

Smock, R.M. 1940. Some additional effects of waxing apples. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 37: 448-452.

Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davidson, P.M. and Johnson, E.A. (1998) Naturally occurring antimicrobials in foods. *Council for Agricultural Science and Technology, West Lincoln, USA.*

Stecchini, M.L., Sarais, I. and Giavedoni, P. (1993) Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *J. Food Protect.*, 56, 1075-1078.

Sterer N. Antimicrobial effect of mastic gum methanolic extract against *Porphyromonas gingivalis*. *J Med Food*, 2006; 9: 290-92.

Stossel, P. and Leuba, J.L. 1984. Effect of chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi. *Phytopathol. Z.* 111: 82-90.

Topitsoglou-Themeli V., Dagalis P. and Lambrou D.A. Chios mastiche chewing gum and oral hygiene. I. The possibility of reducing or preventing microbial plaque formation. *Hell Stomatol Crohn*, 1984; 28: 166-70.

Tulloch, A.P. 1970. Composition of insect beeswax and other insect waxes. *Lipids* 5: 247-248.

Wijtzes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H. and Roberts, T.A. (1993) Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, 18, 139-149.

Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. and González-Martínez, C. 2006. Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology* 41: 164-171.

Va'zquez, B. I., Fente, C., Franco, C. M., Va'zquez, M. J., & Cepeda, A. (2001). Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67, 157-163.

Vilas-Boas EVdeB, Kader AA. Effect of atmospheric modification, 1-MCP and chemicals on quality of fresh-cut banana. *Postharvest Biology and Technology*. 2006;39:155–162.

Xu, S.; Chen, X and Sun, D.-W. 2001. Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature. *Journal of Food Engineering* 50: 211-216.

Yoneyama, M., Okada, K., Mandai, T, Aga, H., Sakai, S. and Ichikawa, T. 1990. Effects of pullulan intake in humans. *Denpun Kagaku* 37: 123-127.

Yuen, S. 1974. Pullulan and its applications. *Process Biochemistry*, November '74: 7-9, 22.

Κατσής X. Τα βότανα στην Τρίτη Χιλιετία και η Χρήση τους στην Οικογένεια. Εκδόσεις Χιλιόφυλλο, Αθήνα; 2001:80.

Σαββίδης Θ. Το μαστιχόδενδρο της Χίου (*Pistacia lentiscus* var. Chia). ISBN: 960-343-528-7, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., 2000.