

“Συνδυαστική επίδραση αντιμικροβιακών εδώδιμων μεμβρανών, εμφάπτισης σε μαρινάδες και ψησίματος στην αδρανοποίηση των παθογόνων *Salmonella*, *E.coli* O157:H7 και *Listeria monocytogenes* σε χοιρινό κρέας”



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΛΥΤΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΑΘΗΝΑ

2012

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ

**ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΕΛΩΔΙΜΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ,
ΕΜΒΑΠΤΙΣΗΣ ΣΕ ΜΑΡΙΝΑΔΕΣ ΚΑΙ ΨΗΣΙΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΩΝ
ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ Salmonella, E.coli O157:H7 ΚΑΙ Listeria monocytogenes
ΣΕ ΧΟΙΡΙΝΟ ΚΡΕΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΑΥΤΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ)
ΔΡΟΣΙΝΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ
ΚΑΨΟΚΕΦΑΛΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου ,κ. Παναγιώτη Σκανδάμη, για τη συνεργασία και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μελέτης. Μέσα απ' τη συνεργασία μας είχα την ευκαιρία να μάθω πολλά πράγματα σχετικά με την επιστήμη και όχι μόνο, να προβληματιστώ και τελικώς να μπορώ να πω ότι ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές έκανα ένα βήμα παραπάνω τόσο σε επίπεδο γνώσεων όσο και σαν άνθρωπος.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Στοφόρο για τις πολύτιμες συμβουλές του σε διάφορα σημεία του πειράματος όπως και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη συμπαράστασή τους και τη βοήθεια που μου παρείχαν πρόθυμα κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην υποψήφια Διδάκτορα Ζιλελίδου Ευαγγελία για τη συνεργασία, την καθοδήγηση και κυρίως για τη φιλία της. Η συμβολή της στη διεξαγωγή αυτής της μελέτης ήταν πολύτιμη και καθοριστική.

Τέλος ευχαριστώ μέσα απ' τα βάθη της καρδιάς μου τους δικούς μου ανθρώπους και πάνω απ' όλα τους γονείς μου για τη στήριξη που μου παρέχουν και για την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
B. ABSTRACT	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1. Υγιεινή και Ασφάλεια Κρέατος.....	11
1.2. Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την ασφάλεια στο κρέας.....	14
1.2.1. Salmonella spp.....	14
1.2.2. E. coli O157:H7.....	15
1.2.3. Listeria monocytogenes.....	16
1.3. Τεχνολογία Πολλαπλών Εμποδίων.....	17
1.4. Θερμική επεξεργασία – Ψήσιμο.....	20
1.5. Αντιμικροβιακές ουσίες – Αιθέρια έλαια.....	24
1.5.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης.....	26
1.6. Εδώδιμες μεμβράνες.....	27
1.6.1. Εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου.....	28
1.7. Μαρινάρισμα.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
3.1. Υλικά.....	34
3.1.1. Θρεπτικά υλικά.....	34
3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια.....	34
3.2. Πειραματική διαδικασία.....	35
3.2.1. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος.....	35
3.2.2. Εμβολιασμός μαρινάδων με καλλιέργειες παθογόνων.....	36
3.2.3. Ενοφθαλμισμός κρέατος με καλλιέργειες παθογόνων, τύλιγμα σε αντιμικροβιακές μεμβράνες, εμβάπτιση σε μαρινάδες και ψήσιμο.....	40
3.2.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση.....	44
3.2.5. Στατιστική ανάλυση.....	44
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1. Αποτελέσματα.....	46
4.1.1. Μέτρηση τιμών pH μαρινάδων.....	46

4.1.2. Αντιμικροβιακή δράση μαρινάδων.....	47
4.1.3. Συνδυαστική επίδραση εδάδιμων μεμβρανών με αιθέριο έλαιο ρίγανης, μαρινάδων και ψησίματος σε ενοφθαλμισμένο με παθογόνους χοιρινό κρέας.....	49
4.2. Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ψήσιμο θεωρείται ως μία από τις απλούστερες μεθόδους για τη μείωση των παθογόνων στο κρέας. Παρόλα αυτά όμως οι θερμοκρασίες ψησίματος δεν είναι πάντα επαρκείς ώστε να διασφαλίσουν την υγεία των καταναλωτών. Οι εναλλακτικοί τρόποι συσκευασίας, όπως οι εδώδιμες μεμβράνες και συνήθειες καταναλωτικές πρακτικές όπως το μαρινάρισμα, θα μπορούσαν να ενισχύσουν την αδρανοποίηση των παθογόνων κατά το ψήσιμο.

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η επίδραση εδώδιμης μεμβράνης αλγινικού νατρίου με αιθέριο έλαιο ρίγανης και εμβάπτισης σε μαρινάδες, στη θερμική αδρανοποίηση της *Salmonella*, του *E.coli O157:H7* και της *Listeria monocytogenes* σε χοιρινό κρέας. Τεμάχια χοιρινού κρέατος (20 g) εμβολιάστηκαν (6-6.5 log cfu/g) με μίγμα 3 στελεχών *Salmonella*, *E.coli O157:H7* ή *Listeria monocytogenes*. Τα δείγματα στη συνέχεια τυλίχθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη αλγινικού νατρίου 3% κ.ο. με (EFO) ή χωρίς (EF) 1% κ.ο. αιθέριο έλαιο ρίγανης. Δείγματα κρέατος που δεν τυλίχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Όλα τα δείγματα συντηρήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 4°C για 4 ημέρες. Ακολούθως, τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε μαρινάδες οικιακής παρασκευής (με βάση τη μπύρα και το πορτοκάλι) ή εμπορικές (με βάση το λεμόνι και το κρασί) όπου και παρέμειναν για 24 ώρες στους 4°C. Την 5^η ημέρα τα δείγματα ψήθηκαν σε φούρνο στους 65°C (θερμοκρασία κέντρου). Οι πληθυσμοί της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και των παθογόνων προσδιορίστηκαν μετά τον εμβολιασμό, μετά τη συντήρηση, μετά την εμβάπτιση στα μαρινάδες και μετά το ψήσιμο.

Μετά από 4 ημέρες συντήρησης, οι πληθυσμοί των 3 παθογόνων και της αλλοιογόνου χλωρίδας ήταν σημαντικά χαμηλότεροι (1-2 log cfu/g) στα δείγματα τα οποία εφαρμόστηκε EFO ενώ στα δείγματα EF δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη μείωση. Η εμβάπτιση σε μαρινάδες δεν οδήγησε σε αξιοσημείωτη μείωση των βακτηριακών πληθυσμών. Η μαρινάδα με βάση το λεμόνι προκάλεσε σε κάποιες περιπτώσεις μικρή αλλά σημαντική μείωση στους πληθυσμούς του παθογόνου κατά 1 log περίπου. Το ψήσιμο όπως αναμενόταν οδήγησε σε σημαντικές μειώσεις των βακτηριακών πληθυσμών της τάξης των 2-4 log cfu/g ενώ η μεταχείριση με EFO ενίσχυσε τη θανάτωση των βακτηρίων κατά τη διάρκεια του ψησίματος κατά 1 περίπου log σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Η μαρινάδα με βάση το λεμόνι αποδείχθηκε η πιο αποτελεσματική μαρινάδα για τη μείωση των παθογόνων στα δείγματα χοιρινού κρέατος. Η συντήρηση του κρέατος σε εδώδιμες μεμβράνες στις οποίες έχουν ενσωματωθεί αιθέρια έλαια όπως και η

εμβάπτιση σε μαρινάδες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικές φυσικές μέθοδοι για την ενίσχυση της θερμικής αδρανοποίησης των παθογόνων κατά τη διάρκεια του ψησίματος ώστε να καθίστανται τα προϊόντα μικροβιολογικώς ασφαλή.

||

ABSTRACT

Cooking seems to be a simple process to control foodborne pathogens in meat. Nevertheless, cooking temperatures are not always sufficient to assure microbial safety. Alternative packaging such as edible films, and common consumer practises such as marination, could enhance inactivation of pathogens during cooking. This study examined the effect of alginate edible films with oregano essential oil, and marinating, on thermal inactivation of Salmonella, E.coli 0157:H7 and Listeria monocytogenes in pork meat.

Fresh cut pork pieces (20g) were inoculated (6.5-7.0 log cfu/g) with a three strain composite of Salmonella, E.coli 0157:H7 or Listeria monocytogenes. Previously prepared alginate (3% w.v) edible films with (EFO) or without (EF) 1% w.v oregano essential oil, were applied on the meat samples. Pork pieces that were not wrapped, were considered as controls. All samples were stored aerobically at 4 °C for 4 days. Following storage, pork samples were marinated for 24 hours at 4 °C by immersion in home-made or commercial marinades based on beer or orange juice, and lemon juice or red wine respectively. Samples immersed in ringer solution served as controls of the marination effect. Subsequently, oven-cooking was performed for all samples to an internal temperature of 65 °C. Total bacterial and pathogen populations, were determined after inoculation, after storage, after marination and after cooking. After 4 days of storage, the populations of the three pathogens and spoilage microflora, were significantly (1-2 log cfu/g) lower in samples treated with EFO compared to control samples while EF caused no significant ($p>0.05$) microbial reduction. Marination did not lead to dramatic reductions of bacterial populations. Small and constantly observed reductions of 0.6 up to 1 log cfu/g (lemon based marinade) were noticed. Marination effect was more pronounced when samples were previously stored with EFO (1 log cfu/g decrease of cell populations compared to nontreated with EFO samples). Oven-cooking expectedly resulted in great reductions in bacterial populations of control samples (2-4 log cfu/g), while treatment with EFO and marinades enhanced destruction of bacteria during cooking (up to 1 log cfu/g additional reduction compared to cooked controls). Lemon based marinade was proved as the most efficient marinade for reducing pathogens on pork samples. Preservation of meat with edible films containing essential oils and marination, could be used as effective, natural methods to enhance thermal destruction of pathogens and render the product microbiologically safe after cooking.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Υγιεινή και Ασφάλεια κρέατος

Η ασφάλεια του κρέατος και των προϊόντων του απασχολεί έντονα την επιστημονική κοινότητα αλλά και το καταναλωτικό κοινό. Τα σοβαρότερα ζητήματα που προκύπτουν σχετικά με την ασφάλεια του κρέατος και οδηγούν σε προβλήματα στην υγεία του καταναλωτή και σε ανακλήσεις απ' τα σημεία πώλησης εν δυνάμει μολυσμένων τροφίμων σχετίζονται με παθογόνους μικροοργανισμούς και ιδιαιτέρως με παθογόνα βακτήρια.

Σύμφωνα με εκτιμήσεις 6.5 με 33 εκατομμύρια ασθένειες και 900 θάνατοι που σχετίζονται με τα τρόφιμα και οφείλονται σε βακτήρια, ιούς, παράσιτα και μύκητες καταγράφονται ετησίως στις Η.Π.Α.

Τα τελευταία χρόνια η δημοσιοποίηση διαφόρων εξάρσεων τροφιμογενών λοιμώξεων στις Η.Π.Α. που προκλήθηκαν από παθογόνα βακτήρια όπως η *Escherichia coli O157:H7* και η *Listeria monocytogenes* έχουν φέρει την ασφάλεια του κρέατος στο προσκήνιο του κοινωνικού ενδιαφέροντος.

Το κυριότερο αίτιο τροφικών λοιμώξεων και ανακλήσεων προϊόντων είναι η *Escherichia coli O157:H7* και άλλα εντερικά παθογόνα όπως η *Salmonella*, ενώ η Gram θετική *L. monocytogenes* είναι το παθογόνο που μας απασχολεί στα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα κρέατος και πουλερικά που επιτρέπουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης.

Οι πέντε κορυφαίες ανακλήσεις προϊόντων κρέατος στις Η.Π.Α. έως το 2008 σύμφωνα με το USDA/FSIS (United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service) είναι α) 18 εκατομμύρια κιλά hot dogs πιθανώς μολυσμένα με *L. monocytogenes* το Δεκέμβριο του 1998 β) 18 εκατομμύρια κιλά έτοιμων προς κατανάλωση πουλερικών προϊόντων πιθανώς μολυσμένων με *L. monocytogenes* τον Οκτώβριο του 2002 γ) 14 εκατομμύρια κιλά φρέσκων και κατεψυγμένων έτοιμων προς κατανάλωση πουλερικών πιθανώς μολυσμένων με *L. monocytogenes* τον Οκτώβριο του 2002 δ) 13 εκατομμύρια κιλά τεμαχισμένου βοδινού πιθανώς μολυσμένου με *E. coli O157:H7* τον Αύγουστο του 1997 και ε) 9.5 εκατομμύρια κιλά τεμαχισμένου βοδινού πιθανώς μολυσμένου με *E. coli O157:H7* τον Ιούλιο του 2002. Αν και έχει γίνει σημαντική πρόοδος στον έλεγχό τους μερικά από αυτά τα παθογόνα θα συνεχίσουν να μας απασχολούν και στο μέλλον, αν σκεφτούμε ότι μερικά από αυτά (π.χ. *Salmonella*) έχουν υπάρξει ο στόχος όλων των προσπαθειών ελέγχου για πολλές δεκαετίες και ακόμη απαντώνται σε μεγάλο αριθμό νοσημάτων (Bacon & Sofos 2003)

Η *Listeria monocytogenes* θα συνεχίσει να είναι ο νούμερο ένα μικροοργανισμός στόχος σε έτοιμα προς κατανάλωση κρέατα και πουλερικά, λαμβάνοντας υπόψη την απανταχού παρουσία της, τη δυνατότητα να μολύνει προϊόντα που έχουν ήδη επεξεργαστεί και την ικανότητά της να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες (FDA/FSIS, 2003; ILSI (International Life Sciences Institute) Research Foundation/Risk Science Institute, 2005; Ryser & Marth, 2007; Tompkin, 2002). Η κύρια αιτία τροφιμογενών ασθενειών που προκαλούνται κατά το service των τροφίμων είναι διάφοροι ιοί όπως οι Norovirus που αυτή τη στιγμή θεωρούνται το κυριότερο αίτιο τροφιμογενών λοιμώξεων στις Η.Π.Α. (www.cdc.gov).

Τα σοβαρότερα ζητήματα που σχετίζονται με μικροβιακούς παθογόνους περιλαμβάνουν εξάρσεις τροφιμογενών λοιμώξεων, ανακλήσεις εμπλεκόμενων προϊόντων, νομοθετικές συμμορφώσεις και ζητήματα σχετικά με τον έλεγχο παθογόνων. Άλλα ζητήματα είναι η εμφάνιση παθογόνων με αυξημένη τοξικότητα και χαμηλές μολυσματικές δόσεις, η ανθεκτικότητα των παθογόνων στα αντιβιοτικά και στα stress που σχετίζονται με τα τρόφιμα, η διαμύανση από τρόφιμα που δε σχετίζονται με το κρέας όπως επίσης και το νερό με τους εντερικούς παθογόνους, οι απεκκρίσεις των ζώων και η εν δυνάμει ενσωμάτωση προγραμμάτων ασφάλειας τροφίμων στη φάρμα.

. Άλλα θέματα που απασχολούν την έρευνα αλλά και τους καταναλωτές σχετικά με την ασφάλεια στο κρέας σχετίζονται με τα πρόσθετα στα τρόφιμα, τα χημικά υπολείμματα, την ταυτοποίηση των ζώων και την ιχνηλασιμότητα, την ασφάλεια και την ποιότητα οργανικών και φυσικών προϊόντων, την ανάγκη ανάπτυξης βελτιωμένων μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων, τα προϊόντα βιοτεχνολογίας ή τα γενετικώς τροποποιημένα τρόφιμα και τα θέματα βιοτρομοκρατίας. (Doyle & Erickson, 2006; Sofos, 2008a, 2009a).

Η καλύτερη στρατηγική για τη βελτίωση της ασφάλειας του κρέατος είναι η εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών υγιεινής αλλά και η χρήση αντιμικροβιακών τεχνολογιών οι οποίες:

- Μειώνουν τις μολύνσεις στα ζώα πριν τη σφαγή

- Ελαχιστοποιούν την είσοδο και τη μεταφορά μικροοργανισμών στο σφάγιο και στο κρέας
- Μειώνουν τους μικροβιακούς πληθυσμούς στο σφάγιο και στο κρέας
- Εμποδίζουν ή ελαχιστοποιούν τη διασταυρούμενη επιμόλυνση και
- Παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των επιζώντων μικροοργανισμών (Juneja & Sofos, 2002, 2009; Sofos, 1994, 2002, 2005; Stopforth & Sofos, 2006).

Ο έλεγχος των παθογόνων κατά την επεξεργασία θα πρέπει να σχεδιάζεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μειώνει ή να εξαλείφει τα επίπεδα μόλυνσης μέσω της ενσωμάτωσης:

α) διαδικασιών απολύμανσης και εξυγίανσης

β) χειρισμών κατά την επεξεργασία για ολική ή μερική καταστροφή του μολυσματικού παράγοντα

γ) αντιμικροβιακών τεχνικών για τη παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης κατά τη διανομή και αποθήκευση των προϊόντων. (Koutsoumanis et al., 2006; Samelis & Sofos, 2003a,b; Sofos, 2005, 2008a, 2009a; Stopforth & Sofos, 2006).

Ο έλεγχος των παθογόνων στα επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος κατορθώνεται μέσω εμποδίων φυσικής, φυσικοχημικής και βιολογικής φύσεως (Koutsoumanis et al., 2006) συμπεριλαμβανομένων χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών, μη θερμικών επεξεργασιών (π.χ. ακτινοβόληση, υπερυψηλή πίεση), οξύτητας και χαμηλού pH, μειωμένης ενεργότητας νερού ή ξήρανσης, τροποποίησης του δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh) μέσω συσκευασίας, εφαρμογή αντιμικροβιακών προσθέτων, χρησιμοποίησης ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας (γαλακτικά βακτήρια) και προϊόντων της (βακτηριοσίνες), τεχνολογιών συσκευασίας (τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ενεργό συσκευασία). Άλλες μέθοδοι που έχουν προταθεί και εφαρμόζονται ως ένα βαθμό στην επεξεργασία και συντήρηση κρέατος και άλλων προϊόντων περιλαμβάνουν τα παλλόμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, τα κύματα υπερήχων, τη λύση των κυττάρων με βακτηριοφάγους και ένζυμα, την έξυπνη αντιμικροβιακή συσκευασία ή τις εδωδιμες αντιμικροβιακές μεμβράνες αλλά και συνδυασμούς όλων των παραπάνω μεθόδων.

1.2. Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την ασφάλεια στο κρέας

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι παθογόνοι μικροοργανισμοί των οποίων απαιτείται ο έλεγχος στο φρέσκο κρέας είναι κυρίως τα διάφορα στελέχη *Salmonella*, το *Campylobacter*, η εντεροαιμοραγική *E. coli* συμπεριλαμβανομένου και του ορότυπου O157:H7 όπως επίσης και άλλα εντερικά παθογόνα. Επίσης η *Listeria monocytogenes* είναι ένας από τους μικροοργανισμούς που απασχολεί έντονα και σχετίζεται με τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα.

1.2.1. *Salmonella* spp

Η *Salmonella* είναι ένα αρνητικό κατά Gram, ετερότροφο μεσόφιλο βακτήριο που απαντάται σε θερμόαιμα ζώα. Οι περισσότερες εξάρσεις σαλμονέλωσης εμφανίζουν ήπια συμπτώματα που περιορίζονται σε μικρές ομάδες πληθυσμού. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις ασθενειών εξαιτίας της *Salmonella* που οδηγούν σε θάνατο κυρίως όταν πρόκειται για ηλικιωμένα ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Παρόλο που η διάδοση της *Salmonella* μειώνεται σταθερά, το 2008 η σαλμονέλωση παρέμεινε, μετά την καμπυλοβακτηρίωση, η δεύτερη πιο συχνά αναφερόμενη ανθρώπινη ζωνόσος, μετρώντας 131.468 επιβεβαιωμένα κρούσματα σε 27 χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης με ρυθμό εμφάνισης 26.4 σε 100000 κατοίκους. (European Food Safety Authority [EFSA], 2010).

Αξιίζει να σημειωθεί ότι ενώ γενικότερα υπάρχει μία τάση μείωσης των περιστατικών λόγω της εφαρμογής σε διάφορες χώρες προγραμμάτων ελέγχου το 2004 παρατηρήθηκε μια αύξηση 22% των κρουσμάτων σαλμονέλωσης. Η αύξηση αυτή σύμφωνα με την εκτίμηση της επιτροπής πιθανότατα οφείλεται στην αυξημένη αναφορά περιστατικών από τα νεοεισελθόντα μέλη της Ε.Ε.. Το 2004 ιδιαίτερη αύξηση των περιστατικών σαλμονέλωσης παρατηρήθηκε και στην Ελλάδα (270 % σε σχέση με το μέσο όρο υπολοίπων ετών) χωρίς να υπάρχει επαρκής εξήγηση της αυξητικής αυτής τάσης.

Σε όλες τις χώρες μέλη το ένα τέταρτο περίπου των περιστατικών καταγράφηκε σε παιδιά ηλικίας 0-4 ετών. Η κατανομή των κρουσμάτων στη διάρκεια του έτους δεν ήταν ομοιογενής καταγράφοντας έξαρση την περίοδο του καλοκαιριού μέχρι τα μέσα Οκτώβρη.

Ο κύριος υπεύθυνος ορότυπος ήταν η *Salmonella enteritidis* (στο 76% των απομονώσεων που υπήρξε ορολογική τυποποίηση). Η τροφολοίμωξη με τον ορότυπο αυτόν συνδέονταν τις περισσότερες φορές με την κατανάλωση αυγών και κρέατος

πουλερικών που δεν είχαν υποστεί επαρκή θερμική κατεργασία. Ακολουθεί ως δεύτερος σε συχνότητα ορότυπος η *Salmonella typhimurium* (στο 14% των απομονώσεων που υπήρξε ορολογική τυποποίηση). Οι τροφολοιμώξεις με αίτιο το συγκεκριμένο ορότυπο, συνδέονταν με την κατανάλωση μολυσμένων ζωικών προϊόντων, κυρίως χοίρειου κρέατος και των προϊόντων του και σε μικρότερο ποσοστό κρέατος πουλερικών και μοσχαριών.

Η μόλυνση των τροφίμων με σαλμονέλα μπορεί να συμβεί σε όλα τα στάδια της τροφικής αλυσίδας, από τη φάρμα έως το οικιακό περιβάλλον. Η μετάδοση συχνά συμβαίνει μέσω άμεσης επαφής με μολυσμένα ζώα ή κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του φαγητού, εξαιτίας ανεπαρκών θερμοκρασιών αποθήκευσης, διασταυρούμενης επιμόλυνσης τροφίμων έτοιμων προς κατανάλωση ή ανεπαρκούς ψησίματος. (EFSA, 2010; Parry et al., 2004; Scott, 2003).

Το 2008 τα αυγά και τα προϊόντα τους αναφέρθηκαν ως το σημαντικότερο τρόφιμο-φορέας στις τροφιμογενείς εξάρσεις σαλμονέλωσης στην ΕΕ αλλά ο συγκεκριμένος παθογόνος ανιχνεύεται επίσης συχνά σε πουλερικά και χοιρινό κρέας. (EFSA, 2010)

1.2.2. *Escherichia coli* O157:H7

Το *Escherichia coli* O157:H7 είναι ένα αρνητικό κατά Gram (-), μη σπορογόνο και προαιρετικά αναερόβιο ραβδοειδές βακτήριο (Samelis et al, 2005).

Τα τελευταία 20 χρόνια το εντεροαιμορραγικό βακτήριο *Escherichia coli* ορότυπου O157:H7 αποτελεί έναν από τους πιο επικίνδυνους τροφιμογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς (Su and Li, 2004). Ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1982 στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Η.Π.Α.) με 2 κρούσματα αιμορραγικής κολίτιδας (Dontorou et al., 2004), έπειτα από την κατανάλωση μολυσμένων μη επαρκώς θερμικά επεξεργασμένων μπιφτεκιών από βόειο κρέας (Byrne et al., 2002). Το συγκεκριμένο βακτήριο ενοχοποιήθηκε για σοβαρές γαστροεντερικές ασθένειες, όπως η αιμορραγική κολίτιδα (CDC), το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) και η θρομβοτική θρομβοπενική πορφύρα (TTP), που προκαλούν υδαρή ακολουθούμενη από αιματώδη διάρροια, αιματώδη κόπρανα, νεφρική ανεπάρκεια, ακόμη και το θάνατο, ιδιαίτερα σε παιδιά. Έχει εκτιμηθεί ότι το *E. coli* O157:H7 είναι υπεύθυνο για πάνω από 20.000 κρούσματα διάρροιας (Su and Li, 2004; Yilmaz et al., 2006), για 73.000 περιπτώσεις μόλυνσης από το βακτήριο (Yang

et al., 2007), 10.800 νοσηλείες και 61 θανάτους στις Η.Π.Α. ετησίως (Jo et al., 2007, Charimba et al., 2010). Τα περισσότερα κρούσματα έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση τροφίμων ζωικής προέλευσης, ενώ η μετάδοση των παθογόνων λαμβάνει χώρα κυρίως μέσω της κατανάλωσης διαφόρων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων του μη επαρκώς θερμικά επεξεργασμένου βοδινού κιμά, του νοπού γάλακτος, των τυριών προερχόμενων από μη παστεριωμένο γάλα, των ζυμούμενων προϊόντων κρέατος καθώς και άλλων τύπων κρέατος, του νερού, των χυμών καθώς και των ακατέργαστων λαχανικών (Medina, 2001; Eribo and Ashenafi, 2003).

Τα μηρυκαστικά ζώα, και πιο συγκεκριμένα η γαστροεντερική οδός των υγιών βοοειδών είναι η κύρια αναγνωρισμένη δεξαμενή αποίκησης, θεωρώντας τον οργανισμό ως μέρος της ενδογενούς μικροχλωρίδας του εντέρου, καθώς το αποικεί ασυμπτωματικά.

Τα στελέχη του *E. coli O157:H7* μπορούν να εισέλθουν στο τρόφιμο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των προϊόντων κρέατος, εφόσον οι συνθήκες υγιεινής είναι ανεπαρκείς. Επομένως, το *E. coli O157:H7* μπορεί να περάσει στους ανθρώπους έμμεσα μέσω των περιττωμάτων που αποβάλλονται και της κοπριάς στη γη (Stopforth et al., 2004; Zhu et al., 2009; Schilling et al., 2009).

Εξαιτίας της παθογένειάς του, της οξυανθεκτικότητάς του και της χαμηλής δόσης που απαιτείται για μόλυνση (≥ 10 κύτταρα), το βακτήριο *E. coli O157:H7* αποτελεί μία διαρκή ανησυχία για τη δημόσια υγεία.

1.2.3. *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria* είναι ένα Gram θετικό αερόβιο ή και προαιρετικά αναερόβιο, ραβδόμορφο μη σπορογόνο βακτήριο. Περιλαμβάνει έξι είδη από τα οποία τα δύο μόνο είναι παθογόνα (*Listeria monocytogenes* και *Listeria ivanovii*) ενώ τα υπόλοιπα είναι μη παθογόνα. Η *L. monocytogenes* είναι ένα ιδιαίτερης σημασίας παθογόνο βακτήριο για τον άνθρωπο και υπεύθυνο για την πρόκληση λιστερίωσης.

Είναι ένας μικροοργανισμός που είναι ευρύτατα διαδεδομένος στο περιβάλλον.

Κύριες πηγές μόλυνσης της *Listeria* είναι το έδαφος, τα χόρτα, το νερό, τα μολυσμένα οικόσιτα και άγρια ζώα. Η κύρια οδός μετάδοσης για τον άνθρωπο και τα

ζώα πιστεύεται ότι είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων και ζωοτροφών.

Μια επαρκής θερμική επεξεργασία καταστρέφει τη *Listeria* ωστόσο η ικανότητα της να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψύξης προκαλεί ανησυχία κυρίως σε ότι αφορά τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (EFSA, 2011).

Παρόλο που όλοι οι ορότυποι και τα στελέχη της *L. monocytogenes* θεωρούνται δυνητικά παθογόνοι εν τούτοις ορισμένοι ορότυποι (4b, 1/2a, 1/2b) εμφανίζονται παγκόσμια πλέον συχνά υπεύθυνοι για τις ομαδικές και τις διάσπαρτες λοιμώξεις (Tomarkin, 2002, Mc Lauchlin et al, 2004).

Σύμφωνα με στοιχεία από 20 χώρες, τα σφάγια και τα παρασκευάσματα νωπού κρέατος βοοειδών, χοίρων και αρνιών ήταν θετικά για *L. monocytogenes* σε ποσοστά 0-50, 3-59 και 5-50% (Farber & Peterkin, 1999; Okutami et al., 2004)

1.3. Τεχνολογία Πολλαπλών Εμποδίων

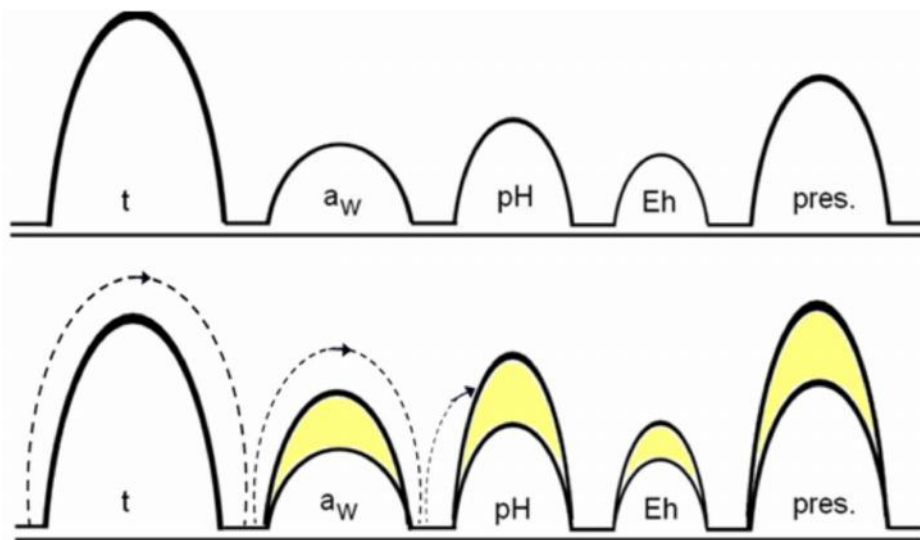
Η τεχνολογία εμποδίων αφορά στον έξυπνο συνδυασμό καινοτόμων ή μη τεχνικών συντήρησης με στόχο τη βελτίωση της μικροβιολογικής σταθερότητας και των οργανοληπτικών και διατροφικών χαρακτηριστικών των τροφίμων (Leistner & Gorris, 1995; Leistner, 2000).

Η ολική ποιότητα ενός τροφίμου, η οποία περιλαμβάνει μικροβιολογική ασφάλεια και σταθερότητα όπως επίσης και οργανοληπτική και διατροφική ποιότητα είναι καθοριστικής σημασίας για την ικανοποίηση των καταναλωτών. Παρόλα αυτά η μικροβιολογική ασφάλεια και οι οργανοληπτικές ιδιότητες των τροφίμων συχνά έρχονται σε αντίφαση. Ήπια επεξεργασμένα τρόφιμα μπορεί να έχουν ικανοποιητική εμφάνιση και γεύση αλλά να μην είναι μικροβιολογικά αποδεκτά ενώ αυστηρώς επεξεργασμένα τρόφιμα είναι ασφαλή και σταθερά αλλά παρουσιάζουν ελαττώματα σχετικά με τον άρωμα, τη γεύση, την υφή και την εμφάνιση. Η εφαρμογή προηγμένης τεχνολογίας εμποδίων διευκολύνει τη δημιουργία ελάχιστα που είναι παράλληλα ασφαλή και μικροβιολογικά σταθερά.

Η εφαρμογή συνδυασμένων μεθόδων εμπειρικά χρησιμοποιείται προ αμνημονεύτων χρόνων. Αφού διευκρινίστηκαν οι αρχές πάνω στις οποίες στηρίζεται παραδοσιακά η συντήρηση των τροφίμων έγιναν περισσότερο κατανοητοί και οι μηχανισμοί συντήρησης. Το επόμενο βήμα ήταν ο εσκεμμένος και έξυπνος συνδυασμός

παραγόντων που συμβάλουν στη συντήρηση (εμπόδια) προκειμένου να βελτιστοποιηθούν τα παραδοσιακά τρόφιμα ή και να δημιουργηθούν καινούρια. Τα πιο σημαντικά εμπόδια που χρησιμοποιούνται στη συντήρηση τροφίμων είναι η θερμοκρασία (υψηλή ή χαμηλή), η ενεργότητα νερού (a_w), η οξύτητα (pH), το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (Eh), η προσθήκη συντηρητικών (νιτρικά, σορβικά, θειικά) και η παρουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας. Παρόλα αυτά περισσότερα από 60 εν δυνάμει εμπόδια για τα τρόφιμα που βελτιώνουν τη σταθερότητα και την ποιότητα των προϊόντων έχουν μελετηθεί και ο αριθμός αυτός συνεχώς αυξάνεται (Leistner & Gorris, 1995; Leistner 2000).

Η μικροβιολογική σταθερότητα και ασφάλεια των περισσότερων τροφίμων βασίζεται σε ένα συνδυασμό διαφόρων εμποδίων, που δε μπορούν να ξεπεραστούν από τους υπάρχοντες στο τρόφιμο μικροοργανισμούς. Η συνδυαστική δράση των εμποδίων είναι ευρύτερα γνωστή ως αποτέλεσμα εμποδίων. Η εφαρμογή αυτής της ιδέας αποδείχτηκε πολύ αποτελεσματική, αφού ένας κατάλληλος συνδυασμός εμποδίων διασφαλίζει την μικροβιακή σταθερότητα και ασφάλεια καθώς και τις επιθυμητές οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες των τροφίμων.



Εικόνα 1.3.1. Αρχές τεχνολογίας πολλαπλών εμποδίων

Γενικά η βιοσυντήρηση και τα φυσικά αντιμικροβιακά προσφέρονται για συνδυασμένα συστήματα συντήρησης. Για παράδειγμα το αιθέριο έλαιο ρίγανης συνδυασμένο με συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) μελετήθηκαν ως εμπόδια στη συντήρηση φρέσκου κρέατος και παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου ζωής σε συνδυασμό σε σχέση με τη συντήρηση στον αέρα. (Skandamis & Nychas, 2002; Chouliara, Karatapanis, Savvaidis, & Kontominas, 2007).

Σε φιλέτα σολωμού του Ατλαντικού Ωκεανού η μεγαλύτερη διάρκεια ζωής παρατηρήθηκε με συνδυασμό υπέρψυξης και συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Τα δείγματα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση CO₂ (90%) και αναλογίας αερίου προς προϊόν 2.5 είχαν την υψηλότερη διάρκεια ζωής (22 ημέρες έναντι 11 ημερών για τους μάρτυρες) (Fernández, Aspe, & Roeckel, 2009).

Πολλές μελέτες έδειξαν μείωση των βακτηριακών σπορίων με συνδυασμό ήπιας θέρμανσης (Hayakawa, Kanno, Tomita, & Fujio, 1994; Ross, Griffiths, Mittal, & Deeth, 2003) ή νισίνης (Michiels, Hauben, Versyck, & Wuytack, 1995; Stewart, Dunne, Sikes, & Hoover, 2000; Garriga et al., 2002; Lee, Heinz, & Knorr, 2003; Jofre, Aymerich & Garriga, 2008; Ogihara, Yatuzuka, Horie, Furukawa, & Yamasaki, 2009) με υψηλή υδροστατική πίεση.

1.4. Θερμική επεξεργασία – Ψήσιμο

Η θερμική επεξεργασία είναι μία από τις σημαντικότερες μεθόδους διασφάλισης υγιεινής και ποιότητας στα τρόφιμα. Οι βασικές επιδράσεις της θέρμανσης περιλαμβάνουν **α)** τροποποίηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των ωμών προϊόντων όπως το χρώμα, το άρωμα, η υφή αλλά και η ευπεπτότητα **β)** απενεργοποίηση ενζύμων και αλλοιογόνου μικροχλωρίδας για την αύξηση του χρόνου ζωής **γ)** καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών.

Είναι αναγκαίο να επιβεβαιωθεί το αν η θερμική επεξεργασία είναι επαρκής και αυτή η ανάγκη θεωρείται κριτικής σημασίας όπως αποδεικνύεται από τις συχνές περιπτώσεις τροφικών δηλητηριάσεων που προκύπτουν από υπομαγειρεμένα προϊόντα

Οι καταναλωτές συνήθως είτε εκτιμούν εμπειρικά τη θερμοκρασία ψησίματος των τροφίμων είτε βασίζονται στις θερμοκρασίες που προτείνονται στις ετικέτες των τροφίμων που συχνά όμως είναι παραπλανητικές. Μια πρόσφατη μελέτη (USDA 3a) αποκάλυψε ότι οι καταναλωτές τις περισσότερες φορές κρίνουν αν το κρέας τους είναι επαρκώς μαγειρεμένο ή όχι βασιζόμενοι στην προσωπική τους άποψη σχετικά με το χρώμα που επιθυμούν να έχει το γεύμα τους. Η ίδια μελέτη έδειξε επίσης ότι η αλλαγή στο χρώμα βοδινού κρέατος ίσως προκύπτει πριν επιτευχθεί η θερμοκρασία ασφαλείας στο σημείο που θερμαίνεται πιο αργά στη μάζα του κρέατος (slowest heating point SHP) γεγονός το οποίο εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Για το λόγο αυτό το Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α. (USDA) δημοσίευσε μία λεπτομερή λίστα με τις θερμοκρασίες ψησίματος που μπορούν να θεωρηθούν ασφαλείς για κάθε τρόφιμο (Πίνακας 1.4.1.). Επίσης το Food and Drug Administration(FDA) των Η.Π.Α. εξέδωσε ένα περιληπτικό πίνακα με τις ελάχιστες θερμοκρασίες ψησίματος και τους χρόνους παραμονής σε αυτές για διάφορα προϊόντα κρέατος (FDA,2009) (Πίνακας 1.4.2.). Αντίστοιχες οδηγίες έχει εκδώσει και η Ευρωπαϊκή Επιτροπή μέσω της καμπάνιας ενημέρωσης για την ασφάλεια των τροφίμων 2000-2001 (EC, 2000)

Πίνακας 1.4.1. Προδιαγραφές θερμοκρασιών μαγειρεμένων τροφίμων (USDA)

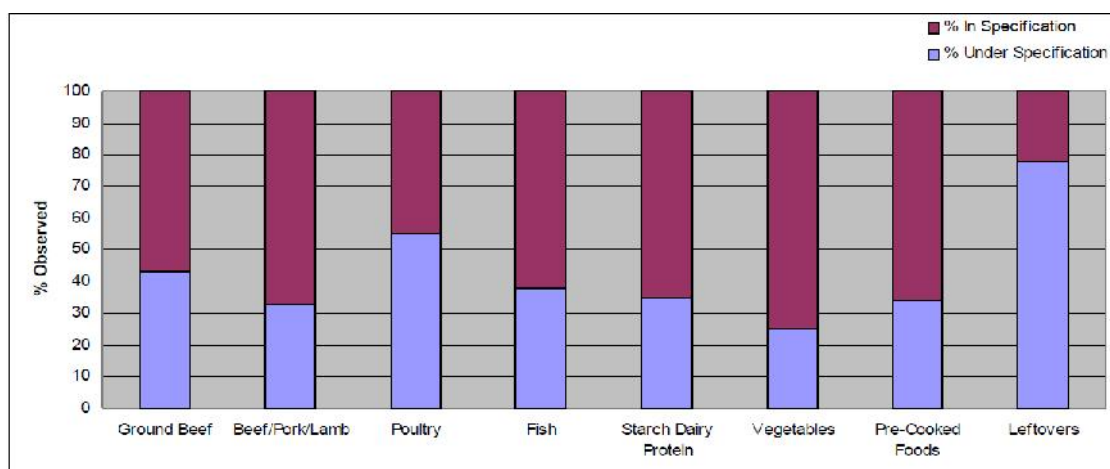
PRODUCT	MINIMUM COOKING TEMPERATURES (°F)
Ground Beef	155
Beef/Pork/Lamb	145
Poultry	165
Fish and Seafood	145
Starch/Dairy/Other Protein	145
Vegetables	140
Reaheted Leftovers	165
Commercially Pre-Cooked Foods	140

Πίνακας 1.4.2. Ασφαλείς θερμοκρασίες ψησίματος (US FDA, 2009)

SAFE COOKING TEMPERATURES as measured with a food thermometer	
GROUND MEAT & MEAT MIXTURES	Internal temperature
Beef, Pork, Veal, Lamb	160°F
Turkey, Chicken	165°F
FRESH BEEF, PORK, VEAL & LAMB	145°F with a 3 minute rest time
POULTRY	
Chicken & Turkey, Whole	165°F
Poultry Parts	165°F
Duck & Goose	165°F
Stuffing (cooked alone or in bird)	165°F
HAM	
Fresh (raw)	160°F
Pre-cooked (to reheat)	140°F
EGGS & EGG DISHES	
Eggs	Cook until yolk & white are firm
Egg Dishes	160°F
SEAFOOD	
Fin Fish	145°F or flesh is opaque and separates easily with fork
Shrimp, Lobster & Crabs	Flesh pearly & opaque
Clams, Oysters & Mussels	Shells open during cooking
Scallops	Milky white or opaque & firm
LEFTOVERS & CASSEROLES	165°F

Μια μελέτη του Υπουργείου Γεωργίας των Η.Π.Α. το 1999 σχετικά με τις θερμοκρασίες ψησίματος διαφόρων προϊόντων σε οικιακό επίπεδο έδειξε ότι σε

πολλές περιπτώσεις παρατηρήθηκε ανεπαρκής θέρμανση ενώ υπήρχαν και σημαντικές διαφοροποιήσεις στις θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για το ψήσιμο των προϊόντων (Πίνακας 1.4.3., Γράφημα 1.4.1.)



Γράφημα 1.4.1. Κατανομή προϊόντων που ψήθηκαν εντός και εκτός προδιαγραφών (USDA, 1999)

Πίνακας 1.4.3. Θερμοκρασίες ψησίματος διαφόρων προϊόντων και κατανομή συχνότητας θερμοκρασιών ψησίματος

Product	Ground Beef	Beef, Pork, Lamb	Poultry	Fish	Starch Dairy Protein	Vegetables	Pre-Cooked Foods	Left Overs
Number of Samples	594	584	570	201	738	95	288	317
Mean (°F)	155.9	154.7	158.6	151.3	152.6	153.5	148.2	144.4
Standard Deviation	20.4	20.94	20.58	18.7	23.8	22.8	24.7	23.9
Minimum (°F)	100	100	100	104	92	100	96	80
Maximum (°F)	208	220	240	196	220	190	206	200
% Under Specification [†]	43	33	55	38	35	25	34	78
Cooking Temperature Frequency Distribution (%)								
<100°F	0	0	0	0	1.5	0	1.7	2.2
100 - 109	1.7	1.2	0.7	1.5	2.7	3.2	2.8	4.7
110 - 119	2.9	3.8	3.3	3.5	5.8	6.3	8.7	10.1
120 - 129	6.2	8.2	4.6	6	8.0	6.3	12.8	10.1
130 - 139	8.8	8.9	8.8	13.9	9.5	9.5	7.6	11.7
140 - 149	16	15.1	11.2	20.9	11.1	13.7	18.1	16.4
150 - 159	13.6	13.2	14.6	13.4	15.0	15.8	9.4	12.6
160 - 169	21.4	19.2	20.5	22.4	16.1	11.6	11.1	15.8
170 - 179	13.5	14.9	18.8	9	12.5	14.7	14.9	6.6
180 - 189	13.5	13.0	13.9	8.5	15.4	17.9	10.1	8.2
190 - 199	2	1.2	2.8	1	1.5	1.1	1.4	0.6
≥200°F	0.5	0.7	0.9	0	0.8	0	1.4	0.9

Η θερμική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών εκφράζεται μέσω των τιμών D και z (Singh & Heldman, 1993; Hendrickx et al, 1995). Ο υπολογισμός αυτών των τιμών γίνεται θεωρώντας ότι η μικροβιακή αδρανοποίηση ακολουθεί κινητική πρώτης

τάξης. Η τιμή D, ή χρόνος θερμικής αδρανοποίησης ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού κατά 90% και είναι ενδεικτικός της θερμικής σταθερότητας ενός μικροοργανισμού σε μια σταθερή θερμοκρασία ενώ η τιμή z εκφράζει τη αύξηση της θερμοκρασίας που απαιτείται για να μειωθεί η τιμή D κατά 90%. και υπολογίζει την εξάρτηση της μικροβιακής αδρανοποίησης από τη θερμοκρασία. Ο καθορισμός των τιμών D και z για κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά είναι πολύ χρήσιμος για το σχεδιασμό μιας θερμικής διαδικασίας που στοχεύει σε συγκεκριμένο μικροοργανισμό. (Pflug, 1997).

Η *Salmonella* σα μικροοργανισμός θεωρείται σχετικά ανθεκτικός στις υψηλές θερμοκρασίες. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την αντοχή της *Salmonella* στη θερμική επεξεργασία ενώ κάποια στελέχη είναι περισσότερο ανθεκτικά από άλλα. Για παράδειγμα, η *S. seftenberg* είναι ασυνήθιστα θερμοανθεκτική. Θεωρείται 10-20 φορές πιο ανθεκτική συγκριτικά με το μέσο όρο των υπολοίπων στελεχών *Salmonella* (Doyle & Cliver, 1990). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη θερμοανθεκτικότητα περιλαμβάνουν τη σύνθεση, την ενεργότητα νερού, το pH του τροφίμου στο οποίο βρίσκεται ο μικροοργανισμός. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι περισσότερο ανθεκτικός στην ξηρή παρά στην υγρή θέρμανση και επιδεικνύει μεγαλύτερη θερμοευαισθησία σε ακραίες τιμές pH (Schuman & Sheldon, 1997). Γενικά οι τιμές D για τη *Salmonella* στους 60°C κυμαίνονται από 5-6 min στο κοτόπουλο, 5-13 min στη γαλοπούλα, 3-5 min στο βοδινό κρέας. Στις περισσότερες μελέτες η τιμή z για τη *Salmonella* κυμαίνονταν από 5 έως 6.5 °C.

Ένας ακόμη παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει την κινητική θερμικής αδρανοποίησης του μικροοργανισμού αυτού είναι η φάση ανάπτυξης όπως και η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων (τραυματισμός, έλλειψη θρεπτικών στοιχείων). Τα κύτταρα σε στατική φάση είναι περισσότερο θερμοάντοχα από την εκθετική ή τη φάση προσαρμογής (Heddleson et al., 1991; Smith et al., 2001). Η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων για τα κύτταρα, ο τραυματισμός αλλά και το θερμικό σοκ πριν τη θερμική αδρανοποίηση μπορούν επίσης να επηρεάσουν τη αδρανοποίηση της *Salmonella*.

Ως θερμικό σοκ ορίζεται η έκθεση των βακτηριακών κυττάρων για μικρό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τις θερμοκρασίες ανάπτυξης αλλά χαμηλότερες από αυτές που μπορούν να οδηγήσουν σε θάνατο των κυττάρων. Τα κύτταρα που εκτίθενται σε τέτοιες θερμοκρασίες αποκτούν κάποια θερμοαντοχή (Bunning et al., 1990). Εικάζεται ότι αυτή η αυξημένη θερμοαντοχή παρατηρείται

εξαιτίας συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών (πρωτεΐνες θερμικού σοκ) που επιφέρουν ανάκτηση των τραυματισμένων κυττάρων (Juneja et., 1998).

Όσον αφορά στο *E.coli O157:H7* οι τιμές D στους 60°C κυμαίνονταν από 0.4 έως 1.6 min στο κοτόπουλο, 0.6-10 min στη γαλοπούλα και 0.5-3 min στο βόειο κρέας. Στις περισσότερες μελέτες η τιμή z κυμαίνονταν από 4 έως 6°C. Παράγοντες που επηρεάζουν τη θερμοανθεκτικότητα του *E.coli O157:H7* είναι η σύσταση του κρέατος, τα διαφορετικά στελέχη του μικροοργανισμού, το μέγεθος και ο όγκος του κρέατος στο οποίο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός. Υψηλότερες τιμές D για όλες τις θερμοκρασίες παρατηρήθηκαν με αύξηση του λίπους στο κρέας (Line et al.,1991;Ahmed et al.,1995) ενώ μελέτες έδειξαν ότι το θερμικό σοκ πριν την τελική θερμική επεξεργασία κατέστησε περισσότερο θερμοάντοχο το μικροοργανισμό (Williams&Ingham, 1997).

Σχετικά με τη *Listeria monocytogenes* Scott A υπολογίστηκαν τιμές D της τάξης των 3.14 min στους 55°C και 0.33 min στους 60°C σε βοδινό κιμά. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και του NaCl στη θερμική αδρανοποίηση 4 στελεχών *Listeria monocytogenes* σε ζωμό βοδινού. Το NaCl είχε μια προστατευτική επίδραση ενώ οι χαμηλές τιμές pH μείωσαν τη θερμοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού (Juneja & Eblen, 1999). Ο τραυματισμός των κυττάρων και το θερμικό σοκ επηρεάζουν επίσης τη θερμοανθεκτικότητα του μικροοργανισμού καθιστώντας τον περισσότερο θερμοάντοχο.

1.5. Αντιμικροβιακές ουσίες – Αιθέρια έλαια

Διάφορες ενώσεις έχουν προταθεί για την αντιμικροβιακή δράση τους στη συσκευασία τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων οργανικών οξέων, ενζύμων όπως η λυσοζύμη, μυκητοκτόνων και φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων όπως τα καρυκεύματα και τα αιθέρια έλαια (Tharanathan, 2003; Weng & Hotchkiss, 1992). Τα καρυκεύματα είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις όπως τα φλαβονοειδή και τα φαινολικά οξέα (Dadalioglu & Evrendilek, 2004).

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 κτλ (Sofos et al, 2006).

Γενικά τα αιθέρια έλαια που έχουν τις ισχυρότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες απέναντι στους παθογόνους των τροφίμων περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων όπως καρβακρόλη, ευγενόλη και θυμόλη (Burt, 2004). Αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν ένα τεράστιο εύρος βιολογικών επιδράσεων μεταξύ των οποίων αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Ο τρόπος δράσης τους έγκειται στη διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας διαταραχή των ημιπερατών ιδιοτήτων της και παρεμπόδιση του μηχανισμού της μετακίνησης των πρωτονίων και της μεταφοράς ιόντων προκαλώντας συναίρεση του κυτταρικού περιεχομένου (Burt, 2004).

Κλάσματα αιθέριου ελαίου ρίγανης είναι αποτελεσματικά έναντι διαφόρων βακτηριών που συναντώνται στα τρόφιμα όπως η *Salmonella* (Helander et al., 1998; Paster et al., 1990) και η το *E.coli O157:H7* (Burt & Reinders, 2003). (oregano4).

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι το αιθέριο έλαιο σκόρδου όταν ενσωματώνεται σε εδώδιμη μεμβράνη αλγινικών σε συγκέντρωση μεγαλύτερη του 0.2 % οδηγεί σε παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* και του *Bacillus cereus* (Pranoto et al, 2004)

Μια παραδοσιακή μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της ανάπτυξης των μικροοργανισμών είναι η εφαρμογή αντιμικροβιακών ουσιών στην επιφάνεια του τροφίμου. Παρόλα αυτά αυτό έχει περιορισμένη χρήση επειδή οι αντιμικροβιακές ουσίες εξουδετερώνονται κατά την επαφή με το τρόφιμο ή αλληλεπιδρούν με τα συστατικά του. (Kerry et al., 2006; Quintavalla and Vincini, 2002; Siragusa and Dickson, 1992).

Μια νέα προσέγγιση για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί είναι η χρήση αντιμικροβιακών συσκευασιών (Appendini and Hotchkiss, 2002) ή η εφαρμογή αντιμικροβιακών εδώδιμων επικαλύψεων (Zhou et al, 2010).

Η ενσωμάτωση αντιμικροβιακών παραγόντων σε εδώδιμες μεμβράνες περιορίζει τη λειτουργική επίδραση στην επιφάνεια του τροφίμου. Οι αντιμικροβιακοί φορείς απελευθερώνονται στην επιφάνεια του τροφίμου με αργό ρυθμό κι έτσι παραμένουν σε υψηλές συγκεντρώσεις για μεγάλο χρονικό διάστημα. (Coma, Sebtí, Pardon, Deschamps, & Pichavant, 2001; Ouattara et al., 2000).

Πτητικοί ή μη αντιμικροβιακοί φορείς είναι δυνατόν να ενσωματωθούν σε υλικά συσκευασιών ή σε επικαλύψεις προκειμένου να επιτευχθεί ο έλεγχος ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στην επιφάνεια του τροφίμου. (Coma et al., 2001; Ouattara et al., 2000). Προκειμένου να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις των καταναλωτών για

περισσότερο φυσικά προϊόντα και για ευρύτερη χρήση οικολογικών υλικών συσκευασίας πολλοί ερευνητές έχουν εστιάσει στην ενσωμάτωση φυτικών εκχυλισμάτων σε μεμβράνες , σε εδώδιμες επικαλύψεις και σε βιολογικά υλικά συσκευασίας (Del Nobile et al., 2008; Norajit et al., 2010; Oussalah et al., 2006; Rojas-Graó et al., 2007). Τα αιθέρια φυτικά έλαια και τα συστατικά τους έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σαν αρωματικοί παράγοντες στα τρόφιμα εδώ και πάρα πολλά χρόνια και έχουν χαρακτηριστεί ως ουσίες GRAS (Generally Recognized as Safe) (Lopez et al, 2007). Αιθέρια έλαια πλούσια σε φαινολικές ενώσεις φαίνεται να έχουν ευρεία αντιμικροβιακή δράση. Μεταξύ αυτών τα έλαια σκόρδου, ρίγανης, δενδρολίβανου, θυμαριού, φασκόμηλου και βανίλιας θεωρούνται τα περισσότερο αποτελεσματικά (Holley and Patel, 2005) .

1.5.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Η ρίγανη (*Origanum vulgare subsp hirtum*) είναι πολυετές φυτό της οικογένειας *Lamiaceae* (*Labiatae*). Χρησιμοποιείται ευρέως για το άρωμα και τη χαρακτηριστική γεύση που προσδίδει στο κρέας καθώς και σε άλλα τρόφιμα.

Η χημική ανάλυση του αιθέριου ελαίου ρίγανης αποκάλυψε την παρουσία διαφόρων χημικών ουσιών οι περισσότερες των οποίων ενέχουν σημαντικές αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Exarchou et al., 2002; Botsoglou et al., 2003; Ozkan et al., 2003). Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι οι δύο κύριες φαινόλες που αποτελούν περίπου το 78-85% του αιθέριου ελαίου ρίγανης και είναι κατά κύριο λόγο υπεύθυνες για την αντιμικροβιακή δράση του ελαίου (Kokkini et al. 1997). Επιπλέον, άλλα χαμηλότερης συγκέντρωσης συστατικά όπως μονοτερπένια, υδρογονάνθρακες, γ-τερπινένια, και p-κυμένα συμβάλουν στην αντιμικροβιακή δράση του ελαίου.(Burt, 2004)

1.6. Εδώδιμες μεμβράνες

Παράγοντες όπως οι οικολογικές ανησυχίες, η ανάγκη για νέες τεχνολογίες συσκευασίας και οι ευκαιρίες για δημιουργία νέων αγορών για τα αγροτικά προϊόντα

έχουν οδηγήσει σε ένα συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τις εδώδιμες μεμβράνες και επικαλύψεις.

Οι εδώδιμες μεμβράνες οι οποίες σχηματίζονται από πολυσακχαρίτες, από πρωτεΐνες και από λιπαρές ύλες έχουν μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως το ότι είναι βιοδιασπώμενες, είναι εδώδιμες, παρουσιάζουν βιοσυμβατικότητα, έχουν αισθητικούς αποδεκτή εμφάνιση και μπορούν να λειτουργήσουν ως εμπόδια στο οξυγόνο και σε άλλα φυσικά stress (Quintavalla & Vicini, 2002).

Μερικά πλεονεκτήματα των εδώδιμων μεμβρανών στο κρέας και τα προϊόντα του έχουν περιγραφεί από τους Gennadios, Hanna και Kurth (1997). Οι εδώδιμες μεμβράνες είναι δυνατόν:

- Να μετριάσουν το πρόβλημα της απώλειας υγρασίας κατά τη διάρκεια της συντήρησης φρέσκου ή κατεψυγμένου κρέατος.
- Να διατηρήσουν το χυμώδες του κρέατος κατά τη συσκευασία του
- Να μειώσουν το τάγγισμα του κρέατος που προέρχεται από την οξείδωση των λιπαρών οξέων αλλά τη δημιουργία καφετί χρωματισμού που προκαλείται από την οξείδωση της μυογλοβίνης.
- Να μειώσουν το μικροβιακό φορτίο της αυτόχθονης μικροχλωρίδας αλλά και των παθογόνων μικροοργανισμών στην επιφάνεια του κρέατος
- Να περιορίσουν την απώλεια πτητικών ενώσεων

Διάφορες μελέτες έχουν γίνει σχετικά με τις εδώδιμες μεμβράνες και τη χρησιμότητά τους. Μεταξύ αυτών, έχει αποδειχθεί ότι μεμβράνες αλγινικών που περιείχαν οργανικά οξέα ήταν οριακά αποτελεσματικές σε βόειο σφάγιο μειώνοντας τα επίπεδα της *Listeria monocytogenes*, της *Salmonella Typhimurium* και της *Escherichia coli* O157:H7 κατά 1.8, 2.11 και 0.74 log αντίστοιχα.

Πλήρης παρεμπόδιση της *Listeria monocytogenes* σε ζαμπόν, σε στήθος γαλοπούλας και σε βόειο κρέας επιτεύχθηκε με τη χρησιμοποίηση πεδιοσίνης και νισίνης ενσωματωμένες σε μεμβράνη κυτταρίνης (Ming, Webber, Ayres & Sandine, 1997) ενώ λυσίνη και λυσοζύμη σε μεμβράνες σόγιας και ζείνης καλαμποκιού κατάφεραν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη του *Lactobacillus plantarum* και του *E. coli* (Dawson, Hat, Padgett, 1998)

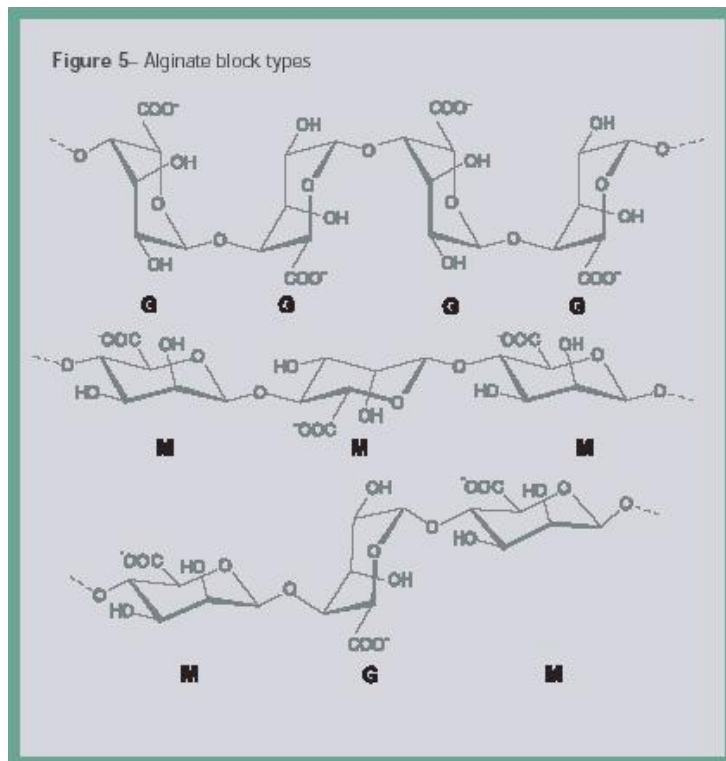
1.6.1. Εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου

Τα αλγινικά είναι φυσικές ουσίες οι οποίες εκχυλίζονται από φύκια της τάξης των Φαιοφυκών. Είναι τα άλατα του αλγινικού οξέος το οποίο είναι ένα συμπολυμερές του 1-4β-D-μανουρονικού οξέος (M) και του α-L-γουλουρονικού οξέος (G)(Ma, 2006)(Εικόνα 1.6.1.1.)

. Τα επιμέρους ποσοστά των μορίων αυτών στην αλυσίδα του αλγινικού οξέος καθόριζουν εκτός της υδατοδιαλυτότητας και άλλες ιδιότητες όπως τη δυνατότητα δημιουργίας πηκτής και τη μηχανική αντοχή.

Η ικανότητα των αλγινικών να αντιδρούν με δισθενή και τρισθενή κατιόντα βρίσκει εφαρμογή στο σχηματισμό μεμβρανών αλγινικών αλάτων (Ashton et al,2007) .Έτσι ιόντα ασβεστίου και νατρίου κυρίως τα οποία θεωρούνται και τα πλέον αποτελεσματικά σαν παράγοντες δημιουργίας πηκτών ενώνουν τις αλγινικές αλυσίδες μέσω ιονικών αλληλεπιδράσεων ένα φαινόμενο που συνοδεύεται από τη δημιουργία δεσμών υδραγόνου. Έτσι τα άλατα αλγινικού νατρίου παρουσιάζουν βελτιωμένες ιδιότητες σχετικά με τη μεταφορά υγρασίας, τη μηχανική αντοχή και τη συνεκτικότητα.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει τη συμβολή των αλγινικών μεμβρανών στη ρύθμιση της απώλειας υγρασίας (Mounteney & Winter, Berlin,) στη βελτίωση της οσμής και της γεύσης μαγειρεμένου κρέατος στη μείωση της οξείδωσης του λίπους αλλά και στη μείωση αλλοιογόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών στην επιφάνεια των τροφίμων σε συνδυασμό πάντα με άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες.



Εικόνα 1.6.1.1. Δομή αλγινικών αλάτων

1.7. Μαρινάρισμα

Το μαρινάρισμα είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος ενίσχυσης της ποιότητας του κρέατος μέσω της βελτίωσης της τρυφερότητας του αλλά και της ενίσχυσης της γεύσης και του αρώματος του. Είναι η διαδικασία εμφάπτισης ή εμφολιασμού του κρέατος με διάλυμα που περιέχει συστατικά όπως ξύδι, χυμό λεμονιού, κρασί, σάλτσα σόγιας, άλμη, αιθέρια έλαια, αλάτι, τρυφεροποιητές, βότανα, καρυκεύματα και οργανικά οξέα τα οποία δίνουν γεύση και άρωμα και βελτιώνουν την υφή του κρέατος. (Pathania et al., 2010; Bjorkroth, 2005). Επιπλέον η διαδικασία του μαρινάρισματος πιθανόν έχει και θετική επίδραση στη διάρκεια ζωής του προϊόντος εξαιτίας της αλκαλικής ή όξινης φύσης του διαλύματος και της αντιμικροβιακής ή αντιοξειδωτικής δράσης ορισμένων συστατικών της μαρινάδας (Tompkin et al., 2001).

Διάφορες μελέτες έχουν αναφερθεί στην αποτελεσματικότητα των μαρινάδων στη βελτίωση της τρυφερότητας και της γευστικότητας του κρέατος (Scanga et al., 2000; Dhanda et al., 2002; Burke and Monahan, 2003; Sheard et al., 2005; Lunde et al.,

2008) ενώ μελέτες σε περιορισμένο βαθμό έχουν γίνει και για την αντιμικροβιακή δράση των μαρινάδων. Ο Bremer και ο Osbourne (1995) ανέφεραν αντιλίστριακή δράση μαρινάδων με οργανικά οξέα σε μύδια τα οποία θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μεθόδων μαριναρίσματος για τη μείωση της *Listeria monocytogenes*. Το γιαούρτι χρησιμοποιείται επίσης σαν ένα συστατικό μαριναρίσματος κι έχει δείξει μειώσεις 2 log στο *Campylobacter jejuni* σε χοιρινά φιλέτα (Birk and Knochel, 2009).

Σύμφωνα με τον Bjorkroth (2005) διαλύματα μαρινάδων που βασίζονται στο χαμηλό pH, στην υψηλή συγκέντρωση άλατος (NaCl) στα σορβικά και βενζοϊκά άλατα και σε διάφορα καρυκεύματα μπορούν να εμποδίσουν την αύξηση της αλλοιογόνου μικροχλωρίδας. Σε μια άλλη μελέτη αναφέρθηκαν μειώσεις του *C. jejuni* (2.4 log₁₀ cfu/ml μετά από 24 ώρες και μη ανίχνευση μετά από 48 ώρες στους 4°C) σε ένα γαλάκτωμα μαρινάδας φυτικού ελαίου και νερού με καρυκεύματα και χλωριούχο νάτριο (NaCl) ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην επιβίωση του *Campylobacter jejuni* μετά από μαρινάρισμα κρέατος (φιλέτο στήθους κοτόπουλου). Ιδιαίτερη επίδραση στη μείωση του πληθυσμού της *Salmonella* είχε μαρινάδα τύπου teriyaki στους 25 αλλά και στους 4°C (Pathania et al 2010).

Πέρα από τη σύσταση των διαλυμάτων μαρινάδας η αντιμικροβιακή δράση τους εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η διάρκεια συντήρησης (Perko-Makela et al., 2000).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η εκτίμηση της συνδυαστικής χρήσης μαρινάδων και εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου με αιθέριο έλαιο ρίγανης για τη θερμική αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella*, *E. coli* O157:H7 και *Listeria monocytogenes* σε χοιρινό κρέας.

Επιμέρους στόχοι αποτέλεσαν:

- Η μελέτη της επίδρασης των μαρινάδων στους πληθυσμούς των παθογόνων που απ' ευθείας έχουν ενοφθαλμιστεί σ' αυτές.
- Η μελέτη της επίδρασης α) των εδώδιμων μεμβρανών με ή χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης και β) των μαρινάδων στους παθογόνους όταν αυτοί έχουν ενοφθαλμιστεί σε χοιρινό κρέας.
- Η εκτίμηση της συνδυαστικής επίδρασης μαρινάδων και εδώδιμων μεμβρανών στη μείωση των παθογόνων στο κρέας.
- Η επίδραση εδώδιμων μεμβρανών και μαριναρίσματος μεμονωμένα ή συνεργιστικά στην ενίσχυση της μείωσης των παθογόνων κατά το ψήσιμο.
- Το ενδεχόμενο της διαφοροποίησης του αποτελέσματος των παραπάνω μεταχειρίσεων ανάλογα με το μικροοργανισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

3.1.1. Θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή της μελέτης αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα 3.1.1.1.

Πίνακας 3.1.1.1.. Θρεπτικά υλικά

Κωδική ονομασία	Αναλυτική ονομασία	Μικροοργανισμοί
SMAC	Sorbitol MacConkey Agar	Escherichia coli O157:H7
PALCAM	Polymyxin, Acriflavine, Lythium chloride, Ceftazidime, Aesculine, Mannitol Agar	Listeria monocytogenes
XLD	Xylose, Lysine, Deoxycholate	Salmonella spp.
TSA	Tryptone Soy Agar	Ολική Χλωρίδα
TSB	Tryptone Soy Broth	
Yeast Extract		
Ringer Solution (1/4 strength) Tablets		

3.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

- Χλωριούχο ασβέστιο (calcium chloride)
- Αλγινικό Νάτριο (sodium alginate)
- Γλυκερόλη (glycerol)

3.2. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία απαρτίζεται ουσιαστικά από δύο μέρη.

Αρχικά παρασκευάστηκαν έξι διαφορετικές μαρινάδες οι οποίες ενοφθαλμίστηκαν με στελέχη τριών διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών (*Escherichia Coli O157:H7*, *Listeria*, *Salmonella spp*). Μετά από 24 ώρες έγινε δειγματοληψία και καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών.

Στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι τέσσερις από τις έξι μαρινάδες με κριτήριο τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και τη δραστικότητα τους απέναντι στους μικροοργανισμούς και χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο μέρος του πειράματος.

Σ' αυτό το στάδιο εμβολιάστηκαν δείγματα χοιρινού κρέατος με τους ίδιους παθογόνους, τυλίχθηκαν σε εδώδιμη μεμβράνη αλγινικού νατρίου στην οποία είχε ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης και διατηρήθηκαν στους 4°C για 4 ημέρες. Την 4^η μέρα εμβαπτίστηκαν στις τέσσερις μαρινάδες που επιλέχθηκαν όπου παρέμειναν για 24 ώρες στους 4°C. Την 5^η ημέρα ακολούθησε ψήσιμο στους 65°C.

Η κάθε μία από τις παραπάνω πειραματικές διαδικασίες περιγράφεται αναλυτικότερα σε επόμενες παραγράφους (3.2.2., 3.2.3.)

3.2.1. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος

Για τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μίγμα τριών στελεχών *Salmonella*, τριών στελεχών *Escherichia coli O157:H7* τα οποία έχουν απομονωθεί από ανθρώπινα περιττώματα και τριών στελεχών *Listeria monocytogenes*. (Πίνακας 3.2.1.1.). 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* και της *Salmonella* η επώαση έγινε στους 37°C ενώ η *Listeria* επώαστηκε στους 30°C για 24 και 18 ώρες.

Έπειτα από τις 2 ανανεώσεις ακολούθησε το στάδιο του καθαρισμού του ενοφθαλμίσματος με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης (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 φυγοκέντρωσης. 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.

Πίνακας 3.2.1.1. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Μικροοργανισμοί	Ορότυποι
<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium,
	Enteritidis
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a,
	4b
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 12079
	NCTC 13125
	NCTC 13127

3.2.2. Ενοφθαλμισμός μαρινάδων με καλλιέργειες παθογόνων

3.2.2.1. Προετοιμασία μαρινάδων

Για τις ανάγκες της διατριβής επιλέχθηκαν έξι διαφορετικές μαρινάδες . Η διαφοροποίηση τους οφείλονταν αφενός στα συστατικά τους και αφετέρου στο αν ήταν εμπορικές ή παρασκευάζονταν οικιακά. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τρεις εμπορικές μαρινάδες καθε μιας από τις οποίες το βασικό συστατικό ήταν το λεμόνι, το κρασί και η μελάσα αντίστοιχα και τρεις οικιακής παρασκευής που είχαν ως βασικό συστατικό το πορτοκάλι, τη μπύρα και το χυμό ντομάτας αντίστοιχα. Τα

ακριβή συστατικά τους καθώς και οι αναλογίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον Πίνακα 3.2.2.1Α Παρασκευάστηκαν 50 ml από την κάθε μαρινάδα σε αποστειρωμένες φιάλες duran των 100 ml όπου και πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός.

Πίνακας 3.2.2.1.Α. Συστατικά μαρινάδων

ΜΑΡΙΝΑΔΕΣ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ/ΑΝΑΛΟΓΙΕΣ
ΟΙΚΙΑΚΕΣ	
Πορτοκάλι	Φυσικός χυμός πορτοκάλι 30 ml Ελαιόλαδο 20 ml Μέλι 8% Μαύρο πιπέρι 1%
Μπύρα	Μπύρα τύπου Lager 50 ml Αποξηραμένο κρεμμύδι 1% Αποξηραμένο σκόρδο 1%
Ντομάτα/Γιαούρτι	Χυμός ντομάτας 25 ml Στραγγιστό αγελαδινό γιαούρτι 25 ml Ρίγανη 1%
ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ	
Λεμόνι	Λεμόνι Δεντρολίβανο Δάφνη
Κρασί	Κόκκινο κρασί Έλαιο Πορτοκαλιού Άρκευθος
Μελάσα	Μελάσα Σόγια Πιπερόριζα

3.2.2.2. Ενοφθαλμισμός μαρινάδων

Αρχικά παρασκευάστηκε το εμβόλιο όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.1. Μετά από μία δεκαδική αραιώση προέκυψε τελικό εμβόλιο της τάξης 10^7 cfu/ml. Όγκος 1 ml από το εμβόλιο προστέθηκε σε κάθε μία απ' τις μαρινάδες έτσι ώστε στο συνολικό όγκο των 50 ml της κάθε μαρινάδας ο πληθυσμός των μικροοργανισμών να είναι της τάξης των 10^6 cfu/ml. Ακολούθησε διατήρηση των μαρινάδων στους 4°C για 24 ώρες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους τρεις μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν (*Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*).

3.2.2.3. Καταμέτρηση πληθυσμού μικροοργανισμών

Μετά τις 24 ώρες παραμονής των εμβολιασμένων μαρινάδων στους 4°C ακολούθησε δειγματοληψία προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός του μικροβιακού πληθυσμού. Όγκος 1 ml από την κάθε μαρινάδα αραιώθηκε δεκαδικά σε διάλυμα 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 την περίπτωση των στελεχών *E. coli O157:H7* 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* ενώ σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Tryptone Soy Agar) έγινε ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX). Στην περίπτωση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TSA) έγινε επώαση στους 30°C για 48 ώρες και στη συνέχεια καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες ενώ τα τρυβλία με το επιλεκτικό υπόστρωμα για *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 που μας ενδιέφερε στην κάθε περίπτωση 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 % προκειμένου να είναι περισσότερο ευδιάκριτες οι αποικίες της *Listeria*. Τα τρυβλία και των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων επώαστηκαν στους 30°C για 48 ώρες.

Ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών. Οι αποικίες της *Listeria* στο επιλεκτικό υπόστρωμα εμφανίστηκαν ως γαλάζιες αποικίες με χαρακτηριστική μαύρη ζώνη περιμετρικά των αποικιών.

Salmonella spp

Ποσότητα 0.1 ml και για την περίπτωση των στελεχών *Salmonella* εμβολιάστηκε σε τρυβλία επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος XLD. Η επώαση έγινε στους 37°C για 24 ώρες και ακολούθησε καταμέτρηση των χαρακτηριστικών μαύρων αποικιών. Ο προσδιορισμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας έγινε σε θρεπτικό υλικό TSA (Tryptone Soy Agar). Ακολούθησε επώαση στους 30°C για 48 ώρες και καταμέτρηση όλων των αποικιών.

Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των 2 επαναλήψεων από κάθε αραιώση. Για την κάθε επανάληψη ξεχωριστά ο υπολογισμός των αποικιών έγινε χρησιμοποιώντας των μέσο όρο δύο διαφορετικών αραιώσεων.

3.2.2.4. Προσδιορισμός pH

Σε κάθε μαρινάδα προσδιορίστηκε η τιμή pH πριν καθώς και μετά τον εμβολιασμό τους με την καλλιέργεια. Η μέτρηση γινόταν με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου απ' ευθείας στο διάλυμα της μαρινάδας.

Η όλη πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα δύο φορές για αύξηση του αριθμού των επαναλήψεων και εξάλειψη των πειραματικών σφαλμάτων.

3.2.3. Ενοφθαλμισμός κρέατος με καλλιέργεια παθογόνων, τύλιγμα σε εδώδιμη μεμβράνη με αιθέριο έλαιο ρίγανης, εμφύπτιση σε μαρινάδες και ψήσιμο.

3.2.3.1. Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου με αιθέριο έλαιο ρίγανης

Για την προετοιμασία των εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου ογκομετρήθηκαν 500 ml απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε θέρμανση στους 60-70°C και προσθήκη υπό ανάδευση σκόνης αλγινικού νατρίου συγκέντρωσης 3% κ.ο. 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% κ.ο. για βελτίωση των φυσικών και των μηχανικών ιδιοτήτων της μεμβράνης (αύξηση ελαστικότητας) καθώς και το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 1% κ.ο επίσης. Ακολούθησε ομογενοποίηση σε συσκευή Ultra Turrax προκειμένου να γίνει η ενσωμάτωση του αιθέριου ελαίου στο διάλυμα αλγινικού νατρίου.

Το διάλυμα έπειτα μοιράστηκε σε τρυβλία Petri (10 g/ τρυβλίο). Τα τρυβλία παρέμειναν για 12 ώρες σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής ώστε να επέλθει η επιθυμητή ξήρανση του διαλύματος. Μετά από 12 ώρες απομακρύνθηκαν οι σχηματισθείσες μεμβράνες από τα τρυβλία με ταυτόχρονη προσθήκη διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (10 ml/ τρυβλίο) για 1 λεπτό και συλλέχθηκαν έως ότου χρησιμοποιηθούν. Παράλληλα με την παρασκευή των αντιμικροβιακών εδώδιμων μεμβρανών παρασκευάστηκαν και μεμβράνες στις οποίες δεν ενσωματώθηκε αιθέριο έλαιο ρίγανης.

3.2.3.2. Μεταχείριση δειγμάτων κρέατος

Για τη διεξαγωγή της μελέτης χρησιμοποιήθηκε χοιρινό κρέας ελληνικής προέλευσης από το μπούτι του σφαγίου. Το κρέας αγοράστηκε από συννοικιακό κρεοπωλείο και μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο εργαστήριο σε λιγότερο από μισή ώρα.

Στη συνέχεια ακολούθησε τεμαχισμός του κρέατος υπό ασηπτικές συνθήκες σε τεμάχια βάρους 20g και διαστάσεων 4 cm x 2.5 cm x 1.7 cm και τοποθέτηση των δειγμάτων σε μεταλλικούς δίσκους ψησίματος.



3.2.3.3. Ενοφθαλμισμός δειγμάτων κρέατος

Μετά την παρασκευή του ενοφθαλμίσματος όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.1. ακολούθησε ο ενοφθαλμισμός των δειγμάτων. Όγκος 200 μl απ' το εμβόλιο προστέθηκε στο κάθε τεμάχιο (100 μl ανά επιφάνεια). Αρχικά εμβολιάστηκε με 100μl η μία επιφάνεια και ακολούθησε διατήρηση των δειγμάτων στους 4°C για 20 min προκειμένου να επιτευχθεί η προσκόλληση των μικροοργανισμών στην επιφάνεια του κρέατος. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την άλλη επιφάνεια των δειγμάτων.

3.2.3.4. Τύλιγμα δειγμάτων κρέατος με εδώδιμες μεμβράνες

Μετά την προετοιμασία των μεμβρανών και τον ενοφθαλμισμό του κρέατος ακολούθησε η περιτύλιξη των δειγμάτων με τις μεμβράνες χωρίς ή με αιθέριο έλαιο ρίγανης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri όπου και τυλίχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι τυλιγμένη όλη η επιφάνεια του κρέατος με τη μεμβράνη. Τεμάχια κρέατος που δεν τυλίχθηκαν σε μεμβράνες χρησιμοποιήθηκαν σα μάρτυρες. Όλα τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 4°C για 4 ημέρες.

3.2.3.5. Παρασκευή μαρινάδων και εμφύπτιση εμβολιασμένων δειγμάτων στις μαρινάδες

Την 4^η ημέρα του πειράματος παρασκευάστηκαν τα διαλύματα των μαρινάδων όπως αναφέρεται στην παράγραφο 4.1. Από τις έξι μαρινάδες που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά επιλέχθηκαν οι εμπορικές μαρινάδες με βάση το κρασί ή το λεμόνι και οι οικιακές με βάση τη μύρα ή το πορτοκάλι. Ακολούθησε απομάκρυνση των εδωδιμων μεμβρανών από τα δείγματα του κρέατος και εμφύπτιση του κρέατος στις μαρινάδες φροντίζοντας ώστε όλα τα δείγματα να είναι πλήρως εμβαπτισμένα στα διαλύματα των μαρινάδων. Δείγματα εμβαπτίστηκαν και σε ισοτονικό διάλυμα Ringer προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν φαινόμενα έκπλυσης των κυττάρων από την επιφάνεια του κρέατος. Διατηρήθηκαν στους 4°C για 24 ώρες. Δείγματα που δεν εμβαπτίστηκαν στις μαρινάδες χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις του πειράματος με 2 ανεξάρτητα δείγματα η κάθε μία. (n=6)

3.2.3.6. Ψήσιμο δειγμάτων

Το ψήσιμο των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε οικιακό φούρνο μέχρι θερμοκρασίας κέντρου των δειγμάτων τους 65°C. Η καταγραφή των θερμοκρασιών καθώς και του χρόνου ψησίματος γινόταν με θερμοζεύγη τα οποία ήταν τοποθετημένα στο

γεωμετρικό κέντρο του τεμαχίου κρέατος καθώς και στην επιφάνεια του. Τα θερμοζεύγη ήταν συνδεδεμένα με καταγραφικό (PicoLog Recorder) ενώ ο χρόνος ψήσιματος και η θερμοκρασία στην οποία βρισκόταν το δείγμα ανά πάσα στιγμή εμφανίζονταν στην οθόνη ενός υπολογιστή.

Όταν η θερμοκρασία στο κέντρο κάθε δείγματος έφτανε τους 65°C, το δείγμα απομακρύνονταν απ' το φούρνο και εμβαπτιζόταν απ' ευθείας σε προζυγισμένη σακούλα stomacher η οποία περιείχε συγκεκριμένο όγκο διαλύματος ginger. Η διαδικασία αυτή αποσκοπούσε στη γρήγορη ψύξη των δειγμάτων προκειμένου να διακοπεί η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στο κρέας μετά την απομάκρυνση του δείγματος από το φούρνο. Πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις σε κάθε μια από τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητα δείγματα (n=9)

3.2.3.7. Καταμέτρηση μικροοργανισμών

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση κάθε σταδίου του πειράματος (ενοφθαλμισμός, περιτύλιξη σε μεμβράνες, εμβάπτιση σε μαρινάδες, ψήσιμο) ακολουθούσε δειγματοληψία προκειμένου να προσδιοριστεί ο μικροβιακός πληθυσμός σε κάθε στάδιο.

Κατά τη δειγματοληψία κάθε δείγμα (τεμάχιο κρέατος) ζυγίζόταν ασηπτικά και προσθέτονταν σ' αυτό κατάλληλος όγκος διαλύματος ginger. Το δείγμα ομογενοποιούνταν 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 ορρού ginger. Οι κατάλληλες ανά περίπτωση δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο μικροβιολογικό υπόστρωμα με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Τα υλικά καθώς και οι συνθήκες επώασης ανά κατηγορία μικροοργανισμού αναφέρονται στην παράγραφο 3.2.2.3.

3.2.3.8. Προσδιορισμός του pH

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

3.2.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η όλη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε και με τεμάχια κρέατος που δεν εμβολιάστηκαν με τους προαναφερθέντες παθογόνους μικροοργανισμούς προκειμένου να διαπιστωθεί το οργανοληπτικό αποτέλεσμα της συδνυστικής εφαρμογής της εδώδιμης μεμβράνης ρίγανης και της κάθε μαρινάδας μετά το ψήσιμο του κρέατος. Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν στα πλαίσια της αξιολόγησης ήταν η οσμή και η γεύση και βαθμολογήθηκαν με κλίμακα από 1-5 στην οποία το χαμηλότερο νούμερο αφορούσε στο χειρότερο οργανοληπτικό αποτέλεσμα και το ψηλότερο το καλύτερο αποτέλεσμα αντίστοιχα.

3.2.5. Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) και εκτιμήθηκαν με μονομεταβλητή ανάλυση. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις υπολογίστηκαν και πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διακύμανσης για τις ανεξάρτητες μεταβλητές και τις αλληλεπιδράσεις τους. Οι διαφορές καθίστανται σημαντικές σε επίπεδο 95%

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Αποτελέσματα

4.1.1. Μέτρηση τιμών pH μαρινάδων

Πίνακας 4.1.1. Τιμές pH μαρινάδων

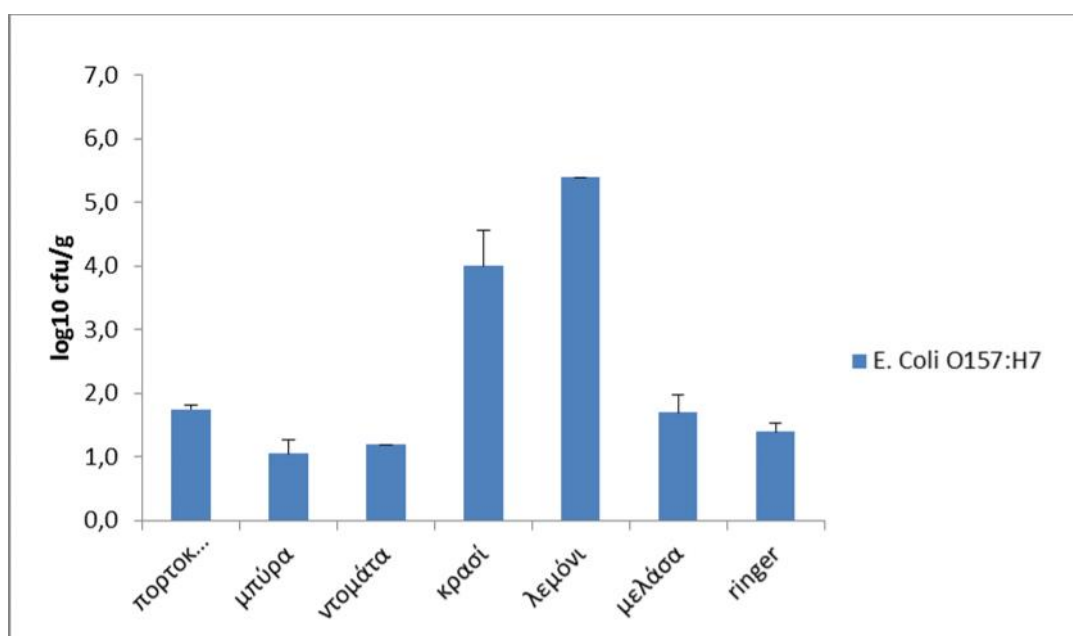
ΜΑΡΙΝΑΔΕΣ	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Πορτοκάλι	3.75 ±0.1	3.81 ±0.1	3.74 ±0.1
Μπύρα	4.66 ±0.1	4.64 ±0.1	4.86 ±0.0
Ντομάτα	4.25 ±0.1	4.20 ±0.0	4.20 ±0.1
Κρασί	3.36 ±0.2	3.27 ±0.1	3.19 ±0.0
Λεμόνι	2.51 ±0.1	2.36 ±0.1	2.42 ±0.1
Μελάσα	4.40 ±0.2	4.43 ±0.2	4.30 ±0.0
Ringer	6.68 ± 0.0	6.66 ± 0.0	6.70 ± 0.0

Όπως μπορεί κανείς να διαπιστώσει και από τον Πίνακα 4.1.1. η μαρινάδα με βάση το λεμόνι είναι αυτή που έχει το χαμηλότερο pH συγκριτικά με τις υπόλοιπες μαρινάδες. Ακολουθούν η μαρινάδα με βάση το κρασί και η μαρινάδα με βάση το πορτοκάλι. Οι μαρινάδες με βάση τη ντομάτα και τη μελάσα έχουν παρόμοιες τιμές pH, ενώ η λιγότερο όξινη μαρινάδα φαίνεται να είναι αυτή με βάση τη μπύρα. Επίσης παρατηρούμε ότι ο ενοφθαλμισμός με διαφορετικό κάθε φορά μικροοργανισμό δεν επηρεάζει το pH των μαρινάδων που παραμένει ίδιο με το pH που είχαν πριν τον ενοφθαλμισμό τους.

4.1.2. Αντιμικροβιακή δράση μαρινάδων

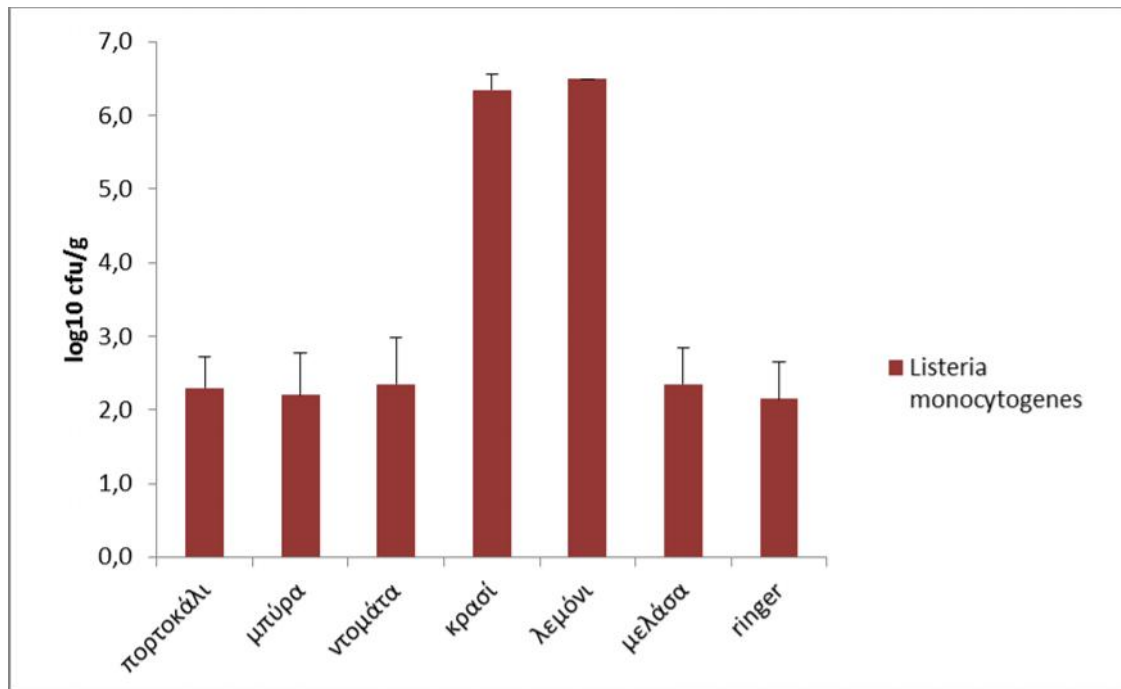
Αρχικά όπως περιγράφηκε και σε προηγούμενο κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων μαρινάδων στην επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών, με απ' ευθείας ενοφθαλμισμό της μαρινάδας με κύτταρα του εκάστοτε παθογόνου.

Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 4.2.1. οι πληθυσμοί του *E. Coli O157:H7* στα περισσότερα διαλύματα μαρινάδων μειώθηκαν κατά 1 με 2 log. Οι μαρινάδες με βάση το κρασί και το λεμόνι είχαν τη μεγαλύτερη δράση απέναντι στον παθογόνο αφού προκάλεσαν μείωση 4 και 5.4 log αντίστοιχα



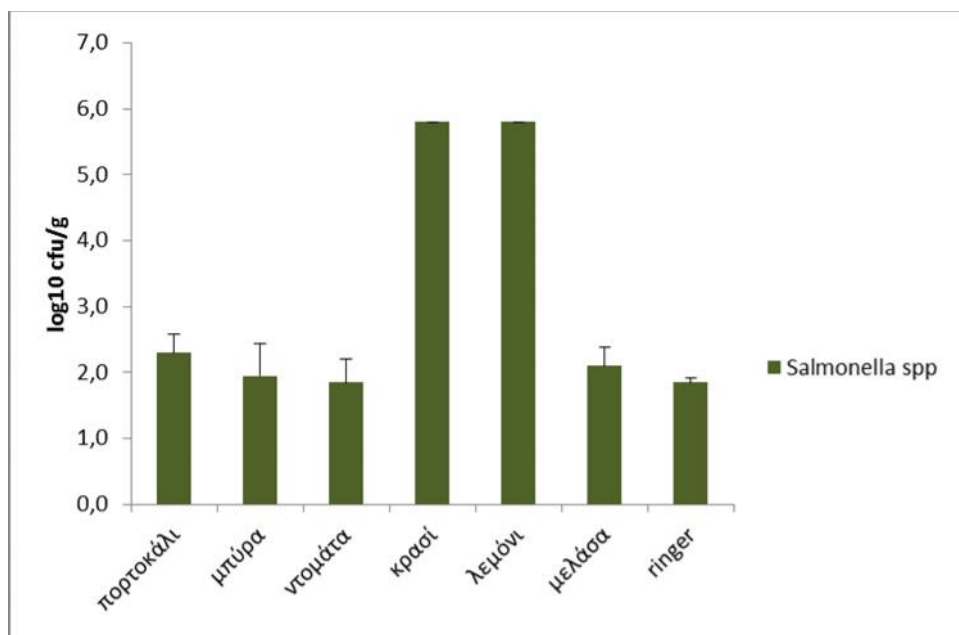
Γράφημα 4.2.1. Λογαριθμική μείωση πληθυσμού *E. coli O157:H7* σε διαλύματα μαρινάδων

Τα διαλύματα των περισσότερων μαρινάδων μετά από 24 ώρες μείωσαν τους πληθυσμούς της *Listeria monocytogenes* κατά 2-3 log. Η μεγαλύτερη όμως μείωση της τάξεως των 6.5 log παρατηρήθηκε στις μαρινάδες με βάση το κρασί και το λεμόνι (Γράφημα 4.2.2.).



Γράφημα 4.2.2. Λογαριθμική μείωση πληθυσμού *Listeria monocytogenes* σε διαλύματα μαρινάδων.

Οι μαρινάδες με βάση το κρασί και το λεμόνι στάθηκαν ικανές να μειώσουν τους πληθυσμούς της *Salmonella spp* σχεδόν κατά 6 log. Οι υπόλοιπες μαρινάδες όπως παρατηρείται και στο Γράφημα 4.2.3. οδήγησαν σε μείωση περίπου 2 log του παθογόνου μικροοργανισμού.



Γράφημα 4.2.3. Λογαριθμική μείωση πληθυσμού *Salmonella spp* σε διαλύματα μαρινάδας

Συγκρίνοντας τους 3 παθογόνους μικροοργανισμούς μεταξύ τους παρατηρείται ότι ο μικροοργανισμός *E.Coli O157:H7* ήταν ο πιο ανθεκτικός στη δράση των μαρινάδων σε σχέση με τη *Listeria monocytogenes* και τα στελέχη *Salmonella spp* που εμφάνισαν παρόμοιες μειώσεις στους πληθυσμούς τους.

4.1.3. Συνδυαστική επίδραση εδώδιμων μεμβρανών με αιθέριο έλαιο ρίγανης, μαρινάδων και ψησίματος σε ενοφθαλμισμένο με παθογόνους χοιρινό κρέας

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών μεταχειρίσεων (τύλιγμα σε αντιμικροβιακή εδώδιμη μεμβράνη, εμβάπτιση σε μαρινάδες, ψήσιμο) ενοφθαλμισμένου χοιρινού κρέατος, μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό στην επιβίωση διαφορετικών παθογόνων μικροοργανισμών.

Οργανοληπτική αξιολόγηση

Πίνακας 4.1.3.1. Οργανοληπτική αξιολόγηση (5→ το περισσότερο αποδεκτό)

ΜΑΡΙΝΑΔΕΣ	ΧΩΡΙΣ ΦΙΑΜ ΡΙΓΑΝΗΣ	ΜΕ ΦΙΑΜ ΡΙΓΑΝΗΣ
Πορτοκάλι	3	2
Μπύρα	3	2
Ντομάτα	1	1
Μελάσα	4	3.5
Κρασί	4	3
Λεμόνι	5	4.5

Η περισσότερο αποδεκτή μαρινάδα είναι αυτή η οποία είχε ως βάση το λεμόνι αφού αναγνωρίστηκε από όλους σχεδόν τους συμμετέχοντες στην οργανοληπτική αξιολόγηση ως αυτή με την πιο ευχάριστη γεύση τόσο όταν το δείγμα είχε μεμβράνη με αιθέριο έλαιο ρίγανης όσο και χωρίς αυτό. Άνω του μετρίου γευστικά επίσης μπορούν να χαρακτηριστούν τα δείγματα που εμβάπτιστηκαν σε μαρινάδες με βάση τη μελάσα αλλά και το κρασί (Πίνακας 4.1.4.1)

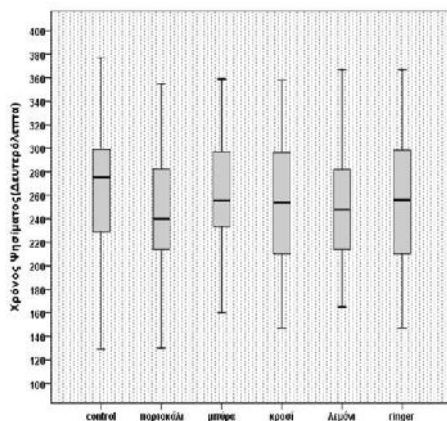
Οι περισσότεροι δοκιμαστές σχολίασαν ότι η γεύση της ρίγανης ήταν αναγνωρίσιμη σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτου μαρινάδας ενώ οι μαρινάδες γενικά καθιστούσαν πιο ήπια τη γεύση της ρίγανης στα δείγματα που είχαν τυλιχθεί σε μεμβράνη με αιθέριο έλαιο ρίγανης.

Θερμική επεξεργασία

Όπως προαναφέρθηκε το κριτήριο για τη θερμική επεξεργασία ήταν η θερμοκρασία κέντρου των 65°C. Παρόλο που όλα τα δείγματα ψήθηκαν στην ίδια θερμοκρασία, σε ορισμένες περιπτώσεις διέφεραν οι χρόνοι στους οποίους έφτασαν τους 65°C, γεγονός που αποτυπώνεται και στον Πίνακα 4.1.3.2. όπου φαίνεται ότι υπάρχει ένα εύρος από 130 έως 370 sec στους χρόνους ψησίματος.

Εν τούτοις στο γράφημα 4.1.3.1. μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι το εύρος χρόνου στο οποίο ψήθηκαν τα δείγματα διαφορετικών μεταχειρίσεων είναι περίπου ίδιο για όλες τις περιπτώσεις και ότι ο αριθμός των δειγμάτων που ψήθηκαν σε υψηλούς χρόνους είναι ίδιος με τον αριθμό αυτών που ψήθηκαν σε χαμηλούς.

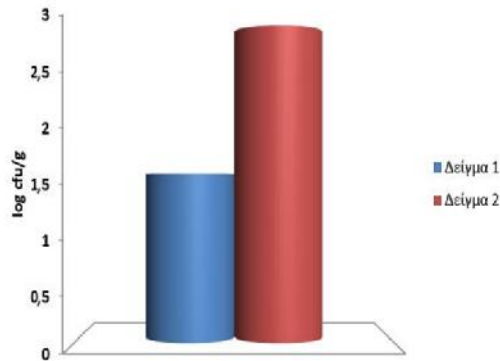
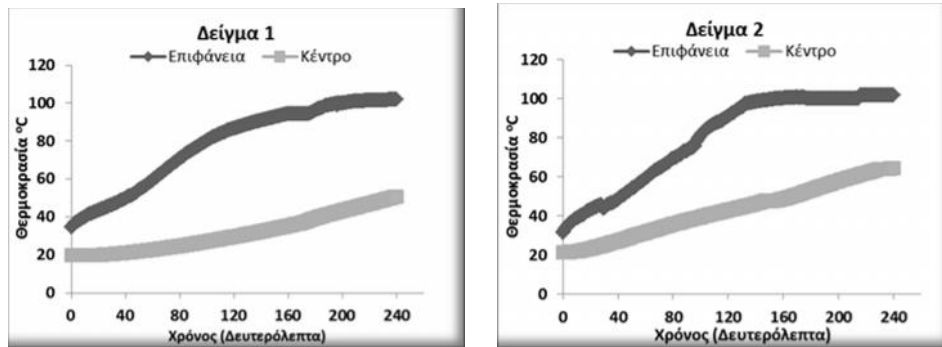
Προκειμένου να διαπιστωθεί πειραματικά η επίδραση του χρόνου ψησίματος στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών αριθμός δειγμάτων ψήθηκε με βάση το χρόνο και παρατηρήθηκε ότι παρόλο που ψήθηκαν στους ίδιους χρόνους οι πληθυσμοί των δειγμάτων διέφεραν (Γράφημα 4.1.3.2.)



Γράφημα 4.1.3.1. Εύρος χρόνων ψησίματος.

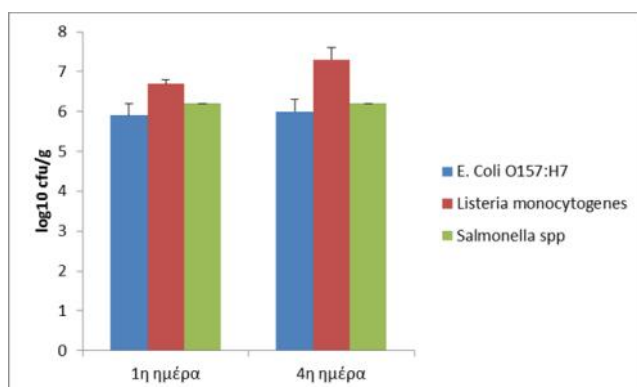
Πίνακας 4.1.3.2. Εύρος και μέσος χρόνος ψησίματος μεταξύ των μεταχειρίσεων

	Μέσος χρόνος ψησίματος (Δευτερόλεπτα)	Εύρος χρόνων ψησίματος (Δευτερόλεπτα)
control	265,3	129-377
πορτοκάλι	244,5	130-355
μύρτα	261,3	160-359
κρασί	248,3	147-358
λεμόνι	245,2	165-367
ringer	261,2	147-367



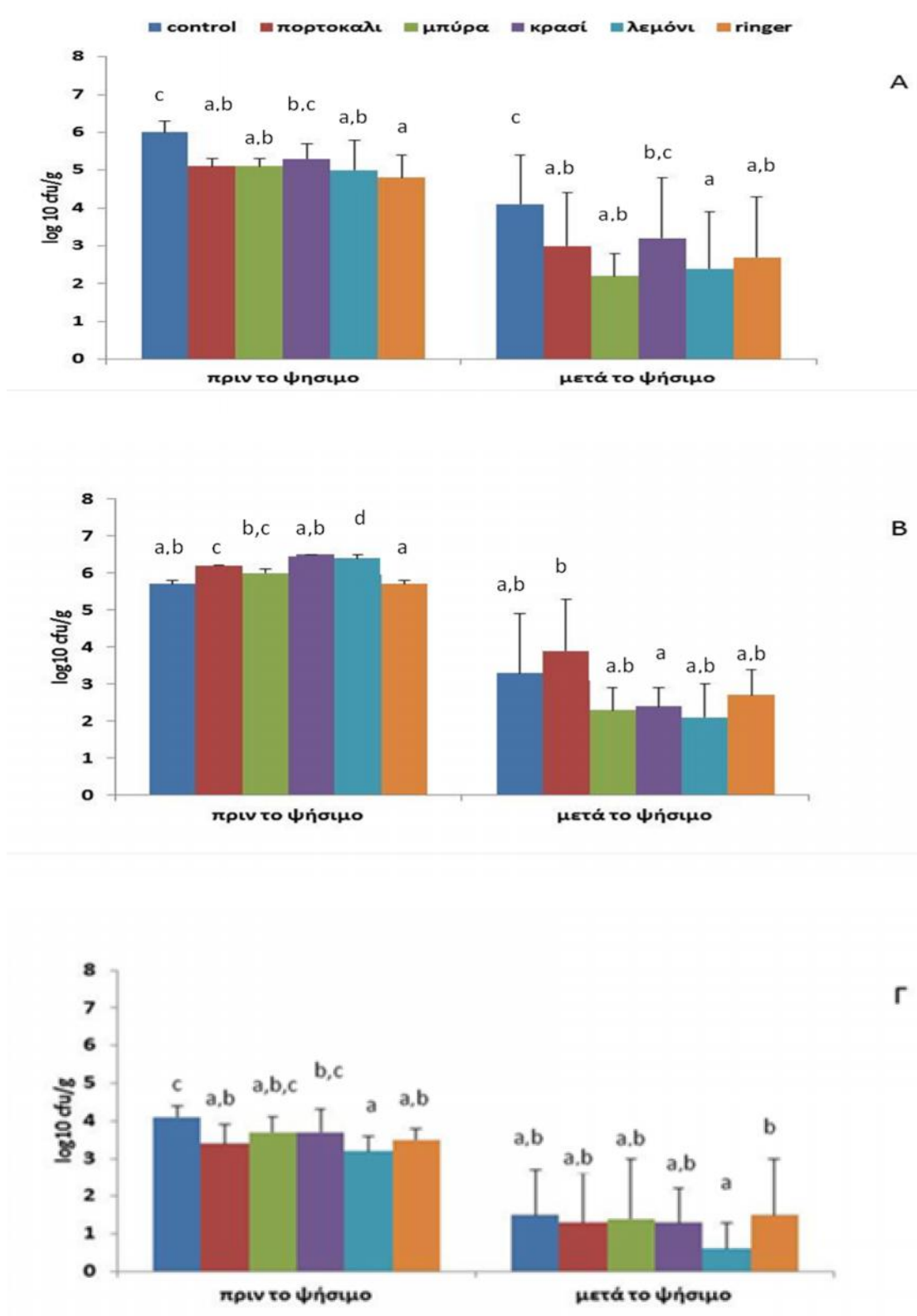
Γράφημα 4.1.3.2. Επιβίωση σε δείγματα που ψήθηκαν σε ίδιους χρόνους

Οι αρχικοί πληθυσμοί των 3 παθογόνων στα δείγματα ήταν της τάξεως των 6-6.5 \log_{10} cfu/g. Όπως απεικονίζεται και στο Γράφημα 4.1.3.3. μετά από συντήρηση στους 4°C για 4 ημέρες οι πληθυσμοί του *E. Coli O157:H7* και των στελεχών *Salmonella* παρέμειναν στα ίδια επίπεδα. Στην περίπτωση της *Listeria monocytogenes* παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στους πληθυσμούς του παθογόνου κατά 0.5 log γεγονός αναμενόμενο αφού η *Listeria* ανήκει στους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς και επομένως είναι δυνατόν να πολλαπλασιάζεται στους 4°C όπου και συντηρούνταν τα ενοφθαλμισμένα δείγματα.



Γράφημα 4.1.3.3. Πληθυσμοί παθογόνων μικροοργανισμών αρχικά και μετά από 4 ημέρες συντήρησης στους 4°C

➤ *E. coli* O157:H7



Γράφημα 4.1.3.4. Επιβίωση του παθογόνου *E. coli* O157:H7 πριν και μετά το ψήσιμο (A) χωρίς εδώδιμη μεμβράνη (B) με εδώδιμη μεμβράνη (Γ) με εδώδιμη μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης.

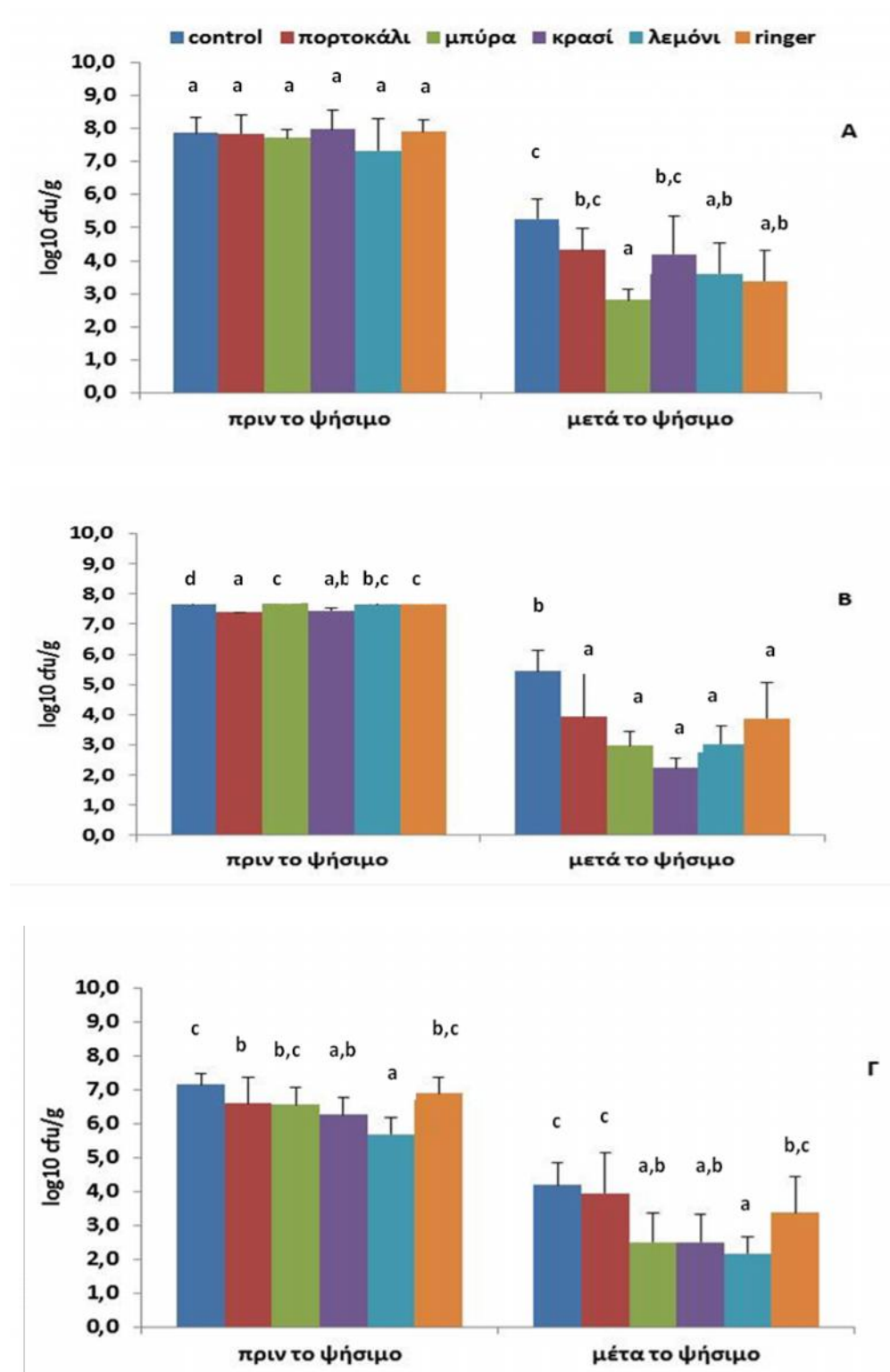
Όπως παρατηρείται στο Γράφημα 4.1.3.4.A. η εμφάνιση των εμβολιασμένων δειγμάτων με *E.coli O157:H7* σε μαρινάδες για 24 ώρες μετά από συντήρηση 4 ημερών στους 4°C οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 1 περίπου log cfu/g σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Παρόλα αυτά μπορεί να παρατηρήσει κανείς ότι αντίστοιχη μείωση είχαν και τα δείγματα τα οποία εμβολιάστηκαν σε διάλυμα ringer γεγονός που μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανόν η μείωση που επέφεραν οι μαρινάδες να μην οφείλεται στη δράση των μαρινάδων αλλά σε έκπλυση των κυττάρων από την επιφάνεια των δειγμάτων. Το ψήσιμο των εμβολιασμένων δειγμάτων στους 65°C μείωσε τους πληθυσμούς του παθογόνου κατά 2 περίπου log. Τα δείγματα τα οποία είχαν προηγουμένως εμβολιαστεί σε μαρινάδες είχαν επιπλέον σημαντική μείωση 1.5 log. Οι σημαντικότερες μειώσεις παρατηρούνται στις μαρινάδες με βάση το λεμόνι και τη μύρα (1.7 και 1.9 log αντίστοιχα).

Στα δείγματα τα οποία μετά τον εμβολιασμό τους τυλίχθηκαν σε εδώδιμη μεμβράνη στην οποία δεν είχε ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης (EF) ο παθογόνος ήταν σε πληθυσμούς αντίστοιχους με τα αμεταχειριστά δείγματα (μάρτυρες) (Γραφήματα 4.1.3.4.A και 4.1.3.4.B). Η εμφάνιση στις μαρινάδες των συγκεκριμένων δειγμάτων επίσης δεν είχε καμία επίδραση στους πληθυσμούς του μικροοργανισμού.

Το ψήσιμο των δειγμάτων αυτών (EF) στους 65°C προκάλεσε μείωση 2 log στον παθογόνο μικροοργανισμό ενώ η εμφάνιση σε μαρινάδες δεν προκάλεσε στατιστικώς σημαντικές μειώσεις ($p > 0.05$) (Γράφημα 4.1.3.4.B)

Η εφαρμογή της εδώδιμης μεμβράνης στην οποία είχε ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης (EFO) οδήγησε σε μείωση 2 log των πληθυσμών του παθογόνου μικροοργανισμού. Η εμφάνιση σε μαρινάδες δεν προκάλεσε επιπλέον μείωση, με εξαίρεση τη μαρινάδα με βάση το λεμόνι που παρουσίασε μικρή αλλά σημαντική μείωση ($p < 0.05$) 1 log. (Γράφημα 4.1.3.4.A και 4.1.3.4.Γ).

Το ψήσιμο των δειγμάτων τα οποία τυλίχθηκαν σε εδώδιμη μεμβράνη στην οποία είχε ενσωματωθεί αιθέριο έλαιο ρίγανης (EFO) οδήγησε σε μείωση 2.5 log των πληθυσμών του παθογόνου. Ο συνδυασμός μεμβράνης με αιθέριο έλαιο ρίγανης και εμφάνιση σε μαρινάδα με βάση το λεμόνι μείωσε τους πληθυσμούς του παθογόνου σε επίπεδα κάτω του ορίου ανίχνευσης (0.7 log cfu/g) μετά το ψήσιμο.



Γράφημα 4.1.3.5. Επιβίωση OMX σε δείγματα εμβολιασμένα με *E. coli* O157:H7 πριν και μετά το ψήσιμο (A) χωρίς εδώδιμη μεμβράνη (B) με εδώδιμη μεμβράνη (Γ) με εδώδιμη μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης

Όσον αφορά στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX) παρατηρήθηκε ότι η εμβάπτιση των δειγμάτων σε μαρινάδες δεν είχε καμία επίδραση στους πληθυσμούς της OMX. Το ψήσιμο μείωσε κατά 2.5 log τους μικροοργανισμούς ενώ στα δείγματα τα οποία είχαν εμβαπτιστεί σε μαρινάδα με βάση τη μπύρα ενισχύθηκε η μείωση αυτή κατά 2.5 log περίπου (γράφημα 4.1.3.5.A.).

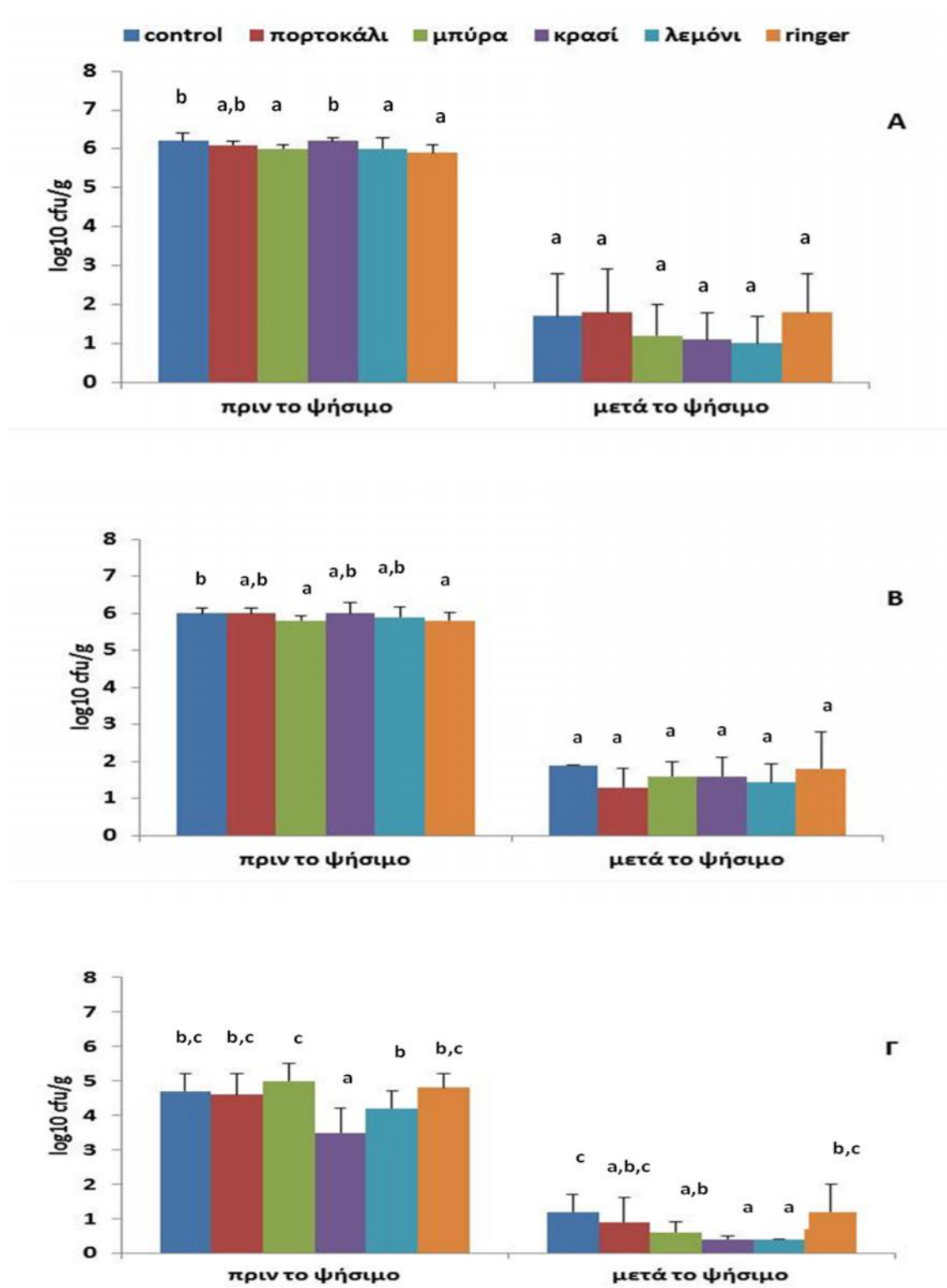
Στην περίπτωση κατά την οποία τα δείγματα τυλίχθηκαν σε εδώδιμη μεμβράνη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) οι πληθυσμοί της OMX ήταν στα ίδια επίπεδα με το μάρτυρα (αμεταχειριστο δείγμα) ενώ ούτε η εμβάπτιση σε μαρινάδες φάνηκε ικανή να μειώσει τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών (γράφημα 4.1.3.5.B).

Το ψήσιμο των δειγμάτων με EF οδήγησε σε μείωση 2.5 περίπου log της OMX. Η εμβάπτιση στις μαρινάδες προκάλεσε επιπλέον μείωση τουλάχιστον 1.5 log στους πληθυσμούς της OMX ενώ τη δραστικότερη επιπλέον μείωση είχαν τα δείγματα που εμβαπτίστηκαν σε μαρινάδες με βάση τη μπύρα, το κρασί και το λεμόνι (2.5, 3 και 2,5 log αντίστοιχα.).

Η εφαρμογή εδώδιμης μεμβράνης με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο ρίγανης (EFO) οδήγησε σε μικρή μείωση 0.7 log των πληθυσμών της OMX σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Γράφημα 4.1.3.5.Γ). Τα δείγματα τα οποία εμβαπτίστηκαν σε μαρινάδα με βάση το λεμόνι παρουσίασαν ενισχυμένη κατά 1.5 log μείωση στους πληθυσμούς της OMX.

Το ψήσιμο των δειγμάτων στα οποία είχε εφαρμοστεί μεμβράνη με αιθέριο έλαιο προκάλεσε μείωση 3 log στον πληθυσμό της OMX συγκριτικά με τους μάρτυρες. Τα δείγματα τα οποία πριν το ψήσιμο εμβαπτίστηκαν σε μαρινάδες με βάση τη μπύρα το λεμόνι και το κρασί μείωσαν επιπλέον τους πληθυσμούς της OMX κατά 1,7, 2 και 1.7 log αντίστοιχα (Γράφημα 4.1.3.5.Γ).

➤ *Salmonella* spp.



Γράφημα 4.1.3.6. Επιβίωση του παθογόνου *Salmonella* πριν και μετά το ψήσιμο (A) χωρίς εδώδιμη μεμβράνη (B) με εδώδιμη μεμβράνη (Γ) με εδώδιμη μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης.

Στην περίπτωση του εμβολιασμού των δειγμάτων με *Salmonella spp* η εμβάπτιση σε μαρινάδες δε φάνηκε ικανή να μειώσει τους πληθυσμούς του παθογόνου μετά από 24 ώρες.

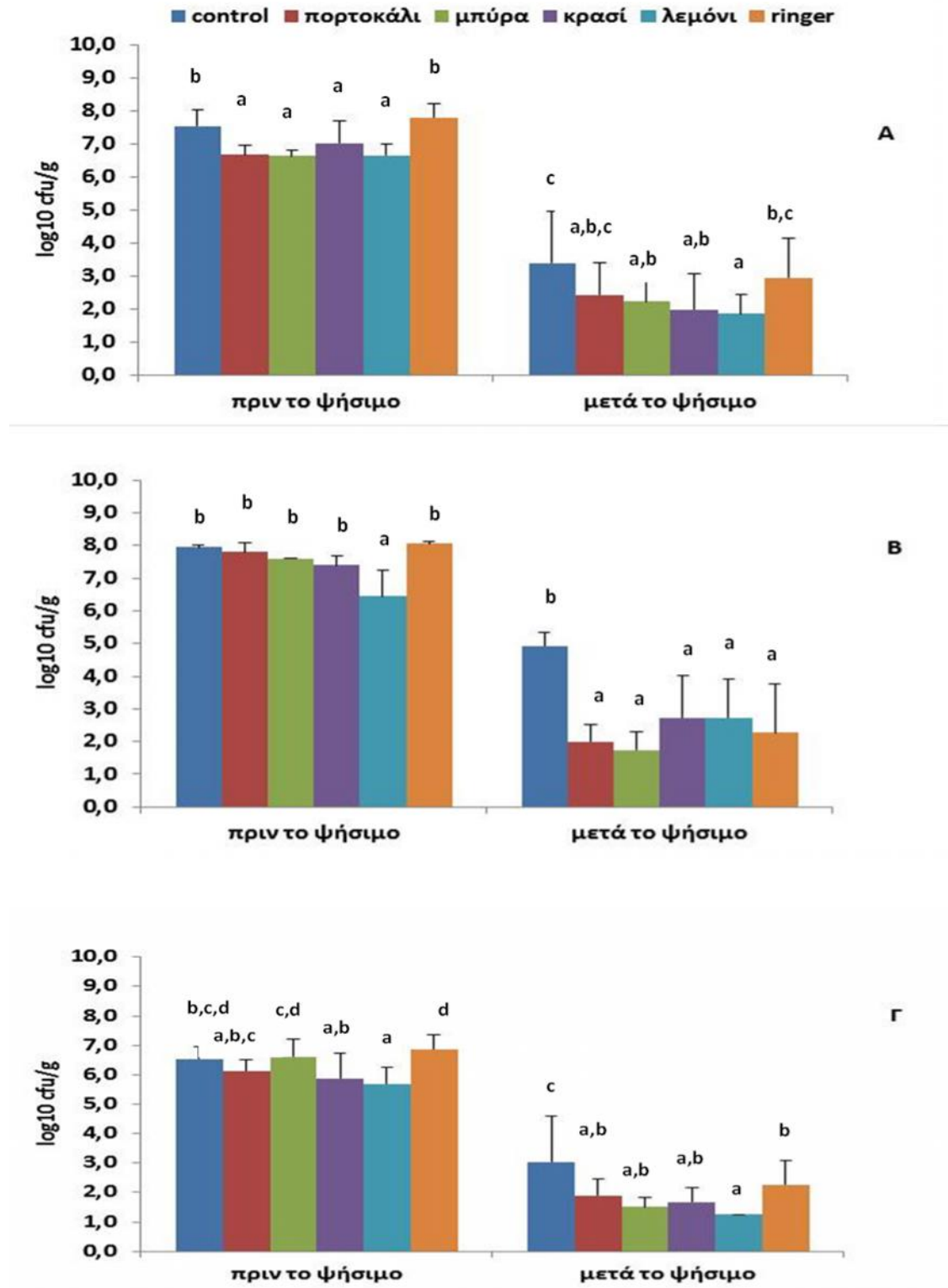
Η διαδικασία του ψήσιματος επέφερε μείωση 4.5 log περίπου στους αρχικούς πληθυσμούς του μικροοργανισμού ενώ στα δείγματα που είχαν εμβαπτιστεί προηγουμένως σε μαρινάδες δεν παρατηρήθηκε κάποια επιπλέον στατιστικώς σημαντική μείωση στους πληθυσμούς του παθογόνου. (Γράφημα 4.1.3.6A).

Η εφαρμογή εδώδιμης μεμβράνης χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) δεν είχε καμία επίδραση στους πληθυσμούς του παθογόνου όπως επίσης καμία επίδραση δεν είχε και ο συνδυασμός της εδώδιμης μεμβράνης (EF) με την εμβάπτιση σε μαρινάδες.

Μετά το ψήσιμο των δειγμάτων με EF οι πληθυσμοί της *Salmonella* εμφανίστηκαν μειωμένοι κατά 4 log χωρίς να παρατηρείται σημαντική επιπλέον μείωση εξαιτίας της εμβάπτισης των δειγμάτων στα διαλύματα μαρινάδων (Γράφημα 4.1.3.6B).

Οι πληθυσμοί του παθογόνου όταν τα δείγματα τυλιχθήκαν σε μεμβράνη με αιθέριο έλαιο ρίγανης (EFO) ήταν χαμηλότεροι κατά 1.5 log σε σύγκριση με τα αμεταχείριστα δείγματα. Οι μαρινάδες με βάση το κρασί και το λεμόνι σε συνδυασμό με τη μεμβράνη αιθέριου ελαίου προκάλεσαν στατιστικώς σημαντική ($p < 0.05$) περαιτέρω μείωση 1.2 και 0.5 log αντίστοιχα (Γραφήματα . 4.1.3.6A και 4.1.3.6Γ)

Το ψήσιμο σε συνδυασμό με EFO μείωσε τους πληθυσμούς της *Salmonella* κατά 3.5 log. Όταν η μεμβράνη με το αιθέριο έλαιο (EFO) συνδυάστηκε με εμβάπτιση σε μαρινάδες οι οποίες είχαν ως βάση το κρασί και το λεμόνι, οι πληθυσμοί του παθογόνου μειώθηκαν σε επίπεδα κάτω του ορίου ανίχνευσης ($0.7 \log \text{ cfu/g}$)(Γράφημα 4.1.3.6.Γ).



Γράφημα 4.1.3.7 Επιβίωση OMX σε δείγματα εμβολιασμένα με *Salmonella spp* πριν και μετά το ψήσιμο (A) χωρίς εδώδιμη μεμβράνη (B) με εδώδιμη μεμβράνη (Γ) με εδώδιμη μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης

Η εμφάνιση σε μαρινάδες οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση ($p < 0.05$) της OMX κατά 1 περίπου log συγκριτικά με τους μάρτυρες.

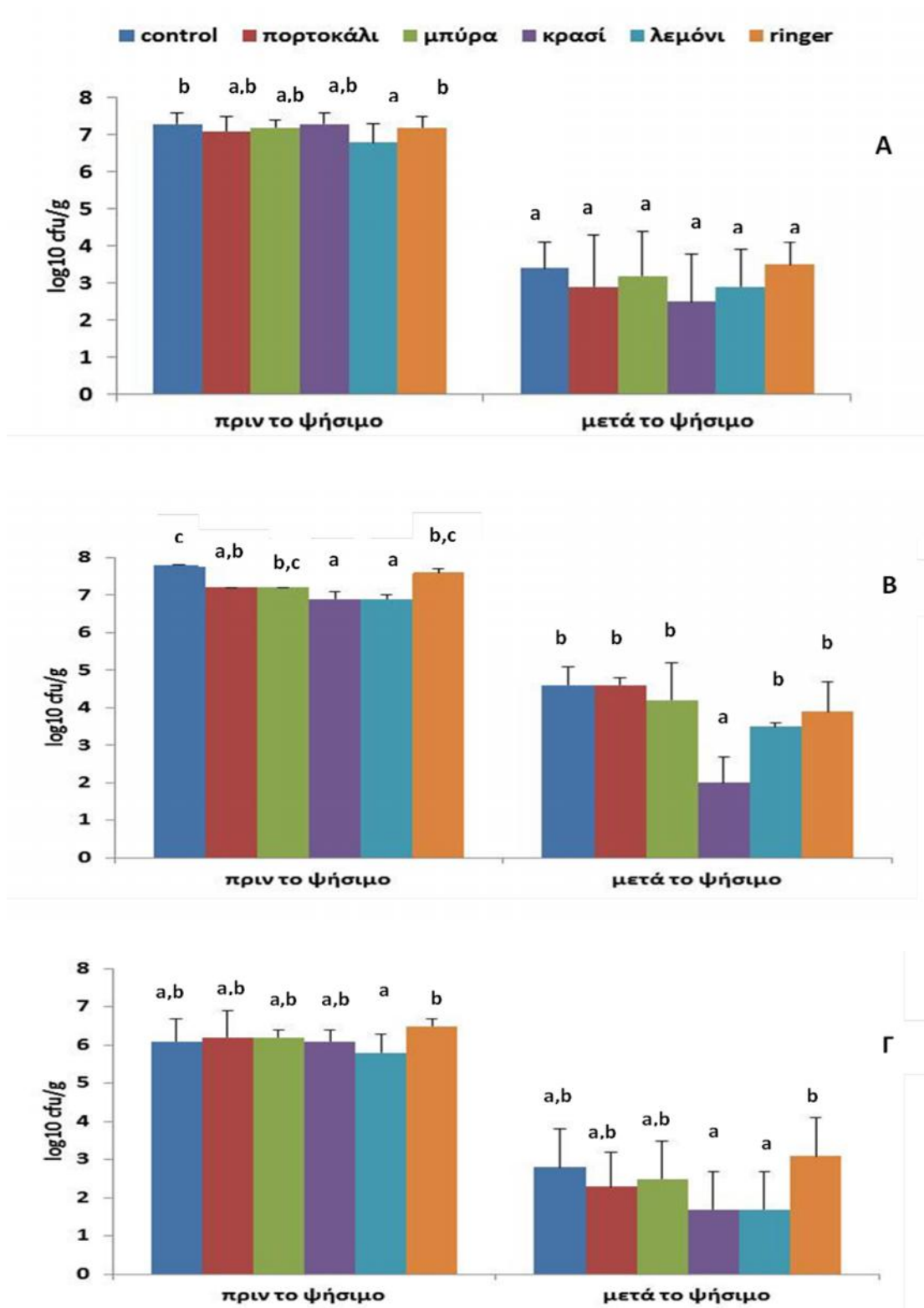
Το ψήσιμο στους 65°C μείωσε τους πληθυσμούς των αμεταχειριστων δειγμάτων κατά 4 log. Όταν προηγήθηκε του ψησίματος εμφάνιση σε μαρινάδες παρατηρήθηκε επιπλέον μείωση 1-1.5 log με τη μαρινάδα με βάση το λεμόνι να προκαλεί τη μεγαλύτερη μείωση (1.5 log) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες (Γράφημα 4.1.3.7.A.) Στην περίπτωση κατά την οποία τα δείγματα τυλίχθηκαν με εδώδιμη μεμβράνη χωρίς αιθέριο έλαιο (EF) οι πληθυσμοί της OMX ήταν αντίστοιχοι με τα αμεταχειριστα δείγματα ενώ ούτε η εμφάνιση σε μαρινάδες επηρέασε τους πληθυσμούς. Εξαιρέση αποτελεί η μαρινάδα με βάση το λεμόνι που σε συνδυασμό με το EF μείωσε επιπλέον την OMX κατά 1.5 log ($p < 0.05$).

Το ψήσιμο προκάλεσε μείωση 3 log στα δείγματα με εδώδιμη μεμβράνη (EF). Οι μαρινάδες σε συνδυασμό με τη μεμβράνη (EF) ενίσχυσαν τη μείωση των πληθυσμών OMX μετά το ψήσιμο κατά 2-3 log (Γράφημα . 4.1.3.7B).

Τα δείγματα που τυλίχθηκαν με μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης (EFO) εμφάνισαν μείωση του πληθυσμού της OMX κατά 1 περίπου log. Η εμφάνιση σε μαρινάδες δε φάνηκε να έχει ιδιαίτερη επίδραση στους μικροοργανισμούς εκτός από τη μαρινάδα η οποία είχε ως βάση το λεμόνι και προκάλεσε μια μικρή αλλά σημαντική επιπλέον μείωση 1 log.

Το ψήσιμο των δειγμάτων με μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης μείωσε τους πληθυσμούς OMX κατά 3.5 log. Η εμφάνιση των δειγμάτων σε μαρινάδες έδειξε να έχει συνεργιστική δράση με τις αντιμικροβιακές μεμβράνες αφού μείωσε επιπλέον κατά 1.5 log τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών μετά το ψήσιμο. Η μαρινάδα με βάση το λεμόνι είχε και σε αυτή την περίπτωση την ισχυρότερη δράση προκαλώντας επιπλέον μείωση 1.8 log (Γράφημα 4.1.3.7.Γ.).

➤ *Listeria monocytogenes*



Γράφημα 4.1.3.8 Επιβίωση του παθογόνου *Listeria monocytogenes* πριν και μετά το ψήσιμο (A) χωρίς εδώδιμη μεμβράνη (B) με εδώδιμη μεμβράνη (Γ) με εδώδιμη μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης.

Όπως παρατηρείται και στο Γράφημα 4.1.3.8Α, η εμφάνιση σε μαρινάδες δε φάνηκε ικανή να μειώσει τους πληθυσμούς του παθογόνου. Εξαίρεση αποτελεί η μαρινάδα με βάση το λεμόνι που προκάλεσε μικρή αλλά σημαντική μείωση ($p < 0.05$) 0.5 log.

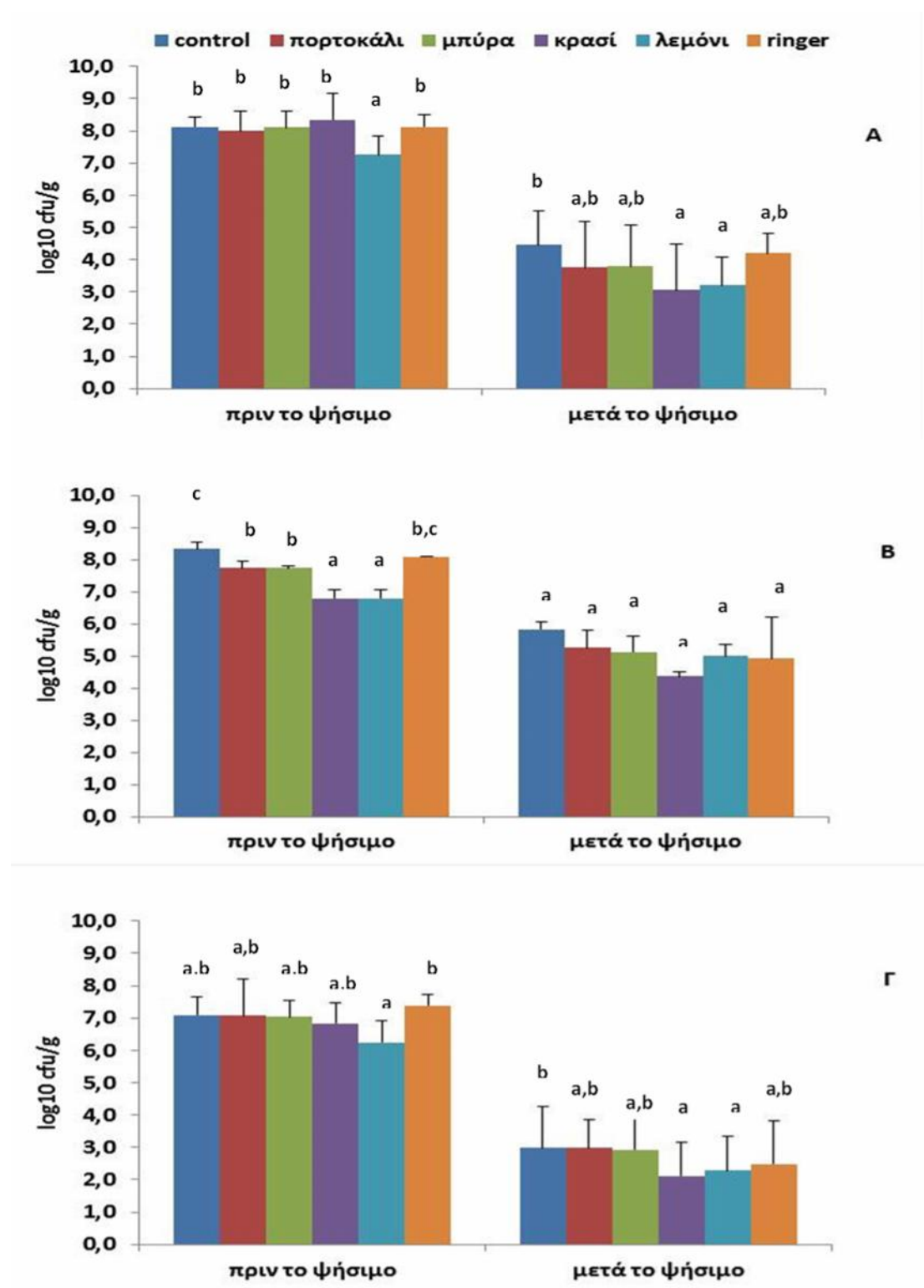
Το ψήσιμο μείωσε τους πληθυσμούς της *Listeria monocytogenes* κατά 4 περίπου log ενώ η εμφάνιση σε μαρινάδες δεν έδειξε να ενισχύει σημαντικά τις μειώσεις που προκάλεσε το ψήσιμο.

Τα δείγματα που εμβολιάστηκαν και στη συνέχεια τυλίχθηκαν σε μεμβράνη χωρίς αιθέριο έλαιο ρίγανης (EF) είχαν μετά από 4 ημέρες συντήρησης ελαφρώς αυξημένους πληθυσμούς παθογόνου συγκριτικά με τους μάρτυρες (Γράφημα 4.1.3.8 Β). Στην περίπτωση αυτή τα δείγματα που μετά τη συντήρηση εμβολιάστηκαν σε μαρινάδες με βάση το κρασί και το λεμόνι είχαν χαμηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με το μάρτυρα περίπου κατά 1 log.

Μετά το ψήσιμο των δειγμάτων με EF οι πληθυσμοί του παθογόνου εμφανίστηκαν μειωμένοι κατά 3 log. Η μαρινάδα με βάση το κρασί μείωσε περαιτέρω τους πληθυσμούς του παθογόνου μετά το ψήσιμο κατά 2.6 log. (Γράφημα 4.1.3.8 Β).

Η εφαρμογή μεμβράνης με αιθέριο έλαιο ρίγανης (EFO) προκάλεσε μείωση 1.2 log στους πληθυσμούς του μικροοργανισμού σε σύγκριση με τους μάρτυρες ενώ οι μαρινάδες δε φάνηκε να έχουν κάποια δράση έναντι των μικροοργανισμών (Γράφημα 4.1.3.8 Γ).

Ο συνδυασμός εδωδιμης μεμβράνης με αιθέριο έλαιο και ψησίματος μείωσε κατά 3.3 log τους πληθυσμούς του παθογόνου. Η εμφάνιση των δειγμάτων σε μαρινάδες ενίσχυσε τη θερμική αδρανοποίηση των μικροοργανισμών. Την ισχυρότερη δράση παρουσίασαν οι μαρινάδες με βάση το κρασί και το λεμόνι οι οποίες προκάλεσαν μικρή αλλά σημαντική επιπλέον μείωση 1 log ($p < 0.05$) (Γράφημα 4.1.3.8 Γ).



Γράφημα 4.1.3.9. Επιβίωση της OMX σε δείγματα εμβολιασμένα με *Listeria monocytogenes* πριν και μετά το ψήσιμο (A) χωρίς εδώδιμη μεμβράνη (B) με εδώδιμη μεμβράνη (Γ) με εδώδιμη μεμβράνη αιθέριου ελαίου ρίγανης

Όσον αφορά στους πληθυσμούς της OMX μόνο η μαρινάδα με βάση το λεμόνι προκάλεσε μικρή αλλά σημαντική μείωση κατά 1 log στους μικροοργανισμούς σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Το ψήσιμο προκάλεσε μείωση της OMX κατά 3.7 log ενώ η εμφύσηση σε μαρινάδες με βάση το κρασί και το λεμόνι ενίσχυσε τη μείωση αυτή κατά 1.4 και 1.3 log αντίστοιχα (Γράφημα 4.1.3.9.A.).

Η εφαρμογή εδώδιμης μεμβράνης χωρίς έλαιο ρίγανης δεν είχε επίδραση στους πληθυσμούς της OMX ενώ ο συνδυασμός EF και μαρινάδων με βάση το λεμόνι και το κρασί μείωσε τους πληθυσμούς κατά 1.3 log σε σύγκριση με τα αμεταχειρίστη δείγματα.

Το ψήσιμο των δειγμάτων με εδώδιμη μεμβράνη χωρίς έλαιο (EF) προκάλεσε μείωση 2.5 log του πληθυσμού της OMX. Η εμφύσηση σε μαρινάδες δεν είχε καμία επίδραση στους μικροοργανισμούς μετά το ψήσιμο (Γράφημα 4.1.3.9.B.).

Η εδώδιμη μεμβράνη με ενσωματωμένο αιθέριο έλαιο ρίγανης (EFO) οδήγησε σε μείωση 1 log του πληθυσμού της OMX ενώ η μαρινάδα με βάση το λεμόνι ενίσχυσε τη μείωση αυτή κατά 1 log ($p < 0.05$).

Το ψήσιμο των δειγμάτων με EFO μείωσε τους πληθυσμούς της OMX κατά 4 log. Ο συνδυασμός EFO και μαρινάδων με βάση το λεμόνι και το κρασί προκάλεσε περαιτέρω στατιστικώς σημαντική μείωση 1 log στους πληθυσμούς της OMX μετά το ψήσιμο (Γράφημα 4.1.3.9.Γ.).

4.2. Συμπεράσματα – Συζήτηση

Οι μαρινάδες οι οποίες είχαν ως βάση το λεμόνι και το κρασί ήταν αυτές που προκάλεσαν τις μεγαλύτερες μειώσεις και για τους μικροοργανισμούς. Οι δύο αυτές μαρινάδες είχαν εμφανώς χαμηλότερες τιμές pH σε σχέση με τις υπόλοιπες (2.5 και 3.3 αντίστοιχα). Επομένως ο όξινος χαρακτήρας των διαλυμάτων των δύο αυτών μαρινάδων είναι ένας παράγοντας που αποδεικνύεται ότι προκαλεί θανάτωση στα κύτταρα των μικροοργανισμών. Το pH άλλωστε είναι ένας από τους βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών αφού οι περισσότεροι μικροοργανισμοί και κυρίως βακτήρια αναπτύσσονται καλύτερα σε τιμές 6,5-7,5 ενώ ελάχιστοι είναι αυτοί που αναπτύσσονται σε τιμές pH κάτω από 4. Οι χαμηλές τιμές pH στη μαρινάδα με βάση το κρασί οφείλονται στην παρουσία οργανικών οξέων (τρυγικό, μηλικό) ενώ και άλλα συστατικά όπως η αιθυλική αλκοόλη και οι φαινολικές ουσίες που περιέχει το κρασί ενδεχομένως να ενίσχυαν την αντιμικροβιακή δράση της μαρινάδας (Kataoka, 2005; Rodríguez Vaquero et al., 2007). Επιπλέον η οξείδωση της αλκοόλης και η παραγωγή οξικού οξέος πιθανόν να συνέβαλε στην αδρανοποίηση των κυττάρων των μικροοργανισμών.

Αντίστοιχα η μαρινάδα που είχε ως βάση το λεμόνι οφείλει τις χαμηλές τιμές pH στο κιτρικό οξύ του χυμού λεμονιού που περιείχε. Η δάφνη και το δεντρολίβανο ενδεχομένως να συνέβαλαν στην αντιμικροβιακή δράση της μαρινάδας αφού η αποτελεσματικότητα των καρυκευμάτων αυτών αλλά και των αιθέριων ελαίων τους έναντι των μικροοργανισμών έχει μελετηθεί στο παρελθόν (Seydim & Sarikus, 2006; Jiang et al., 2011).

Η μαρινάδα με βάση το πορτοκάλι παρόλο που επίσης παρουσίασε χαμηλό pH εξαιτίας του κιτρικού οξέος που περιείχε δεν κατάφερε να μειώσει τους πληθυσμούς των μικροοργανισμών. Αυτό ίσως να οφείλεται και στη σύσταση της μαρινάδας αφού το ελαιόλαδο που περιείχε πιθανόν λειτούργησε προστατευτικά για τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Στην περίπτωση της μαρινάδας με βάση τη μύρα ενδεχομένως η συγκέντρωση αιθανόλης να μην ήταν αρκετή ώστε να επηρεάσει την επιβίωση των μικροοργανισμών. Επίσης η συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες ίσως επέτεινε την εξάτμιση της αιθυλικής αλκοόλης.

Η εμφάνιση των εμβολιασμένων δειγμάτων σε μαρινάδες δεν είχε σημαντική επίδραση στους πληθυσμούς των τριών παθογόνων.

Η δράση των μαρινάδων στο κρέας όπως έχουν δείξει και προηγούμενες μελέτες (Calicioglu, Sofos, Samelis, Kendall, & Smith, 2002; Mukherjee et al., 2008; Yoon, Calicioglu, Kendall, Smith, & Sofos, 2005; Yoon et al., 2009) δεν είναι το ίδιο ισχυρή με την αντιμικροβιακή δράση που παρουσιάζουν τα διαλύματα μαρινάδας. Παρόλα αυτά η μαρινάδα με βάση το κρασί και κυρίως αυτή η οποία είχε ως βάση το λεμόνι διατήρησαν ένα σχετικά χαμηλό pH ακόμη και μετά την αλληλεπίδραση τους με το κρέας και έτσι έδρασαν σε μικρό βαθμό και από μόνες τους αλλά και συνεργιστικά με τα άλλα εμπόδια (εδώδιμη μεμβράνη με αιθέριο έλαιο ρίγανης και ψήσιμο).

Η ενσωμάτωση αιθέριου ελαίου ρίγανης 1% σε εδώδιμη μεμβράνη αλγινικού νατρίου οδήγησε σε μείωση των πληθυσμών και των τριών παθογόνων κατά 1-2 λογάριθμους περίπου. Αντίστοιχες παρατηρήσεις προέκυψαν και από προηγούμενες μελέτες που ασχολήθηκαν με την επίδραση του αιθέριου ελαίου σε παθογόνους μικροοργανισμούς (Gill, 1986; Skandamis and Nychas, 2002; Burt, 2004; Koutsoumanis et al., 2004; Chouliara et al., 2007; Gutierrez et al., 2009; Benavides et al, 2012, Seydim & Sarikus, 2006) ενώ όπως παρατηρήθηκε και σε άλλες μελέτες (Benavides et al, 2012) η εφαρμογή απλής εδώδιμης μεμβράνης δεν είχε καμία επίδραση στους πληθυσμούς των μικροοργανισμών. διασφαλίζεται η υγιεινή του χοιρινού κρέατος σύμφωνα με τις προδιαγραφές ψησίματος που έχει ορίσει το Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α. αλλά και η Ευρωπαϊκή Επιτροπή.

Η θερμική επεξεργασία όπως αναμένονταν μείωσε τους πληθυσμούς των παθογόνων κατά 2-4 log. Αν αναλογιστούμε ότι οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα ήταν της τάξεως των 6-7 λογαρίθμων εξάγεται το συμπέρασμα ότι το ψήσιμο στη συγκεκριμένη θερμοκρασία δε στάθηκε ικανό να προκαλέσει θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο συνδυασμός όλων των παραπάνω μεταχειρίσεων φάνηκε αποδοτικός στην επιπλέον μείωση του μικροβιακού πληθυσμού κατά το ψήσιμο αφού η εδώδιμη μεμβράνη με το αιθέριο έλαιο ρίγανης καθώς και τα διαλύματα των μαρινάδων – ιδιαίτερος τα περισσότερο όξινα- ακόμα κι αν δεν κατάφεραν να σκοτώσουν σημαντικό αριθμό κυττάρων το καθένα ξεχωριστά, ο συνδυασμός τους οδήγησε σε σημαντικές μειώσεις. Αυτό πιθανόν εξηγείται απ' το γεγονός ότι οι μεταχειρίσεις παρόλο που μεμονωμένα δεν προκαλούσαν σημαντικές μειώσεις στους παθογόνους ωστόσο ίσως οι αντιμικροβιακοί παράγοντες που περιείχαν τραυμάτιζαν ή

εξασθενούσαν τα κύτταρα των μικροοργανισμών καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα στα επόμενα εμπόδια που καλούνταν να αντιμετωπίσουν (λ.χ. ψήσιμο). Άλλωστε αυτό έχουν δείξει και μελέτες που έχουν λάβει χώρα τα προηγούμενα έτη (Mukherjee et al., 2008; Yoon et al., 2009 Calicioglu, Sofos, Samelis, Kendall, & Smith, 2002; Mukherjee et al., 2008; Yoon, Calicioglu, Kendall, Smith, & Sofos, 2005).

Η διαφοροποίηση που παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί στην επιβίωση τους μετά την εφαρμογή ίδιων μεταχειρίσεων δεν ήταν ιδιαίτερα σημαντική. Εντούτοις, με μικρή διαφορά πιο ανθεκτικό στη δράση των μαρινάδων βρέθηκε να είναι το *E. coli* O157:H7 αφού συγκριτικά με τους άλλους δύο μικροοργανισμούς έδωσε τις μικρότερες μειώσεις ενώ φάνηκε να είναι και το περισσότερο θερμοανθεκτικό γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με όσα αναφέρει η βιβλιογραφία που παρουσιάζεται ως το λιγότερο θερμοάντοχο σε σύγκριση με *Salmonella* και *Listeria monocytogenes* (Doyle and Schoeni, 1984; Line et al., 1991; Orta-Ramirez et al., 1997)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aymerich, T., Picuet, P.A., Monfort, J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science* 78, 114-129.
2. Bacon, R. T., & Sofos, J. N. (2003). Food hazards: biological food; characteristics of biological hazards in foods. *Food Safety Handbook*. 04-712-10641 157–195.
3. Belloso, O., Pan, Z., McHugh, T.H., 2007. Effects of plant essential oils and oils compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering* 81, 634–641
4. Benavides, S., Villalobos-Carvajal, R., Reyes, J.E. (2012). Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. *Journal of Food Engineering* 110, 232-239.
5. Borch, E., Arinder, P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science* 62, 381-390.
6. Botsoglou, N.A., Govaris, A., Botsoglou, E.N., Grigoropoulou, S., Papageorgiou, G., 2003. Antioxidant activity of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation in long-term frozen stored turkey meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003 (51), 2930–2936.
7. Bunning, V.K., Crawford, R.G., Tierney, J.T. and Peeler, J.T. 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3216-3219.
8. Burt, S.A., Fledderman, M.J., Haagsman, H.P., van Knapen, F., Veldhuizen, E.J.A., 2007. Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by carvacrol vapour. *International Journal of Food Microbiology* 119, 346–350.
9. Byrne C. M., Bolton D. J., Sheridan J. J., Blair I. S., McDowell D. A. (2002), The effect of commercial production and product formulation stresses on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 (NCTC 12900) in beef burgers, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 183 – 192.
10. Calicioglu, M., Sofos, J.N., Kendall, P.A. (2003). Influence of marinades on survival during storage of acid-adapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* inoculated post-drying on beef jerky. *International Journal of Food Microbiology* 86, 283-292.
11. Chang J. – M., Fang T. J. (2007), Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and the antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7, *Food Microbiology*, 24, 745 – 751.

12. Chawla, S.P., Chander, R. (2004). Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. *Food Control* 15, 559-563.
13. Choi, Y.M., Bae, Y.Y., Kim, K.H., Kim, B.C., Rhee, M.S. (2009). Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *E. coli* O157:H7 in marinades and marinated pork. *Meat Science* 82, 419-424.
14. Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology* 24, 607-617.
15. Coma, V., Sebti, I., Pardon, P., Deschamps, A., Pichavant, F.H., 2001. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 64, 470–475.
16. Dadalioglu, I., & Evrendilek, G. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandulastoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 8255–8260
17. Del Nobile, M.A., Conte, A., Incoronato, A.L., Panza, O., 2008. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *Journal of Food Engineering* 89, 57–63.
18. Dontorou A., Papadopoulou C., Filioussis G., Apostolou I., Economou V., Kansouzidou A., Levidiotou S. (2004), Isolation of a rare *Escherichia coli* O157:H7 strain from farm animals in Greece, *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 27, 201 – 207.
19. Doyle, M. P., & Erickson, M. C. (2006). Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science*, 74, 98–112.
20. Emiroglu, Z.K., Yemis, P.G., Coskun, B.K., Cantogan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science* 86, 283-288.
21. Eribo B., Ashenafi M. (2003), Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in tomato and processed tomato products, *Food Research International*, 36, 823 – 830.
22. Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 5294–5299.
23. Falguera, V., Quintero, J.P., Jimenez, A., Munoz, J.A., Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology* 22, 292-303.

24. Farber J.M., Daley, E. (1994). Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. *Journal of Food Microbiology* 22, 33-42.
25. Farber, J.M. and Brown, B.E. 1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1584-1587.
26. Fernández, K., Aspe, E., & Roeckel, M. (2009). Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. *Food Control*, 20, 1036–1042.
27. Garriga, M., Aymerich, M. T., Costa, S., Monfort, J. M., & Hugas, M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology*, 19, 509–518.
28. Gill, C.O., Moza, L.F., Barbut, S. (2009). Survival of bacteria in less than thorough cooked, brine-injected steaks. *Food Control* 20, 501-507.
29. Gorris LGM (1999) Hurdle technology, a concept for safe, minimal processing of foods. In: Robinson RK, Batt CA and Patel PD (eds) *Encyclopedia of Food Microbiology*, pp. 1071–1076. London: Academic Press.
30. Govaris, A., Botsoglou, E., Sergelidis, D., Chatzopoulou, P. (2011). Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. *LWT Food Science and Technology* 44, 1240-1244.
31. Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A., Chatzopoulou, P.S. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 137, 175-180.
32. Hayakawa, I., Kanno, T., Tomita, M., & Fujio, Y. (1994). Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. *Journal of Food Science*, 59, 159–163.
33. Heddleson, R.A., Doores, S., Anantheswaran, R.C., Kuhn, G.D. and Mast, M.G. 1991. Survival of *Salmonella* species heated by microwave energy in a liquid menstruum containing food components. *J. Food Prot.* 54, 637-642.
34. Helander, I. M., Alokomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., et al. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3590–3595.
35. Hendrickx, M., Maesmans, G., De Cordt, S., Noronha, J., Van Loey, A., and Tobback, P. 1995. Evaluation of the integrated time-temperature effect in thermal processing of foods. *Crit.Rev. Food Sci. Nutr.* 35, 231-262.
36. Holley, R.A., Patel, D., 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273–292.
37. Jenson, I., Sumner, J. (2012). Performance standards and meat safety — Developments and direction. *Meat Science*

38. Jo S. – C., Rim A. - Ram, Park H. – J., Yuk H. – G., Lee S. – C. (2007), Combined treatment with silver ions and organic acid enhances growth - inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Food Control*, 18, 1235 – 1240
39. Juneja, V. K., & Sofos, J. N.. (2001). Control of foodborne microorganisms. 08-247-05734 (pp. 535).
40. Juneja, V.K., Klein, EG. and Marmer, B.S. 1998. Heat shock and thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in a model beef gravy system and ground beef. *J. Appl. Microbiol.* 84, 677-684.
41. Kargiotou, C., Katsanidis, E., Rhoades, J., Kontominas, M., Koutsoumanis, K. (2011). Efficacies of soy sauce and wine base marinades for controlling spoilage of raw beef. *Food Microbiology* 28, 158-163.
42. Koutsoumanis, K. P., Geornaras, I., & Sofos, J. N. (2006). Microbiology of land animals. In Y. H. Hui (Ed.). *Handbook of Food Science, Technology and Engineering* (vol. 1). 15-744-45510. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, Chapter 52.1, pp. 52.1–52.43.
43. Kuk-Hwan Seol , Dong-Gyun Lim, Aera Jang, Cheorun Jo, Mooha Lee (2009). Antimicrobial effect of κ -carrageenan-based edible film containing ovotransferrin in fresh chicken breast stored at 5 °C. *Meat Science* 83, 479-483.
44. Lee, H., Soo Noh, B., Min, S.C. (2012). *Listeria monocytogenes* inhibition by defatted mustard meal-based edible films. *International Journal of Food Microbiology* 153, 99-105.
45. Leistner L (2000b) Use of combined preservative factors in foods of developing countries. In: Lund BM, Baird-Parker TC and Gould GW (eds) *The Microbiological Safety and Quality of Food*, vol. I, pp. 294–314.
46. Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181-186.
47. Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 181–186.
48. Leistner, L., & Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, 6, 41–46.
49. Leistner, L., & Gould, G. (2002). *Hurdle Technologies*. New York, NY:Academic / Plenum Publishers, 194 p.
50. López, P., Sánchez, C., Batle, R., Nerín, C., 2007. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8814–8824.
51. Lunde, K., Egelanddal, B., Choinski, J., Mielnik, M., Flatten, A, Kubberod, E. (2008). Marinating as a technology to shift sensory thresholds in ready-to-eat entire male pork meat. *Meat Science* 80, 1264-1272
52. Medina M. B. (2001), Binding of collagen I to *Escherichia coli* O157:H7 and inhibition by carrageenans, *International Journal of Food Microbiology*, 69, 199 – 208.

53. Michiels, C., Hauben, K., Versyck, K., & Wuytack, E. (1995). Sensitization of *Escherichia coli* to nisin and lysozyme by high hydrostatic pressure, EDTA and chitosan. *Journal of Food Protection*, 58, 32.
54. Mitrakas G.E., Koutsoumanis, K.P., Lazarides, H.N. (2008). Impact of edible coating with or without anti-microbial agent on microbial growth during osmotic dehydration and refrigerated storage of a model plant material. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 550-555.
55. Mogollon, M.A., Marks, B.P., Booren, A.M., Orta-Ramirez, A., Ryser, E. (2009). Effect of Beef Product Physical Structure on Salmonella Thermal Inactivation. *Journal of Food Science* 74 Nr 7
56. Murphy, R.Y., Marks B.P., Johnson, E.R., Johnson, M.G. (2000). Thermal Inactivation Kinetics of Salmonella and Listeria in Ground Chicken Breast Meat and Liquid Medium. *Journal of Food Science* 65, No 4.
57. Orta-Ramirez, A. (2002). Thermal inactivation of pathogens and verification of adequate cooking in meat and poultry products. *Advances in Food and Nutrition Research* 44.
58. Orta-Ramirez, A., Marks, B.P, Warsow, C., Booren, A., Ryser, E. (2005). Enhanced Thermal Resistance of Salmonella in Whole Muscle Compared to Ground Beef. *Journal of Food Science* 70 Nr. 7.
59. Ozkan, G., Sagdic, O., Ozcan, M., 2003. Inhibition of pathogenic bacteria by essential oils at different concentrations. *Food Science and Technology International* 9, 85–88.
60. Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowiez, H., et al. (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 11, 33–37.
61. Pathania, A., McKee, S.R., Bilgili, S.F., Singh, M. (2010). Antimicrobial activity of commercial marinades against multiple strains of *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology* 139, 214-217.
62. Pflug, I.J. 1997. Evaluating a ground-beef patty cooking process using the general method of process calculation. *J. Food Prot.* 60, 1215-1223.
63. Pranoto, Y., Salokhe, V.M., Racksit, S.K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International* 38, 267-272.
64. Quintavalla, S. , Vicini, L. (2002). Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62, 373-380.
65. Qvist, S., Sehested, K., Zeuthen, P. (1994). Growth suppression of *Listeria monocytogenes* in a meat product. *International Journal of Food Microbiology* 24, 283-293.
66. Rinaldi, M., Chiavaro, E., Massini, R. (2012). Real-time estimation of slowest heating point temperature and residual cooking time by coupling multipoint temperature measurement and mathematical modelling: Application to meat cooking automation. *Food Control*, 23, 412-418.
67. Rinaldi, M., Tiozzo, B., Capozza, D., Ravarotto, L. (2012). Are you cooking your meat enough? The efficacy of the Theory of Planned Behavior

- inpredicting a best practice to prevent salmonellosis. *Food Research International* 45, 1175-1183.
68. Rojas-Graü, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, O.R., Martín-
 69. Ross, A. I. V., Griffiths, M. W., Mittal, G. S., & Deeth, H. C. (2003). Combining non-thermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 125–138.
 70. Samelis, J., Sofos, J.N., (2003a). Strategies to control stress-adapted pathogens and provide safe foods. In *Microbial Adaptation to Stress and Safety of New-Generation Foods*. A.E. Yousef & V.K. Juneja (Eds.) CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. ISBN 1-56676-912-4. pp. 303–351.
 71. Seydim, A.C., Sarikus G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* 39, 639-644.
 72. Shen, C., Geornaras, I., Kendall, P., Sofos, J. (2009). Antilisterial activities of salad dressings, without or with prior microwave oven heating, on frankfurters during simulated home storage. *International Journal of Food Microbiology* 132, 9-13.
 73. Singh, R.E and Heldman, D.R. 1993. "Introduction to Food Engineering", 2nd edn. Academic Press Inc. New York, NY.
 74. Skandamis, P.N., & Nychas, G.-J.E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. In: *International Journal of Food Microbiology*. 79(1-2):35-45.
 75. Sofos, J.N. (2008). Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science* 78, 3-13.
 76. Sofos, J.N., (2004a). Pathogens in animal products: major biological hazards. In *Encyclopedia of Animal Science*, W. Pond & A. Bell, (Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, NY. pp. 698–700.
 77. Stewart, C. M., Dunne, C. P., Sikes, A., & Hoover, D. G. (2000). Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA 3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 49–56.
 78. Stopforth J. D., Ikeda J. S., Kendall P. A., Sofos J. N. (2004), Survival of acid-adapted or nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds and surrounding tissue following chemical treatments and storage, *International Journal of Food Microbiology*, 90, 51 – 61.
 79. Su X. – L., Li Y. (2004), A self - assembled monolayer - based piezoelectric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 563 – 574.
 80. Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science Technology*, 14, 71–78.
 81. Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection*, 65, 709–725.

82. Velasquez, A., Breslin, T.J., Marks, B.P., Orta-Ramirez, A.(2010). Enhanced Thermal Resistance of Salmonella in Marinated Whole Muscle Compared with Ground Pork. *Journal of Food Protection* 73, 372-375.
83. Weng, Y. M., & Hotchkiss, J. H. (1992). Inhibition of surface molds of cheese by polyethylene containing the antimycotic imazalil. *Journal of Food Protection*, 55, 367–369.
84. Wiegand, K.M., Ingham S.C. (2009). Survival of Escherichia coli O157:H7 in Ground Beef after Sublethal Heat Shock and Subsequent Isothermal Cooking. *Journal of Food Protection* 72, 1727-1731.
85. Yang T. – C., Li C. – F., Chou C. – C. (2007), Cell age, suspending medium and metal ion influence the susceptibility of Escherichia coli O157:H7 to watersoluble maltose chitosan derivative, *International Journal of Food Microbiology*, 113, 258 – 262.
86. Yoon, Y., Mukherjee, A., Geornaras, I., Belk, K., Scanga, J.A., Smith, G, Sofos, J.N. (2011). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 during cooking of non-intact beef treated with tenderization/marination and flavoring ingredients. *Food Control* 22, 1859-1864.
87. Zhou, J.H., Xu, X.L., Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science* 86, 119-128.
88. Zhu A., Gu L., Yu J., Yang J., Zhai X., Dong C., Qian H., Tan Z., Pan H., Liu J., Zhu F., Wang H. (2009), Analysis on the Epidemiological Characteristics of Escherichia coli O157:H7 Infection in Xuzhou, Jiangsu, China, 1999, *Journal of Nanjing Medical University*, 23(1): 20 - 24.