



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ  
ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

---

**ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ  
ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ  
ΘΕΡΜΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ  
*Escherichia coli* O157:H7 ΣΕ ΧΟΙΡΕΙΟ ΚΙΜΑ**

---

**ΚΑΛΟΓΙΑΝΝΑΚΗ Ι. ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

**ΑΘΗΝΑ, 2014**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΚΑΝΔΑΜΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ,  
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Γ.Π.Α.**

## **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Συνδυαστική επίδραση αιθέριου ελαίου ρίγανης και φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών στην επιβίωση και θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε χοίρειο κιμά**

**ΚΑΛΟΓΙΑΝΝΑΚΗ Ι. ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

**Επιβλέπων Καθηγητής:  
Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α. (Επιβλέπων)**

**Γιαννιώτης Σταυριανός, Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Δροσινός Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.**

**Αθήνα, 2014**

“Η παρούσα μελέτη βραβεύτηκε ως η καλύτερη αναρτώμενη εργασία στο 3ο Διεθνές Συνέδριο ISEKI Food που διεξήχθη στις 21-23 Μαΐου του 2014 στην Αθήνα”.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών (ΕΠΕΥΤ) του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά το χρονικό διάστημα 2013-2014.

Φθάνοντας στο τέλος της συγγραφής της παρούσας μελέτης θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη σε όλους εκείνους που στάθηκαν αρωγοί στο να ξεπεράσω όλες τις δυσκολίες και να φέρω εις πέρας την ερευνητική διατριβή.

Πρώτο από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα αυτής της μελέτης Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, κυρίως για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση της εν λόγω εργασίας, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγησή του, την μεγάλη υπομονή του και τις άρτιες επιστημονικές γνώσεις που μου παρείχε τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων, όσο και κατά το στάδιο εκπόνησης της μελέτης.

Ακόμη, είμαι ευγνώμων στα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δροσινό Ελευθέριο και τον Καθηγητή κ. Γιαννιώτη Σταυριανό για τη συμμετοχή τους και το χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση, διόρθωση και εξέταση της μελέτης.

Ακόμη, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς οφείλω στον μεταδιδάκτορα και υπεύθυνο μου Μανιό Σταύρο για τις χρήσιμες και εύστοχες επισημάνσεις του και την καθοδήγηση του που ήταν καταλυτική για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Οι συμβουλές του, η επιμονή και η υπομονή του, η πολύπλευρη βοήθειά του και οι επιστημονικές του γνώσεις υπήρξαν πολύτιμες για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω την έκφραση θερμών ευχαριστιών σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας και τη δημιουργία ενός ευχάριστου περιβάλλοντος στον εργαστηριακό χώρο. Η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης θα ήταν αδύνατη χωρίς τη συμβολή τους, την συνεισφορά και την προθυμία τους κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής των πειραματικών διαδικασιών και ολοκλήρωσης της μεταπτυχιακής μελέτης. Ειδικότερα, επιθυμώ να εκφράσω ειλικρινείς ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη στη συνάδελφο μου Μπικούλη Βασιλική για το ενδιαφέρον, τις συμβουλές και την υποστήριξή της, την αμέριστη προσφορά της και το κουράγιο που μου έδινε όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ επιπλέον θερμά τον Δούλτσο Δημήτριο για τη συνεργασία, την ενεργό συμμετοχή του και τη γενικότερη καθοδήγησή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις συναδέλφους, συμφοιτήτριες και φίλες Πατεράκη Γεωργία-Λητώ, Σκαμπαρδώνη Λαμπρινή και Διαμαντή Λαμπρινή

για την σημαντική βοήθεια, κατανόηση και την ηθική συμπαράσταση και στήριξή τους κατά τη διάρκεια της προσπάθειάς μου.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου θα ήθελα να απευθύνω στους πιο σημαντικούς ανθρώπους της ζωής μου, τους γονείς μου, την αδερφή μου Ελένη και τον Γιώργο, οι οποίοι μου έδειξαν συνεχή συμπαράσταση, αγάπη και κατανόηση όλων αυτών τον καιρό και στήριξαν τις σπουδές μου και τις ευρύτερες επιλογές στη ζωή μου με κάθε τρόπο. Η μεταπτυχιακή διατριβή αφιερώνεται στην οικογένειά μου σαν ελάχιστη αναγνώριση των θυσιών και των παραχωρήσεων τους.

Η παρουσία όλων υπήρξε ανεκτίμητη.

Καλογιαννάκη Καλλιόπη

Αθήνα, 2014

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	9
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	13
1.1 Ο μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i> .....	13
1.1.1 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού E. coli .....	15
1.1.2 Ο ορότυπος E. coli O157:H7 .....	15
1.1.3 Προέλευση του E. coli και το Ιστορικό της Νόσου που προκαλεί .....	16
1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση του E. coli O157:H7 .....	19
1.1.5 Συσχετισμός με τα τρόφιμα .....	20
1.2 Θερμική Επεξεργασία.....	20
1.2.1 Κινητική Θερμικής Απενεργοποίησης.....	23
1.2.3 Μελέτες θερμικής αδρανοποίησης.....	25
1.2.3.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>E. coli</i> O157:H7 στο κρέας.....	26
1.2.4 Διαδικασία επαλήθευσης / επικύρωσης .....	29
1.3 Αιθέρια Έλαια – Γενικά.....	29
1.3.1 Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης.....	31
1.3.2 Μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων .....	32
1.3.3 Ευαισθησία των gram-αρνητικών και των gram-θετικών οργανισμών.....	34
1.3.4 Νομοθετικά στοιχεία για τη χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα .....	35
1.3.5 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey).....	36
1.4 Βακτηριοσίνες - Γενικά.....	36
1.4.1 Νισίνη .....	38
1.4.2 Νισίνη και Gram αρνητικά βακτήρια .....	39
1.4.3 Χρήση νισίνης σε κρεατοσκευάσματα και άλλα τρόφιμα .....	40
1.4.4 Νομοθετικά στοιχεία για τη χρήση της νισίνης στα τρόφιμα.....	41
1.5 Λυσοζύμη .....	41
1.5.1 Μηχανισμός δράσης Λυσοζύμης .....	43
1.5.2 Λυσοζύμη και Gram-αρνητικά βακτήρια .....	44
1.6 Χοιρινός κιμάς .....	45
1.7 Συσσκευασία .....	45
1.7.1 Συσσκευασία υπό κενό.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	47

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
2.1 Μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i> 0157:H7.....	47
2.2 Φυσικές Αντιμικροβιακές Ουσίες .....	47
2.3 Θρεπτικά Υποστρώματα.....	47
2.4 Ανόργανα χημικά αντιδραστήρια .....	48
2.5 Πειραματικός σχεδιασμός.....	48
2.5.1 Ανανέωση του μικροοργανισμού – Προετοιμασία εμβολίου .....	51
2.5.2 Παρασκευή Δειγμάτων.....	52
2.5.3 Θερμική επεξεργασία χοιρινών μπιφτεκιών.....	53
2.5.4 Δειγματοληψία - Ομογενοποίηση δείγματος .....	53
2.5.5 Διαδοχικές αραιώσεις .....	54
2.5.6 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων.....	54
2.5.7 Επώαση θρεπτικών υποστρωμάτων .....	56
2.5.8 Μέτρηση pH .....	56
2.5.9 Αρίθμηση αποικιών.....	56
2.5.10 Δοκιμασία ινδόλης .....	57
2.5.11 Υπολογισμός D- & Z-value.....	57
2.6 Προπειράματα.....	58
2.6.1 1 <sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός.....	58
2.6.2 2 <sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός.....	59
2.6.3 3 <sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός.....	60
2.6.4 4 <sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....	61
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
3.1 Επίδραση των Αντιμικροβιακών Ουσιών Κατά την Συντήρηση.....	62
3.2 Επιβίωση του Παθογόνου Μικροοργανισμού Μετά τη Θερμική Επεξεργασία .....	67
3.2.1 Θερμοκρασία 60 °C .....	67
3.2.2 Θερμοκρασία 64 °C .....	75
3.2.3 Θερμοκρασία 68 °C .....	82
3.2.4 Θερμοκρασία 71 °C .....	89
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....	98
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....	98
4.1 Επίδραση των Αντιμικροβιακών Ουσιών Κατά τη Συντήρηση.....	98
4.2 Επιβίωση του Παθογόνου Μικροοργανισμού Μετά τη Θερμική Επεξεργασία .....	99

4.2.1 Θερμοκρασία 60 °C .....	99
4.2.3 Θερμοκρασία 68 °C .....	101
4.2.4 Θερμοκρασία 71 °C .....	103
4.3 D-values και Shoulder length (Sl) .....	106
4.4 Επίδραση των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών στις τιμές z-value .....	119
4.5 pH .....	122
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	124
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	126
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ.....	142
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	157



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης ήταν να διερευνηθεί και να εκτιμηθεί η επίδραση τριών διαφορετικών φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών: της νισίνης, της λυσοζύμης και του αιθέριου ελαίου ρίγανης, μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς (i) την επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* 157:H7 κατά τη συντήρηση υπό ψύξη χοίρειου κιμά, καθώς και (ii) την επακόλουθη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου κατά τη θερμική επεξεργασία του κιμά.

Πιο αναλυτικά, δείγματα χοίρειου κιμά των 10 g, παρασκευάστηκαν ως εξής: (i) Μάρτυρας (χωρίς αντιμικροβιακές ουσίες), (ii). 0,1%, 0,3% και 0,5% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης, (iii). Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης, (iv). Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης, (v). Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης, και (vi). Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης. Αφού παρασκευάστηκαν, ενοφθαλμίστηκαν με 6-6,5 log CFU/g μίγμα τριών στελεχών *Escherichia coli* O157:H7, διαμορφώθηκαν σε λεπτά μπιφτέκια 3 mm, συσκευάστηκαν σε κενό και συντηρήθηκαν στους 5 °C για 12 ημέρες (το οποίο αποτελεί το σημείο οργανοληπτικής απόρριψης). Όλες οι μεταχειρίσεις εκτέθηκαν σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης στις θερμοκρασίες 60, 64, 68 και 71 °C με χρήση υδατόλουτρου κατά τη 0η και 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης με στόχο τον προσδιορισμό του χρόνου θερμικής θανάτωσης (D-value) του παθογόνου μικροοργανισμού.

Κατά τη συντήρηση στους 5 °C, όλα τα αντιμικροβιακά σε συνδυασμούς δεν εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση κατά του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 για 0 και 12 ημέρες. Αντίθετα, με τη χρήση υψηλής θερμοκρασίας στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με μίγμα αντιμικροβιακών, ο μικροοργανισμός παρουσίασε μικρότερη θερμοανθεκτικότητα, συγκριτικά με τον μάρτυρα. Ακόμη, η προσθήκη 0,5% αιθέριου ελαίου ρίγανης κατέστησε τον παθογόνο λιγότερο ανθεκτικό στην επίδραση της θέρμανσης. Τέλος, η τιμή D-value των δειγμάτων με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης ήταν μεγαλύτερη από την τιμή D-value των δειγμάτων περιείχαν συνδυασμό αντιμικροβιακών.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli* 157:H7, θερμοανθεκτικότητα, αιθέριο έλαιο ρίγανης, νισίνη, λυσοζύμη, χοιρινός κιμάς.

## ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the impact of three different antimicrobials: nisin, lysozyme and oregano essential oil, singly or in combinations, on (i) the survival of *Escherichia coli* O157:H7 during refrigerated storage of ground pork and (ii) the subsequent thermotolerance of the pathogen during thermal processing of ground pork.

Samples of ground pork (10g) were prepared as follows: (i) no antimicrobials (control), (ii) 0.1%, 0.2% v/w and 0,5% oregano essential oil, (iii) nisin (500, 1500 and 5000 IU/g) + 0.1% oregano essential oil, (iv) nisin (500, 1500 and 5000 IU/g) + 0.3% oregano essential oil, (v) lysozyme (500, 1500 and 5000 IU/g) + 0.1% oregano essential oil and (vi) lysozyme (500, 1500 and 5000 IU/g) + 0.3% oregano essential oil. All samples were inoculated (6-6,5 log CFU/g) with a 3-strain composite of *Escherichia coli* O157:H7, shaped in thin (3 mm) pork patties, vacuum packed and stored at 5 °C for 12 days (organoleptic rejection point). At day 0, 6 and 12, control samples and samples with mixture of antimicrobials were heat treated at 64 °C in a water bath, in order to calculate the D-values of the pathogen. All treatments were exposed to heat stress conditions at temperatures of 60, 64, 68 and 71 °C using water bath during 0 or 12 day of storage, in order to determine the decimal reduction time (D-value) of the pathogen.

All antimicrobial combinations showed no antimicrobial activity against the bacterium *E. coli* O157: H7 during 0 and 12 days under storage conditions at 5 °C. However, by using high temperatures in samples prepared with antimicrobial mixture, the microorganism demonstrated less thermotolerance, compared with the control samples. Furthermore, the addition of 0.5% of oregano essential oil made the pathogen less resistant to the effect of heating. Finally, samples of 0.1% and 0.3% oregano essential oil showed higher D-value of the samples contained antimicrobial combination.

Key words: *Escherichia coli* 157:H7, thermotolerance, oregano essential oil, nisin, lysozyme, ground pork

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ασφάλεια και η υγιεινή τροφίμων μας αφορά όλους καθώς καταναλώνουμε συνεχώς τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως κρέας, αυγά, αλιεύματα. Η ασφάλεια των τροφίμων έχει καταστεί το κλειδί, όχι μόνο όσον αφορά τη δημόσια υγεία, αλλά επίσης την ικανοποιητική λειτουργία της αγοράς και της κοινωνίας σαν σύνολο. Σε ένα ανοικτό και παγκοσμιοποιημένο περιβάλλον, η κοινοτική και η εθνική δράση είναι απαραίτητη ώστε να διασφαλίζεται ότι, τα προϊόντα που καταναλώνει κάθε πολίτης, είναι ασφαλή. Σε κάθε μέρος του κόσμου, είναι υποχρεωτικό οι άνθρωποι να δίνουν μια συνεχή μάχη ενάντια στην επιμόλυνση των τροφίμων και των τροφιμογενών ασθενειών, γιατί τα προβλήματα ασφάλειας τροφίμων μαστίζουν την ανθρωπότητα κατά τον 21ο αιώνα, καθώς διάφορες αλλαγές παγκοσμίως συνεχίζουν να επηρεάζουν αρνητικά την ασφάλεια των τροφίμων.

Η επιμόλυνση του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων του με παθογόνα βακτήρια όπως *Escherichia coli* O157:H7, μπορεί να οδηγήσει τόσο σε απώλεια ποιότητας, όσο και σε κίνδυνο της υγείας των καταναλωτών. Επίσης, οι καταναλωτές εμφανίζονται πιο προσεκτικοί και πιο συγκρατημένοι στη χρήση πρόσθετων υλών, οι οποίες διατηρούν και ενισχύουν τα χαρακτηριστικά των τροφίμων. Τα αιθέρια έλαια των βοτάνων που φύονται στην Ελλάδα, όπως η ρίγανη έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση και αποτελούν μια εναλλακτική λύση για τη μείωση των χημικών συντηρητικών, καθώς και για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του προϊόντων με βάση το κρέας στην ψύξη.

Η συγκεκριμένη μελέτη διερευνά τη συνδυαστική επίδραση διαφορετικών φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών ως εναλλακτικών των χημικών συντηρητικών στη μείωση της θερμοανθεκτικότητας του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7, μετά από συντήρηση σε χοιρινό κιμά. Ένα δεύτερο στοιχείο είναι η προσπάθεια βελτιστοποίησης της εφαρμογής ενός συμβατού με τον κιμά αντιμικροβιακού συστατικού όπως το αιθέριο έλαιο ρίγανης, το οποίο, αν και φυσικό, έχει έντονο αρωματικό χαρακτήρα και δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στην επίλυση του προβλήματος μέσω συνδυασμού του αιθέριου ελαίου με άλλα επίσης φυσικά συντηρητικά.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli*

Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* είχε συγκεντρώσει όλο το επιστημονικό ενδιαφέρον σε τέτοιο βαθμό ώστε σήμερα θεωρείται πιθανότατα ο πιο μελετημένος μικροοργανισμός. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1885 από δείγμα παιδικών περιττωμάτων και περιγράφηκε από τον γερμανό βακτηριολόγο Theodor Escherich. Αν και αποτελεί μόνο ένα πολύ μικρό μέρος της συνολικής μικροχλωρίδας, είναι ο κυρίαρχος προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός και το έντερο του ανθρώπου και άλλων θερμόαιμων ζώων αποτελεί σχεδόν τη μόνιμή του κατοικία. Παρά το γεγονός ότι ως συμβιώτης είναι γενικά αβλαβής, μπορεί να είναι ένα καιροσκοπικό παθογόνο προκαλώντας διάφορες μολύνσεις όπως Gram-αρνητική σηψαιμία, μολύνσεις μέρους της ουροδόχου κύστεως, πνευμονία σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς καθώς και μηνιγγίτιδα στα νεογνά, δυσεντερία και λοιμώξεις στα νεφρά. Ορισμένες από τις ασθένειες αυτές μπορεί να οδηγήσουν σε θάνατο (Blackburn & McClure, 2002). Το ότι ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσης και πιθανής παρουσίας εντερικών παθογόνων όπως το βακτήριο *Salmonella typhi* στο νερό, προέκυψε από το γεγονός ότι είναι γνωστό το φαινόμενο της παρουσίας του στα περιττώματα, ο γενικά μη παθογενής χαρακτήρας του και τα χαρακτηριστικά επιβίωσής του στο νερό. Αυτή η χρήση έχει μεταφερθεί στα τρόφιμα όπου μεγαλύτερη προσοχή απαιτείται στην ερμηνεία της σημασίας των θετικών αποτελεσμάτων (Adams & Moss, 2007, Jay, 2000).

Στην Αγγλία στις αρχές του 1940, στελέχη *E.coli* αναγνωρίστηκαν αρχικά ως αιτία της γαστρεντερίτιδας στα βρέφη. Μέχρι το 1982, τα στελέχη που ευθύνονταν για τη διάρροια ταξινομήθηκαν σε τρεις τύπους βασισμένους στη λοιμογόνο ικανότητά τους και είναι τα εξής στελέχη (Adams & Moss, 2007, Jay, 2000):

1. Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (enteropathogenic *E.coli* - EPEC),
2. Εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (enterohemorrhagic *E.coli* - EHEC)
3. Εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E. coli* (enteroinvasive *E.coli* – EIEC) και

#### 4. Εντεροτοξικογόνα στελέχη *E. coli* (enterotoxigenic *E. Coli* – ETEC).

Αποτελούν σίγουρα σημαντική αιτία της παιδικής διάρροιας στις λιγότερο αναπτυγμένες χώρες, παρόλο που δεν είναι από τις πολύ κοινές αιτίες τροφιμογενούς ασθένειας στις αναπτυγμένες χώρες. Τα εντεροτοξικογόνα στελέχη *E. coli* ETEC συχνά συνδέονται με την αποκαλούμενη διάρροια του ταξιδιώτη. Επιπλέον από το 1982, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC) και ιδιαίτερα ο ορότυπος 0157:H7 έχει αναγνωριστεί ως αίτιο επιδημιολογικών εξάρσεων αιμορραγικής κολίτιδας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (Haemolytic Uremic Syndrome – HUS), ιδιαίτερα στη Βόρεια Αμερική, όπου προκαλείται από τρόφιμα όπως ο μη επαρκώς ψημένος κιμάς, το νωπό γάλα και οι φρέσκοι χυμοί. Στον Καναδά μεταξύ του 1982 και του 1986 αναφέρθηκε μια εκθετική άνοδος των κρουσμάτων του ορότυπου 0157:H7 και μια σχετική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο μεταξύ 1985 και 1988 έδειξε ότι η αύξηση αυτή αποτελούσε πραγματικό γεγονός και εκεί (118 στην Αγγλία και την Ουαλία και 86 στη Σκωτία). Στο Ηνωμένο Βασίλειο έως το 1997 ο αριθμός των κρουσμάτων συνέχισε να αυξάνεται και έκτοτε κυμαίνεται μεταξύ 600 έως 1000 κρουσμάτων το χρόνο (Adams & Moss, 2007 & Jay, 2000).

Υπάρχουν ακόμη δύο τύποι του βακτηρίου *E. coli* που αναγνωρίστηκαν ως διαρροϊκές αιτίες πρωτίστως στα παιδιά και δρουν μέσω προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Η εμφάνιση αυτών των παθότυπων του *E. coli* απεικονίζει με μεγάλη άνεση την *ευπλαστικότητα* του γονιδιώματος του μικροοργανισμού. Η απόκτηση, η απώλεια ή η αναδιοργάνωση των γενετικών στοιχείων εισάγουν νέα χαρακτηριστικά παθογένειας και λοιμογόνου ικανότητας (Adams & Moss, 2007, Jay, 2000). Η ασθένεια που προκαλεί μπορεί να κυμανθεί από μια μη-αιμορραγική διάρροια, μέσω της αιμορραγικής κολίτιδας, έως το απειλητικό για τη ζωή αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) και τη θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση (Thrombotic Thrombocytopenic Purpura - TTP). Εμφανίζεται πολύ συχνά σε παιδιά στη δυτική Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική όπου εκεί είναι η κύρια αιτία της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας. Περίπου 10% των παιδιών κάτω από 10 ετών που μολύνθηκαν με *E. coli* O157 τείνουν να εμφανίσουν HUS και το 50% εξ αυτών θα χρειαστούν αιμοκάθαρση, ενώ το ποσοστό θνησιμότητας ανέρχεται γενικά στο 3-5%. Στο Λονδίνο μεταξύ 1980 – 1986, από τα

70 κρούσματα που παρουσιάστηκαν, το ποσοστό μοιραίων περιστατικών ήταν 6-13% σε άτομα που εμφάνιζαν μακροχρόνια νεφρική βλάβη. Σ' έναν οίκο ευγηρίας στη Β. Αμερική, το ποσοστό θνητότητας εκ συνόλου 55 ασθενών ήταν 31%.

### **1.1.1 Χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού *E. coli***

#### Ανατομία και Φυσιολογία του *E.coli*

Ο μικροοργανισμός *E. coli* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και είναι ένα Gram-αρνητικό, προεραϊτικά αναερόβιο, σποριογόνο βακτήριο. Είναι θετικό στην καταλάση και αρνητικό στο τεστ της οξειδάσης ενώ τα κύτταρά του έχουν μήκος περίπου 2 μm και 0,5 μm διάμετρο και όγκος 0,6-0,7 μm<sup>3</sup> (Kubitschek, 1990) και η κίνησή τους υποβοηθείται από περίτριχα μαστίγια που υπάρχουν γύρω από το σώμα του βακίλλου. Μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε μια πληθώρα υποστρωμάτων, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει γαλακτικό και οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα.

### **1.1.2 Ο ορότυπος *E. coli* O157:H7**

Ο Kauffman τη δεκαετία του '40 δημιούργησε ένα σχέδιο ταξινόμησης ανά ορότυπο για το βακτήριο *E. coli* βασισμένο στο σωματικό λιποπολυσακχαρίτη O και μαστίγιο H. Κατά το σύστημα O:H, οι κύριες οροομάδες καθορίζονται από τα αντιγόνα O και υποδιαιρούνται έπειτα σε ορότυπους βάσει των αντιγόνων H. Οπότε τα διάφορα στελέχη του παθογόνου *E. coli* τείνουν να εμπίπτουν σε κάποιο από τους ορότυπους O:H, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται το έργο ταυτοποίησης και ανίχνευσης των παθογόνων καθώς επίσης και οι διάφορες επιδημιολογικές έρευνες. Ο ορότυπος *E. coli* O157:H7 είναι ο πιο ο πιο κοινά αναφερόμενος και προφανώς προέκυψε λόγω της οριζόντιας μεταφορά γονιδίων από λοιμογόνους παράγοντες (Whitam, 1988).

Έχει προταθεί ότι το *E. coli* O157:H7 εξελίχθηκε από το *E. coli* Ø55:H7, ένα εντεροπαθογόνο στέλεχος του *E. coli* που σχετίζεται από πολύ παλιά με διάρροια σε βρέφη σε όλο τον κόσμο (Whittam et al. 1993; Wachsmuth et al. 1997; Mead and Griffin 1998).

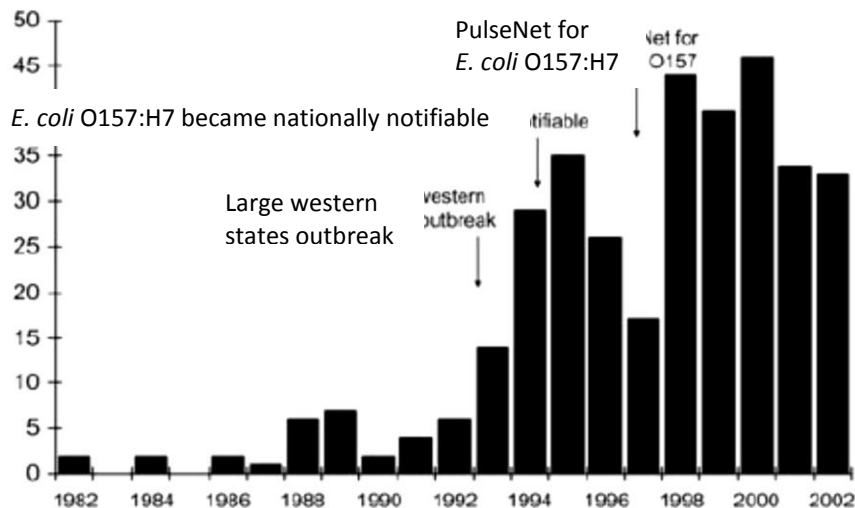
### 1.1.3 Προέλευση του *E. coli* και το Ιστορικό της Νόσου που προκαλεί

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Escherichia coli* O157:H7 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά ως ανθρώπινο παθογόνο βακτήριο μετά από δύο κρούσματα που αφορούσαν τη νόσο του γαστρεντερικού συστήματος και σχετιζόταν με κατανάλωση ελαφρώς μαγειρεμένων μπιφτεκιών σε χάμπουργκερ στις Ηνωμένες Πολιτείες (Riley et al. 1983, Wells et al. 1983).

Το 1978, οι Konowalchuk et al., (1978) ανέφεραν ότι ορισμένα στελέχη του διαρροϊκού παθογόνου *E. coli* παρήγαγαν μια ισχυρή τοξίνη που σκότωσε κύτταρα του νεφρού του αφρικανικού πράσινου πιθήκου (γνωστά και ως κύτταρα Vero) και έτσι ονόμασαν τον κυτταροτοξικό παράγοντα ως Βεροτοξίνη – VT (Verotoxin producing *E. coli* – VTEC). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ανοσολογικές και λειτουργικές ομοιότητες μεταξύ VT και της τοξίνης Shiga που παράγεται από τον μικροοργανισμό *Shigella dysenteriae* (O'Brien και La Veck 1983, O'Brien και Holmes 1987, Neill 1997), και έτσι η βεροτοξίνη VT έγινε επίσης γνωστή ως Shiga-τοξίνη (SLT). Σύμφωνα με τον Strockbine et al. (1986), ο υψηλός βαθμός ομολογίας των δύο τοξινών τις τοποθετεί στην οικογένεια των Shiga τοξινών.

Από το 1982 έως το 2002, 49 κράτη μέλη ανέφεραν 350 κρούσματα, που εκπροσωπούν 3.4.598 περιπτώσεις. Κατά τη διάρκεια αυτών των ετών τα κρούσματα άρχισαν να αυξάνονται από το 1993 και κορυφώθηκαν το 2002 (Πίνακας 1.1). Από τις 3.4.598 περιπτώσεις, όπως αναφέραμε παραπάνω, οι 1.493 (δηλαδή το 17%) εισαγωγή σε νοσοκομεία, οι 354 (4%) αφορούσαν περιπτώσεις με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο και οι 40 (0,5%) ήταν θάνατος. Οι πηγές μόλυνσης για τις 183 περιπτώσεις (δηλαδή το 52%) ήταν τροφιμογενής, για τις 74 (21%) οι αιτίες ήταν άγνωστες, για τις 50 (14%) εξ επαφής, για τις 31 (9%) από νερό, για τις 11 (3%) από επαφή με ζώα, και μία μόνο περίπτωση (0,3%) σχετιζόταν με μόλυνση από εργαστηριακό χώρο. Από τις τροφιμογενής αιτίες οι 75 (41%) αφορούσαν το βόειο κρέας, και οι 38 (21%) φρέσκα λαχανικά (Rangel et al., 2005).





**Εικόνα 1:** Τα κρούσματα από το παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli* O157:H7 κάθε χρόνο από το 1982 έως το 2002.

Το πρώτο κρούσμα από *E. coli* O157:H7 που αναφέρθηκε το 1982 συνδέεται με το βόειο κρέας και το τελευταίο κρούσμα που σχετίζεται με ανεπαρκώς μαγειρεμένο βόειο κρέας τύπου χάμπουργκερ σε εστιατόριο ήταν το 1995. Το μεγαλύτερο ποσοστό κρουσμάτων αφορά αυτό το είδος γρήγορου φαγητού (Rangel et al., 2005). Το πρώτο συμβάν, με 26 περιπτώσεις εκ των οποίων 19 εισήχθησαν στο νοσοκομείο, συνέβη στο Όρεγκον, ενώ ένα δεύτερο περιστατικό 3 μήνες αργότερα στην περιοχή του Μίσιγκαν, με 21 περιπτώσεις εκ των οποίων, 14 εισήχθησαν στο νοσοκομείο. Και τα δύο κρούσματα εντοπίστηκαν σε εστιατόρια γρήγορου φαγητού της ίδιας αλυσίδας όπου τα άτομα έφαγαν μολυσμένα μπιφτέκια βοείου κρέατος. Η μετ' έπειτα έρευνα αποκάλυψε ότι τα κατεψυγμένα μπιφτέκια δεν είχαν θερμανθεί επαρκώς ώστε να αδρανοποιήσουν τον παθογόνο (Buchanan & Doyle, 1997). Τον Ιανουάριο του 1993, το μεγαλύτερο κρούσμα από *E. coli* O157:H7 που αφορούσε βόειο κρέας αναφέρθηκε σε 4 δυτικές πολιτείες, με συμμετοχή σε αυτό πάνω από 700 άτομα που ασθένησαν, το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν παιδιά. Παραπάνω από το 1/4 των παιδιών αυτών εισήχθησαν σε νοσοκομείο, από τα οποία το 7,5% ασθένησαν από το σύνδρομο HUS και τελικά 4 από αυτά πέθαναν. Η ασθένεια αυτή προκλήθηκε από ανεπαρκώς μαγειρεμένο βόειο κρέας τύπου χάμπουργκερ σε αλυσίδα εστιατορίων από τα οποία ανακλήθηκαν τελικά πάνω από 250000 μπιφτέκια (Bell et al., 1994 & Tuttle et al., 1999). Παρόλα αυτά το

μεγαλύτερο κρούσμα στην ιστορία συνέβη το 1996 επηρεάζοντας πάνω από 9.000 άτομα (κυρίως παιδιά σχολικής ηλικίας), με αποτέλεσμα 12 θανάτους στην Ιαπωνία (πόλη Sakai) (Sato et al., 2003). Συνολικά 106 παιδιά ανέπτυξαν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, 12 εκ των οποίων έχασαν τη ζωή τους. Οι βλαστοί από λευκά ραπανάκια, που σερβίρονταν ως μέρος ενός γεύματος του σχολείου, προσδιορίστηκαν ως οι πλέον πιθανοί φορείς της μόλυνσης.

Ακόμη, το 1994 νόσησαν 23 άτομα που κατανάλωσαν καπνιστό σαλάμι και από αυτά το 13% με το σύνδρομο HUS. Αυτό το γεγονός οδήγησε το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ να αναπτύξει μεθόδους και κανονισμούς οι οποίοι να εξασφαλίζουν την ασφάλεια ζυμούμενων αλλαντικών (CDC, 1994 & USDA, 2001). Το μεγαλύτερο κρούσμα από χυμό μήλου ο οποίος ήταν μη παστεριωμένος συνέβη στον Καναδά με 71 επιβεβαιωμένους ασθενείς και 1 θάνατο (Cody et al., 1999). Το 1999, 781 κρούσματα από *E. coli* O157:H7 εκ των οποίων 2 θάνατοι, σχετίστηκαν με κατανάλωση πόσιμου νερού στις Ηνωμένες Πολιτείες το οποίο ήταν μολυσμένο (CDC, 1999). Ένα σύνολο 243 περιπτώσεων από μόλυνση του *E. coli* O157:H7 εκ των οποίων 4 θάνατοι συνδέθηκε με τη μόλυνση του νερού ενός δήμου στην Cabool από το Δεκέμβριο του 1989 έως τον Ιανουάριο του 1990 (Swerdlow et al. 1992). Δύο μεγάλα δίκτυα ύδρευσης που έσπασαν εξαιτίας δυσμενών καιρικών συνθηκών μπορεί να είναι η αιτία του κρούσματος. Το 1991, 21 περιπτώσεις ανθρώπων νόσησαν από το νερό της λίμνης Portland στο Όρεγκον (Keene et al., 1994). Οι λουόμενοι συμπεριλαμβανομένων πολλών βρεφών νόσησαν από *E. coli* O157:H7 λόγω κατάποσης του μολυσμένου από κόπρανα νερού (Faith et al., 1996, Buchanan & Doyle, 1997).

Άλλα κρούσματα σχετίζονται με κατανάλωση νωπού γάλακτος και κατανάλωση τυριού, βουτύρου και παγωτού φτιαγμένα από νωπό γάλα (πιθανών οφείλονται σε διασταυρούμενη μόλυνση). Έρευνες έδειξαν ότι ο παθογόνος μικροοργανισμός επιβιώνει κατά τη διάρκεια παρασκευής τυριού Cottage (Arocha et al., 1992) και τυριού Cheddar (Reitsma & Henning, 1996) από εμβολιασμένο με το βακτήριο γάλα. Τα επίπεδα του πληθυσμού άρχιζαν να αδρανοποιούνται κατά τη διάρκεια παστερίωσης του γάλακτος και να μειώνονται κατά τη διάρκεια παλαίωσης του τυριού Cheddar (Buchanan & Doyle, 1997).

#### 1.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση του *E. coli* O157:H7

Όπως σε όλα τα βακτηρία, η ανάπτυξη και η επιβίωση του *E. coli* O157:H7 στα τρόφιμα επηρεάζεται από την αλληλεπίδραση ορισμένων παραγόντων. Αυτοί είναι οι ενδογενείς (intrinsic) και οι εξωγενείς (extrinsic) παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH και η ενεργότητα νερού (Buchanan and Doyle, 1997).

##### - Θερμοκρασία

Ο μικροοργανισμός *E. coli* είναι ένα χαρακτηριστικό μεσόφιλο βακτήριο που αναπτύσσεται σε θερμοκρασία από 7 ή 10°C έως 50 °C με βέλτιστη αυτή των 37 °C. Έχουν όμως υπάρξει αναφορές για μερικά εντεροτοξινογόνα στελέχη (ETEC) που αυξάνονται ακόμα και σε θερμοκρασίες της τάξης των 4 °C (Adams & Moss, 2008). Ως επί των πλείστων, η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του παθογόνου βακτηρίου σε βέλτιστες συνθήκες είναι περίπου 8-10 °C (Buchanan and Bagi, 1994; Rajkowski and Marmer, 1995). Επίσης, ο *E. coli* O157:H7 δεν αναπτύσσεται καλά, αν όχι καθόλου, σε θερμοκρασίες άνω των 51 °C (Szabo et al., 1986). Το *E. coli* O157:H7 αδρανοποιείται εύκολα όταν τα τρόφιμα θερμαίνονται επαρκώς σε αρκετά υψηλές θερμοκρασίες (Cheville et al., 1996; Buchanan and Michael, 1997). Το Center for Food Security and Public Health (CFSPH) το 2004, αναφέρει ότι τα τρόφιμα είναι πάντα ασφαλή όταν η ελάχιστη θερμοκρασία στο κέντρο του τροφίμου είναι 71°C.

##### - pH

Το ελάχιστο pH για την ανάπτυξη *E. coli* είναι 4,0-4,5 σύμφωνα με τους Buchanan & Bagi (1994). Αναπτύσσεται σε pH περίπου ίσο με 7 αλλά η αύξησή του είναι δυνατή ακόμα και κάτω από pH 4,4 υπό ιδανικές συνθήκες, σύμφωνα με τους Adams & Moss (2008). Ακόμη, σύμφωνα με πειράματα το παθογόνο βακτήριο φαίνεται να επιβιώνει για αρκετές εβδομάδες σε μια ποικιλία από όξινα τρόφιμα όπως είναι η μαγιονέζα (Zhao & Doyle, 1994), τα λουκάνικα, ο χυμός μήλου και το τυρί Cheddar (Reitsma & Henning, 1996). . Επιβίωση σε αυτά τα τρόφιμα επεκτείνεται σε μεγάλο βαθμό, όταν αποθηκεύονται σε θερμοκρασία ψύξης. Για παράδειγμα, το παθογόνο επιβίωσε σε χυμό μήλου μόνο 2-3 ημέρες στους 25 ° C, σε σύγκριση με τους 8 ° C που επιβίωσε για 10-31 ημέρες (Zhao et al., 1993).

- Ενεργότητα νερού ( $a_w$ )

Σύμφωνα με μελέτες, η ελάχιστη τιμή ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) για την αύξηση των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 είναι περίπου 0.98 (Buchanan and Michael, 1997).

### **1.1.5 Συσχετισμός με τα τρόφιμα**

Τα περιστατικά που προκαλούνται από EHEC με ορότυπο O157:H7 περιλαμβάνουν κυρίως τα ελλιπώς ψημένα προϊόντα από κιμά και περιστασιακά το απαστερίωτο γάλα. Τα βοοειδή φαίνονται να είναι μια σημαντική πηγή μόλυνσης και το στέλεχος O157:H7 έχει απομονωθεί από ποσοστό 0.9 - 3.4.2% των υγιών βοοειδών στο Ηνωμένο Βασίλειο. Άλλες έρευνες έχουν απομονώσει το συγκεκριμένο ορότυπο από το 3.7% των δειγμάτων (6/164 δείγματα) του φρέσκου βόειου κρέατος του λιανικού εμπορίου και από ένα σημαντικό ποσοστό (1-2%) άλλων προϊόντων φρέσκου κρέατος όπως το χοιρινό κρέας, τα πουλερικά και το αρνί. Έχουν υπάρξει κάποια πολύ μεγάλου εύρους περιστατικά ανά τον κόσμο και ο δημόσιος αντίκτυπός τους ήταν συχνά δραματικός. Εξακόσιοι άνθρωποι νόσησαν και τέσσερα παιδιά πέθαναν σε μια επιδημική έκρηξη στις Ηνωμένες Πολιτείες το 1993 που προκλήθηκε από τα ελλιπώς ψημένα χάμπουργκερ βόειου κρέατος. Αυτό προκάλεσε μια σημαντική δημόσια επίκριση για την υγιεινή του κρέατος και οδήγησε, μεταξύ άλλων, στην εισαγωγή νέων κανονισμών σήμανσης του κρέατος.

### **1.2 Θερμική Επεξεργασία**

Πολλές μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων θεωρούνται στεσογόνες, σύμφωνα με τον πρακτικό ορισμό που αναφέρει ότι οποιοσδήποτε επιβλαβής παράγοντας, μέθοδος ή κατάσταση που επηρεάζει αρνητικά τη μικροβιακή ανάπτυξη και επιβίωση θεωρείται ως στρεσογόνος. Οι συμβατικές μέθοδοι που αποτελούν επιπλέον, μέθοδοι για τη συντήρηση των τροφίμων, περιλαμβάνουν τη θέρμανση, ξήρανση, κατάψυξη, και την προσθήκη εγκεκριμένων συντηρητικών. Η θερμική επεξεργασία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος συντήρησης και τα θερμικά κατεργασμένα τρόφιμα έχουν γενικά ένα καλό ιστορικό που αφορά την ασφάλειά τους. Όταν εφαρμόζεται σωστά, η θερμότητα μπορεί να εξαλείψει

βακτήρια, μύκητες, ιούς, παράσιτα, και ένζυμα, που είναι οι βιολογικοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την ασφάλεια των τροφίμων. Εναλλακτικές τεχνολογίες δεν μπορούν να αντικαταστήσουν και να επιτύχουν τη θανάτωση των μικροβίων που γίνεται σήμερα εφικτή με τις συμβατικές μεθόδους συντήρησης, ιδιαίτερα τη θερμική επεξεργασία (Yousef & Juneja, 2003). Σε όλες τις μορφές της εφαρμογής της, η θερμική επεξεργασία παραμένει ως η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τη διατήρηση και την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων στο ράφι (Awuah et al., 2007). Η εφαρμογή της θερμικής επεξεργασίας καθιστά το προϊόν απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς που είναι ικανοί να αναπαραχθούν στο τρόφιμο κάτω από κανονικές μη-ψυχόμενες συνθήκες αποθήκευσης και διανομής (Awuah et al., 2007), και κατ'επέκταση χρησιμεύει στην προστασία των ανθρώπων από τροφικές ασθένειες (Juneja et al., 2001). Οι συνθήκες που επιτυγχάνονται σε ένα προϊόν με την παραπάνω εφαρμογή δημιουργούν ένα προϊόν με σταθερότητα κατά την αποθήκευση του στο ράφι, σύμφωνα με το USDA (U.S. Department of Agriculture) (Awuah et al., 2007). Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών Θερμική Επεξεργασία (άρθρο 89α) είναι η επεξεργασία σε συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου τέτοιων που να επιφέρουν την μετουσίωση των πρωτεϊνών του κρέατος και μείωση σε αποδεκτά επίπεδα ή καταστροφή του μικροβιακού φορτίου ανάλογα με το είδος του προϊόντος και τον πιθανό συνδυασμό άλλων μεθόδων επεξεργασίας.

Η χρήση της θερμικής επεξεργασίας (ή το μαγείρεμα- cooking) για να επιτευχθεί θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών (όπως *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* & *Listeria monocytogenes*) είναι ένα από τα πιο σημαντικά κρίσιμα σημεία ελέγχου (Critical Control Points –CCP) και παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην πρόληψη τροφιμογενών κρουσμάτων από πολλά κιμαδοποιημένα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Juneja & Marmer, 1999, Murphy et al, 2004). Όμως, συχνά, η ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων αυτών δεν είναι αρκετά αξιόπιστη δεν τηρούνται δηλαδή όλα τα μέτρα ασφάλειας και υγιεινής για να αποτραπεί η ανάπτυξη παθογόνων, αν τα προϊόντα αυτά είναι ανεπαρκώς επεξεργασμένα. Το 1999 σημειώθηκαν αλλαγές στους κανονισμούς για να θέσουν σε εφαρμογή τα πρότυπα θνησιμότητας για έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (RTE - Ready-To-Eat) ζωικής προέλευσης (O'Bryan et al., 2006).

Το ανεπαρκώς μαγειρεμένο τρόφιμο ή η επιβίωση του παθογόνου κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος του τροφίμου ήταν ένας παράγοντας που συνέβαλλε στα περισσότερα κρούσματα (Mermelstein, 1993). Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας του παθογόνου *E. coli* O157:H7 στην θερμότητα. Ωστόσο, ο συγκεκριμένος ορότυπος διαφέρει στην ικανότητά του να ζυμώνει τη σορβιτόλη και παράγει το ένζυμο Β-γλυκουρονιδάση σε σχέση με τους άλλους ορότυπους, και επιδεικνύει σημαντική αντίσταση σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις συμπεριλαμβανομένων των όξινων συνθηκών, της κατάψυξης και των χαμηλών θερμοκρασιών ανάπτυξης (Conner και Hall, 1992, 1993, 1994; Conner και Kotrola, 1994). Έτσι, άλλα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένης της ανθεκτικότητας στη θερμότητα, δεν μπορεί να είναι παρόμοια για όλα τα είδη *E. coli* (Ahmed et al., 1995).

Αν και τα κρούσματα *E. coli* O157:H7, όπως η αιμορραγική κολίτιδα, το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS) και η θρομβωτική θρομβοκυτοπενική ερυθρίαση (TTP) που προσβάλλουν τους ανθρώπους (Juneja & Marmar, 1999; Carter et al., 1987; Swerdlow et al., 1992; Tarr, 1994) έχουν συσχετιστεί κυρίως με μαγειρεμένο μοσχαρίσιο κιμά (Pandhrye και Doyle 1992), εκτεταμένες μελέτες από διάφορους ερευνητές έχουν δείξει ότι ο οργανισμός δεν διαθέτει ασυνήθιστη αντοχή στη θερμότητα (Juneja et al., 1998), με τις τιμές D-value να κυμαίνονται από 270-9,6 sec για θερμοκρασίες 57-64°C (Ahmed et al, 1995). Η αντοχή των οργανισμών αυτών στη θερμότητα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Διαφορετικά στελέχη του ίδιου οργανισμού έχουν διαφορετικές αντιδράσεις στη θερμότητα. Η αντοχή των μικροοργανισμών στη θερμότητα μπορεί επίσης να επηρεάζεται από την ηλικία της καλλιέργειας, τις συνθήκες ανάπτυξης, το pH, και πολλούς άλλους παράγοντες (O'Bryan et al., 2006).

Για παράδειγμα, η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, επηρεάζει την θερμική αντίσταση των βακτηρίων. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες έχει αποδειχθεί ότι είναι περισσότερο ανθεκτικοί στην θερμότητα από εκείνους που αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Bhaduri et al., 1991, Juneja & Eblen, 1999 & O'Bryan et al., 2006). Επιπλέον, η σοβαρότητα της θερμικής διαδικασίας (Fellows, 2000) μπορεί να εξαρτάται και από παράγοντες όπως: (i) τα φυσικά χαρακτηριστικά του

προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων των θερμο-φυσικών ιδιοτήτων, το σχήμα και το μέγεθος του δοχείου που περιέχει το προϊόν, (ii) ο τύπος και η θερμική αντοχή του μικροοργανισμού στόχου που είναι πιθανό να βρίσκονται στο τρόφιμο (Awuah et al., 2007).

### **1.2.1 Κινητική Θερμικής Απενεργοποίησης**

Η πρόσφατη ανάπτυξη της αγοράς για έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα (RTE) με βάση το κρέας και τα πουλερικά έχει οδηγήσει σε σοβαρή ανησυχία για τροφολογικές ασθένειες λόγω της παρουσίας παθογόνων, ιδιαίτερα της *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli O157: H7* στα προϊόντα κρέατος και πουλερικών. Έμφαση έχει δοθεί στη θερμική επεξεργασία εφόσον εξακολουθεί να θεωρείται το κύριο μέσο εξάλειψης των παθογόνων μικροοργανισμών από το ωμό κρέας και τα προϊόντα πουλερικών (Juneja, Eblen, & Ransom, 2001). Ανεπαρκής χρόνος/θερμοκρασία έκθεσης κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στα κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης. Απαιτείται βέλτιστη θερμική επεξεργασία όχι μόνο για την καταστροφή παθογόνων μικροοργανισμών στα προϊόντα κρέατος και τα πουλερικών, αλλά επίσης και για να διατηρηθεί η επιθυμητή ποιότητα των τροφίμων και απόδοση του προϊόντος.

Ως εκ τούτου, τα μοντέλα πρόβλεψης έχουν μεγάλη σημασία για την επικύρωση των προγραμμάτων επεξεργασίας των τροφίμων σε εμπορικές δραστηριότητες για να εξασφαλίζουν ότι το μεταποιημένο κρέας ή προϊόντα πουλερικών πληρούν τις προϋποθέσεις που αφορούν την θνησιμότητα του παθογόνου (Murphy et al., 2004). Το USDA έχει σχεδιάσει "Το Πρόγραμμα Μοντελοποίησης των Παθογόνων" ως ερευνητικό και εκπαιδευτικό εργαλείο για την εκτίμηση των επιπτώσεων των πολλαπλών μεταβλητών που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την επιβίωση και την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Ο προσδιορισμός του ρυθμού θέρμανσης του προϊόντος επιτυγχάνεται από μία λεπτομερή ανάλυση των παραμέτρων (τόσο του προϊόντος όσο και του συστήματος) που έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν τη συμπεριφορά θέρμανσης του προϊόντος.

Θερμική καταστροφή των παθογόνων είναι μια διαδικασία εξαρτώμενη από το χρόνο και τη θερμοκρασία. Η σχέση χρόνου-θερμοκρασίας της θερμικής αδρανοποίησης των παθογόνων μικροοργανισμών εδώ και καιρό εκφράζεται με την έννοια δεκαδικής μείωσης χρόνο (D-value) και τη σταθερά θερμικής ανθεκτικότητας (z-value). Η D-value ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται για να προκληθεί 90% μείωση του μικροβιακού πληθυσμού σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Αντανακλά την ανοχή ενός παθογόνου στην αύξηση του χρόνου θέρμανσης σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία. Η D-value σε κάθε θερμοκρασία υπολογίζεται από το μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ του  $\log_{10}$  των επιζώντων βακτηρίων και του χρόνου θέρμανσης. Η D-value είναι η αρνητική αντίστροφη κλίση της καμπύλης επιβίωσης (Εξίσωση 1.2.1). Το z-value είναι η θερμοκρασιακή διαφορά που απαιτείται για την καμπύλη θερμικής αδρανοποίησης για να προκαλέσει ένα λογάριθμο ( $\log_{10}$ ) μείωση. Συσχετίζεται με την ανοχή ενός συγκεκριμένου παθογόνου στις θερμοκρασιακές αλλαγές στο προϊόν. Η z-value υπολογίζεται με τον προσδιορισμό της γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ  $\log_{10}$  των τιμών D-values και της θερμοκρασίας. Η τιμή z-value είναι η αρνητική αντίστροφη κλίση της καμπύλης της θερμικής ανθεκτικότητας (Εξίσωση 1.2.2). Για τον υπολογισμό των D- και z-values, η μικροβιακή αδρανοποίηση έχει παραδοσιακά υποτεθεί ότι ακολουθεί την κινητική πρώτης τάξεως, δηλαδή, σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, ένας λογάριθμος ( $\log_{10}$ ) μείωσης των βακτηρίων είναι γραμμικός συναρτήσει του χρόνου (Heldman & Hartel, 1997). Η υπόθεση αυτή ισχύει, εάν (1) η σχέση της  $t$  {T, N} =  $g\{T\} \cdot f\{N\}$  περιγράφει τη θερμική αδρανοποίηση των μικροβίων, όπου  $t$  = χρόνος θέρμανσης σε συγκεκριμένη θερμοκρασία (T), N = αριθμός των επιζώντων τη χρονική στιγμή  $t$  (Kormendy & Kormendy, 1997), (2) το φαινόμενο του τραυματισμού αγνοηθεί και (3) η επίδραση της θέρμανσης στους μικροοργανισμούς στο δείγμα τροφίμων είναι ομοιογενές (Moats, 1971).

$$D = \frac{\log_{10}(N_0) - \log_{10}(N_t)}{t} \quad (1.2.1)$$

όπου,

$N_0$  είναι οι επιζώντες σε χρόνο 0.

$N$  είναι οι επιζώντες στο χρόνο  $t$ .



$$z = \frac{\log_{10}(D_0) - \log_{10}(D_T)}{\Delta T} \quad (1.2.2)$$

όπου,

$D_0$  είναι το δεκαδικό χρόνο αναγωγής (min) σε θερμοκρασία  $T_0$  (°C).

$D$  είναι ο δεκαδικός χρόνο αναγωγή σε θερμοκρασία  $T$

$\Delta T$  είναι η διαφορά μεταξύ  $T$  και  $T_0$  ( $T - T_0$ )

$z$  είναι η σταθερά θερμικής ανθεκτικότητας (°C).

Το μοντέλο D-z προβλέπει μεγάλες τιμές θνησιμότητας για θερμοκρασίες κάτω των  $T = 121,1$  °C. Ωστόσο, ορισμένοι ειδικοί συνιστούν την έννοια D-z για την παρακολούθηση-έλεγχο και την επικύρωση των διαδικασιών αποστείρωσης (Holdsworth, 1997). Για υπερεκτιμημένες τιμές D-value από την άλλη πλευρά, το προϊόν θα είναι υπερ-μαγειρεμένο και άρα με κατώτερες θρεπτικές ιδιότητες. Ως εκ τούτου, η έννοιες D- & z-value γίνονται προβληματικές όταν οι πειραματικές ημι-λογαριθμικές καμπύλες δείχνουν μη γραμμικότητα (Peleg & Petchina, 2000). Εναλλακτικές τεχνολογίες μπορούν να χρησιμοποιούν παρόμοιες έννοιες για τον καθορισμό κινητικών παραμέτρων (Awuah, 2007).

### 1.2.3 Μελέτες θερμικής αδρανοποίησης

Οι περισσότερες μελέτες θερμικής αδρανοποίησης των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών στα προϊόντα με βάση το κρέας και τα πουλερικά έχουν διεξαχθεί σε μεταλλικούς ή γυάλινους σωλήνες ή σε πλαστικές σακούλες. Στους σωλήνες, η καταστροφή των μικροοργανισμών σε υψηλή θερμοκρασία επιτυγχάνεται στο εξωτερικό μέρος του δείγματος κοντά στο τοίχωμα του σωλήνα, αλλά υψηλές θερμοκρασίες δεν φθάνουν στο κέντρο των σωλήνων, και ως εκ τούτου, η πλειοψηφία του δείγματος δεν φτάνει την επιθυμητή θερμοκρασία (Orta - Ramirez, 2002). Για την παραγωγή ισοθερμικών συνθηκών καταστροφής και για πιο ομοιογενή μεταφορά θερμότητας στο δείγμα, δείγματα κρέατος μπορούν να τοποθετηθούν σε ασηπτικές πλαστικές σακούλες (Juneja, Eblen, & Ransom, 2001; Murphy, Beard, Martin, Duncan, and Marcy, 2004; Osaili et al., 2007). Το πάχος των πλαστικών σακουλών έχει επίδραση στη θερμική αδρανοποίηση των παθογόνων

στο δείγμα τροφίμων που υπάρχει μέσα στη σακούλα. Αυξάνοντας το πάχος της πλαστικής σακούλας μειώνεται ο ρυθμός θερμικής αδρανοποίησης των παθογόνων (Murphy, Duncan, Marcy, Berrang, & Driscoll, 2002).

Μολονότι η θερμική καταστροφή των παθογόνων στα τρόφιμα έχει υποτεθεί ότι είναι γραμμική με το χρόνο, έχουν παρατηρηθεί από ορισμένους ερευνητές αποκλίσεις από τη γραμμική καταστροφή με το χρόνο. Οι αποκλίσεις από την αντίδραση πρώτης τάξης (που συνήθως αναφέρεται ως η μηχανιστική προσέγγιση) έχουν αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία που υποδεικνύει ότι οι ημι-λογαριθμικές καμπύλες επιβίωσης ορισμένων οργανισμών μπορεί να έχουν μια ανοδική ή καθοδική κοιλότητα. Με άλλα λόγια η ημι-λογαριθμική καμπύλη επιβίωσης μπορεί να έχει “shoulder” ή / και “tail”. Η παρουσία του “shoulder” έχει αποδοθεί σε μικροβιακούς πληθυσμούς που αποτελούνται από αρκετούς υπο-πληθυσμούς (με κάθε πληθυσμό να έχει τη δική του κινητική απενεργοποίησης), συσσώρευση/συσσωματώματα κυττάρων και κακή μεταφορά θερμότητας (Awuah, 2007). Το «shoulder» μπορεί να σχετίζεται με την ικανότητα των επεξεργασμένων μικροοργανισμών να αποκαθιστούν τη ζημιά στα πρώτα στάδια της έκθεσής τους στη θερμότητα.

#### 1.2.3.1 Ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 στο κρέας

Ποικιλία αποτελεσμάτων αναφέρονται στη βιβλιογραφία που αφορούν πως το είδος του τροφίμου και η θερμοκρασία της θερμικής επεξεργασίας επηρεάζουν τη θερμική θανάτωση του παθογόνου μικροοργανισμού (Juneja & Marmer, 1999). O’Doyle & Schoeni (1987) προσδιόρισαν τον επιπολασμό του *E. coli* O157:H7 σε δείγματα από βόειο, χοιρινό, αρνίσιο κρέας και σε δείγματα από κρέας πουλερικών. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι τα πουλερικά αποτελούν ιδανικό ξενιστή του παθογόνου βακτηρίου γιατί μπορεί να αποικίζει στα κόπρανα των πουλερικών. Επίσης, το *E. coli* O157:H7 βρίσκεται στα κόπρανα και στα έντερα υγιών βοοειδών και μπορεί να μολύνει το κρέας τους κατά τη διάρκεια της σφαγής τους ή γενικά της επεξεργασίας-μεταποίησης τους (Wells et al., 1991; Juneja & Marmer, 1999).

Εγγενείς ιδιότητες του προϊόντος έχουν επίδραση στη θερμική ανθεκτικότητα των παθογόνων που συνδέονται με το προϊόν. Οι ερευνητές έχουν

βρει διαφορετικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της περιεκτικότητας σε λίπος για θερμική αδρανοποίηση των παθογόνων στα προϊόντα κρέατος και πουλερικών. Ορισμένοι διαπίστωσαν ότι το λίπος μειώνει τη θερμική ανθεκτικότητα των παθογόνων.

Ο Ahmed et al (1995) μελέτησε τα βοοειδή, τα πουλερικά, τη γαλοπούλα, το χοιρινό λουκάνικο σε 3 επίπεδα λίπους για κάθε προϊόν. Διαπίστωσαν ότι τα υψηλότερα επίπεδα λίπους οδήγησαν σε υψηλότερες τιμές D-value σε όλα τα προϊόντα. Αντίθετα, οι Kotrola και Conner (1997) διαπίστωσαν ότι η αύξηση του επιπέδου του λίπους από 3 έως 11% του κιμά γαλοπούλας δεν έχει σημαντική επίδραση στο D-value του *E. coli* O157:H7 σε θερμοκρασία 52,5 °C, 55 °C, και 60 °C. Οι Line et al. (1991), Ahmed et al. (1995) και Smith, Maurer, Orta - Ramirez, Ryser & Smith (2001) μελέτησαν την επίδραση της περιεκτικότητας σε λιπαρές ουσίες στη θερμική αδρανοποίηση του *E. coli* O157:H7 στο βόειο κρέας και τα πουλερικά. Ο Line et al. (1991) διαπίστωσε ότι τα D-values του *E. coli* O157:H7 αυξήθηκαν από 78,2 σε 115,5 λεπτά στους 51,7 °C, από 4,1 σε 5,3 λεπτά στους 57,2 °C και από 0,3 σε 0,5 λεπτά στους 62,8 °C, όταν η περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες αυξήθηκε στον κιμά από 2 σε 30,5%. Ο Ahmed et al. (1995) διαπίστωσε ότι όταν η περιεκτικότητα σε λίπος αυξήθηκε από 3 σε 11 % στη γαλοπούλα και το κοτόπουλο, οι D-values αυξήθηκαν σε θερμοκρασίες 50 – 60 °C. Για το κοτόπουλο, το D-value στους 50 °C αυξήθηκε από 65,24 σε 105,5 λεπτά, στους 55 °C αυξήθηκε από 8,76 σε 9,74 λεπτά, και στους 60 °C αυξήθηκε από 0,38 σε 0,55 λεπτά. Για την γαλοπούλα, το D-value στους 50 °C αυξήθηκε από 70,41 σε 115 λεπτά, στους 55 °C αυξήθηκε από 6,37 σε 8,76 λεπτά, και στους 60 °C αυξήθηκε από 0,55 σε 0,58 λεπτά. Ο Smith et al. (2001) ανέφερε ότι το *E. coli* O157:H7 ήταν θερμοκρασιακά πιο σταθερό στο βόειο που περιέχει 19 % λιπαρά παρά στο βόειο που περιέχει 4,8 % λιπαρά. Οι θεωρίες πίσω από αυξημένη θερμική ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών σε προϊόντα τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά σχετίζονται με τη χαμηλότερη θερμική αγωγιμότητα ή τη μειωμένη δραστηριότητα νερού ( $a_w$ ) σε λιπαρά τμήμα.

Ακόμη, ο Juneja et al (1997) σύγκρινε την ανθεκτικότητα τεσσάρων στελεχών του ίδιου βακτηρίου στη θερμότητα μεταξύ του βόειου κιμά και του κιμά από κοτόπουλο. Βρήκαν ότι τα παθογόνα βακτήρια επιβίωσαν περισσότερο χρονικό διάστημα στον βόειο κιμά από ότι στον κιμά από κοτόπουλο και η διαφορά αυτή

πιθανόν να έγκειται στην περιεκτικότητά του σε λίπος (O'Bryan et al., 2006). Οι τιμές D-value και z-value δίνονται στον πίνακα 1.2.1.

**Πίνακας 1:** Οι τιμές D-value και z-value σε διαφορετικά είδη τροφίμων ζωικής προέλευσης (O'Bryan et al., 2006).

Strain	Medium	D-value (in min) at °C										z-Value	
		52	55	57	57.5	58	60	61	62.5	65	67.5		70
204P, 505B, 933, 932, F501, F585	Ground beef/turkey		23.23		7.43		2.38		0.76	0.24	0.08	0.03	5.15
204P	Ground turkey 3% fat	42.3	12.5	2.8			0.9						4.47
204P	Ground turkey 11% fat	38.5	11.0	2.4			0.9						4.39
204P	Ground turkey 3% fat With 8% NaCl	83.6	26.1	8.6			0.9						5.85
204P	Ground turkey 11% fat With 8% NaCl	83.1	20.4	8.9			1.0						5.42
204P	Ground turkey 3% fat With 4% Na lactate	77.9	9.6	4.0			1.4						4.08
204P	Ground turkey 11% fat With 4% Na lactate	74.6	10.7	4.2			1.6						4.21
204P	Ground turkey 3% fat With 8% NaCl, 4% NAL, 0.5% polyphosphate	103.3	23.0	10.8			2.4						6.09
204P	Ground turkey 11% fat With 8% NaCl, 4% NAL, 0.5% polyphosphate	95.2	17.9	6.1			2.7						6.01
204P	Ground beef 4.8% fat		20.08			1.22		0.32	0.16 (63)				3.79
204P	Ground beef 19.1% fat		22.47			2.05		0.32	0.18 (63)				3.60
204P	Turkey breast 3% fat		51.1	7.7	3.4		0.7						4.47
204P	Turkey breast 11% fat		46.8	11.0	2.7		0.7						4.39
204P	Turkey frank 17% fat		106.5	38.5	9.6		4.4						5.38
204P	Turkey ham 11% fat		66.7	23.9	7.0		1.5						4.53
204P	Turkey sausage 31% fat		81.7	31.6	7.8		2.4						4.64
204P	Chicken 3% fat	65.24		8.76			0.38						4.48
204P	Chicken 11% fat	105.5		9.74			0.55						4.38
204P	Turkey 3% fat	70.41		6.37			0.55						4.74
204P	Turkey 11% fat	115.0		9.69			0.58						4.35
204P	Beef 7% fat	55.34		11.4			0.45						4.78
204P	Beef 10% fat	80.66		15.3			0.46						4.44
204P	Beef 20% fat	92.67		19.26			0.47						4.35
204P	Pork sausage 7% fat	49.5		6.37			0.37						4.72
204P	Pork sausage 10% fat	62.9		7.83			0.46						4.67
204P	Pork sausage 30% fat	80.64		11.28			0.55						4.61
EDL-931, 45753-35 C1-9218, 933	Ground beef 10% fat			21.13	4.95 (57.5)		3.17		0.93	0.39			5.98
EDL-931, 45753-35 C1-9218, 933	Ground chicken			11.83	3.79 (57.5)		1.63		0.82	0.36			6.79
NCTC 12900	Quality formulation: Control			20.8			2.7			0.6			
NCTC 12900	Economy formulation: Control			41.1			4.2			0.7			
NCTC 12900	Quality form.: Commercial			9.3			1.9			0.5			
NCTC 12900	Economy form.: Commerc.			11.7			2.4			0.6			

Οι Murphy, Beard, Martin, Duncan, et al. (2004), Murphy, Martin, et al. (2004) και Murphy, Davidson, & Marcy (2004) ανέφεραν D-values για κοκτέιλ του *E. coli* O157: H7 στο χοιρινό κιμά, σε εύρος 33,44 με 0,048 λεπτών, στους 55-70 °C και z-value 4.94 °C, αντιστοίχως. Οι Osaili, Griffis, Martin, Beard, et al. (2006) και Osaili et al. (2007) ανέφεραν D-values για παναρισμένα χοιρινά μπιφτέκια στους 55-70 °C σε εύρος 32,11 έως 0,08 λεπτών και z-value 5.4°C, αντιστοίχως. Ακόμη, οι Juneja, Klein, and Marmar (1998) ανέφεραν ότι η θερμική ανθεκτικότητα του *E. coli*

O157:H7 σε ζωμό και κιμά βοείου κρέατος αυξήθηκε περίπου κατά 1,5 φορές, όταν τα κύτταρα εκτέθηκαν προηγουμένως σε μη θανατηφόρες θερμοκρασίες.

#### **1.2.4 Διαδικασία επαλήθευσης / επικύρωσης**

Η διαδικασία επαλήθευσης και επικύρωσης είναι το κλειδί για να εξασφαλιστεί η ασφάλεια των θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων. Τυπικά, το προϊόν εμβολιάζεται με ένα κατάλληλο μικροοργανισμό γνωστής ανθεκτικότητας και υποβάλλεται σε διάφορους χρόνους θέρμανσης σε μία ή περισσότερες διαφορετικές θερμοκρασίες επεξεργασίας. Το προϊόν στη συνέχεια επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία ανάπτυξης. Η διαδικασία θα είναι ικανοποιητική εάν δεν υπάρχουν ενδείξεις αλλοίωσης. Αν και μικροβιολογική επικύρωση δίνει άμεση απόδειξη της στεριότητας του προϊόντος, η παρακολούθηση των χημικών μεταβολών στα τρόφιμα προσφέρει μια εξαιρετική εναλλακτική λύση για την εκτίμηση της ολοκληρωμένης έκθεσης (χρόνος-θερμοκρασία) του τροφίμου σε θανατηφόρες θερμοκρασίες.

#### **1.3 Αιθέρια Έλαια – Γενικά**

Για τη μείωση ή εξάλειψη των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών και κατά συνέπεια για τη μείωση των κινδύνων στην υγεία του ανθρώπου, υπάρχει ανάγκη για νέες μεθόδους ενδεχομένως σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες μεθόδους (τεχνολογία εμποδίων) (Leistner, 1978 & Oussalah et al., 2007). Την ίδια στιγμή, στη Δύση φαίνεται να παρατηρείται μία τάση για «πράσινο» καταναλωτισμό (Tuley de Silva, 1996; Smid & Gorris, 1999), επιθυμώντας λιγότερα συνθετικά πρόσθετα τροφίμων και προϊόντα με μικρότερο αντίκτυπο στο περιβάλλον (Burt, 2004).

Μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει τη φυσική αντιβακτηριακή δραστηριότητα των αιθέρων ελαίων (Essential Oils - EOs) έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* και *Staphylococcus aureus* σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,2 και 10  $\mu\text{l ml}^{-1}$  (Burt, 2004). Τα αιθέρια έλαια (ονομάζονται επίσης και πτητικά έλαια: Guenther, 1948) είναι αρωματικά ελαιώδη υγρά που προέρχονται από φυτικά υλικά

(λουλούδια, μπουμπούκια, σπόροι, φύλλα, κλαδιά, φλοιός, τα βότανα, το ξύλο, τα φρούτα και ρίζες) (Burt, 2004). Μπορούν να παραληφθούν με ζύμωση, απορρόφηση ή εκχύλιση, αλλά η μέθοδος της απόσταξης με ατμό είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εμπορική παραγωγή των αιθέριων ελαίων (Van de Braak & Leijten, 1999). Το αιθέριο έλαιο μπορεί να προστεθεί στο τρόφιμο κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας/μεταποίησής του, με σκοπό να επιμηκύνει τη διάρκεια της ζωής του τροφίμου στο ράφι (Oussalah et al., 2007). Οι φυσικές συνθήκες που βελτιώνουν τη δράση των αιθέριων ελαίων είναι το χαμηλό pH, η χαμηλή θερμοκρασία και τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Γενικότερα, η ευαισθησία των βακτηρίων στην αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου φαίνεται επίσης να αυξάνει με μείωση του pH του τροφίμου, της θερμοκρασίας αποθήκευσης και της ποσότητας του οξυγόνου εντός της συσκευασίας (Tassou et al., 1995, 1996; Skandamis & Nychas, 2000; Tsigarida et al., 2000).

Λαμβάνοντας υπόψη τα δημοσιευμένα δεδομένα σχετικά με τα αιθέρια έλαια στα τρόφιμα, η ακόλουθη κατά προσέγγιση γενική κατάταξη (με κατά φθίνουσα σειρά αντιμικροβιακή δράση) μπορεί να είναι: ρίγανη > σκελίδα > κόλιανδρο > κανέλα > θυμάρι > μέντα > δεντρολίβανο > μουστάρδα > κόλιαντρο > φασκόμηλο (Burt, 2004). Η αντιμικροβιακή δράση των: ρίγανη, θρούμπι, και θυμάρι για πρώτη φορά αναφέρθηκαν κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και διαπιστώθηκε ότι η ανασταλτική δράση αυτών είναι πιθανό να οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε θυμόλη και καρβακρόλη, οι οποίες είναι από τους πιο αποτελεσματικούς αντιβακτηριακούς παράγοντες που είναι γνωστοί στα βότανα (Oussalah et al., 2007).

Ορισμένα έλαια ξεχωρίζουν ως καλύτερα αντιβακτηριακά από άλλα έλαια για εφαρμογές με βάση το κρέας. Τα έλαια από ευγενόλη και κορίανδρο, γαρούφαλλο, ρίγανη και θυμάρι βρέθηκαν να είναι αποτελεσματικά σε συγκεντρώσεις 5-20  $\mu\text{l g}^{-1}$  για την αναστολή των μικροοργανισμών *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* σε προϊόντα με βάση το κρέας, προκαλώντας μερικές φορές μία έντονη αρχική μείωση στον αριθμό των κυττάρων (Aureli et al., 1992; Stecchini et al., 1993; Hao et al., 1998a,b; Tsigarida et al., 2000; Skandamis and Nychas, 2001). Τα αποτελέσματα της έρευνας των Oussalah et al. (2007)

αναφέρουν ότι ένα από τα πιο δραστικά αιθέρια έλαια από όλα που μελετήθηκαν σε συγκεντρώσεις (0.003%, 0.006%, 0.013%, 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4% & 0.8% v/v) είναι η ρίγανη (*Origanum Essential Oil*).

### 1.3.1 Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) απαντάται σε πολλές περιοχές της Μεσογείου, αν και η “ελληνική ρίγανη” (*Origanum vulgare spp. hirtum*) θεωρείται ότι έχει την καλύτερη ποιότητα από τα διάφορα άλλα είδη ρίγανης που χρησιμοποιούνται σε παγκόσμια κλίμακα. Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, “Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης” (*Origanum Oil*) χαρακτηρίζεται το προϊόν που λαμβάνεται με απόσταξη της ανθισμένης πλάσης *Origanum niljare L.*

Η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του παθογόνου *E. coli* O157:H7 μελετήθηκε από διάφορους ερευνητές. Από μελέτες που έκαναν οι Friedman et al. (2004) βρέθηκε ότι ανάμεσα στα αιθέρια έλαια που χρησιμοποίησαν για την έρευνά τους η ρίγανη είναι ανάμεσα σ’ αυτά που έχουν υψηλή αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου *E. coli* O157:H7 σε χυμό μήλου. Σύμφωνα με τους Sagdic et al, (2002) αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1, 1,5 και 2% είχε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμούς  $10^8$  CFU/ml σε θρεπτικό υπόστρωμα που επωάστηκε στους 37°C. Σε μια άλλη μελέτη οι Skandamis et al., (2001) αναφέρουν ότι η συγκέντρωση 0.05 % αιθέριου ελαίου ρίγανης είχε βακτηριοκτόνο δράση κατά του παθογόνου που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμούς 5 log cfu/ml σε ζωμό BHI και επωάστηκε στους 37 °C. Στην ίδια μελέτη, συγκέντρωση 0.03% αιθέριου ελαίου παρουσίασε βακτηριοστατική δράση. Οι Skandamis και Nychas (2000) βρήκαν ότι η προσθήκη ελαίου ρίγανης σε μελιτζάνοσαλάτα με χαμηλό pH σε συγκεντρώσεις 0.1 - 0.7 %, αύξησε το ρυθμό θανάτωσης του *E. coli* O157:H7 και μείωσε το χρόνο επιβίωσης. Είναι γνωστό ότι το *E. coli* O157:H7 επιβιώνει σε χαμηλό pH, για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Για τον μικροοργανισμό *S. typhimurium*, οι Skandamis et al., (2002) βρήκαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκέντρωση 0.8 % στην επιφάνεια βόειου κρέατος που επιμολύνθηκε τεχνητά με το συγκεκριμένο παθογόνο, οδήγησε

σε σημαντική μείωση του παθογόνου κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 5 °C για 15 ημέρες.

Από οργανοληπτικής άποψης: η γεύση φιλέτων βοείου κρέατος που περιείχε έλαιο ρίγανη συγκέντρωσης 0.8% v/w βρέθηκε ότι είναι αποδεκτή μετά από αποθήκευση στους 5 °C και μετά από το μαγείρεμα (Tsigarida et al., 2000 & Burt, 2004). Ακόμη, η γεύση, η οσμή και το χρώμα του κιμά από βόειο κρέας που περιείχε συγκέντρωση 1% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης βελτιώθηκε κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας και κενού στους 5 °C και ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμη μετά το μαγείρεμα (Skandamis and Nychas, 2001). Αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκέντρωσης 0,05% v/w σε φιλέτα μπακαλιάρου παρήγαγε μια «χαρακτηριστική αλλά ευχάριστη» γεύση, η οποία μειώθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης στους 2 °C (Burt, 2004).

Παρά το γεγονός ότι το άρωμα του ελαίου ρίγανης βρέθηκε να είναι ευχάριστο, όταν προστίθεται σε συγκέντρωση 0,05% (v/w) σε φιλέτα μπακαλιάρου (Mejlholm and Dalgaard 2002) και αποδεκτή έως 1% (v/w) σε κιμά (Skandamis and Nychas 2001), μπορεί να είναι όμως λιγότερο αποδεκτό σε άλλες κατηγορίες τροφίμων (Burt & Reinders, 2003). Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει την ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση (χωρίς προσθήκη σταθεροποιητών), σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας που έκαναν οι Burt & Reinders (2003).

Η χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα ως συντηρητικά είναι περιορισμένη: πιθανοί λόγοι για τον περιορισμό αυτό μπορεί να είναι η έντονη μυρωδιά των ουσιών αυτών όταν χρησιμοποιούνται σε δραστικές δόσεις (μεγάλες συγκεντρώσεις) και η μείωση της δραστηριότητας τους, όταν προστίθενται σε αυτές τις ουσίες άλλες πιο πολύπλοκες (Burt & Reinders, 2003).

### **1.3.2 Μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των αιθέριων ελαίων**

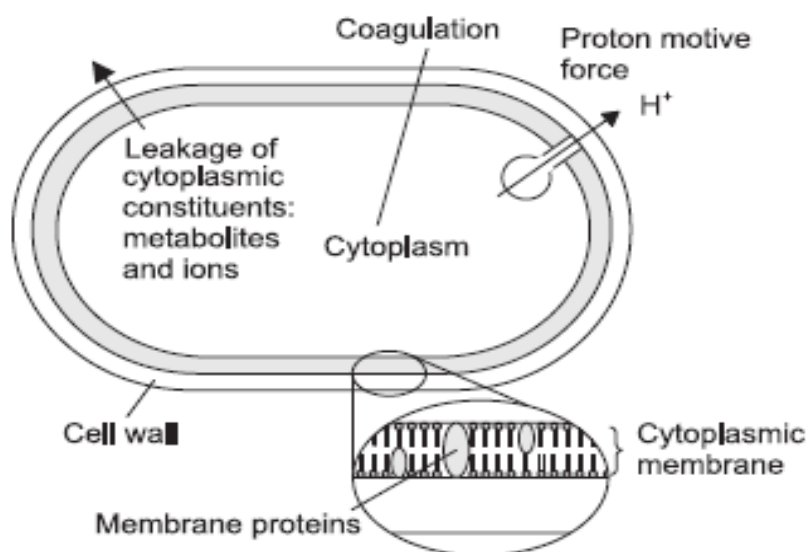
Παρά το γεγονός ότι οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους, έχουν αναθεωρηθεί στο παρελθόν (Shelef, 1983; Nychas, 1995), ο μηχανισμός δράσης δεν έχει μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια (Lambert et al., 2001).



Λαμβάνοντας υπόψη τον μεγάλο αριθμό των διαφορετικών ομάδων των χημικών ενώσεων που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια, το πιθανότερο είναι ότι η αντιμικροβιακή τους δράση δεν μπορεί να αποδοθεί σε ένα συγκεκριμένο μηχανισμό, αλλά υπάρχουν αρκετοί στόχοι στο βακτηριακό κύτταρο (Skandamis et al., 2001; Carson et al., 2002). Οι θέσεις ή οι μηχανισμοί στα βακτηριακά κύτταρα που θεωρείται ότι είναι θέσεις δράσης των συστατικών των αιθέριων ελαίων φαίνονται στο εικόνα 2. Αυτοί οι μηχανισμοί δεν είναι όλοι χωριστοί στόχοι, αλλά το ότι μερικοί επηρεάζονται αποτελεί συνέπεια ενός άλλου μηχανισμού που βρίσκεται στο στόχαστρο (Burt, 2004).

Τα αιθέρια έλαια περιλαμβάνουν ένα μεγάλο αριθμό συστατικών και είναι πιθανό ο τρόπος δράσης τους να περιλαμβάνει αρκετούς στόχους στο βακτηριακό κύτταρο. Η υδροφοβικότητα των αιθέριων ελαίων τους επιτρέπει να στεγανοποιηθούν στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και στα μιτοχόνδρια, καθιστώντας τα διαπερατά και οδηγώντας έτσι σε διαρροή του περιεχομένου του κυττάρου. Διαρροή των ιόντων και άλλων περιεχομένων του κελιού μπορεί στη συνέχεια να συμβούν. Αν και ένα ορισμένο ποσό της διαρροής από βακτηριακά κύτταρα μπορεί να είναι ανεκτό χωρίς να έχει ως συνέπεια την απώλεια της βιωσιμότητας, η εκτεταμένη απώλεια του περιεχομένου του κυττάρου ή η έξοδος των κρίσιμων μορίων και ιόντων θα οδηγήσει σε θάνατο. Γενικώς, τα αιθέρια έλαια που διαθέτουν τις ισχυρότερες αντιβακτηριδιακές ιδιότητες κατά των τροφιμογενών παθογόνων περιέχουν υψηλό ποσοστό φαινολικών ενώσεων, όπως η καρβακρόλη, ευγενόλη (2-μεθοξυ-4-(2-προπενυλο) φαινόλη) και θυμόλη (Burt, 2004). Η καρβακρόλη είναι ένα από τα πιο κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου ρίγανης και θυμαριού. Συστατικά των αιθέριων ελαίων επίσης, φαίνεται να δρουν στις πρωτεΐνες των κυττάρων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Knobloch et al., 1989). Ένζυμα όπως οι ΑΤΡάσες είναι γνωστό ότι βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και συνορεύουν μόρια λιπιδίων. Δύο πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί σύμφωνα με τους οποίους κυκλικοί υδρογονάνθρακες θα μπορούσαν να λειτουργήσουν σε αυτά. Λιπόφιλα μόρια υδρογονανθράκων θα μπορούσαν να συσσωρευτούν στη λιπιδική διπλοστοιβάδα και να στρεβλώσουν την αλληλεπίδραση λιπιδίου-πρωτεΐνης: εναλλακτικά, είναι δυνατή η άμεση

αλληλεπίδραση των λιπόφιλων ενώσεων με τα υδρόφοβα τμήματα της πρωτεΐνης (Juven et al., 1994; Sikkema et al., 1995).



**Εικόνα 2:** Περιοχές και μηχανισμοί στο βακτηριακό κύτταρο που θεωρείται ότι είναι θέσεις δράσης των συστατικών του αιθέριου ελαίου (Burt, 2004): αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος, ζημιά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ζημιά στις μεμβρανικές πρωτεΐνες, διαρροή του περιεχομένου των κυττάρων, πήξη του κυτταροπλάσματος και μείωση της δύναμης των πρωτονίων.

### 1.3.3 Ευαισθησία των gram-αρνητικών και των gram-θετικών οργανισμών

Οι περισσότερες μελέτες που διερευνούν τη δράση όλων των αιθέριων ελαίων κατά των οργανισμών που προκαλούν αλλοίωση στα τρόφιμα και κατά των τροφιμογενών παθογόνων συμφωνούν ότι, σε γενικές γραμμές, τα αιθέρια έλαια είναι ελαφρώς πιο δραστικά στα gram-θετικά σε σχέση με τα gram-αρνητικά βακτήρια (Burt, 2004). Το γεγονός ότι τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στη δράση των αντιβακτηριακών ίσως πρέπει να αναμένεται, δεδομένου ότι διαθέτουν μία εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα (Ratledge and Wilkinson, 1988), που περιορίζει τη διάχυση των υδρόφοβων ενώσεων διαμέσου του στρώματος από λιποπολυσακχαρίτη (Vaara, 1992).

Σε μία μελέτη δεν υπήρχε καμία προφανής διαφορά μεταξύ των gram-θετικών και των gram-αρνητικών βακτηρίων όσον αφορά την ευαισθησία μετά από 24 ώρες, αλλά η ανασταλτική δράση επεκτάθηκε πιο γρήγορα μέσα σε 48 ώρες στα

gram αρνητικά από ό,τι στους θετικούς κατά gram οργανισμούς (Ouattara et al., 1997). Μια μελέτη που εξέτασε 50 διαθέσιμα στο εμπόριο αιθέρια έλαια δεν βρήκε κανένα στοιχείο που να αποδεικνύει τη διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ gram αρνητικών και gram-θετικών οργανισμών (Deans and Ritchie, 1987). Ωστόσο, μια μεταγενέστερη μελέτη με τη χρήση της ίδιας μεθόδου δοκιμής και τις ίδιες βακτηριακές απομονώσεις αλλά προφανώς χρησιμοποιώντας αιθέρια έλαια στα οποία είχε πραγματοποιηθεί πρόσφατη απόσταξη αποκάλυψε ότι, τα gram-θετικά βακτήρια ήταν πράγματι πιο επιρρεπή σε δύο από τα αιθέρια έλαια που δοκιμάστηκαν και εξίσου ευαίσθητα σε άλλα τέσσερα από ότι ήταν τα κατά gram αρνητικά βακτήρια (Dorman and Deans, 2000). Είχε υποτεθεί ότι τα μεμονωμένα συστατικά των αιθέριων ελαίων εμφανίζουν διαφορετικούς βαθμούς δραστηριότητας έναντι των gram-θετικών και των gram-αρνητικών βακτηρίων (Dorman και Deans, 2000) και είναι γνωστό ότι η χημική σύνθεση του αιθέριου ελαίου από ένα συγκεκριμένο είδος φυτού μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση και την περίοδο συγκομιδής. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό η διαφοροποίηση στη σύνθεση μεταξύ των αιθέριων ελαίων είναι επαρκής για να προκαλέσει μεταβλητότητα στο βαθμό ευαισθησίας των gram-αρνητικών και gram-θετικών βακτηριδίων (Burt, 2004).

#### **1.3.4 Νομοθετικά στοιχεία για τη χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα**

Διάφορα συστατικά των αιθέριων ελαίων θεωρούνται ασφαλή για την υγεία των καταναλωτών και έχουν εγκριθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για χρήση στα τρόφιμα ως βελτιωτικά γεύσης. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται η καρβακρόλη (κύριο συστατικό της ρίγανης), η θυμόλη, η μενθόλη και άλλες (EC/113/2002). Όλες οι εγκεκριμένες από την ΕΕ ουσίες διαθέτουν άδεια για χρήση στα τρόφιμα και στις ΗΠΑ. Οι ουσίες αυτές είναι γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς (GRAS) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) και περιλαμβάνονται στη λίστα "Everything Added to Food in the US" (EAFUS - FDA).

### 1.3.5 Πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Whey)

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος (whey) μπορεί να αποτελέσει φορέα διαφόρων αντιμικροβιακών ουσιών, έχει δηλαδή υψηλό δυναμικό στο να μεταφέρει ενώσεις όπως τα αντιμικροβιακά (Royo et al., 2010), διαδραματίζοντας με αυτόν τον τρόπο σημαντικό ρόλο στην ενεργώ συσκευασία. Η ενσωμάτωσή του αιθέριου ελαίου σε ένα τέτοιο φορέα βοηθάει στην σταδιακή και ελεγχόμενη διάχυσή του στο τρόφιμο.

Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος είναι ένα μέσο με βάση το νερό (υδρόφιλο μέσο), και μέσα σε αυτό μπορεί να δεσμευτεί το αιθέριο έλαιο. Εξαιτίας αυτής της υδρόφιλης φύσης του, έχει φτωχές ιδιότητες φραγμού της υγρασίας και αυτή η ιδιότητα βελτιώνεται με την ενσωμάτωσή του σε υδρόφοβα υλικά όπως τα λιπίδια – συστατικά ελαίων (Seydim & Sarikus, 2006). Η πρωτεΐνη αυτή φέρνει σε άμεση επαφή τον μικροοργανισμό με το αντιμικροβιακό.

Οι Zinoviadou et al., (2009), χρησιμοποίησαν αιθέριο έλαιο ρίγανης για να αναπτύξουν WPI (Whey Protein Isolates) αντιμικροβιακές εδώδιμες μεμβράνες για τη βελτίωση της διατήρησης του βοείου κρέατος. Επίσης, οι Seydim και Sarikus (2006), ανέπτυξαν WPI αντιμικροβιακές εδώδιμες μεμβράνες με αιθέριο έλαιο ρίγανης, σκόρδου και δεντρολίβανου, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης ήταν το πιο αποτελεσματικό εναντίον του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157: H7.

### 1.4 Βακτηριοσίνες - Γενικά

Οι βακτηριοσίνες είναι πεπτίδια με αντιμικροβιακή δράση που συντίθενται στα ριβοσωμάτια και εξάγονται από τα κύτταρα, ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών, για να δράσουν εναντίον άλλων μικροοργανισμών (Cotter et al., 2005).

Οι βακτηριοσίνες οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων, είναι κυρίως αυτές που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία θεωρούνται γενικότερα ασφαλή (GRAS status) (Nettles & Barefoot, 1993). Οι βακτηριοσίνες καθίστανται κατάλληλες για χρήση στη συντήρηση των τροφίμων (Galvez et al., 2007) εξαιτίας πολλών επιθυμητών ιδιοτήτων, όπως:

- Είναι γενικότερα αναγνωρισμένες σαν ασφαλή συστατικά
- Δεν είναι ενεργές ή τοξικές εναντίον των ευκαρυωτικών κυττάρων

- Επηρεάζουν την εντερική χλωρίδα σε μικρό βαθμό
- Παρουσιάζουν αντοχή σε χαμηλό pH και σε υψηλή θερμοκρασία
- Έχουν σχετικά ευρύ αντιμικροβιακό πεδίο, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων που ροκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα ή είναι τροφογενώς παθογόνα

Οι βακτηριοσίνες έχουν βακτηριοστατική ή βακτηριοκτόνο δράση και στόχος τους αποτελεί η κυτταροπλασματική μεμβράνη. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικές κατά των Gram θετικών βακτηρίων, αφού τα Gram αρνητικά βακτήρια προστατεύονται σε σημαντικό βαθμό από τους λιποπολυσακχαρίτες (LPS) της εξωτερικής μεμβράνης τους (Ray, 1993, Abee et al., 1995, Sahl et al., 1995 & Venema et al., 1995). Μόνο όταν για κάποιους λόγους αυξηθεί η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων, μπορεί οι βακτηριοσίνες να γίνουν αποτελεσματικές σε αυτά. Αύξηση της διαπερατότητας των Gram αρνητικών βακτηρίων μπορεί να γίνει με τραυματισμό του κυττάρου (Kalchayanand et al., 1994).

Σύμφωνα με τον Eijsink et al. (2002), οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τα βιοχημικά και γενετικά χαρακτηριστικά τους. Αυτές περιληπτικά είναι:

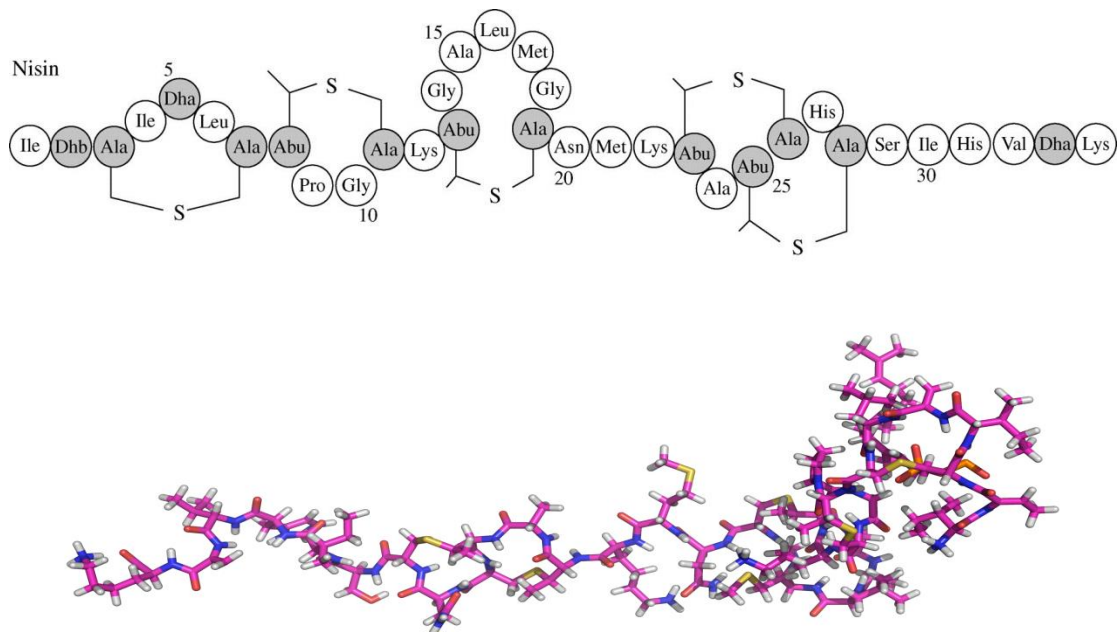
1. Κλάση I (class I): σ' αυτή κατατάσσονται μικρά πεπτίδια (<5 kDa), που διατηρούν τη σταθερότητά τους κατά τη θέρμανση. Περιλαμβάνονται τα λαντιβιοτικά (lantibiotics), που περιέχουν τους χαρακτηριστικούς δακτυλίους της λανθιονίνης και άνυδρα αμινοξέα (Jack & Sahl et al 1995, Ryan et al., 1999). Τα λαντιβιοτικά χωρίζονται σε δύο διαφορετικούς τύπους (Jung, 1991, Sahl et al 1995, Sahl & Bierbaum, 1998).
  - α. Στον τύπο A (type A): στον οποίο ανήκει μεταξύ άλλων η διαδεδομένη βακτηριοσίνη, Νισίνη (nisin), η οποία παράγεται από στελέχη του *Lactococcus lactis* (Papagianni, 2003 & Deegan et al., 2006).
  - β. Στον τύπο B (type B): στον οποίο ανήκουν τα σφαιρικά λαντιβιοτικά με μοριακό βάρος περίπου 2 kDa, όπως η μερσασιδίνη (mersacidin) και η ακταγκαρδίνη (actagardine) (Sahl et al., 1995).
2. Κλάση II (class II): σ' αυτή κατατάσσονται μικρά πεπτίδια (<10 kDa), που δεν περιέχουν λανθιονίνη, είναι ανθεκτικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Σε αυτήν

την κλάση ανήκουν βακτηριοσίνες όπως η γλυκίνη (Ouwehand, 1998, Cintas et al., 2001). Η κλάση II υποδιαιρείται στην υποκλάση IIα με βκτηριοσίνες τύπου της πεδιοσίνης, στην υποκλάση IIβ και στην υποκλάση IIIγ (Eijsink et al., 2002).

3. Κλάση III (class III): σ' αυτή κατατάσσονται μεγάλα πεπτίδια (>30 kDa) που είναι ασταθείς σε υψηλές θερμοκρασίες (Ouwehand, 1998 & Paragianni, 2003).

#### 1.4.1 Νισίνη

Η νισίνη (Nisin) ( $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ ) είναι η μόνη βακτηριοσίνη που χρησιμοποιείται ως βιοσυντηρητικό (biopreservative) σε τρόφιμα (εικόνα 3). Παράγεται από συγκεκριμένα στελέχη *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* και παρουσιάζει ευρύ πεδίο βακτηριοκτόνου δράσης σε Gram θετικά βακτήρια, καθώς επίσης και κατά των *S. aureus* και *L. Monocytogenes* (Hurst, 1981, Cintas et al., 1998). Οι Rogers & Whittier το 1928 ήταν οι πρώτοι που υπέθεσαν την ύπαρξη της νισίνης (Delves-Broughton et al., 1996). Δρα βακτηριολυτικά στα κύτταρα με άμεσα αποτελέσματα που οφείλονται στο διπλό μηχανισμό δράσης της. Μία σημαντική ιδιότητα της νισίνης είναι ότι εμφανίζει το εξωτερικό της τμήμα να είναι περισσότερο υδρόφοβο από το εσωτερικό της τμήμα.



**Εικόνα 3:** Δομή της Νισίνης

Η νισίνη, όσον αφορά την αντιμικροβιακή της ιδιότητα έναντι άλλων αντιμικροβιακών ουσιών, παρουσιάζει αρκετά σημαντικά πλεονεκτήματα, μερικά από τα οποία είναι:

- αποτελεί ουσία αναγνωρισμένη ευρέως ως ασφαλής “GRAS” (FDA, 1988),
- παρουσιάζει σταθερότητα σε συνθήκες κατάψυξης και θερμικής επεξεργασίας,
- είναι ενεργή σε συνθήκες χαμηλού pH (Cutter & Siragusa, 1998, Joerger et al., 2000).

Η νισίνη έχει βακτηριοκτόνο δράση για ένα μεγάλο εύρος Gram θετικών βακτηρίων και αποτρέπει την εκβλάστηση των σπόρων τους. Αντίθετα είναι αναποτελεσματική κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων λόγω του προστατευτικού ρόλου μιας εξωτερικής μεμβράνης που τα περιβάλλει (Hurst & Hoover, 1993).

#### **1.4.2 Νισίνη και Gram αρνητικά βακτήρια**

Μηχανισμός Δράσης: Σύμφωνα με μια πλειοψηφία ερευνητών η νισίνη εμφανίζει αναποτελεσματικότητα κατά της ομάδας των Gram αρνητικών βακτηρίων (όπως το *E. coli* O157:H7), στην οποία ανήκουν πολλά παθογόνα των τροφίμων. Το χαρακτηριστικό αυτό της νισίνης οφείλεται κυρίως στην προστατευτική εξωτερική μεμβράνη, η οποία καλύπτει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από δύο στρώματα, ένα εξωτερικό στρώμα από μόρια λιποπολυσακχαριτών (LPS) και ένα εσωτερικό στρώμα από γλυκεροφωσfolιπίδια. Τα μόρια των λιποπολυσακχαριτών αποτελούνται από ένα λιπιδικό μέρος και ένα σύμπλεγμα ετεροπολυσακχαριτών με ελάχιστα ανιονικό χαρακτήρα και σχηματίζουν ένα συμπαγές στρώμα με υδρόφιλη επιφάνεια (Nikaido, 1996). Ως αποτέλεσμα, η εξωτερική μεμβράνη των Gram αρνητικών βακτηρίων αποτελεί φραγμό για την είσοδο υδρόφοβων ουσιών και μακρομορίων, όπως είναι η νισίνη.

Για να δράσει η νισίνη κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων, πρέπει πρώτα να αρθεί ο φραγμός της προστατευτικής μεμβράνης, δηλαδή να έχουν μερικώς κατεστραμμένο εξωτερικό τοίχωμα (Stevens et al., 1991). Η προσβολή της εξωτερικής τους μεμβράνης, επιτυγχάνεται με τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων (Murdoch et al., 2007 & Solomakos et al., 2008), όπως χηλικών ενώσεων π.χ.: EDTA (Stevens et al., 1991, Cutter & Siragusa, 1995), αιθανόλης

(Brewer et al., 2002), αιθέριων ελαίων βοτάνων (Singh et al., 2001, Dykes et al., 2003) ή με την προσθήκη δακτυλίων  $\text{Ca}^{2+}$  (Stevens et al., 1991). Ακολούθως, μετά την προσβολή της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης, η νισίνη μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και έτσι να γίνεται ενεργή εναντίον του Gram αρνητικού βακτηρίου. Η επίδραση της νισίνης στα Gram-αρνητικά βακτήρια που παρατηρήθηκε από άλλους συγγραφείς θα μπορούσε να οφείλεται σε θερμοκρασίες πάνω από 50 ° C, η οποία μπορεί να επηρεάσει την εξωτερική μεμβράνη (Boziaris et al. 1998).

#### **1.4.3 Χρήση νισίνης σε κρεατοσκευάσματα και άλλα τρόφιμα**

Η προσθήκη νισίνης (5000 IU/g) σε σφάγια μοσχαριών που ενοφθαλμίστηκαν με *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* και *L. Innocua* (4 log cfu/cm<sup>2</sup>), προκάλεσε μείωση των πληθυσμών των μικροβίων κατά 1,8 – 3,5 log cfu/cm<sup>2</sup> αμέσως μετά τον ψεκάσμό της και κατά 2,0-3,6 log cfu/cm<sup>2</sup> μετά από συντήρηση στους 4 °C για μία ημέρα (Cutter & Siragusa, 1994). Όταν η συγκέντρωση της νισίνης σε φρέσκο άπαχο βοδινό κρέας ήταν 10<sup>4</sup> IU/ml, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* μειώθηκε από 10<sup>7</sup>/ml σε λιγότερο από 10/ml σε 30 s (Chung et al., 1989).

Κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 4 °C μαγειρεμένου χοίρειου κρέατος, η προσθήκη νισίνης (10000 IU/g) ανέστειλε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* όχι όμως και της *Pseudomonas fragi*, ενώ σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (80% CO<sub>2</sub> και 2% αέρα) ανέστειλε την ανάπτυξη και των δύο παραπάνω μικροοργανισμών (Fang & Lin, 1994). Επιπλέον, ίδιο τύπο κρέατος με τιμή pH 5,8 ο συνδυασμός νισίνης σε συγκέντρωση 22000 IU/g με 60 ppm νιτρικών αλάτων, δεν μπόρεσε να αποτρέψει την εκβλάστηση σπόρων *Clostridium botulinum*, ενώ αντίθετα σε pH 5,5 ο συνδυασμός νισίνης 8000 IU/g με 60 ppm νιτρικών αλάτων απέτρεψε την εκβλάστηση σπόρων *C. Botulinum* (Rayman et al., 1983).

Σύμφωνα με τη μελέτη που πραγματοποίησε ο Boziaris et al. (1998), η μείωση της τιμής D-value και κατά συνέπεια ο χρόνος θέρμανσης από την παρουσία νισίνης ήταν σημαντική στο ασπράδι του αυγού. Πιο συγκεκριμένα, σε



συγκέντρωση 500 IU/ml δεν παρουσίασε μείωση, αλλά σε συγκέντρωση 1500 IU/ml και 2500 IU/ml η μείωση του D-value ήταν 17,7% και 26,5%, αντίστοιχα.

#### **1.4.4 Νομοθετικά στοιχεία για τη χρήση της νισίνης στα τρόφιμα**

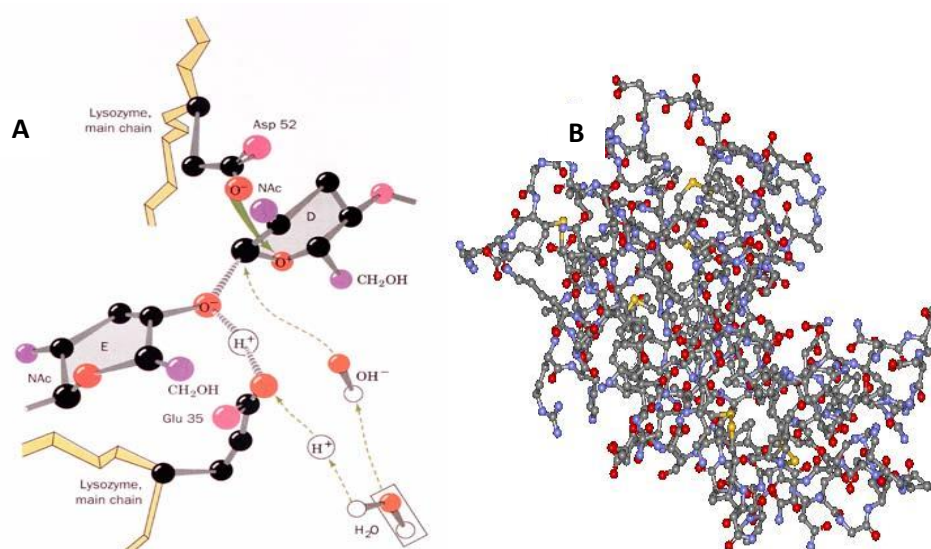
Η νισίνη εγκρίθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση το 1961, με κωδικό E234, ως συντηρητικό (πρόσθετο) κάποιων τροφίμων, πχ.: κονσερβοποιημένα τρόφιμα, παιδικές τροφές, λαχανικά, τυρί και κρέμα που έχουν υποστεί ζύμωση (Οδηγία 95/2/EK της ΕΕ) (Hurst, 1981). Κυκλοφορεί με το εμπορικό σκεύασμα Nisaplin (Delves-Broughton et al., 1996) και είναι εγκεκριμένη σε πάνω από 50 χώρες παγκοσμίως για τη χρήση της στη βιομηχανία τροφίμων (Jay, 2000) ως ασφαλές συντηρητικό (GRAS status). Για να εγκριθεί η νισίνη σε όλες αυτές τις χώρες εξετάστηκε και κρίθηκε ασφαλής σε πειραματόζωα, αφού δεν παρατηρήθηκαν τοξικές επιδράσεις στον οργανισμό τους (Frazer et al., 1962).

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (FAO), ως μέγιστη ημερήσια δόση για άτομο 70 κιλών, συνιστανται τα 60 mg ή 3000 IU (Hurst & Hover, 1993). Αντίθετα, στις ΗΠΑ το μέγιστο επιτρεπόμενο όριο για χρήση σε επεξεργασμένα τυριά είναι 10000 IU/g, ενώ στη Ρωσία είναι 8000 IU/g. Επιπλέον, σε Αργεντινή, Ιταλία και Μεξικό το όριο είναι 500 IU/g στα επεξεργασμένα τυριά και άλλα προϊόντα (Chikindas & Montville, 2002). Τα βασικότερα εμπόδια για την ευρύτερη χρήση της νισίνης στα τρόφιμα είναι το υψηλό κόστος παρασκευής και η αναποτελεσματικότητα κατά των Gram αρνητικών βακτηρίων.

#### **1.5 Λυσοζύμη**

Η λυσοζύμη ανακαλύφθηκε από τον Alexander Fleming, το 1922, και ονομάστηκε λυσοζύμη- λύσο λόγω της ικανότητας να λύει τα βακτήρια και ζύμη γιατί ήταν ένα ένζυμο (Stryer, 1988). Η λυσοζύμη είναι 1,4-β-N-ακετυλομουραμιδάση (Nakimbugwe et al., 2006) και πρόκειται για ένα συμπαγές, σχετικά μικρό ένζυμο με MW 14,6 kDa, με ελλειψοειδές σχήμα και με διαστάσεις 45x30x30 Å (Εικόνα 1.3). Ένα από τα 6 είδη λυσοζύμης που υπάρχουν, σύμφωνα με τον Sonomi Hikima et al., (2003), είναι η λυσοζύμη τύπου κοτόπουλου (chicken-

type, c-τύπου ή HEW, Hen Egg White λυσιζύμη) η οποία υπάρχει στο άσπρο του αυγού του κοτόπουλου.



**Εικόνα 4: A).** Μηχανισμός Λυσοζύμης (hen egg white lysozyme), (Voet et al., 1995).

**B).** Η δομή της λυσοζύμης. Τα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου και θείου είναι χρωματισμένα με γκρι, μπλε, κόκκινο και κίτρινο αντίστοιχα.

Τα ένζυμα αυτά βρίσκονται στα φυτά και στα ζώα ως φυσικά προϊόντα, τα οποία συνιστούν ένα φυσικό αμυντικό μηχανισμό έναντι των μικροοργανισμών (Nakimbugwe et al., 2006). Η λυσοζύμη με κωδικό E1105 ως συντηρητικό υπάρχει και σε πολλά τρόφιμα (Κατάλογος πρόσθετων τροφίμων E, *Codex Alimentarius*, INS). Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει σε αφθονία στο λεύκωμα των αυγών, στο αγελαδινό γάλα (Conner, 1993), στο ανθρώπινο πρωτόγαλα (Mathur et al., 1990), στο κουνουπίδι και στο λάχανο (Proctor & Cunningham, 1988). Το ένζυμο από το ασπράδι του αυγού της κότας, που είναι μια πλούσια πηγή λυσοζύμης, είναι ένα πολυπεπτίδιο που αποτελείται από 129 αμινοξέα (Stryer, 1997).

Η λυσοζύμη που απομονώνεται από το λεύκωμα του αυγού από κοτόπουλο είναι η μοναδική μορφή που επιτρέπεται να χρησιμοποιείται από βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων πάντα σε συμφωνία με τους παραγωγούς (WHO, 1993). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση προστίθεται σε συγκεκριμένα προϊόντα όπως ημίσκληρα τυριά, με σκοπό τον έλεγχο της ζύμωσης του γαλακτικού οξέος από το μικροοργανισμό *Cl. tyrobutyricum*, καθώς επίσης και κατά την παραγωγή κρασιών, με σκοπό τον έλεγχο των μολύνσεων. Παγκοσμίως χρησιμοποιείται ως συντηρητικό στα τυριά, τα

θαλασσινά, τα φρούτα και τα λαχανικά, τη μύρα και τα κρασιά, καθώς επίσης και στην παρασκευή φαρμάκων (Losso et al., 2000). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της λυσοζύμης από ασπράδι αυγού κοτόπουλου είναι περιορισμένη διότι Gram-αρνητικά βακτήρια είναι ανθεκτικά και μπορούν να αναπτύσσονται σε υψηλά επίπεδα (Bera et al., 2005). Επιπλέον, η λυσοζύμη είναι το ένζυμο το οποίο συνήθως προστίθεται στα υλικά συσκευασίας των τροφίμων ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Han, 2005, Mecitoglu et al., 2006, Park et al., 2004), σε καθαρή μορφή σε πολύ μεγάλο βαθμό. Έχει αναφερθεί ότι περιέχει συνήθως 1-6% w/wπροσμίξεις πρωτεϊνών και έχει υψηλή ενζυμική δραστηριότητα μεταξύ 20000-100000 IU/mg (Judge et al., 1998).

### **1.5.1 Μηχανισμός δράσης Λυσοζύμης**

Σύμφωνα με τους Ibrahim et al. (2001), πιστεύεται ότι η αντιμικροβιακή δράση της λυσοζύμης αποδίδεται κυρίως στην καταλυτική λειτουργία των βακτηριακών κυττάρων.

Η πεπτιδογλυκάνη (μουρεΐνη) είναι ο πολυσακχαρίτης των κυτταρικών τοιχωμάτων, η οποία αποτελείται από σάκχαρα και αμινοξέα. Πιο συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο είδη (δι-)σακχάρων: την N-ακετυλογλυκοζαμίνη (NAG) και το N-ακετυλομουραμικό (NAM), τα οποία είναι παράγωγα της γλυκοζαμίνης. Στα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων, η NAG και το NAM συνδέονται με γλυκοζιτικό δεσμό μεταξύ του C-1 του ενός σακχάρου και του C-4 του άλλου με διαμόρφωση β, με τον δεσμό αυτό να είναι τοποθετημένος πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου. Η NAG και το NAM εναλλάσσονται σε αλληλουχία και σχηματίζουν στην πεπτιδογλυκάνη, μια πολυσακχαρική αλυσίδα, ενωμένη με (Johnson, 1994, Taylor & Leach, 1995).

Η πεπτιδογλυκάνη ένα από τα κυριότερα συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων τόσο των Gram-θετικών όσο και των Gram-αρνητικών βακτηρίων (Gill & Holey, 2000), η οποία εξασφαλίζει στα βακτήρια το σχήμα τους (Masschalck & Michiels, 2003). Η λυσοζύμη όταν έρθει σε επαφή με το κυτταρικό τοίχωμα διασπά τα πολυσακχαριτικά συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων. Λύει τα κύτταρα μέσω της καταστροφής της πεπτιδογλυκάνης (καταλύει δηλαδή τους β-

1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των NAG και NAM), και κατά συνέπεια καταστρέφεται το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου (Mecitoglu et al., 2006). Ο ρόλος του κυτταρικού τοιχώματος στα βακτήρια είναι η παροχή μηχανικής υποστήριξης. Ένα βακτηριακό κύτταρο που δεν διαθέτει βακτηριακό τοίχωμα, σπάει λόγω υψηλής ωσμωτικής πίεσης στο εσωτερικό του κυττάρου (Masschalck & Michiels, 2003).

### **1.5.2 Λυσοζύμη και Gram-αρνητικά βακτήρια**

Τα περισσότερα βακτήρια δεν θανατώνονται αλλά κάποια γίνονται πιο ευαίσθητα σε άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες, καθώς επίσης και το ωσμωτικό στρες. Η λυσοζύμη είναι δραστική έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων και ιδιαίτερα των θερμόφιλων, τα οποία σχηματίζουν σπορογόνες μορφές (James & Simpson, 1996). Τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι ανθεκτικά στη δράση της λυσοζύμης, εξαιτίας της εξωτερικής μεμβράνης που έχουν η οποία περιβάλλει τη στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης, ενώ τα Gram-θετικά βακτήρια είναι ευαίσθητα διότι η πεπτιδογλυκάνη του τοιχώματός τους, που υπάρχει σε ποσοστό 90% είναι εκτεθειμένη και έρχεται σε άμεση επαφή με τη λυσοζύμη κατά την προσθήκη της στα τρόφιμα (Mecitoglu et al., 2006).

Η αντιμικροβιακή δράση της λυσοζύμης έναντι της ανάπτυξης κάποιων παθογόνων μικροοργανισμών είναι ασθενής, ιδίως έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Αλλά η δράση αυτή ενισχύεται από άλλες ουσίες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ή χηλικούς παράγοντες όπως το EDTA. Αυτοί οι συμπαράγοντες διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, ανοίγουν πόρους και επιτρέπουν στη λυσοζύμη να διεισδύσει στο κύτταρο, να έρθει σε επαφή με την πεπτιδογλυκάνη και να την καταστρέψει (Masschalck & Michiels, 2003).

Η ευαισθησία των Gram-αρνητικών βακτηρίων μπορεί να επηρεαστεί και να αυξηθεί από το στρες που προκαλείται από το περιβάλλον όπου βρίσκονται και το οποίο μπορεί να αποδυναμώνει την εξωτερική τους μεμβράνη (Wilkins & Board, 1989), από το pH, τη θερμοκρασία και την απομάκρυνση ιόντων  $Ca^{2+}$  ή  $Mg^{2+}$  από την προσθήκη κάποιου χηλικού παράγοντα όπως το EDTA (Masschalck & Michiels, 2003).

Υπάρχουν, αναφορές που βασίζονται σε μοναδικές βακτηριοκτόνες ιδιότητες που παρατηρήθηκαν με μερικώς ή πλήρως μετουσιωμένη λυσοζύμη, η οποία έχει μειωμένη ή καθόλου ενζυματική δραστηριότητα έναντι τόσο των gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηρίων. Για παράδειγμα, οι Ibrahim et al. έδειξαν απενεργοποίηση ενός στελέχους του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli* K-12 με θερμικά-μετουσιωμένη λυσοζύμη, το οποίο (*E. coli*) δεν ήταν σχετικά ευαίσθητο σε φυσική λυσοζύμη. Οι During et al. έδειξαν ότι η φυσική και θερμικά επεξεργασμένη, ενζυματικά αδρανής λυσοζύμη από το κολιφάγο T4 προκάλεσε παρόμοια επίπεδα αδρανοποίησης σε ένα συγκεκριμένο στέλεχος *E. coli*. Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες της μετουσιωμένης λυσοζύμης έχουν προταθεί για να προκύψουν από την κατιονική φύση του πεπτιδίου σε συνδυασμό με διαμορφωτικές αλλαγές που οδηγούν σε αυξημένη υδροφοβικότητα.

### **1.6 Χοιρινός κιμάς**

Τα προϊόντα χοιρινού αποτελούν μία ομάδα τροφίμων εξαιρετικά ευαλλοίωτη, συγκριτικά με άλλα προϊόντα τροφίμων. Ο κιμάς σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) 853/2004 ορίζεται ως το κρέας χωρίς οστά το οποίο έχει υποστεί άλεσμα σε τεμάχια και περιέχει αλάτι σε ποσοστό μικρότερο του 1%. Στη χώρα μας η νομοθεσία που αφορά τον μικροβιολογικό έλεγχο του κιμά καλύπτεται από τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 2079/2005 της Επιτροπής της 15<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. Σύμφωνα με τον Κανονισμό αυτό τα μικροβιολογικά κριτήρια που αφορούν τον κιμά διακρίνονται σε «κριτήρια ασφάλειας» και «κριτήρια υγιεινής της παραγωγικής διαδικασίας» (ΕΚ αριθμ. 2073/2005).

### **1.7 Συσκευασία**

Βασικός στόχος της συσκευασίας των τροφίμων είναι να επιμηκύνει τη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος δηλαδή, το χρόνο ζωής του. Για το σκοπό αυτό, η συσκευασία πρέπει να διατηρήσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου που συντηρείται υπό ψύξη και, κυρίως, την ελκυστική του εμφάνιση, η οποία επηρεάζεται κατά κύριο λόγο από το χρώμα. Παράλληλα, πρέπει να

εμποδίζει την ανάπτυξη των αυστηρά αερόβιων και των προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων που προκαλούν σοβαρές αλλοιώσεις στο συσκευασμένο κρέας και να επιβραδύνει την ανάπτυξη των αναερόβιων βακτηρίων που προκαλούν λιγότερο σημαντικές αλλοιώσεις στα συσκευασμένα τρόφιμα. Τέλος, πρέπει να ελαχιστοποιήσει την έξοδο οπού, αφενός επειδή συνεπάγεται απώλειες βάρους που έχουν οικονομικές επιπτώσεις και αφετέρου επηρεάζει αρνητικά την εμφάνιση και τη διάρκεια συντήρησης του κρέατος, αφού ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Μπλούκας, 2004, Μπλούκας, 2006).

Στη συσκευασία τροφίμων χρησιμοποιούνται πολλά είδη υλικών όπως τα πλαστικά. Για τη συσκευασία των τροφίμων σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα / υπό κενό, χρησιμοποιούνται εύκαμπτα (όπως πολυαιθυλένιο – PE, το πολυπροπυλένιο – PP, το πολυαμίδιο – PA ή το πολυβινυλοχλωρίδιο - PVC) και ημιεύκαμπτα πλαστικά, καθώς και πολυστρωτικά υλικά.

#### **1.7.1 Συσκευασία υπό κενό**

Η συσκευασία υπό κενό (vacuum packaging) θεωρείται σημαντική εξέλιξη στη μεταχείριση και εμπορία του κρέατος. Είναι η συσκευασία στην οποία το τρόφιμο τοποθετείται σε υλικό συσκευασίας, το οποίο έχει χαμηλή διαπερατότητα στα αέρια, ενώ κατά τη σφράγιση του περιέκτη (θερμοσυγκόλληση) απομακρύνεται ο αέρας από το εσωτερικό της συσκευασίας, με αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης των αερόβιων βακτηρίων και την ελάττωση της αλλοίωσης λόγω οξείδωσης (Robertson, 1993). Όσο μικρότερη είναι η διαπερατότητα του περιέκτη σε αέρια ( $O_2$  και  $CO_2$ ) τόσο περιορίζεται η συγκέντρωση σε οξυγόνο και αυξάνει σε  $CO_2$  και τόσο περισσότερο επιβραδύνεται η ανάπτυξη των βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις στο κρέας, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάρκεια συντήρησής του (Μπλούκας, 2004, Μπλούκας, 2006).

Η συσκευασία υπό κενό επιτυγχάνεται τοποθετώντας αρχικά τα τρόφιμα σε πλαστικές σακούλες, κατόπιν απομακρύνεται ο αέρας με ειδικό κλειστικό κενού και τελικά οι σακούλες κλείνονται με θερμοσυγκόλληση. Από μικροβιολογική άποψη, η πιο σημαντική επίδραση της επεξεργασίας αυτής είναι η μεταβολή του αέριου περιβάλλοντος του προϊόντος (Jay, 1996). Ο μέγιστος χρόνος συντήρησης υπό κενό μεγάλων τεμαχίων χοιρινού είναι 4-6 εβδομάδες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Μικροοργανισμός *Escherichia coli* 0157:H7

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα (εμβολιασμού) κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι ο παθογόνος μικροοργανισμός *Escherichia coli* 0157:H7, μίγμα τριών στελεχών (NCTC 12079, NCTC 13125, NCTC 13127). Τα στελέχη διατηρούνταν στους -22 °C, σε Nutrient broth παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 20% του συνολικού όγκου, στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων (Ε.Π.Ε.Υ.Τ.) του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

#### 2.2 Φυσικές Αντιμικροβιακές Ουσίες

Στην παρούσα μελέτη οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η Νισίνη (Nisin - from *Lactococcus lactis*, Sigma), η Λυσοζύμη (Lysozyme - from chicken egg white, Applichem) και το αιθέριο έλαιο ρίγανης (*Origanum Essential Oil* – *Origanum vulgare*). Είναι απαραίτητο να σημειώσουμε ότι, το αιθέριο έλαιο ρίγανης χρησιμοποιήθηκε είτε απευθείας στον κιμά είτε μετά από ενσωμάτωσή του σε διάλυμα κλάσματος πρωτεΐνης τυρογάλακτος (whey) και λυοφιλίωση.

#### 2.3 Θρεπτικά Υποστρώματα

Ως θρεπτικά υλικά σε όλη την πειραματική διαδικασία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα στερεά σε μορφή σκόνης υποστρώματα:

- **SMAC:** γνωστό με την ονομασία Sorbitol MacConkey Agar (SMAC), είναι ένα μερικώς εκλεκτικό διαφορικό υλικό για την απομόνωση του *E. Coli* 0157:H7 από δείγματα. Η προσθήκη στο SMAC εκλεκτικού συμπληρώματος (αντιβιοτικού) cefixime & tellurite (CT- SMAC) αυξάνει την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα για την απομόνωση του *E. Coli* 0157:H3.4. Στο συγκεκριμένο υλικό οι αποικίες του παθογόνου που αναπτύσσονται έχουν μία καφέ-ροζ απόχρωση.
- **TSA:** γνωστό με την ονομασία Trypticase Soy Agar (TSA), είναι ένα υλικό γενικής χρήσης που υποστηρίζει την ανάπτυξη μη απαιτητικών καθώς και

μέτρια απαιτητικών μικροοργανισμών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης ως υλικό για την καλλιέργεια βακτηρίων π.χ. *Enterobacteriaceae*. Στο συγκεκριμένο υλικό οι αποικίες του παθογόνου που αναπτύσσονται έχουν μία ανοιχτή κίτρινη απόχρωση.

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το υγρό σε μορφή σκόνης υλικό, TSB. Το TSB γνωστό με την ονομασία Tryptic Soy Broth είναι ένα υγρό μέσο εμπλουτισμού γενικής χρήσης και χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια αερόβιων μικροοργανισμών. Είναι αρχικά σε μορφή σκόνης και αργότερα γίνεται υγρό και τοποθετείται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.

#### **2.4 Ανόργανα χημικά αντιδραστήρια**

Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Πυρουβικό Οξύ (Pyruvic acid sodium salt) ή πυροσταφυλικό οξύ.

#### **2.5 Πειραματικός σχεδιασμός**

Αρχικά παρατίθενται περιληπτικά όλα τα στάδια του πειραματικού σχεδιασμού, ο οποίος συνοδεύεται από διάγραμμα ροής αυτού και των μικροβιακών χειρισμών που πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες κάθε φορά, και ακολουθεί αναλυτικά η περιγραφή των σταδίων αυτών.

Συσκευασία ολόκληρου τεμαχίου χοιρινού κρέατος (λαιμός) 6 κιλών παρελήφθη και μεταφέρθηκε στον εργαστηριακό χώρο και εν συνεχεία τεμαχίστηκε και παρασκευάστηκε φρέσκος κιμάς με χρήση κιμαδομηχανής. Στόχος αυτής της τεχνικής ήταν η επίτευξη του χαμηλότερου δυνατού αρχικού μικροβιακού φορτίου στον υπό εξέταση κιμά. Μετά από ενοφθαλμισμό του κιμά σε επίπεδα 6,0 – 6,5 log CFU/g, παρασκευάστηκαν δείγματα 10 γραμμαρίων τα οποία μορφοποιήθηκαν σε λεπτά μπιφτέκια (πάχους 3 χιλιοστών περίπου), με σκοπό την άμεση μεταφορά της θερμοκρασίας στο γεωμετρικό κέντρο των δειγμάτων κατά την θερμική επεξεργασία. Εν συνεχεία προστέθηκαν τα αντίστοιχα αντιμικροβιακά σε κάθε περίπτωση:

1. Νισίνη
2. Λυσοζύμη



3. Αιθέριο έλαιο ρίγανης μετά από ενσωμάτωσή του σε διάλυμα κλάσματος πρωτεΐνης τυρογάλακτος (whey).

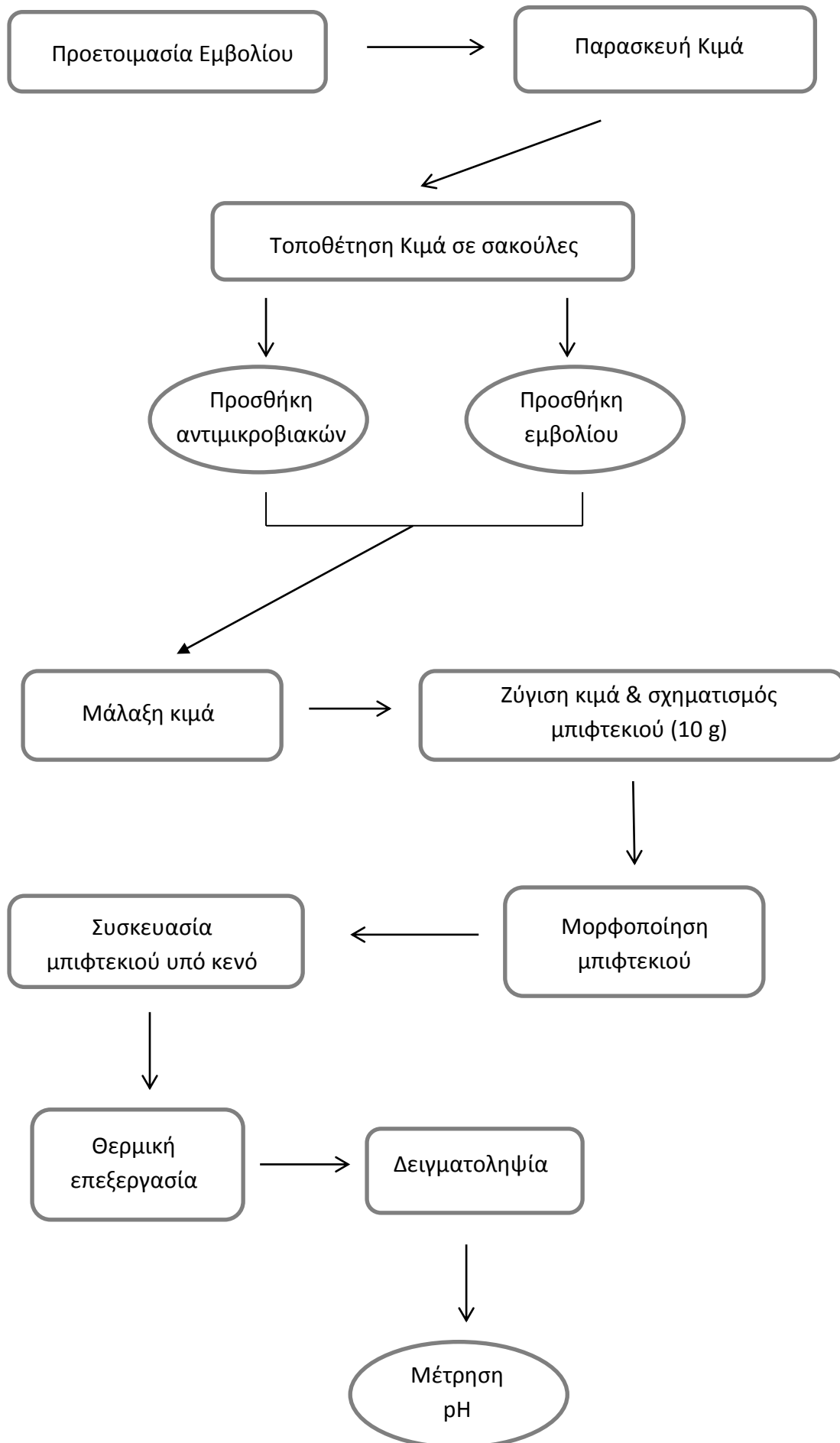
Συνολικά, οι περιπτώσεις οι οποίες μελετήθηκαν ήταν οι εξής:

1. Μάρτυρας (χωρίς αντιμικροβιακές ουσίες)
2. 0,1% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
3. 0,3% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
4. 0,5% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
5. Νισίνη (500 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
6. Νισίνη (1500 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
7. Νισίνη (5000 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
8. Νισίνη (500 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
9. Νισίνη (1500 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
10. Νισίνη (5000 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
11. Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
12. Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
13. Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,1 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
14. Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
15. Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης
16. Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,3 % v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης

Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 4 °C για 12 ημέρες (χρόνος οργανοληπτικής απόρριψης). Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε κατά την 0<sup>η</sup> και 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης των αντιμικροβιακών ουσιών στην επιβίωση του παθογόνου.

Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 60 °C ήταν 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 min τη 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 64 °C ήταν 0, 60, 90, 120, 150 και 210 sec τη 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 68 °C ήταν 0, 8, 16, 24, 32, 40 και 50 sec τη 0η ημέρα και 0, 15, 30, 40, 50, 60 και 70 sec τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 71 °C ήταν 0, 8, 16, 24, 32, 40 και 50 sec τη 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Εικόνα 5: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας.



### 2.5.1 Ανανέωση του μικροοργανισμού – Προετοιμασία εμβολίου

Πριν τον ενοφθαλμισμό του μικροοργανισμού σε κάποιο υπόστρωμα, προηγείται το στάδιο της ανανέωσης των τριών στελεχών του υπό ασηπτικές συνθήκες, προκειμένου να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να καταστούν άμεσα έτοιμοι για ανάπτυξη. Η ανανέωση του μικροοργανισμού διαρκεί 18 - 24 ώρες. Είναι υποχρεωτικές δύο ανανεώσεις με στόχο τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα όσον αφορά την αναζωογόνηση και τη διατήρηση της ζωτικότητας του μικροοργανισμού. Κάθε στέλεχος αναπτύσσεται σε 10 ml μη-επιλεκτικού, υγρού, θρεπτικού υποστρώματος TSB (Tryptone Soy Broth) στους 37°C για 24 ώρες (1<sup>η</sup> ανανέωση). Μετά το πέρας 18 ωρών και αφού από την ανανεωμένη καλλιέργεια μεταφερθούν 100 ml μέσα σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν περίπου 10 ml TSB, ακολουθεί ξανά επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 37 °C (2<sup>η</sup> ανανέωση). Σε αυτή την φάση η συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων ήταν περίπου 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> cfu/ml. Μετά από 18 – 24 ώρες πραγματοποιείται καθαρισμός του εμβολίου. Αρχικά, γίνεται ανάμιξη-vortex (Si<sup>TM</sup> Scientific Industries) του γυάλινου περιέκτη που περιέχει TSB και το εμβόλιο, αμέσως μετά απόρριψη του περιεχομένου σε πλαστικούς περιέκτες φυγοκέντρησης (falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση (φυγόκεντρος – Heraeus Instruments) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C στις 3600 rpm. Έπειτα, το υπερκείμενο κάθε στελέχους απορρίφθηκε και η παραλαμβανόμενη από τη φυγοκέντρηση βιομάζα (ίζημα) επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer 10 ml. Το στάδιο του καθαρισμού (έκπλυσης) επαναλήφθηκε δύο φορές. Τέλος, αφού έγινε παραλαβή της ποσότητας εμβολίου από κάθε στέλεχος (NCTC 12079, NCTC 13125, NCTC 13127), τα στελέχη αναμίχθηκαν σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη duran 100 ml και το μίγμα αυτό αποτέλεσε το τελικό εμβόλιο. Σε κάθε πείραμα, η εκτίμηση της συγκέντρωσης του αρχικού εμβολίου γινόταν με την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων μετά από δεκαδικές αραιώσεις [ISO 16654:2001 (E) & ISO 16649-2:2001(E)] .

### 2.5.2 Παρασκευή Δειγμάτων

Τη μηδενική ημέρα παρελήφθη συσκευασία ολόκληρου τεμαχίου χοιρινού κρέατος (λαιμός) 6 κιλών, μεταφέρθηκε στο εργαστήριο και συντηρήθηκε σε θερμοκρασία 1°C μέχρι να γίνει κιμαδοποίηση του. Στον εργαστηριακό χώρο ακολουθούσε τεμαχισμός του τεμαχίου χοιρινού κρέατος και παρασκευή φρέσκου κιμά με χρήση ειδικής μηχανής επεξεργασίας κρέατος – κιμαδομηχανής (Kenwood MG510, China). Οι ποσότητες κιμά που παράγονταν, διαχωρίζονταν σε σακούλες των 360 g, συσκευάζονταν υπό κενό και συντηρούνταν σε θερμοκρασία 1°C για μία μέρα. Το βάρος κάθε σακούλας υπολογιζόταν έτσι ώστε να εξασφαλίζονται 36 δείγματα των 10 g για μετέπειτα συσκευασία σε κενό. Την επόμενη μέρα, σε κάθε σακούλα των 360 g χοιρινού κιμά προστίθενται οι κατάλληλες ποσότητες των αντιμικροβιακών ανάλογα την μεταχείριση και η κατάλληλη ποσότητα από το μίγμα των τριών στελεχών *E. coli* O157:H7, ώστε να επιτευχθεί αρχικό εμβόλιο 360 ml μπιφτεκιού. Ακολούθησε μάλαξη με τα χέρια για 1 λεπτό με σκοπό την κατάλληλη κατανομή του εμβολίου σε όλη τη μάζα του κιμά. Στη συνέχεια, παραλαμβάνονταν ποσότητα κιμά από τη σακούλα και κατόπιν ζυγιζόταν με τη βοήθεια αναλυτικού ζυγού με στόχο την επίτευξη κιμά βάρους 10 g. Αμέσως μετά πραγματοποιούταν ελαφριά μάλαξη του κιμά ώστε να προκύψει μπιφτεκάκι με σφαιρικό σχήμα. Τελικά, από την σακούλα προέκυπταν συνολικά 36 μπιφτεκάκια βάρους 10 g το καθένα. Με τη βοήθεια μεταλλικής στεφάνης (τσέρκι-*cerchi*) μορφοποιήθηκαν σε λεπτά μπιφτεκάκια (πάχους περίπου 3-4 cm) με στόχο την άμεση μεταφορά της θερμοκρασίας στο γεωμετρικό κέντρο των δειγμάτων κατά την θερμική επεξεργασία. Σημειώνουμε ότι, μπιφτεκάκια χωρίς αντιμικροβιακές ουσίες αποτέλεσαν τους κύριους μάρτυρες του πειραματικού σχεδιασμού. Τέλος, τα δείγματα συσκευάστηκαν σε πλαστική σακούλα στο κενό και συντηρήθηκαν στους 5 °C συνολικά για 12 ημέρες, με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης των αντιμικροβιακών ουσιών στην επιβίωση του παθογόνου. Οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν ήταν τη 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, η τελευταία από τις οποίες αποτελεί τον χρόνο οργανοληπτικής απόρριψης.

### 2.5.3 Θερμική επεξεργασία χοιρινών μπιφτεκιών

Κατά την 0η και 12η ημέρα, δείγματα μαρτύρων και δείγματα με μίγμα αντιμικροβιακών ουσιών εκτέθηκαν σε θερμική καταπόνηση στους 60 °C , 64 °C, 68 °C και 71 °C εντός υδατόλουτρου (Stuart, SBS40). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, τρία δείγματα απομακρύνονταν από το υδατόλουτρο και εμβαπτιζόνταν σε κρύο νερό (0 °C) για άμεση πτώση της θερμοκρασίας. Η επίδραση των αντιμικροβιακών ουσιών στην επιβίωση του παθογόνου *E. coli* 0157:H7 κατά τη θερμική επεξεργασία χοιρινών μπιφτεκιών εκτιμήθηκε σε 18 δείγματα ανά πειραματική μεταχείριση.

Η διαδικασία της θερμικής επεξεργασίας άρχιζε όταν το υδατόλουτρο αποκτούσε θερμοκρασία 60 °C , 64 °C, 68 °C και 71 °C (κάθε θερμοκρασία αντιστοιχεί σε μία πειραματική διαδικασία-συνολικά 4 πειραματικές διαδικασίες) με τη βοήθεια καταγραφικού θερμοκρασίας (PicoLog). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα διαφορετικά σε κάθε θερμοκρασία, τρία σακουλάκια (που περιείχαν το δείγμα) απομακρύνονταν από το υδατόλουτρο σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα από 8 sec έως 20 min εξαρτώμενα από τη θερμοκρασία και τοποθετούνταν σε πλαστικό σκεύος με πάγο (0 °C) για 2-3 λεπτά με στόχο την γρήγορη πτώση της θερμοκρασίας. Μετά από 7 χρονικές στιγμές διαφορετικής διάρκειας η κάθε μία ανάλογα τη θερμοκρασία, η θερμική επεξεργασία λάμβανε τέλος. Στη συνέχεια, το σακουλάκι με το θερμικά επεξεργασμένο πλέον μπιφτεκάκι μεταφερόταν στον πάγκο δειγματοληψίας για να αρχίσει η διαδικασία της δειγματοληψίας.

### 2.5.4 Δειγματοληψία - Ομογενοποίηση δείγματος

Για τη διαδικασία της δειγματοληψίας, τοποθετείται στον ζυγό (BEG Engineering & KERN PCB), ποτήρι ζέσεως μέσα στο οποίο έχει τοποθετηθεί και ανοιχθεί αποστειρωμένη σακούλα τύπου stomacher. Στη συνέχεια, μηδενίζεται ο ζυγός προκειμένου να ζυγιστεί το δείγμα 10 g που προστίθεται μέσα στη σακούλα με τη βοήθεια μικρής σπάτουλας. Ακολουθεί η προσθήκη 90 ml αποστειρωμένου ισοτονικού διαλύματος Ringer στη σακούλα (βάρους 9 φορές εκείνου του δείγματος), έτσι ώστε να προκύψει αραιώση 1 προς 10. Έπειτα, η αφού η σακούλα κλειστεί πρόχειρα, προσέχοντας να μην έχει εγκλωβίσει αέρα, τοποθετείται σε ομογενοποιητή (Stomacher® 400 CIRCULATOR) ώστε η ποσότητα του δείγματος να ομογενοποιηθεί για συνολικό χρόνο 1 min και 230 rpm. Με την ομογενοποίηση, το

μικροβιακό φορτίο του δείγματος διαχέεται στον ορό Ringer, δεδομένου ότι για να πραγματοποιηθεί ο μικροβιολογικός έλεγχος, το δείγμα θα πρέπει να βρίσκεται σε υγρή μορφή. Όλη η διαδικασία της δειγματοληψίας που αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιείται δίπλα σε λύχνο για τη διατήρηση ασηπτικών συνθηκών.

### **2.5.5 Διαδοχικές αραιώσεις**

Κάθε τρόφιμο μπορεί να περιέχει από χίλια έως εκατομμύρια βακτηριακά κύτταρα ανά όγκο. Η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού χρειάζεται μια κατάλληλη διαδικασία διαχωρισμού των βακτηρίων, ώστε τελικά να καλλιεργηθούν σε ένα στερεό θρεπτικό υπόστρωμα και να σχηματίζουν μετρήσιμες, μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες με αριθμό CFU μεταξύ 30 και 300 . Η καλλιέργεια του δείγματος που προέκυψε από την πρώτη αραιώση με την προσθήκη ορού Ringer στη σακούλα η οποία περιέχει το στερεό δείγμα, δεν εξυπηρετεί την απαρίθμηση του μικροβιακού φορτίου, ιδιαίτερα όταν η αλλοίωση του τροφίμου βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο. Επομένως, για να διευκολυνθεί η εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού του δείγματος, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  έως και  $10^{-9}$  όταν το μικροβιακό φορτίο έχει αυξηθεί σημαντικά.

### **2.5.6 Ενοφθαλμισμός θρεπτικών υποστρωμάτων**

Ο ενοφθαλμισμός ενός βακτηριακού εναιωρήματος (δείγμα) σε στερεό υπόστρωμα έγινε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) και με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique). Στην πρώτη τεχνική προστίθεται από τους δοκιμαστικούς σωλήνες μικρός όγκος (100 μl) δείγματος της επιθυμητής αραιώσης με χρήση tip στο κέντρο της επιφάνειας στερεοποιημένου θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλίο. Στη συνέχεια, γίνεται ομοιόμορφη διασπορά (εξάπλωση) του βακτηριακού αιωρήματος σε όλη την επιφάνεια του στερεού υποστρώματος με τη βοήθεια μικροβιολογικού τριγώνου με κυκλικές κινήσεις. Τα τρυβλία τοποθετούνται ανάποδα το ένα πάνω στο άλλο σχηματίζοντας μια εικοσάδα, ύστερα μέσα σε σακούλες και εν συνεχεία, προς επώαση στην κατάλληλη θερμοκρασία για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Επίσης, σημειώνουμε ότι στην περίπτωση που θέλουμε να μειώσουμε το όριο ανίχνευσης,

1ml δείγματος από την 1<sup>η</sup> αραιώση ( $10^{-1}$ ) εξαπλώνεται ισόποσα σε 3 τρυβλία του ίδιου θρεπτικού στερεού υλικού και ύστερα γίνεται εξάπλωση του δείγματος σε όλη την επιφάνεια του στερεού υποστρώματος με τη βοήθεια μικροβιολογικού τριγώνου με κυκλικές κινήσεις. Η τελευταία μέθοδος χρησιμοποιείται μετά τη θερμική επεξεργασία ανεξαρτήτως θερμοκρασίας. Τέλος, η απαρίθμηση των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *E. Coli* 0157:H7 θα προκύψει αθροιστικά από τα 3 τρυβλία.

Πριν την θερμική επεξεργασία χρησιμοποιούνται τρυβλία που περιέχουν το μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TSA το οποίο περιείχε επιπλέον 5 g πυρροβικού οξέος σε κάθε 500 ml υλικού, και τρυβλία που περιέχουν το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC. Αντίθετα, μετά τη θερμική επεξεργασία χρησιμοποιούνται τρυβλία που περιέχουν TSA. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία με TSA, στα οποία έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, επιστρώθηκαν με 10 ml από SMAC. Εν συνεχεία, αφέθηκαν στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου για 120 min με σκοπό να επιτραπεί η ανάκτηση των θερμικά καταπονημένων κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού. Κατά τη διάρκεια αυτών των 120 λεπτών το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα-SMAC στερεοποιήθηκε. Σε αυτό το σημείο πρέπει να συμπληρώσουμε ότι τα τρυβλία αυτά χρησιμοποιήθηκαν μετά από τη θερμική επεξεργασία, τα οποία όπως περιγράφηκε παραπάνω περιέχουν μία στρώση TSA και μία στρώση SMAC, μετά το πέρας των 120 λεπτών, τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο (Memert & Sanyo Incubator) θερμοκρασίας 30 °C για 48 h (Juneja, 2008).

Τέλος, η τεχνική της ενσωμάτωσης χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις των προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών, σε σχέση με την τεχνική της επίστρωσης που χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις των υποχρεωτικά αερόβιων μικροοργανισμών. Στην περίπτωση της τεχνικής της ενσωμάτωσης πραγματοποιείται ομοιόμορφη διασπορά των μικροοργανισμών στη μάζα τους θρεπτικού υλικού το οποίο αφήνεται στη συνέχεια να στερεοποιηθεί. Η τεχνική της ενσωμάτωσης χρησιμοποιείται για τα θρεπτικά υλικά PCA, MRS και VRBGA.

### 2.5.7 Επώαση θρεπτικών υποστρωμάτων

Οι συνθήκες επώασης πρέπει να εξασφαλίζουν τη βέλτιστη μικροβιακή αύξηση. Το κατάλληλο θρεπτικό μέσο αύξησης, η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης είναι οι απαιτούμενες συνθήκες.

**Πίνακας 2:** Θρεπτικό υπόστρωμα, τεχνική ενοφθαλμισμού, θερμοκρασία και χρόνος επώασης που συνοδεύουν τους παρακάτω μικροοργανισμούς.

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης	Μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται	Τεχνική ενοφθαλμισμού	Θερμοκρασία επώασης (°C)	Χρόνος επώασης
TSA	<i>E. coli</i>	Spread	37 °C	18 – 24 h
CT-SMAC	<i>E. coli</i>	Spread	37°C	18 – 24 h
PCA	OMX	Pour	30°C	3 ημέρες
MRS	<i>Lactobacilli</i>	Pour	30°C	3 ημέρες
VRBGA	<i>Enterobacteriaceae</i>	Pour	37 °C	18 – 24 h

### 2.5.8 Μέτρηση pH

Η μέτρηση των τιμών του pH πραγματοποιήθηκε με χρήση ηλεκτρονικού pHμέτρου (WTW Mulitcal®). Έπειτα από κάθε μικροβιολογική ανάλυση, πραγματοποιούταν εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του ηλεκτρονικού pH – μέτρου στο ομογενοποιημένο διάλυμα δείγματος – ορού Ringer 1/10 (w/w), προκειμένου να μετρηθεί το pH. Η τιμή pH μετριόταν σε κάθε δείγμα τροφίμου και πιο συγκεκριμένα λαμβανόταν ο μέσος όρος τριών τιμών pH (τρεις επαναλήψεις) για το κάθε δείγμα.

### 2.5.9 Αρίθμηση αποικιών

Η αρίθμηση αποικιών (colony count) είναι η μέθοδος προσδιορισμού/εκτίμησης του μικροβιακού πληθυσμού ενός δείγματος και πραγματοποιείται αμέσως μετά την επώαση των μικροοργανισμών. Οι αποικίες αναπτύσσονται πάνω ή μέσα σε ενοφθαλμισμένο θρεπτικό υλικό που έχει στερεοποιηθεί στο τρυβλίο. Ο αριθμός των αποικιών που σχηματίζεται σε αυτό το θρεπτικό υλικό αντιπροσωπεύει τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων.



Ακόμη, η μέτρηση των αποικιών πραγματοποιείται με χρήση εργαστηριακού οργάνου καταμέτρησης αποικιών (Stuart Scientific Colony Counter). Στην δική μας περίπτωση όπου οι πληθυσμοί του παθογόνου μικροοργανισμού καθώς και της ενδογενούς χλωρίδας που επιβίωσαν κατά την συντήρηση και τη θερμική επεξεργασία των δειγμάτων, καταμετρήθηκαν με την κλασσική μέθοδο της μετασποράς σε τρυβλία CT-SMAC και TSA, αντίστοιχα [ISO 16654:2001 (E) & ISO 16649-2:2001(E)].

Τέλος, για τη διευκόλυνση της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων ο αριθμός των αποικιών που προέκυψε, λογαριθμίστηκε με χρήση δεκαδικού λογαρίθμου (με τη βοήθεια αριθμητικών τύπων) και εκφράστηκε σε Log CFU/g δείγματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων που ελήφθησαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, αναπαραστάθηκαν σε μορφή γραφήματος με χρήση Excel, το οποίο ακολουθεί την τυπική καμπύλη ανάπτυξης μικροοργανισμών.

#### **2.5.10 Δοκιμασία ινδόλης**

Η δοκιμασία ινδόλης έχει σκοπό την ταυτοποίηση των στελεχών *E. Coli* 0157:H7 χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Kovac's (p dimethyl amino benzaldehyde, amyl alcohol, HCL). Όταν το εντεροβακτήριο *E. Coli* 0157:H7 είναι θετικό στην ινδόλη τότε σχηματίζει ένα ροζ στρώμα, η αποικία δηλαδή από καφέ απόχρωση αποκτά ροζ απόχρωση στην επιφάνεια της αποικίας πάνω στο θρεπτικό υπόστρωμα που υπάρχει μέσα στο τρυβλίο.

#### **2.5.11 Υπολογισμός D- & Z-value**

Η παράμετρος D-value, εκφράζει τον χρόνο -εκφρασμένο σε λεπτά- που απαιτείται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία (T) για έναν υποδεκαπλασιασμό ή μία μείωση κατά 90% του πληθυσμού του επιζήσαντος μικροοργανισμού σε συγκεκριμένο υπόστρωμα. Οι τιμές D-value υπολογίζονται από το τμήμα της ευθείας γραμμής στο γράφημα με την καμπύλη επιβίωσης του μικροοργανισμού, η οποία είναι μια γραφική παράσταση (plot) και περιέχει στον άξονα γ' τις μετρήσεις επιβίωσης του μικροοργανισμού (Log CFU/g) και στον άξονα χ' τους χρόνους της θερμικής επεξεργασίας. Η διαφορά θερμοκρασίας που απαιτείται για να

δεκαπλασιαστεί ή να υποδεκαπλασιαστεί η τιμή της D-value ορίζεται ως z-value. Η z-value είναι ένα μέγεθος που συσχετίζει τη σχετική αντίσταση ενός μικροοργανισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες ώστε να επιτευχθεί ισοδύναμη καταστροφή από τη διεργασία. Η παράμετρος z-value εκτιμήθηκε με υπολογισμό της γραμμικής παλινδρόμησης της μέσης τιμής του log D- value σε σχέση με τις αντίστοιχες θερμοκρασίες της θερμικής επεξεργασίας των δειγμάτων. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μετρήσεων στο πρωτογενές μοντέλο – λογαριθμικής συσχέτισης με χρόνο προσαρμογής (log linear with shoulder: Geeraerd et al., 2000), από το οποίο προέκυψαν ο χρόνος λογαριθμικής μείωσης (D-value) και η σταθερά θερμικής ανθεκτικότητας (z-value). Το z-value υπολογίστηκε λαμβάνοντας την απόλυτη τιμή της αντίστροφης κλίσης της ευθείας.

## 2.6 Προπειράματα

Προπειραματικά, για να μελετηθούν οι παραπάνω περιπτώσεις έγιναν οι προπειραματικοί σχεδιασμοί που θα αναφερθούν περιληπτικά παρακάτω. Σημειώνεται ότι στους παρακάτω πειραματικούς σχεδιασμούς το πείραμα διήρκεσε 12 ημέρες με 3 δειγματοληψίες εντός των 12 ημερών την 0η, την 6<sup>η</sup> και την 12<sup>η</sup> ημέρα. Επίσης, η θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν οι 64 °C και η θερμοκρασία συντήρησης των δειγμάτων πριν από κάθε θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια των 6 και των 12 ημερών ήταν 4 °C.

### 2.6.1 1<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός

#### Στόχος μελέτης 1<sup>ου</sup> προπειράματος:

Μελέτη της θερμοανθεκτικότητας του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 παρουσία των φυσικών αντιμικροβιακών - αιθέριο έλαιο ρίγανης, νισίνη και λυσοζύμη κατά τη συντήρηση χοίρειου κιμά (δεν παρατίθενται αποτελέσματα).

Στον 1<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις:

1. Μάρτυρας (control)
2. 0,1% E.O.
3. Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O.
4. Nisin (500 IU/g) + 0,1% E.O.

5. Lysozyme (5000 µg/g) + 0,1% E.O.
6. Lysozyme (500 µg/g) + 0,1% E.O.
7. Lysozyme (5000 IU/g) + Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O. (Mix)

Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 64 °C ήταν 0, 30, 60, 90, 120, 180, 300 και 600 sec (για το control τη μηδενική ημέρα) και 0, 30, 60, 90, 120, 150, 240 sec (για την 6η και τη 12η ημέρα) με 2 επαναλήψεις κάθε χρονική στιγμή.

### **2.6.2 2<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός**

#### Στόχος μελέτης 2<sup>ου</sup> προπειράματος:

Μελέτη του τρόπου δράσης του φυσικού αντιμικροβιακού αιθέριου ελαίου ρίγανης με και χωρίς whey σε συγκέντρωση 0,2%, με EDTA στον κιμά, σε συνδυασμό με τα αντιμικροβιακά Νισίνη και Λυσοζύμη, μετά την προσθήκη του σε όλες τις μεταχειρίσεις (δεν παρατίθενται αποτελέσματα).

Στον 2<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις:

1. Μάρτυρας (control)
2. 0,2% E.O. (with whey) + EDTA (50 mM)
3. 0,2% E.O. (without whey) + EDTA (50 mM)
4. Nisin (5000 IU/g) + 0,2% E.O. (with whey) + EDTA (50 mM)
5. Nisin (5000 IU/g) + 0,2% E.O. (without whey) + EDTA (50 mM)
6. Lysozyme (5000 µg/g) + 0,2% E.O. (with whey) + EDTA (50 mM)
7. Lysozyme (5000 µg/g) + 0,2% E.O. (without whey) + EDTA (50 mM)
8. Lysozyme (5000 µg/g) + Nisin (5000 IU/g) + 0,2% E.O. (with whey) + EDTA (50 mM): (Mix)
9. Lysozyme (5000 µg/g) + Nisin (5000 IU/g) + 0,2% E.O. (without whey) + EDTA (50 mM): (Mix)

Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 64 °C ήταν 0, 30, 60, 75, 90, 120, 180, 240 sec.

Σημειώνουμε σ' αυτό το σημείο ότι το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) είναι ένας χηλικός παράγοντας ο οποίος χρησιμοποιήθηκε διότι είναι γνωστό ότι ενισχύει την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών ουσιών, ιδιαίτερα εναντίων των αρνητικών κατά Gram αρνητικών βακτηρίων (όπως ο παθογόνος

μικροοργανισμός *E.coli* 0157:H7). Έτσι, ο συνδυασμός αντιμικροβιακών ουσιών (Νισίνη, Λυσοζύμη και EDTA) με διαφορετικούς μηχανισμούς μπορεί να αυξήσει την αντιμικροβιακή δράση (Ko et al, 2010).

### **2.6.3 3<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός**

#### **Στόχος μελέτης 3<sup>ου</sup> προπειράματος:**

Μελετάμε την αντίδραση του παθογόνου μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια της συντήρησης με την προσθήκη μόνο EDTA και με την προσθήκη 0,2 % αιθέριο έλαιο ρίγανης χωρίς whey χωρίς την προσθήκη EDTA σε αυτό καθώς και στα άλλα αντιμικροβιακά (Νισίνη και Λυσοζύμη) (δεν παρατίθενται αποτελέσματα).

Στον 3<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις:

1. Control
2. 0,2% E.O. χωρίς whey
3. EDTA (50 mM)
4. Nisin (5000 IU/g) + 0,2% E.O. without whey
5. Lysozyme (5000 μg/g) + 0,2% E.O. without whey
6. Lysozyme (5000 μg/g) + Nisin (5000 IU/g) + 0,2% E.O. without whey (Mix)

Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 64 °C ήταν 60, 75, 90, 180, 240 sec.

### **2.6.4 4<sup>ος</sup> πειραματικός σχεδιασμός**

Στον 4<sup>ο</sup> πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις:

1. Control
2. 0,2% E.O. χωρίς whey + EDTA (50 mM) + Nisin (5000 IU/g) + Lysozyme (5000 μg/g): Mix

Οι χρόνοι δειγματοληψίας κατά τη θερμική επεξεργασία στους 64 °C ήταν 60, 90, 120, 180, 240 sec.

Αυτό το προπείραμα διήρκησε 6 ημέρες και οι δειγματοληψίες που έγιναν ήταν την 0η και την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης των δειγμάτων σε σχέση με τα υπόλοιπα 3 προπειράματα (δεν παρατίθενται αποτελέσματα).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της έρευνας απεικονίζονται στα παρακάτω γραφήματα και πρόκειται να αναλυθούν ξεχωριστά για κάθε θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας.

Αρχικά (ενότητα 3.1), παρατίθενται γραφήματα που περιγράφουν την μεταβολή του πληθυσμού της ενδογενούς χλωρίδας (TSA) και του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (CT-SMAC) κατά την συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά για την 0η και 12<sup>η</sup> ημέρα (γραφήματα 3.1.1 & 3.1.2 αντίστοιχα). Κάθε γράφημα περιλαμβάνει όλες τις μεταχειρίσεις τη 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στη συνέχεια (ενότητα 3.2), παρατίθενται τα γραφήματα της επιβίωσης του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 μετά τη θερμική επεξεργασία. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι κάθε γράφημα αντιπροσωπεύει τέσσερις ή/και πέντε μεταχειρίσεις μιας συγκεκριμένης θερμοκρασίας για την 0η ή την 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Σε όλα τα γραφήματα γίνεται σύγκριση των μεταχειρίσεων με τον μάρτυρα (control) της 0ης ή της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης, δηλαδή με την περίπτωση κατά την οποία ο χοιρινός κιμάς είχε εμβολιαστεί με *Escherichia coli* O157:H7, αλλά δεν είχε γίνει προσθήκη καμίας αντιμικροβιακής ουσίας. Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μετρήσεων στο πρωτογενές μοντέλο – λογαριθμικής συσχέτισης με χρόνο προσαρμογής (log linear with shoulder: Geeraerd et al., 2000), από το οποίο προέκυψαν αρχικά η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (Shoulder length – SI), ο μέγιστος ρυθμός αδρανοποίησης ( $k_{max}$ ) και κατ' επέκταση ο χρόνος λογαριθμικής μείωσης (D-value) και η σταθερά θερμικής ανθεκτικότητας (z-value). Τα δεδομένα εκφράζονται ως ο δεκαδικός λογάριθμος του πληθυσμού (N) των κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού που επιβίωσαν σε θερμική επεξεργασία με θερμοκρασία 60, 64, 68 και 71 °C σε σχέση με το χρόνο t (sec).

Από τα γραφήματα προκύπτει η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης, καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας της θερμικής επεξεργασίας σε συνδυασμό με την προσθήκη των φυσικών αντιμικροβιακών στην επιβίωση και θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7.

### 3.1 Επίδραση των Αντιμικροβιακών Ουσιών Κατά την Συντήρηση

Σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της νισίνης, της λυσοζύμης και του αιθέριου ελαίου ρίγανης, μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς για την επιβίωση της *Escherichia coli* O157:H7 κατά τη συντήρηση του χοίρειου κιμά στους 5 °C για 0 και 12 ημέρες.

Στα δείγματα μάρτυρες (γράφημα 3.1.1) κατά τη διάρκεια της συντήρησης τους για 12 ημέρες, ο πληθυσμός της ενδογενούς μικροχλωρίδας των δειγμάτων δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή. Αντίθετα, ο πληθυσμός του παθογόνου *E. coli* O157:H7 H7 με τον οποίο εμβολιάστηκε ο κιμάς τη 0η ημέρα (γράφημα 3.1.2) ήταν 6,45 log cfu/g και παρουσίασε μείωση της τάξεως του 0,7 log CFU/g περίπου από τη 0η στη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Δεν παρουσιάστηκε δηλαδή σημαντική μεταβολή, πιθανότατα λόγω της ιδιαίτερα χαμηλής θερμοκρασίας συντήρησης, η οποία δεν επέτρεψε μικροβιακή αύξηση.

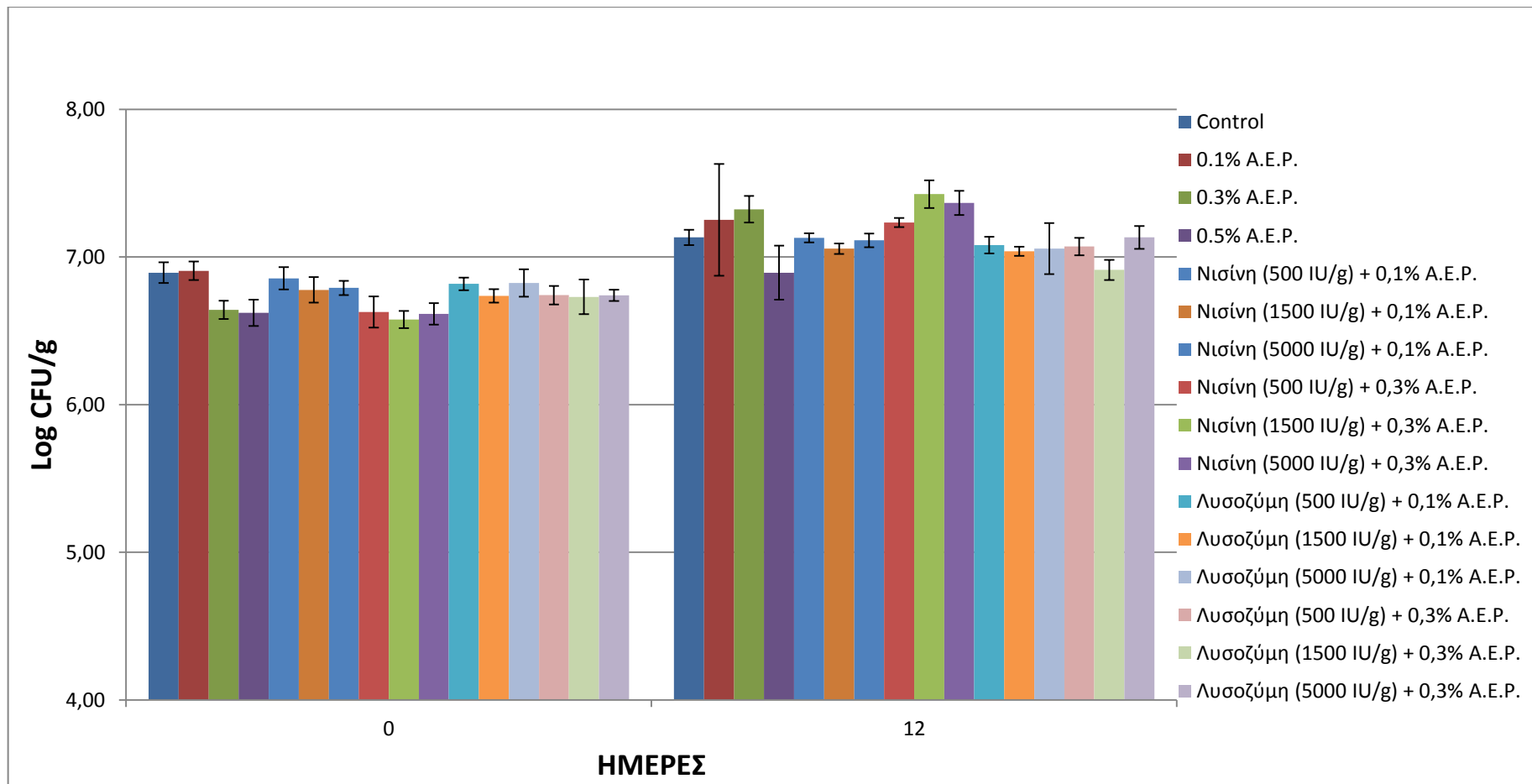
Στα δείγματα κιμά με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης από την 0η έως τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, τόσο ο πληθυσμός της ενδογενούς μικροχλωρίδας (γράφημα 3.1.1), όσο και ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού (γράφημα 3.1.2), δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική μεταβολή, όπως στα δείγματα-control. Στο γράφημα 3.1.1, η προσθήκη 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης προκάλεσε αύξηση του πληθυσμού της ενδογενούς μικροχλωρίδας της τάξεως των 0,7 log CFU/g, ενώ ο πληθυσμός του παθογόνου (γράφημα 3.1.2) δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή (μείωση) ( $p > 0,05$ ) μεταξύ της 0ης και της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης. Η προσθήκη 0,5% αιθέριου ελαίου ρίγανης (γράφημα 3.1.1) στα δείγματα χοιρινού κιμά δεν μετέβαλε στατιστικώς σημαντικά τον πληθυσμό της ενδογενούς μικροχλωρίδας, ενώ ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού (γράφημα 3.1.2) παρέμεινε σταθερός (5,86 log CFU/g) από τη 0η στην 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Ο πληθυσμός της ενδογενούς μικροχλωρίδας στα δείγματα με Νισίνη συγκεντρώσεων 500, 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.1.1) δεν παρουσίασε διαφορές στατιστικώς σημαντικές. Όμοια τάση παρουσίασε και ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli*

O157:H7 στα δείγματα των ίδιων μεταχειρίσεων (γράφημα 3.1.2), όπως ακριβώς συνέβη (i) στα δείγματα-control και (ii) στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης.

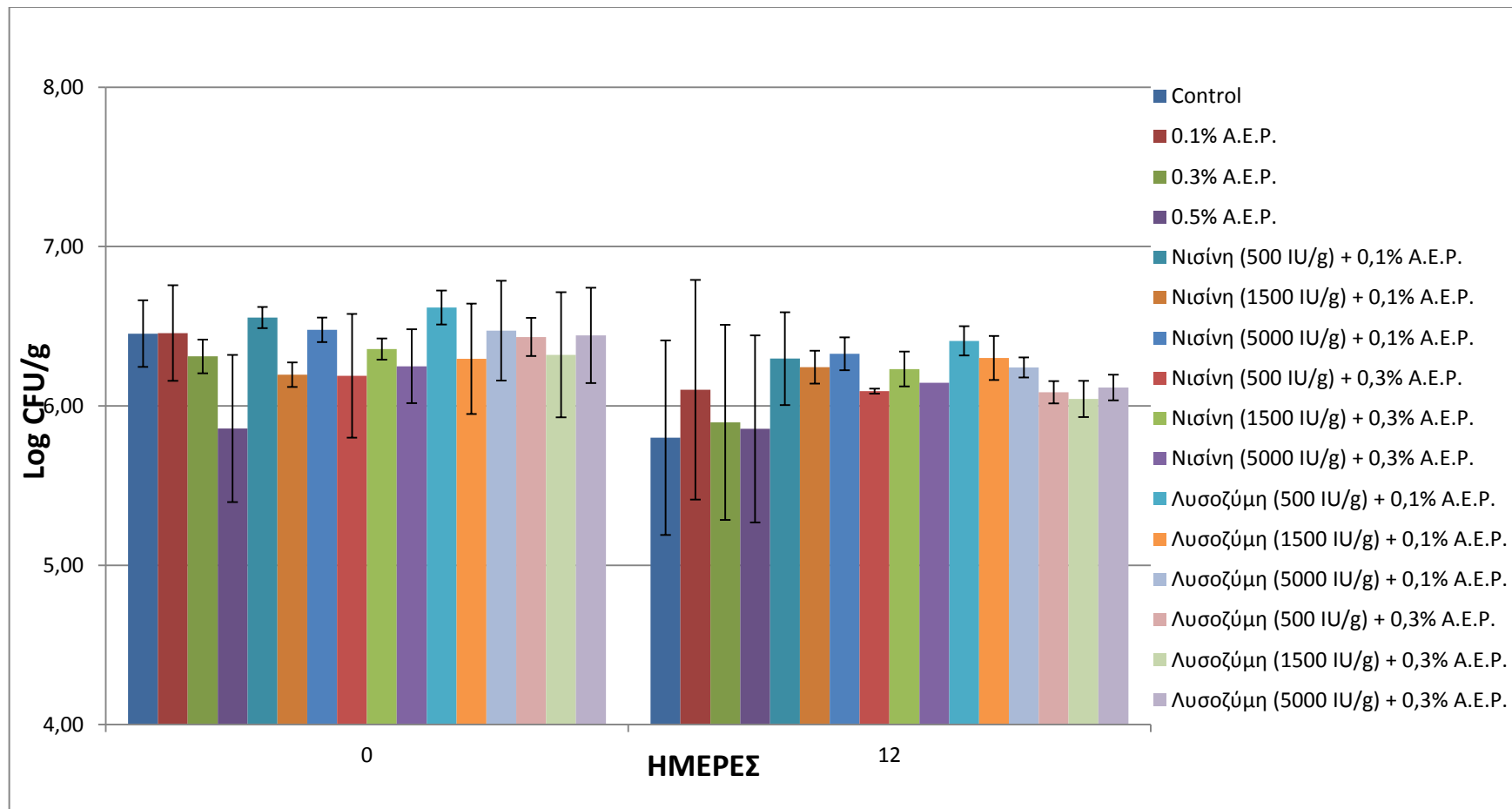
Με τη χρήση Νισίνης συγκέντρωσης 500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0.3% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.1.1) δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό της ενδογενούς μικροχλωρίδας. Αντίθετα, τα δείγματα με Νισίνη συγκέντρωσης 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.1.1) παρουσίασαν αύξηση της τάξεως των 0,9 log CFU/g περίπου από τη 0η στη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Ο πληθυσμός του παθογόνου *E. coli* O157:H7 στο επιλεκτικό υπόστρωμα CT-SMAC στα δείγματα των μεταχειρίσεων με Νισίνη συγκεντρώσεων 500, 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.1.2) δεν παρουσίασε μεταβολές στατιστικώς σημαντικές ( $p>0,05$ ), όπως στα δείγματα (i) control, (ii) με 0,3% αιθέριο έλαιο και (iii) με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0.1% v/w αιθέριο έλαιο.

Ομοίως, στα δείγματα κιμά που περιείχαν Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% και 0,3% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.1.1) δεν μεταβλήθηκε σημαντικά ο πληθυσμός της ενδογενούς μικροχλωρίδας ( $p>0,05$ ). Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στον πληθυσμό του παθογόνου κατά τη 0η και 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Το ίδιο συνέβη στα δείγματα (i) control, (ii) με 0,1% αιθέριο έλαιο και (iii) με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0.1% v/w αιθέριο έλαιο ρίγανης. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός του παθογόνου *E. coli* O157:H7 παρέμεινε σταθερός (6,3 log CFU/g) στα δείγματα με λυσοζύμη συγκέντρωσης 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης.



**Γράφημα 3.1.1:** Μεταβολή του πληθυσμού της ενδογενούς μικροχλωρίδας (στο γενικό υπόστρωμα TSA) κατά την συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά με την προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος σε συνδυασμό με αντιμικροβιακές ουσίες τη 0η και τη 12η ημέρα συντήρησης.





**Γράφημα 3.1.2:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (στο επιλεκτικό υπόστρωμα CT-SMAC) κατά την συντήρηση δειγμάτων χοιρινού κιμά με την προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος σε συνδυασμό με αντιμικροβιακές ουσίες τη 0η και τη 12η ημέρα συντήρησης.

Τέλος, στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3.1.1), οι τιμές του pH κατά τη διάρκεια της συντήρησης εμφανίζεται να μειώνονται, αλλά η μείωση είναι πολύ μικρή, άρα ουσιαστικά δεν μεταβάλλονται στατιστικώς σημαντικά. Παρ' όλα αυτά, αυτή η μείωση των τιμών του pH μπορεί να οφείλεται στην επιβίωση των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) στον κιμά. Η παραγωγή γαλακτικού οξέος και η αποικοδόμηση των σακχάρων από τα γαλακτιά βακτήρια οδηγεί σε μείωση του pH.

**Πίνακας 3.1.1:** Ο Μέσος Όρος των τιμών του pH των μεταχειρίσεων τη χρονική στιγμή των 0sec την 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

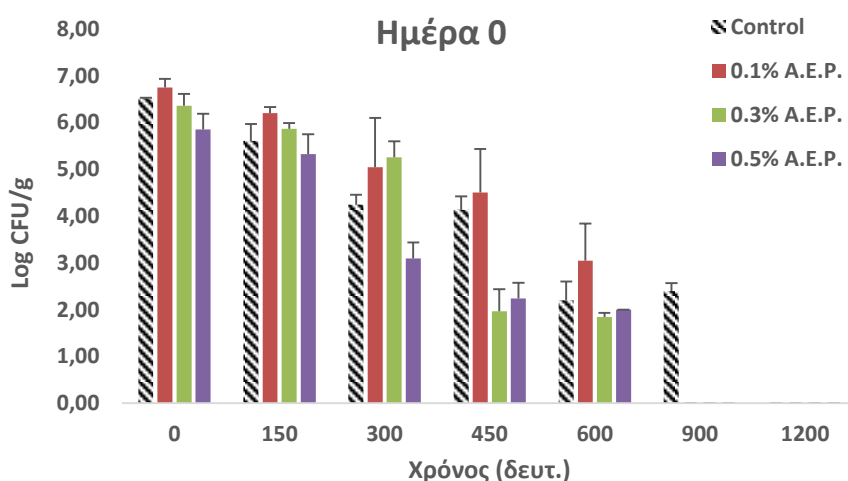
Μεταχειρίσεις	Ημέρα 0		Ημέρα 12	
	Average	StDev	Average	StDev
<b>Control</b>	5,86	0,18	5,69	0,27
<b>0,1% E.O.</b>	5,88	0,16	5,60	0,31
<b>0,3% E.O.</b>	5,96	0,19	5,73	0,33
<b>0,5% E.O.</b>	5,91	0,16	5,70	0,30
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	5,90	0,19	5,78	0,31
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	5,93	0,19	5,83	0,26
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	5,84	0,08	5,84	0,23
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	5,92	0,16	5,86	0,22
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	5,86	0,16	5,88	0,17
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	5,91	0,14	5,96	0,17
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	5,88	0,10	5,62	0,32
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	5,91	0,18	5,66	0,28
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	5,89	0,31	5,65	0,38
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	5,90	0,22	5,67	0,28
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	5,92	0,22	5,71	0,31
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	5,86	0,21	5,62	0,28

### 3.2 Επιβίωση του Παθογόνου Μικροοργανισμού Μετά τη Θερμική Επεξεργασία

Σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της νισίνης, της λυσοζύμης και του αιθέριου ελαίου ρίγανης, μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς, στη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου σε θερμική καταπόνηση στους 60 °C, 64 °C, 68 °C και 71 °C.

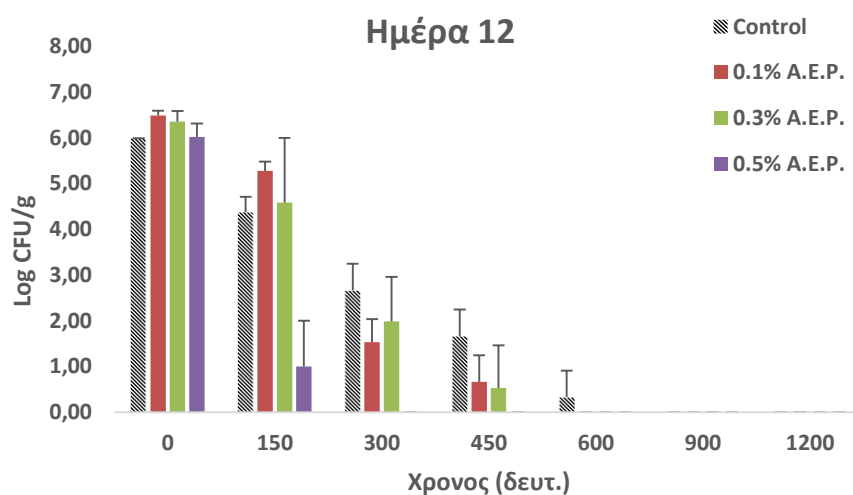
#### 3.2.1 Θερμοκρασία 60 °C

Ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 τη 0η ημέρα συντήρησης στο δείγμα-μάρτυρα (γράφημα 3.2.1.1 a), είναι 6,5 log CFU/g. Παρατηρείται θανάτωση του πληθυσμού του παθογόνου στον κιμά και μηδενισμός του τη χρονική στιγμή των 1200 s. Σε δείγματα που περιείχαν 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 0η ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.1 a), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι περίπου 6,8 log CFU/g. Ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο την ίδια ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.1.1 a) είναι 6,4 log CFU/g περίπου. Στα δείγματα που περιείχαν 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 (γράφημα 3.2.1.1 a) είναι 5,9 log CFU/g. Παρατηρείται ο ίδιος χρόνος θανάτωσης του πληθυσμού του παθογόνου στον κιμά στις μεταχειρίσεις με 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης, δηλαδή στα 900 s, συγκριτικά με τα δείγματα-control που ο πληθυσμός του παθογόνου θανατώθηκε 300 s αργότερα.



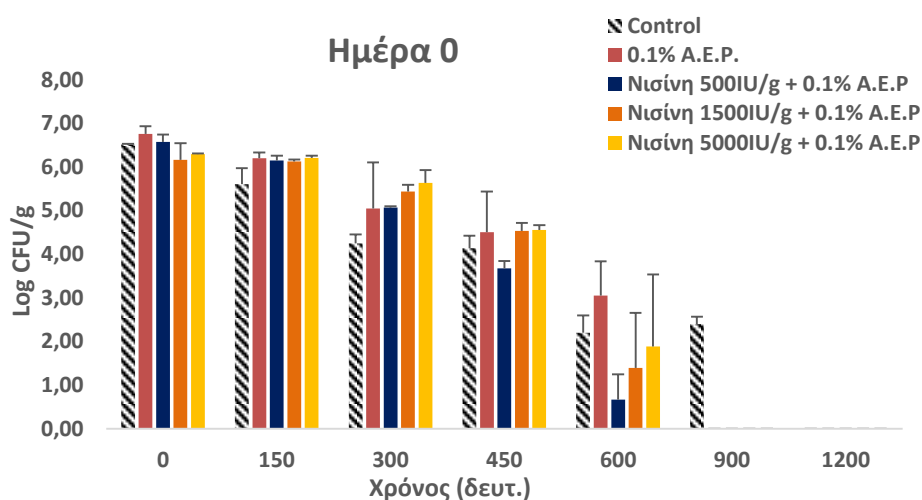
**Γράφημα 3.2.1.1 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Μετά από 12 ημέρες συντήρησης στους 5 °C στο δείγμα-μάρτυρας (γράφημα 3.2.1.1 b), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι περίπου 6,0 log CFU/g, 0,5 log κάτω από το δείγμα-control της 0ης ημέρας. Ο πληθυσμός του παθογόνου στον κιμά θανατώνεται, μέχρι το μηδενισμό του στα 900 s, σε σχέση με τα δείγματα control της 0ης ημέρας όπου ο παθογόνος μηδενίστηκε στα 1200 s. Στα δείγματα με 0,1% αιθέριο (γράφημα 3.2.1.1 b), ο πληθυσμός του παθογόνου είναι 6,5 log CFU/g, μειώθηκε δηλαδή κατά 0,5 log CFU/g από τον πληθυσμό του παθογόνου στα δείγματα της ίδιας μεταχείρισης της 0ης ημέρας.. Στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο τη 12<sup>η</sup> ημέρα (γράφημα 3.2.1.1 b) ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι 6,4 log CFU/g, ίδιος με τα δείγματα της ίδιας μεταχείρισης της 0ης ημέρας συντήρησης. Στις μεταχειρίσεις με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο ο πληθυσμός του παθογόνου μηδενίστηκε στα 600 s. Στα δείγματα με 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης μετά το πέρας 12 ημερών συντήρησης (γράφημα 3.2.1.1 b), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή ( $p > 0,05$ ) από τη 0η στη 12<sup>η</sup>. Ο πληθυσμός του παθογόνου στον κιμά θανατώθηκε τη χρονική στιγμή των 300 s, σε σχέση με το control και τις μεταχειρίσεις με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης στις οποίες ο παθογόνος θανατώθηκε στα 900 s και στα 600 s, αντίστοιχα.



**Γράφημα 3.2.1.1 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

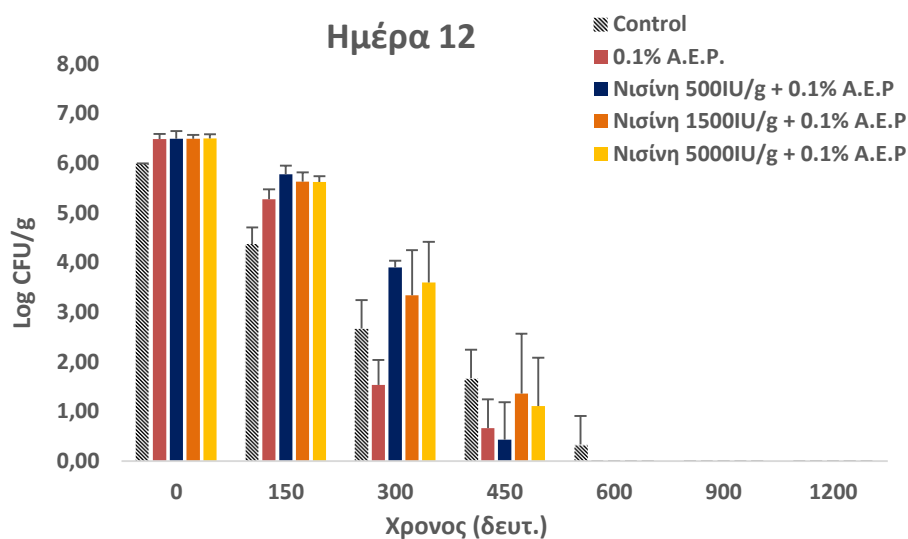
Στα δείγματα με Νισίνη 500, 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 0η ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.1.2 α), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 τη χρονική στιγμή  $t=0$  sec δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών. Επίσης, ο πληθυσμός του παθογόνου δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και των δειγμάτων (i) control και (ii) με 0,1% αιθέριο έλαιο, αφού στις μεταχειρίσεις με τη νισίνη ο πληθυσμός του παθογόνου κυμαίνεται από 6,2 έως 6,6 log cfu/g και στο control είναι 6,5 log cfu/g.. Τέλος, σε αυτές τις τρεις περιπτώσεις με Νισίνη τη 0η ημέρα, παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 900 s (όπως ακριβώς συμβαίνει στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο της 0ης ημέρας), συγκριτικά με τον μάρτυρα που μηδενίστηκε στα 1200 s.



**Γράφημα 3.2.1.2 α:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

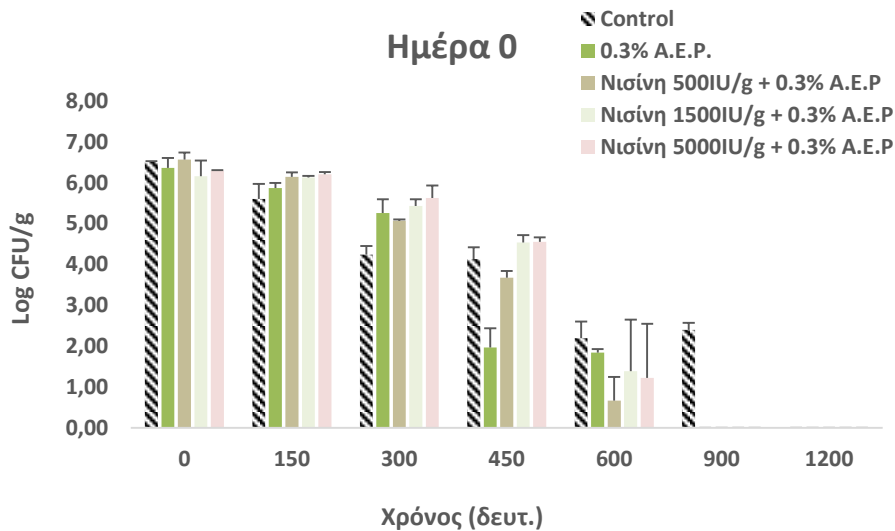
Στα δείγματα με Νισίνη 500, 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.1.2 β), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 τη χρονική στιγμή  $t=0$  sec διατηρείται σταθερός μεταξύ των μεταχειρίσεων στους 6,5 log CFU/g και είναι ίδιος με τον πληθυσμό του παθογόνου στη μεταχείριση με 0,1% αιθέριο έλαιο τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Επίσης, δεν διαφέρει σημαντικά με τον πληθυσμό των δειγμάτων του control, αφού η μεταβολή είναι 0,5 log cfu/g περίπου. Τέλος, και στις τρεις

περιπτώσεις ο παθογόνος εμφανίζει θανάτωση στα 600 s, σε σχέση με τα δείγματα control της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης που εμφανίζουν θανάτωση στα 900 s.



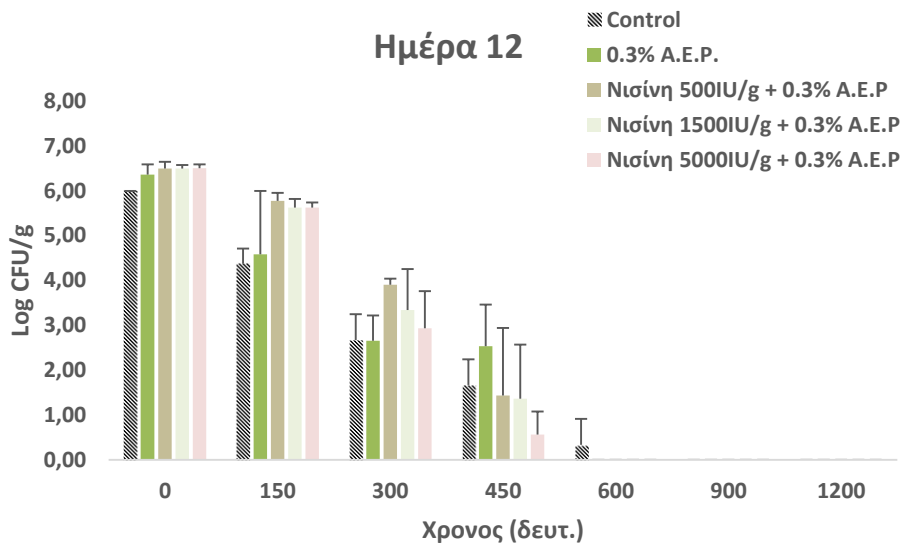
**Γράφημα 3.2.1.2 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με Νισίνη 500, 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 0η ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.1.3 a), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 τη χρονική στιγμή t=0 sec δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Επίσης, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και του control, καθώς και της μεταχείρισης με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης, αφού στις μεταχειρίσεις αυτές ο πληθυσμός του παθογόνου κυμαίνεται από 6,2 έως 6,6 log cfu/g και στο control είναι 6,5 log cfu/g. Τέλος, σε αυτές τις περιπτώσεις με νισίνη τη 0η ημέρα, παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 900 s, σε αντιδιαστολή με τα δείγματα (i) control που ο χρόνος θανάτωσης του παθογόνου άγγιζε τα 1200 s.



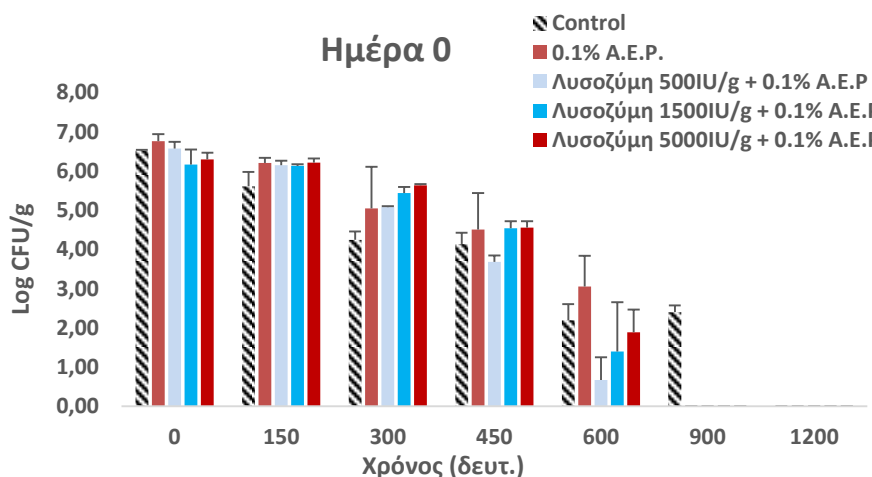
**Γράφημα 3.2.1.3 α:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Όσον αφορά τα δείγματα με νισίνη 500, 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.1.3 b), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 τη χρονική στιγμή t=0 sec παραμένει σταθερός μεταξύ των μεταχειρίσεων στους 6,5 log CFU/g. Διαφέρει σχεδόν 0,5 log CFU/g (όχι στατιστικώς σημαντικά) μεταξύ αυτών και των δειγμάτων-control της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης. Τέλος, ο πληθυσμός του παθογόνου των δειγμάτων στις μεταχειρίσεις αυτές θανατώνεται στα 600 s, με τα δείγματα που περιέχουν 0.3% A.E.P. + 5000IU/g νισίνη να εμφανίζουν ελαφρώς πιο γρήγορη θανάτωση σε σχέση με αυτό που περιείχαν μικρότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού. Συγκριτικά με ότι συμβαίνει στα δείγματα με Νισίνη συγκέντρωσης 500, 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο της 0ης ημέρας συντήρησης, όπου ο πληθυσμός του παθογόνου μηδενίζεται στα 900 s, παρατηρήθηκε ταχύτερη θανάτωση την 12<sup>η</sup> μέρα συντήρησης



**Γράφημα 3.2.1.3 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

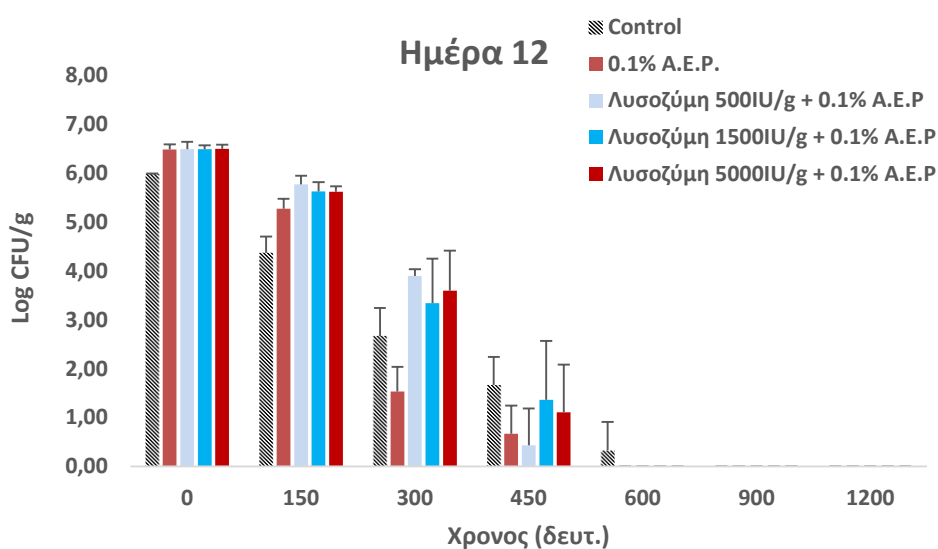
Ο πληθυσμός του παθογόνου δεν διαφέρει σημαντικά τη 0η ημέρα μεταξύ των μεταχειρίσεων με Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.1.4 a) και δεν διαφέρει σημαντικά από τα δείγματα-control και τα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης της 0ης ημέρας συντήρησης. Τέλος, σε όλες τις μεταχειρίσεις θανατώνεται ο παθογόνος στη χρονική στιγμή των 900 s, όπως στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα με νισίνη σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο.



**Γράφημα 3.2.1.4 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

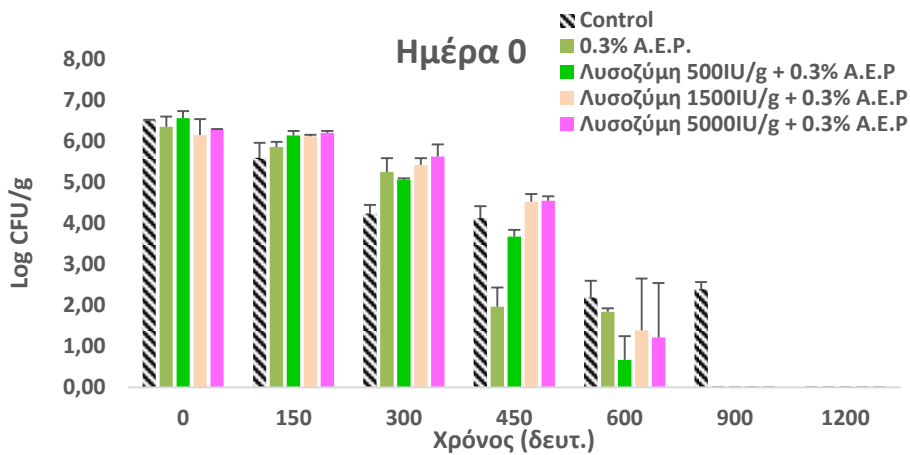


Τη 12<sup>η</sup> ημέρα, στα δείγματα που περιείχαν Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο (γραφήματα 3.2.1.4 b) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 παραμένει σταθερός μεταξύ των μεταχειρίσεων στους 6,5 log CFU/g και μεταξύ αυτών και του control της 12ης ημέρας παρατηρείται μεταβολή της τάξεως του 0,5 log cfu/g περίπου. Ακόμη, σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρείται θανάτωση στα 600 s, όπως ακριβώς στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο, σε σχέση με τα δείγματα του μάρτυρα όπου ο πληθυσμός μηδενίζεται στα 900 s.



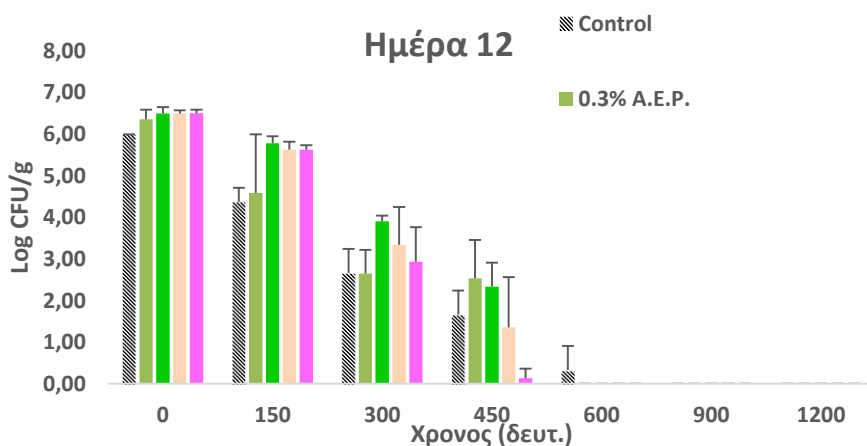
**Γράφημα 3.2.1.4 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Ο πληθυσμός του παθογόνου τη 0η ημέρα μεταξύ των μεταχειρίσεων με λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.1.5 a) δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά, όπως δεν διαφέρει σημαντικά από τα δείγματα-control της 0ης ημέρας συντήρησης. Ακόμη, στις τρεις μεταχειρίσεις παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου τη χρονική στιγμή των 900 s, όπως συνέβει στα δείγματα με Νισίνη (500, 1500 & 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο της 0ης ημέρας συντήρησης.



**Γράφημα 3.2.1.5 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

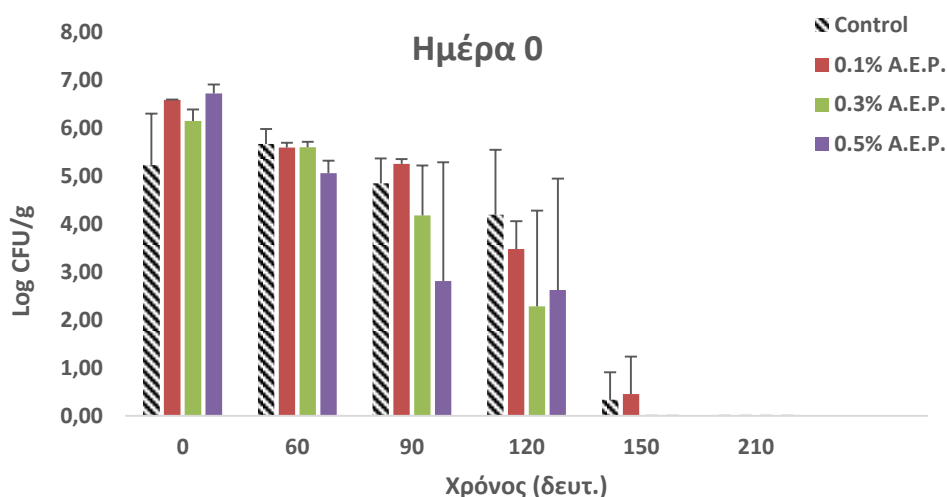
Στα δείγματα με λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο τη 12<sup>η</sup> ημέρα (γραφήματα 3.2.1.5 b) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του παθογόνου δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και μεταξύ αυτών και του control της 12ης ημέρας, αφού μεταξύ των τελευταίων παρατηρείται διαφορά 0,5 log. Ακόμη, σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρείται θανάτωση στα 600 s, ωστόσο ταχύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα δείγματα με την μεγαλύτερη συγκέντρωση λυσοζύμης. Συγκριτικά με τα δείγματα του μάρτυρα, που ο πληθυσμός μηδενίζεται στα 900 s, όλες οι μεταχειρίσεις εμφάνισαν ταχύτερη θανάτωση του παθογόνου.



**Γράφημα 3.2.1.5 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 60 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

### 3.2.2 Θερμοκρασία 64 °C

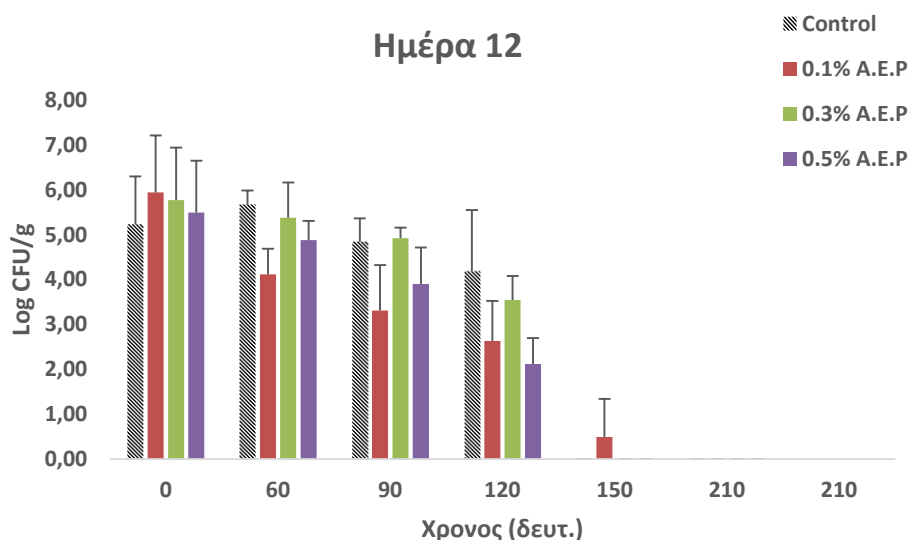
Στα δείγματα-μάρτυρες τη 0η ημέρα (γράφημα 3.2.2.1 a), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι 5,2 log CFU/g. Σε δείγματα που περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκεντρώσεων 0,1%, 0,3% και 0,5% τη 0η ημέρα (γράφημα 3.2.2.1 a) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του παθογόνου διαφέρει περίπου 0,5 log cfu/g μεταξύ των μεταχειρίσεων, άρα δεν παρουσιάζονται διαφορές στατιστικώς σημαντικές. Τέλος, στις μεταχειρίσεις με 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 150 s, σε σύγκριση με τα δείγματα (i) control και (ii) με 0,1% αιθέριο έλαιο, της 0ης ημέρας που ο παθογόνος θανατώθηκε στα 210 s.



**Γράφημα 3.2.2.1 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

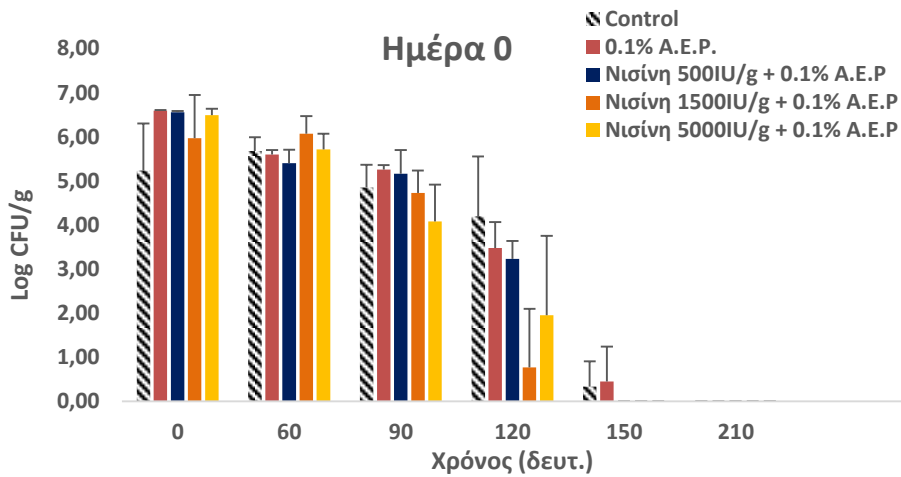
Στα δείγματα-μάρτυρες τη 12<sup>η</sup> ημέρα ( γράφημα 3.2.2.1 b), ο πληθυσμός του παθογόνου είναι 5,2 log cfu/g, ίδιος με τον πληθυσμό των δειγμάτων του μάρτυρα τη 0η ημέρα συντήρησης. Ο πληθυσμός του παθογόνου παρουσίασε θανάτωση στα 150 s σε σχέση με τα δείγματα control της 0ης ημέρας όπου ο παθογόνος θανατώθηκε στα 210 s. Τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, στα δείγματα με 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.2.1 b) ο πληθυσμός του παθογόνου διαφέρει μεταξύ των μεταχειρίσεων λιγότερο από 0,5 log. Κατά συνέπεια δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές μεταξύ των μεταχειρίσεων. Παρατηρείται

θανάτωση του παθογόνου στα 150 s και στις μεταχειρίσεις με 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης, όπως ακριβώς συμβαίνει (i) στις ίδιες μεταχειρίσεις τη 0η ημέρα συντήρησης και (ii) στα δείγματα control την 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Αντίθετα, η μεταχείριση με 0,1% αιθέριο έλαιο προκάλεσε τον μηδενισμό του πληθυσμού στα 210 s.



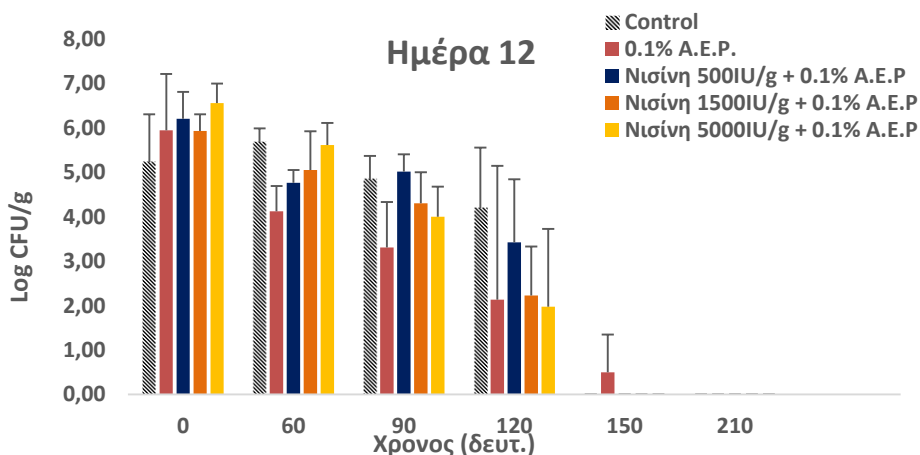
**Γράφημα 3.2.2.1 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Τη 0η ημέρα, στα δείγματα με Νισίνη συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.2.2 a) τη χρονική στιγμή  $t=0$ , ο πληθυσμός του παθογόνου δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και της μεταχείρισης με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Αντίθετα, υπάρχει διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών με τα δείγματα του μάρτυρα στον πληθυσμό του παθογόνου κατά 0,7-1,3 log CFU/g. Και στις τρεις περιπτώσεις παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 150 s, συγκριτικά με τα δείγματα-control και τα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο που παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 210 s.



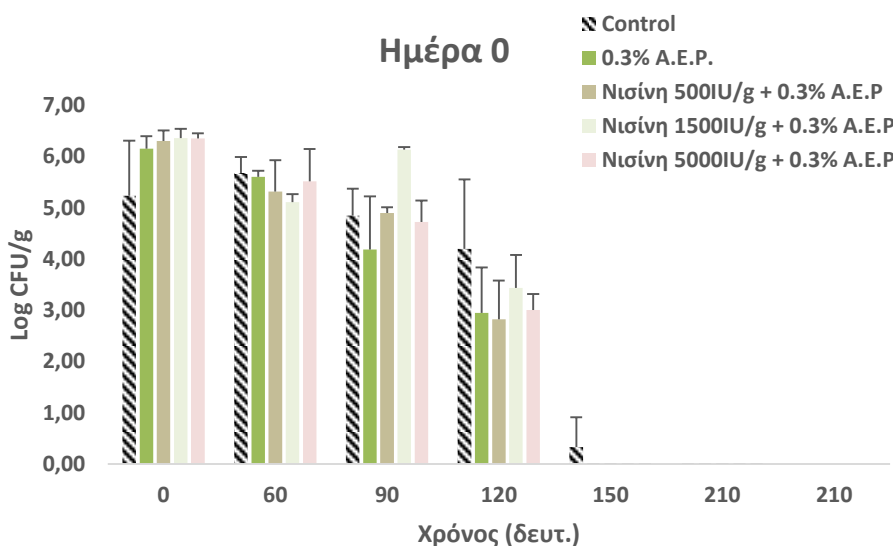
**Γράφημα 3.2.2.2 α:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Τη 12<sup>η</sup> ημέρα, στα δείγματα με Νισίνη συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.2.2 b) τη χρονική στιγμή  $t=0$ , δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό του παθογόνου, ενώ η διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και του control της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης αγγίζει τον 1 με 1,3 log. Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται θανάτωση και μηδενισμός του παθογόνου στα 150 s, όπως στα δείγματα με προσθήκη νισίνης σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο τη 0η ημέρα. Αντίθετα, η μεταχείριση με 0,1% αιθέριο έλαιο προκαλεί θανάτωση και μηδενισμό του παθογόνου στα 210 s.



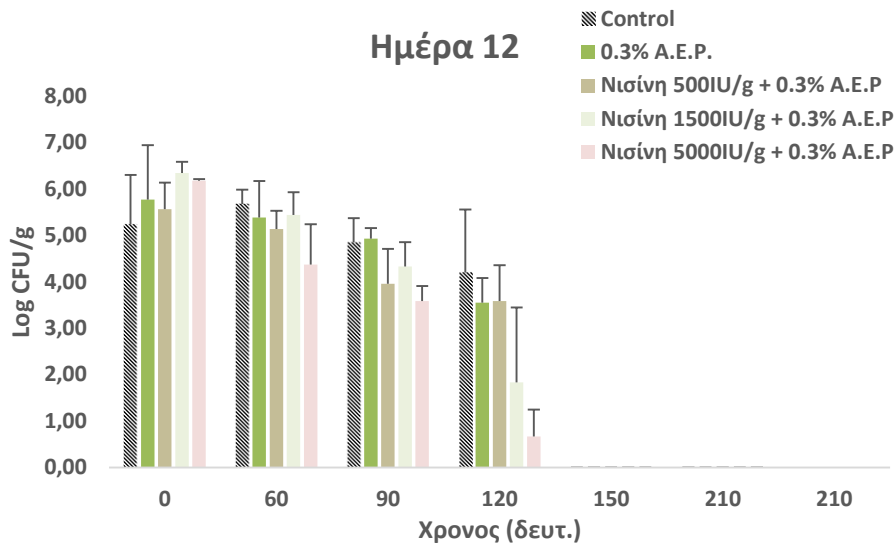
**Γράφημα 3.2.2.2 β:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στις μεταχειρίσεις με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο τη 0η ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.2.3 a) τη χρονική στιγμή  $t=0$ , ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 παραμένει σταθερός μεταξύ των μεταχειρίσεων (6,3-6,4 log CFU/g), δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και της μεταχείρισης με 0,1% αιθέριο έλαιο, αλλά διαφέρει με τα δείγματα του μάρτυρα κατά 1 log CFU/g περίπου. Ο ίδιος χρόνος θανάτωσης του παθογόνου παρατηρείται και στις τρεις περιπτώσεις στα 150 s, ίδιος με τον χρόνο θανάτωσης του παθογόνου στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο της 0ης ημέρας, σε σχέση με τα δείγματα-control που παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 210 s.



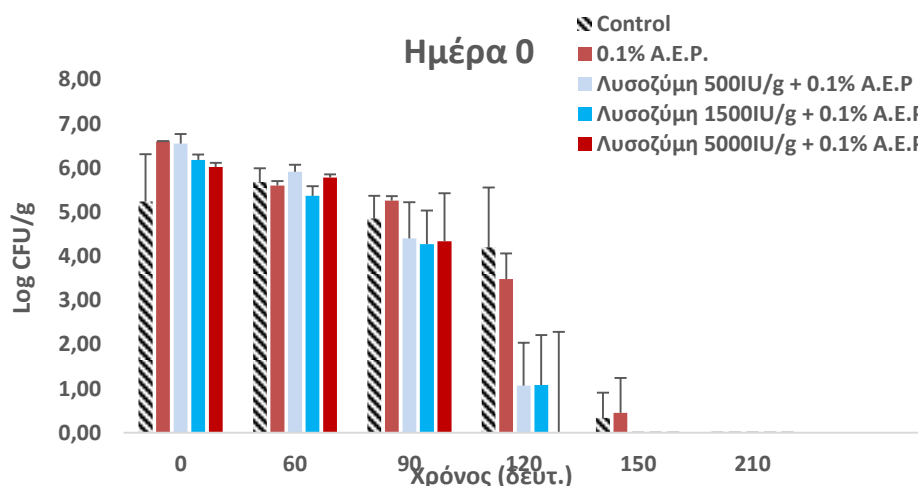
**Γράφημα 3.2.2.3 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Στις μεταχειρίσεις με νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.2.3 b), τη χρονική στιγμή  $t=0$ , στον πληθυσμό του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 παρατηρούνται μεταβολές της τάξεως των 0,6-0,8 log CFU/g, όχι στατιστικώς σημαντικές. Αντίθετα, η διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και του control της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης φτάνει τον 1,0 log CFU/g. Ο ίδιος χρόνος θανάτωσης του παθογόνου παρατηρείται και στις τρεις περιπτώσεις στα 150 s, όπως ακριβώς στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο, και στα δείγματα-control της 12<sup>ης</sup> ημέρας.



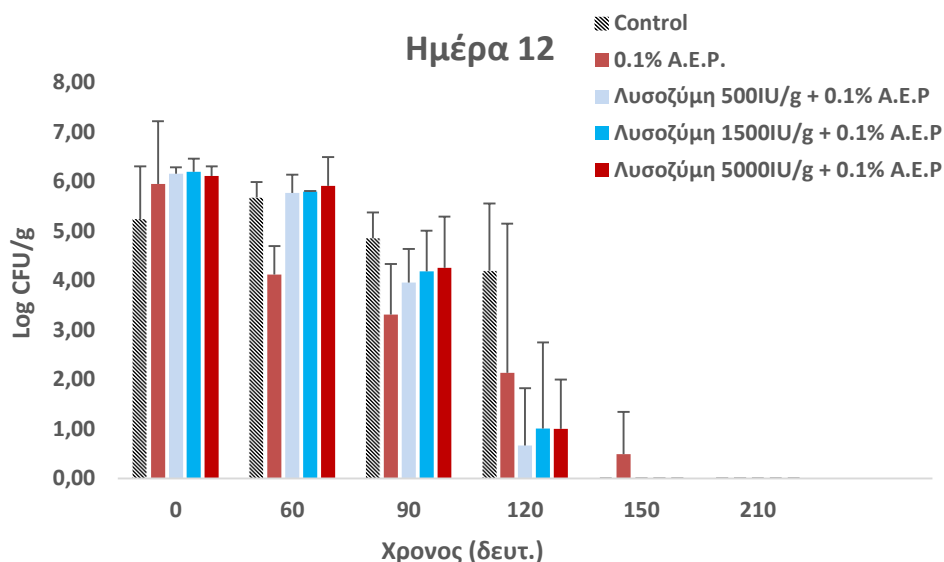
**Γράφημα 3.2.2.3 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Ο πληθυσμός του παθογόνου τη 0η ημέρα με Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.2.4 a) δεν μεταβάλλεται σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και δεν διαφέρει σημαντικά από τα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο της 0ης ημέρας συντήρησης. Παρατηρείται θανάτωση και μηδενισμός του παθογόνου στα 150 s, εκτός της μεταχείρισης με λυσοζύμη 5000 IU/g στα 120 s. Αντίθετα, με τα δείγματα (i) του μάρτυρα και (ii) που περιείχαν 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης που παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 210 s.



**Γράφημα 3.2.2.4 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

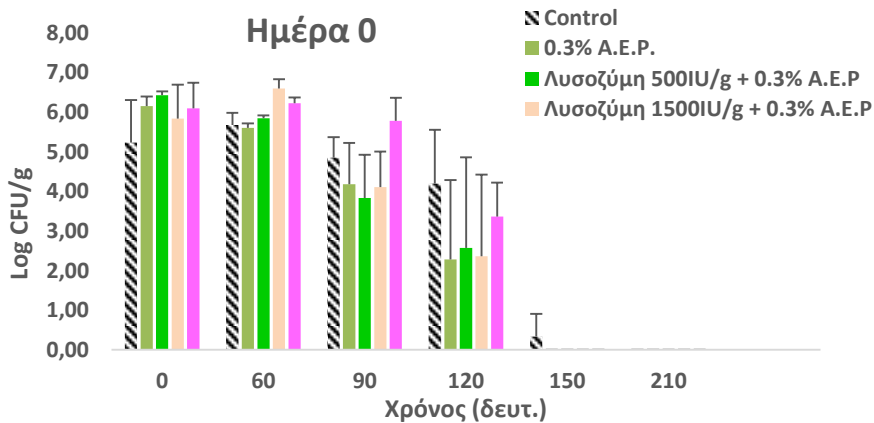
Τη 12<sup>η</sup> ημέρα, ο πληθυσμός του παθογόνου των δειγμάτων που περιείχαν λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.2.4 b) τη χρονική στιγμή t=0, διατηρείται σταθερός (6,1-6,2 log cfu/g). Μεταξύ των δειγμάτων των μεταχειρίσεων αυτών με τη μεταχείριση 0,1% αιθέριο έλαιο δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου, αντίθετα μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και του μάρτυρα υπάρχει μεταβολή 0,7-0,9 log cfu/g. Ακόμη, και στις τρεις περιπτώσεις καθώς και στον μάρτυρα παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 150 s σε σχέση με τα δείγματα που περιείχαν αιθέριο έλαιο 0,1%. όπου ο χρόνος θανάτωσης είναι 210 s.



**Γράφημα 3.2.2.4 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

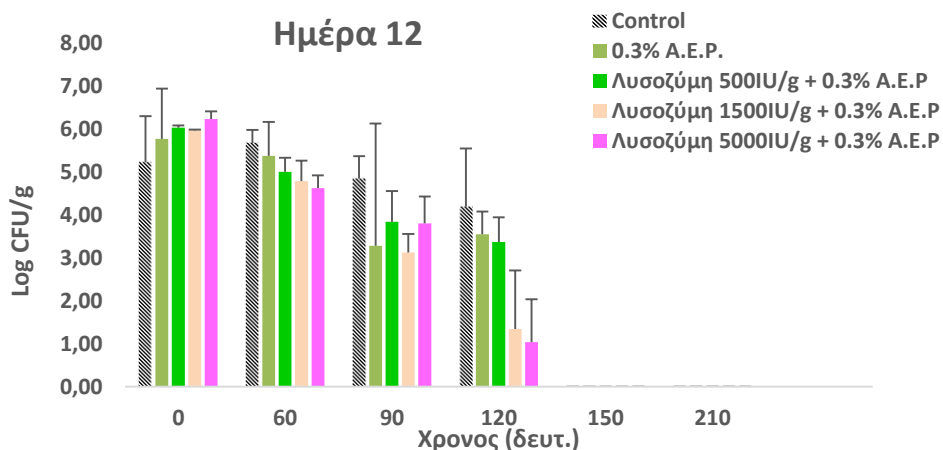
Στις μεταχειρίσεις με Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο τη 0η ημέρα συντήρησης (γράφημα 3.2.2.5 a) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και μεταξύ αυτών με τη μεταχείριση 0,3% αιθέριο έλαιο. Ο ίδιος χρόνος θανάτωσης του παθογόνου παρατηρείται και στις τρεις περιπτώσεις στα 150 s, ίδιος με τον χρόνο θανάτωσης του παθογόνου στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο και διαφορετικός με τα δείγματα-control που παρατηρείται στα 210 s.





**Γράφημα 3.2.2.5 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

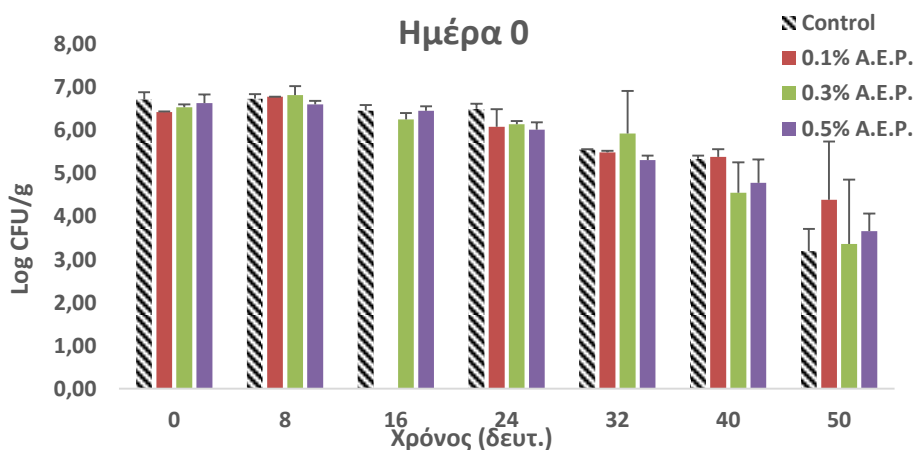
Μετά το πέρας 12 ημερών συντήρησης υπό ψύξη, στις μεταχειρίσεις με λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.2.5 b) τη χρονική στιγμή  $t=0$  sec, ο πληθυσμός του παθογόνου δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων, αλλά διαφέρει με το control κατά 0,8-1 log περίπου. Ο ίδιος χρόνος θανάτωσης του παθογόνου παρατηρείται και στις τρεις περιπτώσεις στα 150 s, όπως στα δείγματα-control, στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα με νισίνη σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, ωστόσο εντονότερη μείωση παρουσιάστηκε στα δείγματα που πειρέιχαν 0.3% A.E.P. + 5000IU/g λυσοζύμη.



**Γράφημα 3.2.2.5 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 64 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

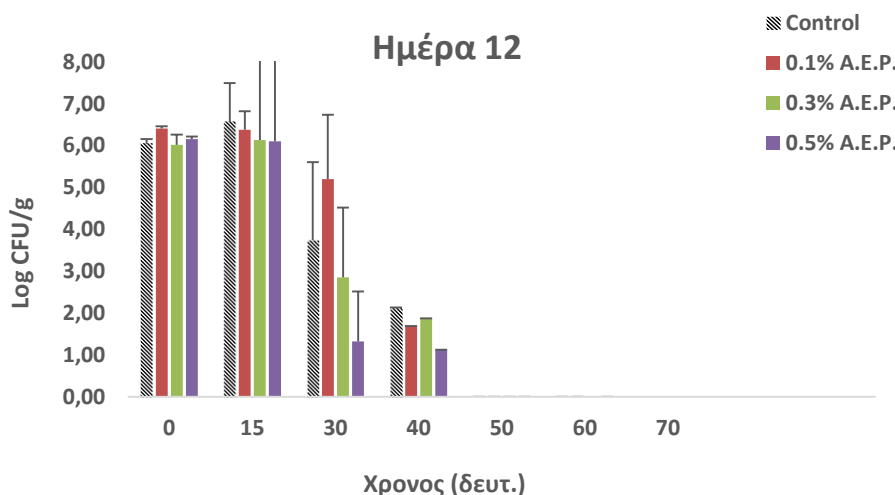
### 3.2.3 Θερμοκρασία 68 °C

Στο δείγμα του μάρτυρα τη 0η ημέρα (γράφημα 3.2.3.1 a), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι 6,7 log CFU/g. Παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στον κιμά κατά 4,5 log cfu/g σε 50 sec, αλλά δεν παρατηρήθηκε μηδενισμός του πληθυσμού. Σε δείγματα που περιείχαν 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.3.1 a) ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι 6,4 log CFU/g. Παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στον κιμά κατά 3,0 log cgu/g σε 50 sec, αλλά δεν παρατηρήθηκε μηδενισμός του πληθυσμού, όπως στα δείγματα-control της 0ης ημέρας συντήρησης. Τη 0η ημέρα συντήρησης, δείγματα με προσθήκη 0,3% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.3.1 a) είχαν περίπου 6,50 log CFU/g όσον αφορά τον πληθυσμό του παθογόνου. Παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στον κιμά κατά 3,0 log cgu/g περίπου σε 50 sec, αλλά δεν παρατηρήθηκε μηδενισμός του πληθυσμού, όπως (i) στα δείγματα-control και (ii) στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο. Ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 στα δείγματα που περιείχνα 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.3.1 a) είναι περίπου 6,60 log CFU/g. Δεν παρατηρήθηκε όμως μηδενισμός του πληθυσμού του παθογόνου στον κιμά σε αυτή τη μεταχείριση, όπως (i) στα δείγματα-control και (ii) στα δείγματα με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο της 0ης ημέρας συντήρησης. Ο πληθυσμός μειώθηκε περίπου 3,0 log cfu/g μέχρι τα 50 s.



**Γράφημα 3.2.3.1 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

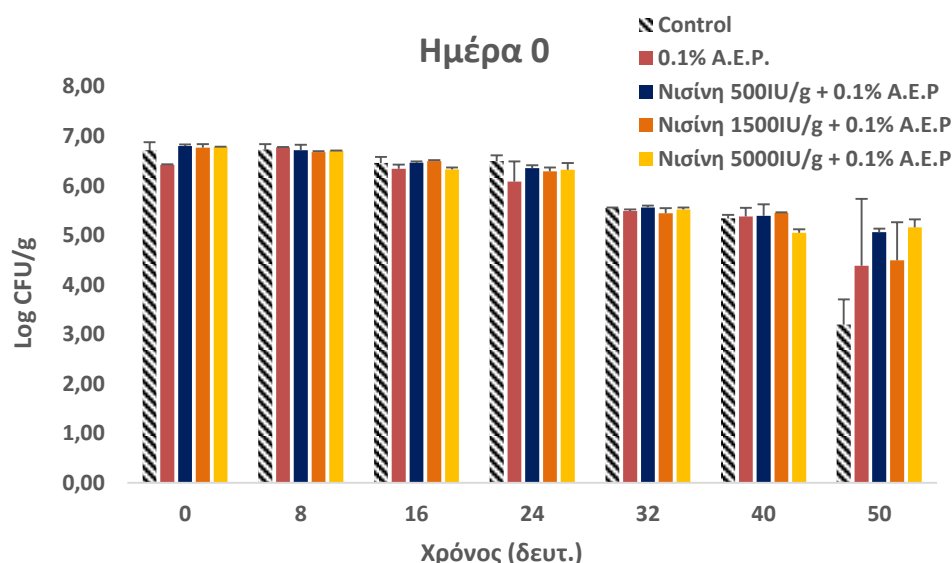
Στο δείγμα του μάρτυρα τη 12<sup>η</sup> ημέρα (γράφημα 3.2.3.1 b), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 φτάνει τους 6,0 log CFU/g. Ο πληθυσμός του παθογόνου στον κιμά άρχισε να μειώνεται σημαντικά από τα 15 s και μετά, μέχρι τη θανάτωσή του στα 50 s, σε σχέση με τα δείγματα control της 0ης ημέρας όπου ο παθογόνος δεν μηδενίστηκε. Σε δείγματα που περιείχαν 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.3.1 b) ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι 6,4 log CFU/g. Δείγματα που περιείχαν 0,3% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.3.1 b) είχαν πληθυσμός περίπου 6,0 log cfu/g τη χρονική στιγμή t=0, ίδιος με τα δείγματα-control της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης και 0,4 log κάτω από τον πληθυσμό του παθογόνου στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο της 12<sup>ης</sup> ημέρας. Ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 στα δείγματα που περιείχαν 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.3.1 b) φτάνει τους 6,16 log cfu/g. Τα κύτταρα του παθογόνου στα δείγματα χοιρινού κιμά σετς μεταχειρίσεις με 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριου ελαίου θανατώθηκαν στα 50 s, σε σχέση με τα δείγματα της ίδιας μεταχείρισης της 0ης ημέρας όπου ο παθογόνος δεν θανατώθηκε.



**Γράφημα 3.2.3.1 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

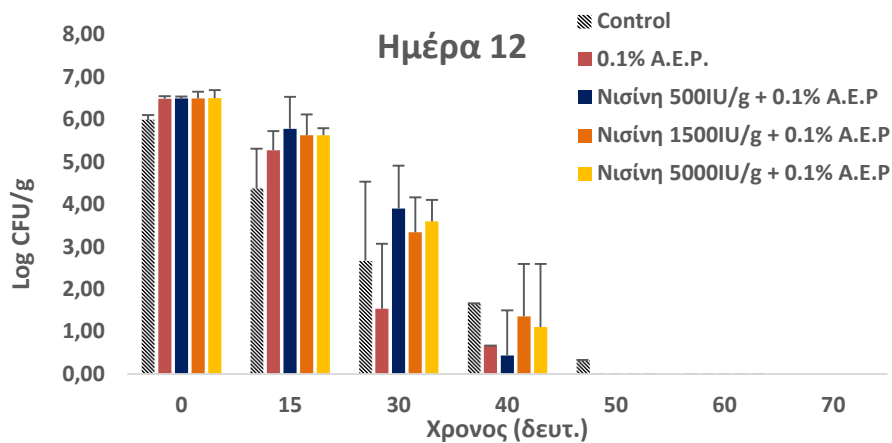
Στα δείγματα με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 0η ημέρας (γράφημα 3.2.3.2 a) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 διατηρείται σταθερός και δεν

διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και του control, αφού στις μεταχειρίσεις με Νισίνη ο πληθυσμός του παθογόνου κυμαίνεται από 6,8 έως 6,8 log cfu/g και στο control είναι 6,7 log cfu/g. Ακόμη, ο πληθυσμός του παθογόνου στη μεταχείριση με 0,1% αιθέριο έλαιο δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Τέλος, σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις δεν παρατηρείται μηδενισμός του παθογόνου, όπως ακριβώς συμβαίνει και στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα-control.



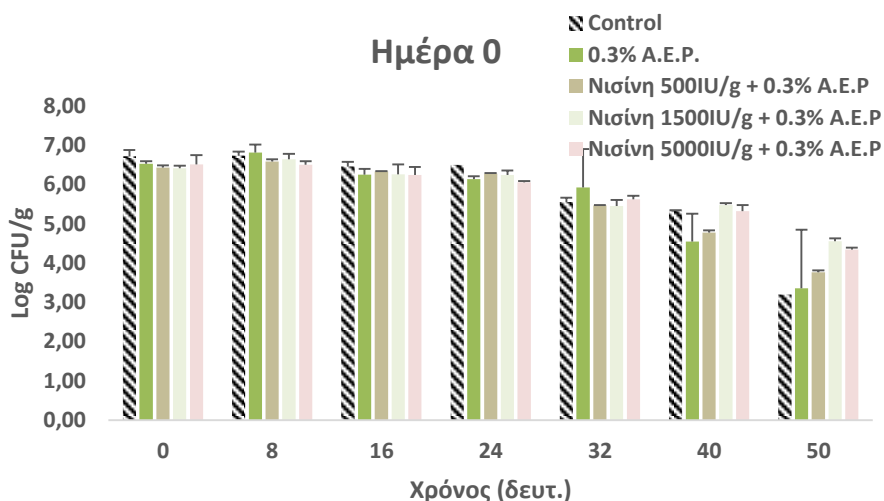
**Γράφημα 3.2.3.2 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Όσον αφορά τα δείγματα με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης της 12<sup>ης</sup> ημέρας (3.2.3.2 b) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 διατηρείται σταθερός μεταξύ των μεταχειρίσεων και δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ αυτών και της μεταχείρισης με 0,1% αιθέριο έλαιο, αφού ο πληθυσμός του παθογόνου φτάνει τους 6,5 log cfu/g σε όλες τις περιπτώσεις. Ακόμη, ο πληθυσμός του παθογόνου στα δείγματα του μάρτυρα δεν διαφέρει στατιστικώς σημαντικά (0,5 log cfu/g περίπου) από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Τέλος, και στις τρεις περιπτώσεις ο παθογόνος εμφανίζει θανάτωση στα 50 s, σε σχέση με τα δείγματα control της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης που εμφανίζουν θανάτωση στα 50 s.



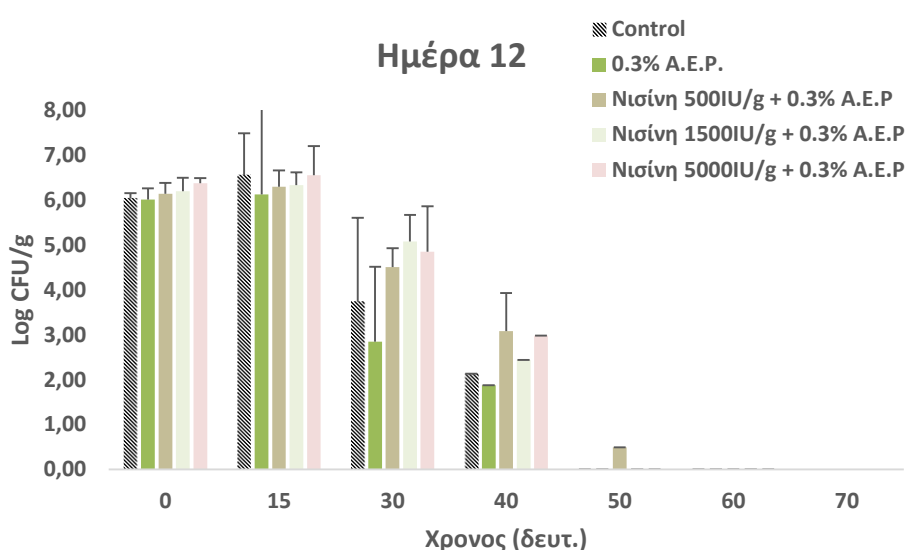
**Γράφημα 3.2.3.2 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης της 0ης ημέρας (γράφημα 3.2.3.3 a) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και του control. Τέλος, αν και παρουσιάζεται μείωση του πληθυσμού περίπου 2-3 log cfu/g, σε καμία από τις τρεις περιπτώσεις δεν παρατηρείται μηδενισμός του πληθυσμού. Το ίδιο συμβαίνει και στα δείγματα-control, στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα με νισίνη σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο.



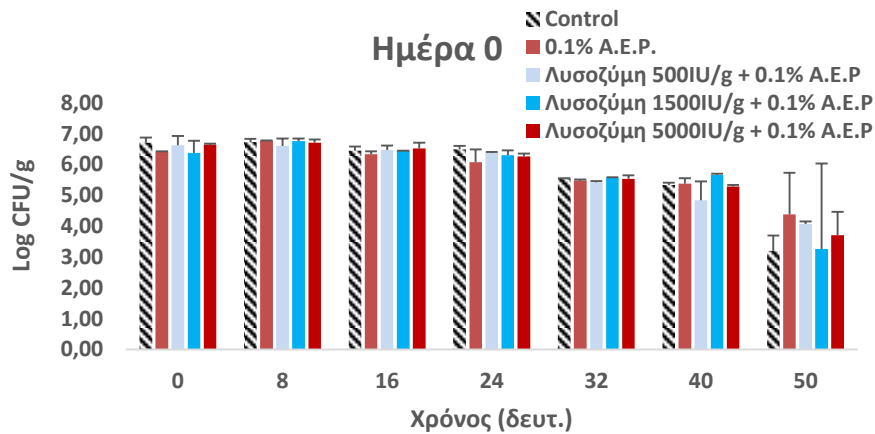
**Γράφημα 3.2.3.3 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Στο γράφημα 3.2.3.3 b, που αφορούν δείγματα με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 12<sup>η</sup> ημέρας, τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή μεταξύ των μεταχειρίσεων, και μεταξύ αυτών και του control, καθώς και μεταξύ αυτών και της μεταχείρισης με 0,3% αιθέριο έλαιο. Και στις τρεις μεταχειρίσεις με νισίνη σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ο παθογόνος εμφανίζει τον ίδιο χρόνο θανάτωσης που είναι τα 50 s, σε σχέση με τα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης.



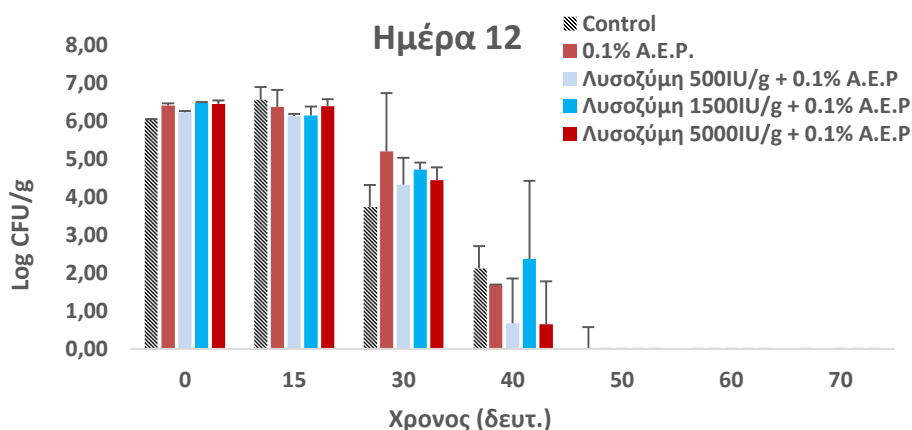
**Γράφημα 3.2.3.3 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 12η ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης της 0ης ημέρας (γράφημα 3.2.3.4 a) τη χρονική στιγμή t=0, στον πληθυσμό του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές μεταξύ των μεταχειρίσεων και ο πληθυσμός του παθογόνου δεν διαφέρει σημαντικά από εκείνον του μάρτυρα της 0ης ημέρας συντήρησης. Τέλος, σε όλες τις μεταχειρίσεις δεν γίνεται μηδενισμός του παθογόνου σε καμία χρονική στιγμή, όπως στα δείγματα-control, στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα με Νισίνη σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο, αλλά γίνεται μείωση του πληθυσμού κατά 2-3 log cfu/g.



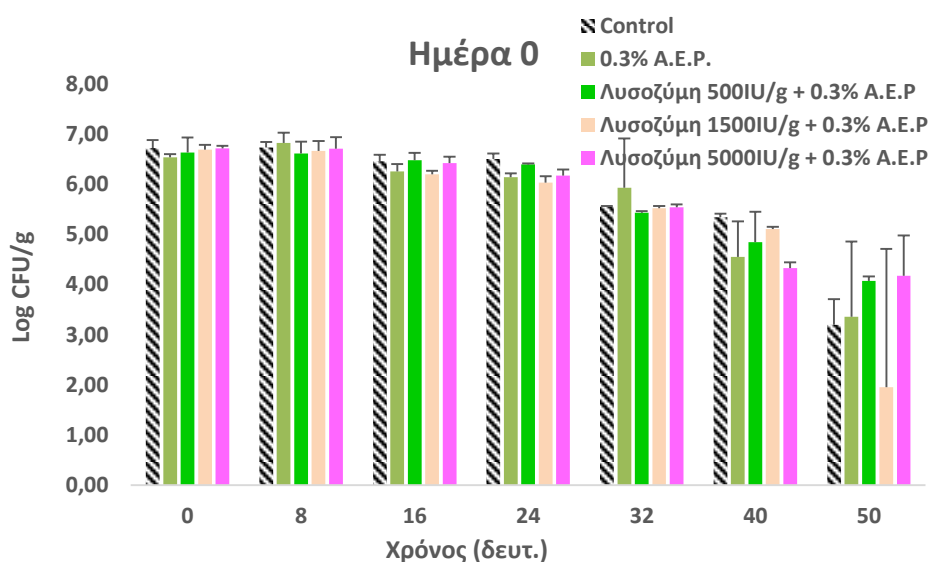
**Γράφημα 3.2.3.4 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Μετά το πέρας 12 ημερών υπό ψύξη των δειγμάτων που λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.3.4 b) τη χρονική στιγμή  $t=0$ , ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 δεν παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων. Μεταξύ αυτών και του control της 12ης ημέρας, όπως και μεταξύ αυτών και της μεταχείρισης με 0,1% αιθέριο έλαιο, δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό του παθογόνου. Τέλος, σε όλες τις μεταχειρίσεις παρατηρείται θανάτωση στα 50 s, όπως ακριβώς στα δείγματα-control της 12<sup>ης</sup> ημέρας.



**Γράφημα 3.2.3.4 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης της 0ης ημέρας (γράφημα 3.2.3.5 a) τη χρονική στιγμή t=0, στον πληθυσμό του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές μεταξύ των μεταχειρίσεων και δεν παρουσιάζονται διαφορές στατιστικώς σημαντικές από τα δείγματα-control της 0ης ημέρας συντήρησης. Τέλος, σε όλες τις μεταχειρίσεις δεν γίνεται μηδενισμός του παθογόνου σε καμία χρονική στιγμή, όπως στα δείγματα-control, στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα με Νισίνη σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο, αλλά γίνεται μείωση του πληθυσμού κατά 2-3 log cfu/g.

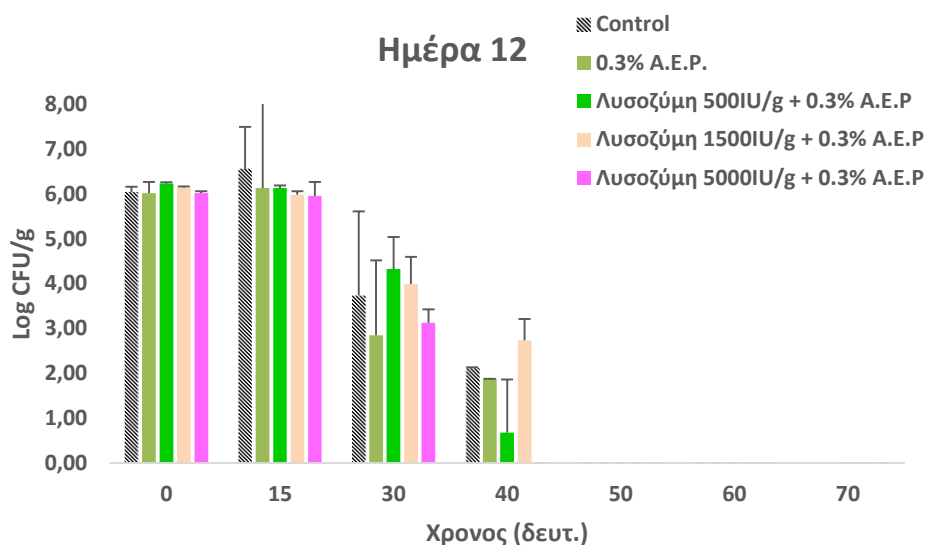


**Γράφημα 3.2.3.5 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Μετά το πέρας 12 ημερών στη συντήρηση τα δείγματα με λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.3.5 b) τη χρονική στιγμή t=0, δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή στον πληθυσμό του παθογόνου τόσο μεταξύ των μεταχειρίσεων, όσο και μεταξύ αυτών και των δειγμάτων-control. Τέλος, στις μεταχειρίσεις με λυσοζύμη 500 και 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 50 s, σε σχέση με την τρίτη μεταχείριση με λυσοζύμη 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3%



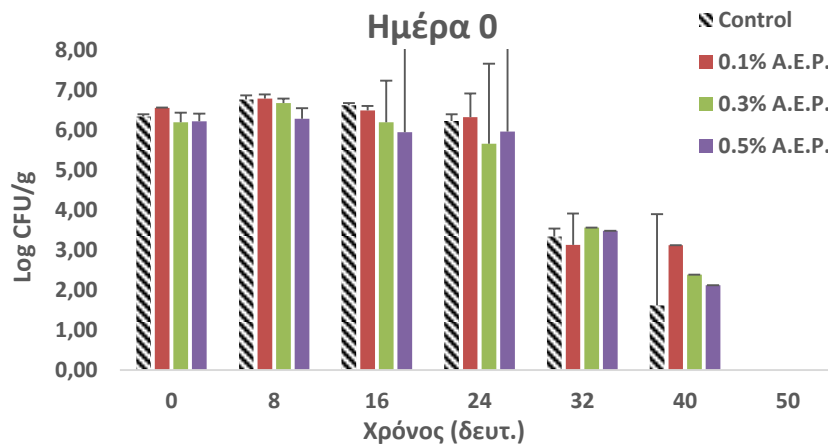
αιθέριο έλαιο που ο παθογόνος μικροοργανισμός θανατώνεται 10 s νωρίτερα από τις άλλες, δηλαδή στα 40 s.



**Γράφημα 3.2.3.5 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 68 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

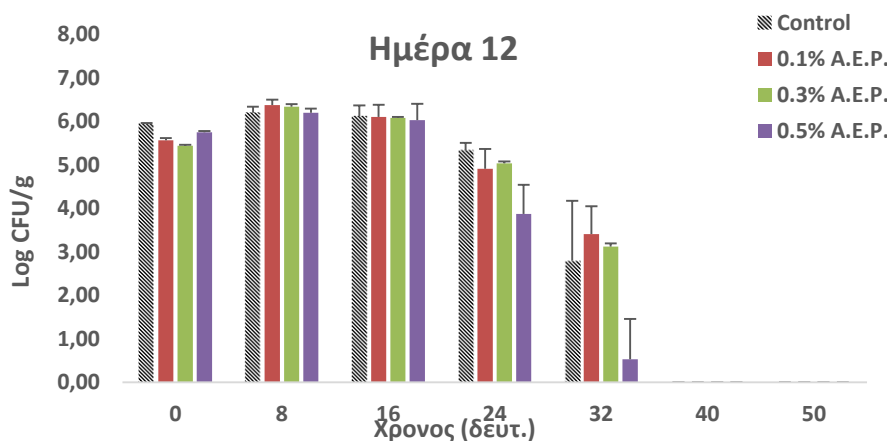
### 3.2.4 Θερμοκρασία 71 °C

Στο δείγμα-control της 0ης ημέρας συντήρησης (γράφημα 3.2.4.1 a), ο αρχικός πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι περίπου 6,3 log CFU/g. Σε δείγματα που περιείχαν 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.4.1 a) ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 κιμά είναι περίπου 6,5 log CFU/g. Στα δείγματα που περιείχαν 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.4.1 a) ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 κιμά φτάνει τους 6,2 log CFU/g. Τέλος, σε όλες τις μεταχειρίσεις με προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης παρατηρείται μείωση (θανάτωση) του πληθυσμού του παθογόνου κατά 3-5 λογάριθμους μέχρι τα 40 sec και μετέπειτα μηδενισμός του τη χρονική στιγμή των 50 s.



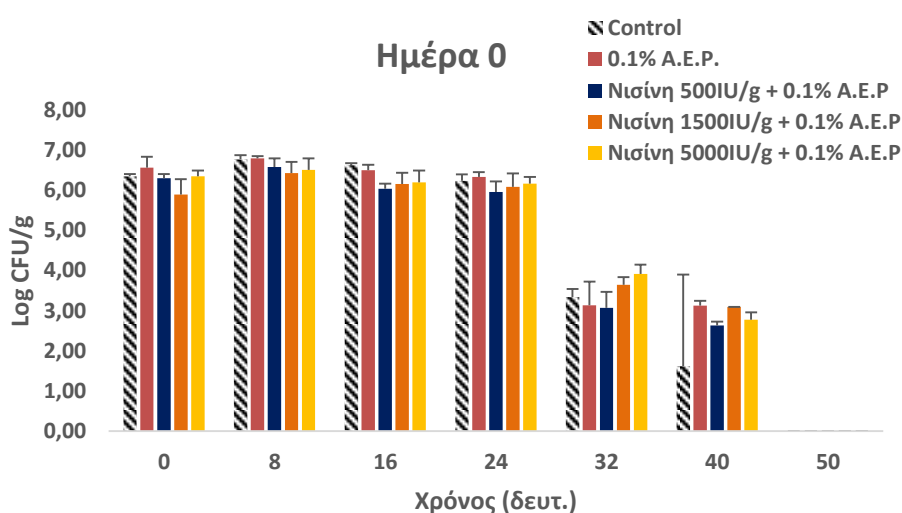
**Γράφημα 3.2.4.1 α:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Στο δείγμα-control της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης (γράφημα 3.2.4.1 b), ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 φτάνει τους 5,9 log cfu/g, δηλαδή μειωμένος κατά 0,4 log περίπου από τα δείγματα-control της 0ης ημέρας. Σε δείγματα που περιείχαν 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.4.1 b) ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 είναι 5,6, 5,4 και 5,8 log CFU/g, αντίστοιχα, μειώθηκε δηλαδή κατά 0,7-0,9 log cfu/g από τον πληθυσμό του παθογόνου στα δείγματα των ίδιων μεταχειρίσεων της 0ης ημέρας. Ο πληθυσμός του παθογόνου στον κιμά θανατώθηκε στα 40 s σε όλες τις μεταχειρίσεις με προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης



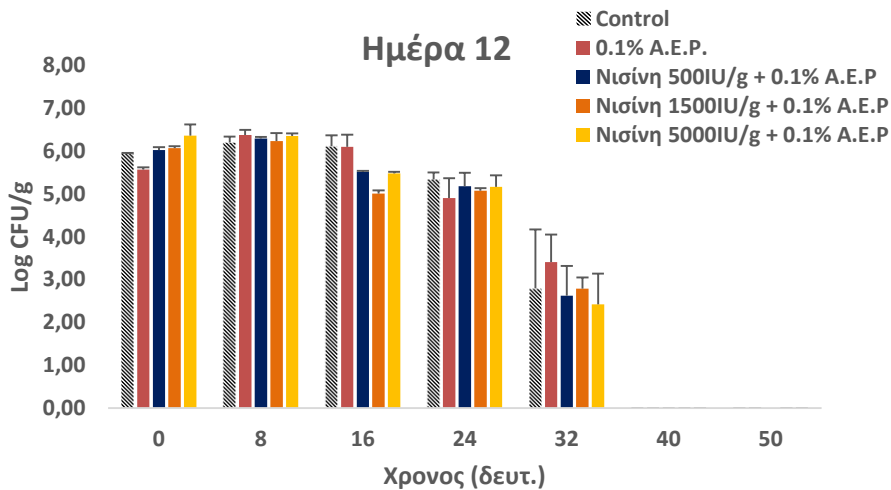
**Γράφημα 3.2.4.1 β:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control και των δειγμάτων με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 0ης ημέρα (γράφημα 3.2.4.2 a) τη χρονική στιγμή t=0, δεν παρουσιάζονται μεταβολές στατιστικώς σημαντικές μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή μεταξύ αυτών και του control, αφού στις μεταχειρίσεις με Νισίνη ο πληθυσμός του παθογόνου κυμαίνεται από 5,9 έως 6,4 log cfu/g και στο control είναι 6,3 log cfu/g. Σημαντική διαφορά δεν παρουσιάζει ούτε η μεταχείριση με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με τα δείγματα του μάρτυρα και της νισίνης. Τέλος, σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρείται μηδενισμός του παθογόνου στα 50 s, όπως συμβαίνει και στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα-control.



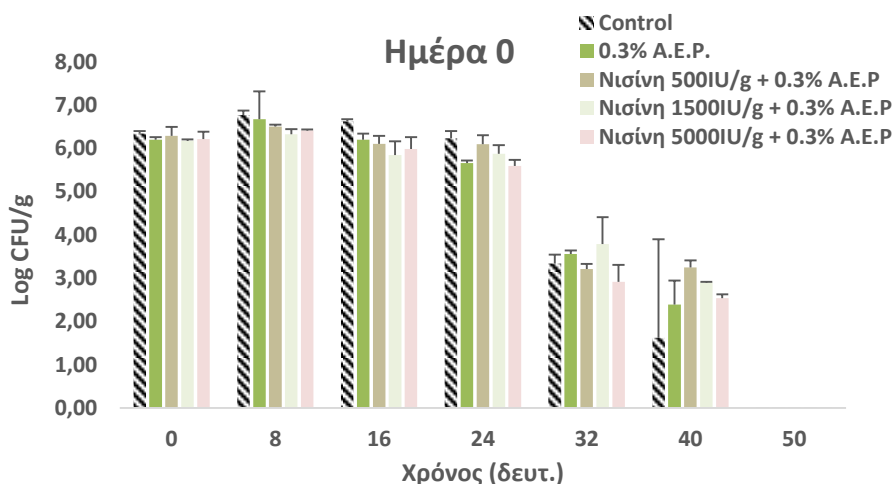
**Γράφημα 3.2.4.2 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Μετά από 12 ημέρες συντήρησης, στα δείγματα με νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.4.2 b) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 στον εμβολιασμένο με τον παθογόνο κιμά δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων (6,0-6,4 log cfu/g), και μεταξύ αυτών και του control (5,9 log cfu/g). Τέλος, και στις τρεις περιπτώσεις ο παθογόνος εμφανίζει θανάτωση στα 40 s, όπως ακριβώς συμβαίνει στα δείγματα-control, καθώς και στις μεταχειρίσεις με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



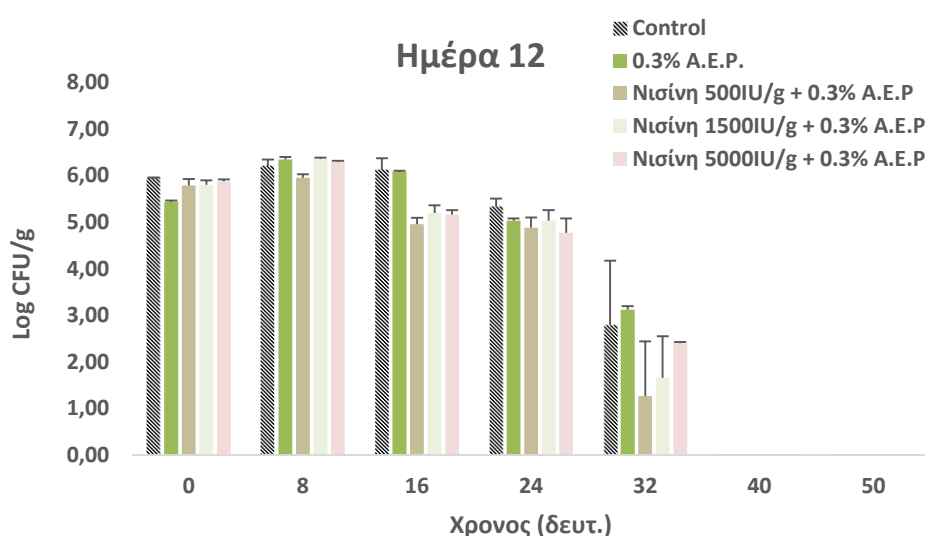
**Γράφημα 3.2.4.2 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης της 0ης ημέρας (γράφημα 3.2.4.2.3 a) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 δεν παρουσιάζει σημαντική μεταβολή μεταξύ των μεταχειρίσεων αυτών και του control, καθώς και μεταξύ αυτών και της μεταχείρισης με 0,3% αιθέριο έλαιο. Τέλος, παρατηρείται μηδενισμός του πληθυσμού του παθογόνου στα 50 s. Το ίδιο συμβαίνει και στα δείγματα-control, στα δείγματα με 0,3% αιθέριο έλαιο και στα δείγματα με Νισίνη σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο.



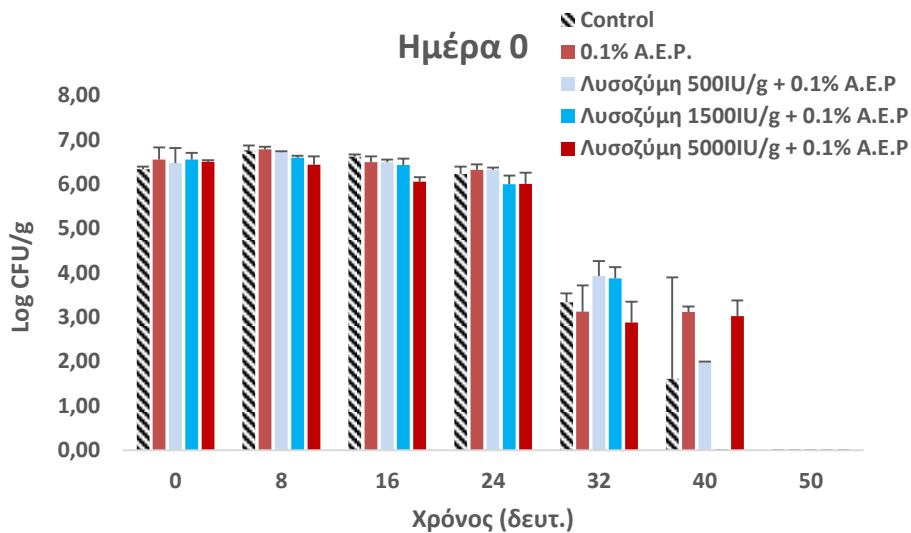
**Γράφημα 3.2.4.3 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 12η ημέρας (γράφημα 3.2.4.2.3 b), τη χρονική στιγμή  $t=0$ , ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 διατηρείται σχεδόν σταθερός (6,8-6,9 log CFU/g) μεταξύ των μεταχειρίσεων. Μεταξύ αυτών και του control και της μεταχείρισης με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μετά το πέρας 12 ημερών συντήρησης κυπό ψύξη. Τα 40 s αποτελούν τον κοινό χρόνο θανάτωσης παρατηρείται και στις 3 μεταχειρίσεις, όπως ακριβώς συμβαίνει στα δείγματα-control και στα δείγματα με προσθήκη 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης.



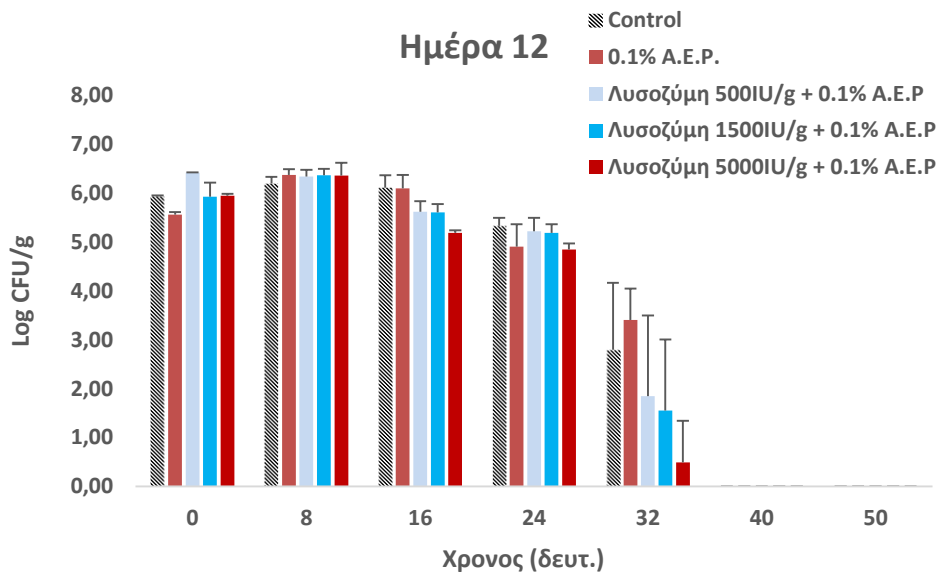
**Γράφημα 3.2.4.3 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη νισίνης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Στα δείγματα με Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης της 0ης ημέρας (γράφημα 3.2.4.4 a) τη χρονική στιγμή  $t=0$ , στον πληθυσμό του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 δεν παρατηρείται σημαντική μεταβολή μεταξύ των μεταχειρίσεων. Επίσης, δεν υπάρχει σημαντική διαφορά από τα δείγματα-control και τα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο της 0ης ημέρας συντήρησης. Τέλος, στη μεταχείριση με Λυσοζύμη 500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο παρατηρείται μηδενισμός του παθογόνου οργανισμού στα 50 s, ενώ στα δείγματα με Λυσοζύμη 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ο παθογόνος θανατώνεται στα 40 s.



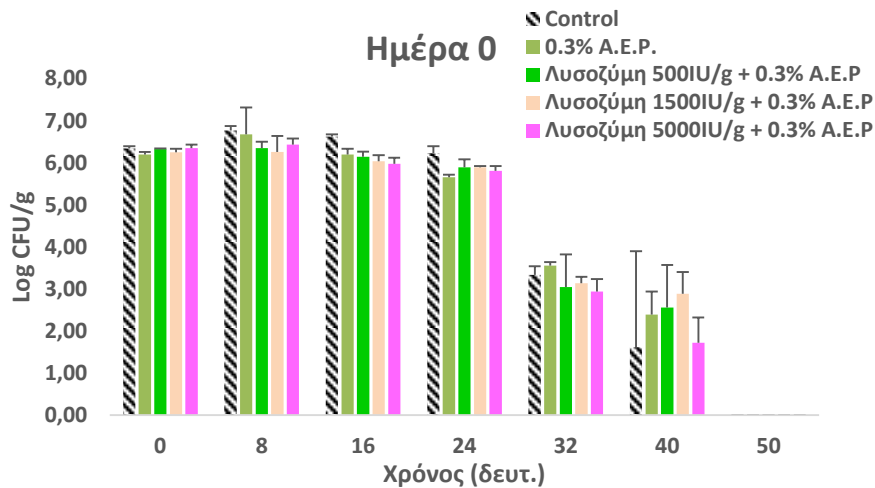
**Γράφημα 3.2.4.4 a:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Μετά το πέρας 12 ημερών υπό ψύξη των δειγμάτων που περιέχουν λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης (γράφημα 3.2.4.4 b) τη χρονική στιγμή  $t=0$ , ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 διαφέρει μεταξύ των μεταχειρίσεων κατά 0,5 log cfu/g, δηλαδή όχι στατιστικώς σημαντικά. Όμοιος, μεταξύ αυτών και του control της 12ης ημέρας. Όμως, διαφέρουν όλες οι μεταχειρίσεις από 0,4-0,9 log cfu/g με τη μεταχείριση με 0,1% αιθέριο έλαιο. Τέλος, και στις τρεις περιπτώσεις παρατηρείται ο ίδιος χρόνος θανάτωσης που είναι τα 40 s, όπως ακριβώς συμβαίνει στα δείγματα-control, καθώς και στα δείγματα με 0,1% αιθέριο έλαιο.



**Γράφημα 3.2.4.4 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

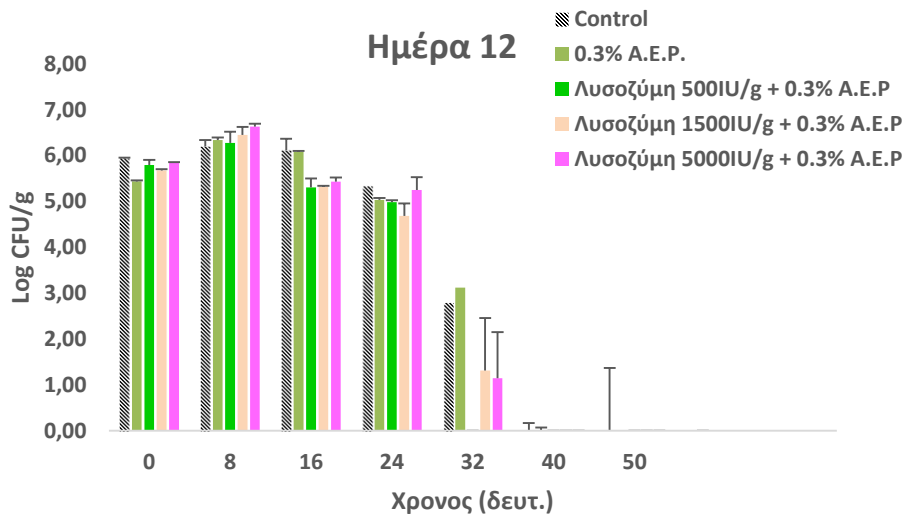
Τη 0η ημέρα συντήρησης στα δείγματα με Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.4.5 a) τη χρονική στιγμή t=0, ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και του control της 0ης ημέρας συντήρησης, καθώς και μεταξύ αυτών και της μεταχείρισης με 0,3% αιθέριο έλαιο. Τέλος, σε αυτές τις περιπτώσεις παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 50 s, όπως ακριβώς συμβαίνει στα δείγματα-control, καθώς και σε όλες τις μεταχειρίσεις με νισίνη και λυσοζύμη της 0ης ημέρας.



**Γράφημα 3.2.4.5 α:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 0η ημέρα συντήρησης.

Μετά το πέρας 12 ημερών στα δείγματα με με Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο (γράφημα 3.2.4.5 b) τη χρονική στιγμή  $t=0$ , ο πληθυσμός του μικροοργανισμού στον κιμά δεν διαφέρει σημαντικά, τόσο μεταξύ των μεταχειρίσεων, όσο και μεταξύ αυτών και των δειγμάτων-control. Διαφέρει κατά 0,4 log CFU/g μεταξύ των μεταχειρίσεων που αναφέρθηκαν και της μεταχείρισης με 0,3% αιθέριο έλαιο. Τέλος, στη μεταχείριση με λυσοζύμη 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο παρατηρείται θανάτωση του παθογόνου στα 32 s, σε σχέση με τις δύο επόμενες μεταχειρίσεις που ο παθογόνος μικροοργανισμός θανατώνεται τη χρονική στιγμή των 40 s, κατά 8 s αργότερα, όπως συμβαίνει στο μάρτυρα και στη μεταχείριση με 0,3% αιθέριο έλαιο.





**Γράφημα 3.2.4.5 b:** Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* 0157:H7 των δειγμάτων Control, των δειγμάτων με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και των δειγμάτων με προσθήκη λυσοζύμης (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συναρτήσει του χρόνου σε θερμοκρασία 71 °C τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

#### 4.1 Επίδραση των Αντιμικροβιακών Ουσιών Κατά τη Συντήρηση

##### Συμπεριφορά του παθογόνου βακτηρίου στους μάρτυρες (control)

Ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 στους μάρτυρες δεν εμφάνισε ανάπτυξη κατά τη διάρκεια στους συντήρησης από τη 0η έως τη 12<sup>η</sup> ημέρα στους 5 °C. Έτσι, ο αρχικός πληθυσμός των δειγμάτων-control στο γενικό υπόστρωμα TSA είναι 6,9 log CFU/g και αυξήθηκε στους 7,1 log CFU/g και ο πληθυσμός του παθογόνου βακτηρίου από 6,5 log CFU/g μειώθηκε στους 5,8 log CFU/g, μετά το πέρας των 12 ημερών σε συντήρηση υπό ψύξη. Επομένως, δεν υπάρχουν διαφορές στατιστικώς σημαντικές ( $p>0,05$ ) μεταξύ των δειγμάτων-control από τη 0η έως τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Αυτή η μείωση πιθανότατα οφείλεται στην αύξηση της ενδογενούς μικροχλωρίδας στα δείγματα-control χοιρινού κιμά, καθώς και στο ότι η συντήρηση των δειγμάτων γίνεται υπό ψύξη σε θερμοκρασία 5 °C, στην οποία το παθογόνο (μεσόφιλο) βακτήριο *E. coli* O157:H7 δεν αναπτύσσεται (αλλά αναπτύσσεται σε θερμοκρασία από 7 ή 10°C έως 50 °C με βέλτιστη αυτή των 37 °C).

##### Συμπεριφορά του παθογόνου βακτηρίου στις μεταχειρίσεις

Σύμφωνα με όλα τα γραφήματα και τα αποτελέσματα, οι πληθυσμοί της ενδογενούς μικροχλωρίδας στο γενικό υπόστρωμα TSA και οι πληθυσμοί του παθογόνου μικροοργανισμού στο επιλεκτικό υπόστρωμα CT-SMAC δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή ( $p>0,05$ ) στους περισσότερους συνδυασμούς των αντιμικροβιακών ουσιών. Επομένως, πριν την θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια της συντήρησης από τη 0η έως τη 12<sup>η</sup> ημέρα παρατηρούμε επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού στην εφαρμογή όλων των συνδυασμών των αντιμικροβιακών ουσιών.

Άρα, η προσθήκη των αντιμικροβιακών ουσιών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, μόνες τους ή σε συνδυασμούς δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή

δράση κατά του παθογόνου μικροοργανισμού, αφού οι πληθυσμοί του βακτηρίου δεν διέφεραν σημαντικά ( $p > 0,05$ ) από στους αντίστοιχους πληθυσμούς των δειγμάτων-control (μάρτυρες) σε όλη τη διάρκεια (0-12 ημέρες) συντήρησης στους 5 °C.

Επιπλέον, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι επειδή τα δείγματα του χοιρινού κιμά είχαν υψηλό εμβόλιο, περίπου 6 - 6,5 log CFU/g, ο πληθυσμός που παρατηρούμε αρχικά στο γενικό υπόστρωμα TSA είναι αποικίες του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7. Παρ' όλο που το θρεπτικό αυτό υλικό αποτελεί υπόστρωμα για την καλλιέργεια της ενδογενούς μικροχλωρίδας χοιρινού κιμά, συμπεραίνουμε ότι το επίπεδο του *E. coli* O157:H7 ξεπερνάει τα επίπεδα της ενδογενούς μικροχλωρίδας.

## **4.2 Επιβίωση του Παθογόνου Μικροοργανισμού Μετά τη Θερμική Επεξεργασία**

### **4.2.1 Θερμοκρασία 60 °C**

Κατά τη μηδενική ημέρα συντήρησης, οι πληθυσμοί του παθογόνου στα δείγματα – μάρτυρες θανατώθηκαν στα 1200 s, κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας στους 60 °C. Στην ίδια μεταχείριση, τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη, τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού θανατώθηκαν στα 600 s – υποδιπλάσιο χρονικό διάστημα, πράγμα που σημαίνει ότι παρουσίασαν μικρότερη θερμοανθεκτικότητα. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης στις συγκεντρώσεις 0,1% και 0,3% δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση της θερμοανθεκτικότητας του πληθυσμού του παθογόνου τόσο μεταξύ της 0ης ημέρας και της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης υπό ψύξη, όσο και με αυτά του control της 12<sup>ης</sup> ημέρας. Αυτό σημαίνει ότι σ' αυτές τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε θανάτωση των κυττάρων του παθογόνου τη 0η ημέρα τη χρονική στιγμή των 900 s και τη 12<sup>η</sup> ημέρα στα 600 s. Διαφορετική ικανότητα επιβίωσης στη θέρμανση παρουσίασαν τα κύτταρα του παθογόνου στα δείγματα με 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης αφού παρουσιάστηκε θανάτωση στα 300 s.

Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη νισίνης συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) και λυσοζύμης συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο συγκέντρωσης 0,1% και 0,3% ξεχωριστά η κάθε μία,

τη 0η ημέρα ο παθογόνος μικροοργανισμός παρουσίασε θανάτωση στα 900 s, ενώ την 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης παρουσίασε θανάτωση στα 600 s.

Συνοψίζοντας, η μεταχείριση με (i) αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκέντρωσης 0,5% προκάλεσε πιο γρήγορη θανάτωση (300 s) του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 μετά το πέρας 12 ημερών συντήρησης υπό ψύξη στους 5 °C, σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιμικροβιακή δράση υψηλής συγκέντρωσης του φυσικού αντιμικροβιακού που χρησιμοποιήθηκε, οδήγησε αρχικά στην ευαισθητοποίηση του παθογόνου, άρα στον τραυματισμό των κυττάρων του και βοήθησε κατ'έπекταση στη θανάτωση του βακτηρίου σε λιγότερο χρόνο κατά τη θερμική επεξεργασία. Άρα, ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 εμφάνισε μικρότερη θερμοανθεκτικότητα στη μεταχείριση αυτή συγκριτικά με τους μάρτυρες και με όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Επίσης, η προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης του Α.Ε.Ρ. (0.3%) σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση νισίνης ή λυσοζύμης (5000IU/g) εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των κυττάρων σε σχέση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο την αντίστοιχη συγκέντρωση Α.Ε.Ρ. Τέλος, η εφαρμογή των υπόλοιπων συνδυασμών των αντιμικροβιακών ουσιών με αιθέριο έλαιο ρίγανης με 500 ή 1500IU/g δεν επηρέασε τη θερμοανθεκτικότητα των κυττάρων του παθογόνου τη 0η ή 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

#### **4.2.2 Θερμοκρασία 64 °C**

Κατά τη 0η ημέρα συντήρησης, οι πληθυσμοί του παθογόνου στα δείγματα – μάρτυρες θανατώθηκαν στα 210 s, κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας στους 64 °C. Στα ίδια δείγματα, τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη, τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού θανατώθηκαν στα 150 s, πράγμα που σημαίνει ότι παρουσίασαν μικρότερη θερμοανθεκτικότητα. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1%, 0,3% και 0,5%) δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή/διαφοροποίηση ( $p > 0.05$ ) της θερμοανθεκτικότητας του πληθυσμού του παθογόνου τόσο τη 0η ημέρα όσο και μετά από 12 ημέρες συντήρησης υπό ψύξη, με αυτά του control της 12<sup>ης</sup> ημέρας. Αυτό σημαίνει ότι σε αυτές τις μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε θανάτωση των

κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού τη χρονική στιγμή των 150 s και τη 0η και την 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

Όμοια ικανότητα επιβίωσης στη θέρμανση παρουσίασε το παθογόνο βακτήριο τη 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης σε δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη Νισίνης διαφόρων συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο συγκεντρώσεων 0,1% και 0,3%, αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός θανατώθηκε στα 150 s, όπως στα (i) στα δείγματα control μετά από 12 ημέρες συντήρησης στους 5 °C και (ii) στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1%, 0,3% και 0,5%) και τη 0η και την 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης. Ωστόσο παρουσιάστηκε μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των κυττάρων μετά την προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης του A.E.P. (0.3%) σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση νισίνης (5000IU/g) σε σχέση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο την αντίστοιχη συγκέντρωση A.E.P ή χαμηλότερη συγκέντρωση του φυσικού αντικροβιακού.

Τέλος, δεν υπήρχε σημαντική μεταβολή στη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη Λυσοζύμης συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκέντρωσης 0,3%, καθώς παρουσίασαν θανάτωση στα 150 s τόσο στη 0η όσο και στη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης τους. Ομοίως με την νισίνη, και πάλι παρουσιάστηκε μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των κυττάρων μετά την προσθήκη υψηλής συγκέντρωσης του A.E.P. (0.3%) σε συνδυασμό με την υψηλή συγκέντρωση λυσοζύμης (5000IU/g) σε σχέση με τα δείγματα που περιείχαν μόνο την αντίστοιχη συγκέντρωση A.E.P ή χαμηλότερη συγκέντρωση του φυσικού αντικροβιακού.

#### **4.2.3 Θερμοκρασία 68 °C**

Κατά τη 0η ημέρα συντήρησης, οι πληθυσμοί του παθογόνου *E. coli* O157:H7 στα δείγματα – μάρτυρες θανατώθηκαν αλλά δεν μηδενίστηκαν σε καμία χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των δειγμάτων στους 68 °C. Στην ίδια μεταχείριση, τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη, τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού θανατώθηκαν στα 50 s, πράγμα που σημαίνει ότι παρουσίασαν μικρότερη θερμοανθεκτικότητα. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν

με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1%, 0,3% και 0,5%) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη θερμοανθεκτικότητα του πληθυσμού του παθογόνου τόσο τη 0η ημέρα όσο και τη 12<sup>η</sup> ημέρα, με αυτά του control. Αυτό σημαίνει ότι και σε αυτές τις μεταχειρίσεις δεν παρατηρήθηκε μηδενισμός των κυττάρων του παθογόνου τη 0η ημέρα σε καμία από τις χρησιμοποιούμενες χρονικές στιγμές, ενώ τη 12<sup>η</sup> ημέρα παρατηρήθηκε θανάτωση στα 50 s. Το ίδιο συνέβη και με τα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη Νισίνης και λυσοζύμης συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκέντρωσης 0,1%.

Όμοια ικανότητα επιβίωσης στη θέρμανση με κάποιες εξαιρέσεις, παρουσίασε ο μικροοργανισμός τη 0η και 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης σε δείγματα με νισίνη και λυσοζύμη σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο – δηλαδή τη 0η θανατώθηκε ο παθογόνος αλλά δεν μηδενίστηκε, ενώ παρατηρήθηκε θανάτωση του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 στα 50 s τη 12<sup>η</sup> ημέρα. Μια όμως σημαντική διαφορά είναι ότι, ο πληθυσμός του παθογόνου θανατώθηκε σε αυτές τις μεταχειρίσεις στα 50 s, ενώ στη μεταχείριση με Νισίνη συγκέντρωσης 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ο παθογόνος θανατώθηκε στα 60 s τη 12<sup>η</sup> ημέρα. Τέλος, η προσθήκη Λυσοζύμης συγκέντρωσης 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης τη 0η ημέρα δεν προκάλεσε θανάτωση στον παθογόνο, ενώ τη 12<sup>η</sup> ημέρα, ο παθογόνος θανατώθηκε στα 40 s.

Προκύπτει έτσι το συμπέρασμα ότι η μεταχείριση με Λυσοζύμη συγκέντρωσης 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης, προκάλεσε πιο γρήγορη θανάτωση (40 s) του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 μετά το πέρας 12 ημερών συντήρησης υπό ψύξη στους 5 °C σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιμικροβιακή δράση του συνδυασμού των υψηλών συγκεντρώσεων των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία (της θερμικής επεξεργασίας) οδήγησαν στην ευαισθητοποίηση του παθογόνου, άρα στον τραυματισμό των κυττάρων του και κατ'επέκταση βοήθησαν στη θανάτωση του βακτηρίου σε λιγότερο χρόνο. Άρα, ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 εμφάνισε μικρότερη θερμοανθεκτικότητα στη μεταχείριση αυτή συγκριτικά με τους μάρτυρες και με όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Σειρά έχουν φυσικά οι μεταχειρίσεις στις οποίες ο

παθογόνος θανατώθηκε στα 50 s και έπειτα ακολουθούν εκείνες στις οποίες ο παθογόνος θανατώθηκε στα 60 s.

#### 4.2.4 Θερμοκρασία 71 °C

Κατά τη 0η ημέρα συντήρησης, οι πληθυσμοί του παθογόνου στα δείγματα – μάρτυρες θανατώθηκαν στα 50 s κατά τη διάρκεια θερμικής επεξεργασίας στους 71 °C. Στην ίδια μεταχείριση, τη 12η ημέρα συντήρησης υπό ψύξη, τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού θανατώθηκαν ξανά στα 40 s, πράγμα που σημαίνει ότι παρουσίασαν την μικρότερη θερμοανθεκτικότητα. Στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0,1%, 0,3% και 0,5%) δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση της θερμοανθεκτικότητας ( $p > 0.05$ ) του πληθυσμού του παθογόνου μεταξύ αυτών και του control της 0η ημέρας συντήρησης υπό ψύξη. Αντίθετα, τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης υπό ψύξη τα κύτταρα του παθογόνου θανατώθηκαν στα 40 s στα δείγματα με προσθήκη 0,1%, 0,3% και 0,5% αιθέριου ελαίου, όπως οι μάρτυρες.

Η προσθήκη του συνδυασμού της Νισίνης συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) με αιθέριο έλαιο συγκεντρώσεων 0,1% και 0,3% αντίστοιχα, παρουσίασε πληθυσμούς του παθογόνου *E. coli* O157:H7 που δεν διέφεραν σημαντικά ( $p > 0.05$ ) συγκρινόμενοι μεταξύ τους, με το control και με τις παραπάνω μεταχειρίσεις. Δηλαδή, τη 0η ημέρα ο παθογόνος παρουσίασε θανάτωση και μηδενισμό στα 50 s, ενώ τη 12η ημέρα συντήρησης παρουσίασε μηδενισμό στα 40 s.

Όμοια ικανότητα επιβίωσης στη θέρμανση παρουσίασαν τα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού στα δείγματα που παρασκευάστηκαν με προσθήκη Λυσοζύμης συγκεντρώσεων (500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκέντρωσης 0,1% τη 0η ημέρα τα οποία θανατώθηκαν και μηδενίστηκαν στα 50 s, με εξαίρεση τα δείγματα με Λυσοζύμη συγκέντρωσης 1500 IU/g που θανατώθηκαν στα 40 s. Την 12η ημέρα συντήρησης, ο παθογόνος στα δείγματα της ίδιας μεταχείρισης θανατώθηκε στα 40 s, όπως στις αντίστοιχες μεταχειρίσεις με την προσθήκη Νισίνης. Όσο για τα δείγματα με προσθήκη συνδυασμού Λυσοζύμης συγκεντρώσεων (500, 1500 και 5000 IU/g) με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης ο μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 μηδενίστηκε στα 50 s την 0η ημέρα συντήρησης, όπως στα δείγματα της ίδιας ημέρας με Νισίνη ίδιων συγκεντρώσεων σε

συνδυασμό με 0,1 και 0,3% αιθέριο έλαιο. Ωστόσο, την 12η ημέρα συντήρησης τα δείγματα των ίδιων μεταχειρίσεων, με εξαίρεση τα δείγματα με προσθήκη Λυσοζύμης 500 IU/g σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο 0,3% στα οποία ο παθογόνος θανατώθηκε στα 32 s, θανατώθηκαν στα 40 s, όπως όλες οι μεταχειρίσεις με Νισίνη και Λυσοζύμη της αντίστοιχης ημέρας συντήρησης.

Συνοψίζοντας, η μεταχείριση με Λυσοζύμη συγκέντρωσης 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης, προκάλεσαν πιο γρήγορη θανάτωση (32 s) του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 μετά το πέρας 12 ημερών συντήρησης υπό ψύξη στους 5 °C, σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιμικροβιακή δράση των φυσικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με την υψηλή θερμοκρασία (της θερμικής επεξεργασίας) οδήγησαν στην ευαισθητοποίηση του παθογόνου, άρα στον τραυματισμό των κυττάρων του και βοήθησαν κατ'επέκταση στη θανάτωση του βακτηρίου σε λιγότερο χρόνο. Άρα, ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 εμφάνισε μικρότερη θερμοανθεκτικότητα στις μεταχειρίσεις αυτές συγκριτικά με τους μάρτυρες και με όλες τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις.

Επίσης, όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση της Νισίνης έχει βρεθεί ότι εξαρτάται κυρίως από τα στελέχη και το είδος του παθογόνου, από τη συγκέντρωσή της, καθώς επίσης και από τη θερμοκρασία συντήρησης και τη θερμοκρασία της θερμικής επεξεργασίας. Η αντιμικροβιακή δράση της Νισίνης δεν είναι ισχυρή κατά των Gram – αρνητικών βακτηρίων, όπως είναι το παθογόνο βακτήριο *E. coli* O157:H7 που μελετάμε. Το γεγονός ότι τα κατά Gram-αρνητικά βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στη δράση των αντιβακτηριακών και λιγότερο ευαίσθητα από τα Gram – θετικά βακτήρια ίσως πρέπει να αναμένεται, δεδομένου ότι διαθέτουν μία εξωτερική μεμβράνη (ένα λιποπρωτεϊνικό στρώμα) που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα (Ratledge and Wilkinson, 1988), που περιορίζει τη διάχυση των υδρόφοβων ενώσεων διαμέσου του στρώματος από λιποπολυσακχαρίτη (Vaara, 1992).

Η συνεργός δράση του αιθέριου ελαίου με τη Νισίνη κατά των Gram – αρνητικών βακτηρίων, θα μπορούσε να εξηγηθεί από την αποδόμηση της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης των Gram – αρνητικών βακτηρίων από τα



φαινολικά συστατικά του αιθέριου ελαίου, γεγονός που επιτρέπει στη Νισίνη να διαπερνά τον “φραγμό” της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης και να δρα εναντίον του βακτηριακού κυττάρου. Η ποσότητα της Νισίνης που μπορεί να εισέλθει και να δράσει εναντίον του βακτηριακού κυττάρου, εξαρτάται από τον βαθμό της βλάβης που προξενείτε στην εξωτερική προστατευτική μεμβράνη από το αιθέριο έλαιο. Έτσι, όταν το αιθέριο έλαιο είχε ασθενή δράση κατά των παθογόνων, ορισμένη μόνο ποσότητα της Νισίνης μπορούσε να διαπεράσει τον “φραγμό” της εξωτερικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να παρατηρείται συνεργός αντιμικροβιακή δράση. Αντίστοιχα, στις περιπτώσεις που το αιθέριο έλαιο είχε ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση και ως εκ τούτου είχε μεγαλύτερη δράση κατά της εξωτερικής προστατευτικής μεμβράνης, μεγαλύτερη ποσότητα Νισίνης μπορούσε να εισέλθει και έτσι να παρουσιάζεται μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση στις 5000 IU/g από εκείνη με τις 500 ή τις 1500 IU/g. Όταν το έλαιο δεν παρουσίαζε δράση κατά του παθογόνου, τότε η Νισίνη δεν μπορούσε να δράσει εναντίον του βακτηριακού κυττάρου και συνεπώς δεν παρατηρούνταν συνεργός δράση.

Άλλοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η αντιμικροβιακή δράση της Νισίνης εξασθενεί όταν η τελευταία προστίθεται στο κρέας παρά σε εργαστηριακά υποστρώματα. Αυτό αποδίδεται τόσο στη δέσμευση της Νισίνης από τις πρωτεΐνες και το λίπος, όσο και στην εξουδετέρωσή της από τις πρωτεάσες του κρέατος (Aasen et al., 2003, Stergiou et al., 2006).

Επίσης, η λυσοζύμη είναι δραστική έναντι των Gram-θετικών βακτηρίων και ιδιαίτερα των θερμόφιλων, συγκριτικά με τα Gram-αρνητικά βακτήρια που είναι ανθεκτικά στη δράση της λυσοζύμης, εξαιτίας της εξωτερικής μεμβράνης που έχουν η οποία περιβάλλει τη στοιβάδα της πεπτιδογλυκάνης. Η αντιμικροβιακή δράση της λυσοζύμης έναντι της ανάπτυξης κάποιων παθογόνων μικροοργανισμών είναι ασθενής, ιδίως έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Αλλά η δράση αυτή ενισχύεται από άλλες ουσίες. Αυτοί οι συμπαράγοντες διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, ανοίγουν πόρους και επιτρέπουν στη λυσοζύμη να διεισδύσει στο κύτταρο, να έρθει σε επαφή με την πεπτιδογλυκάνη και να την καταστρέψει (Masschalck & Michiels, 2003).

### 4.3 D-values και Shoulder length (SI)

Οι παραπάνω παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και από τον προσδιορισμό των τιμών D-value του παθογόνου (Πίνακες 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 και 4.4.4), ανάλογα με την μελετώμενη μεταχείριση. Οι τιμές D-value μετριοούνται σε λεπτά (sec), όπως και οι τιμές του Shoulder length (SI). Στα γραφήματα, ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2 > 0,90$ ) που προέκυψε είναι  $R^2 = 0,7683$  ο μικρότερος και  $R^2 = 0,9941$  ( $R^2 > 0,90$ ) ο μεγαλύτερος για τη 0η ημέρα, καθώς και  $R^2 = 0,7543$  ο μικρότερος και  $R^2 = 0,9995$  ( $R^2 > 0,90$ ) ο μεγαλύτερος για τη 12<sup>η</sup> ημέρα.

Οι τιμές D-value υπολογίστηκαν από τα δεδομένα που προέκυψαν, με τη γραμμική παλινδρόμηση (log linear regression), με τα δείγματα-control χοιρινού κιμά να κυμαίνονται τη 0η ημέρα από 59,82 sec έως 1,46 sec για το θερμοκρασιακό εύρος 60 έως 71 °C, και τη 12<sup>η</sup> ημέρα από 29,61 min έως 1,28 min για το θερμοκρασιακό εύρος 60 έως 71 °C. Γενικά, το εύρος των τιμών D-value και από τη 0η και τη 12<sup>η</sup> ημέρα από όλες τις θερμοκρασίες κυμαίνεται από 60,71 sec έως 0,87 sec για τη θερμοκρασία 60 °C και τη θερμοκρασία 71 °C, αντίστοιχα.

Τη 0η ημέρα για τη θερμοκρασία 60 °C (Πίνακας 4.3.1) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 60,71 min έως 37,77 sec. Οι πιο χαμηλές τιμές είναι εκείνες των μεταχειρίσεων: Λυσοζύμη (500 και 5000 IU/g) και 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 37,77 sec. Αυτό υποδηλώνει ότι ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του συγκεκριμένου βακτηριακού πληθυσμού, δηλαδή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 κατά 90% στη συγκεκριμένη θερμοκρασία (60 °C) στα δείγματα χοιρινού κιμά είναι 37,77 sec για τις αντίστοιχες αναφερόμενες μεταχειρίσεις. Αντίθετα πολύ περισσότερο χρόνο χρειάζεται ο πληθυσμός του παθογόνου στα δείγματα-control με 59,82 sec και στις μεταχειρίσεις με 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 60,71 min. Ωστόσο σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και ο χρόνος που απαιτείται για να εκκινήσει η μείωση του πληθυσμού (shoulder length). Την ίδια μέρα το μήκος της ευθείας γραμμής πριν την καμπύλη, έχει εύρος από 2,22 sec έως 58,71 min, με μικρότερα εκείνα των μεταχειρίσεων: 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης, Λυσοζύμη (1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 5,68 min, 9,36 min και 6,19 sec, αντίστοιχα. Μεγαλύτερο Shoulder length έχουν οι μεταχειρίσεις: Νισίνη συγκεντρώσεων 500, 1500 και 5000 IU/g σε

συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 58,71 sec, 48,77 sec και 48,54 sec, αντίστοιχα. Τα δείγματα που περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,3%, εμφάνισαν υψηλότερες τιμές SI σε σχέση με αυτά του control που δεν περιείχαν. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην πρόσθετη παρουσία του ελαίου το οποίο δρα προστατευτικά για τον μικροοργανισμό ενάντια στην υψηλή θερμοκρασία (Oteiza et al., 2003).

Η τιμή D-value (59,82 sec) των δειγμάτων (Πίνακας 4.3.1) χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών (μάρτυρας) είναι μεγαλύτερη και σχεδόν ίση με τις τιμές D-value των υπόλοιπων μεταχειρίσεων. Το γεγονός ότι οι μεταχειρίσεις με νισίνη και λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης έχουν μικρότερες τιμές D-value από τις αντίστοιχες μεταχειρίσεις με αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκέντρωσης 0,1% χωρίς όμως τα αντιμικροβιακά Νισίνη και Λυσοζύμη, υποδηλώνει ότι η παρουσία της βακτηριοσίνης Νισίνης και της Λυσοζύμης προκάλεσε stress στον παθογόνο και κατ' επέκταση μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των κυττάρων του στη θέρμανση. Το ίδιο ισχύει και για τις μεταχειρίσεις με Νισίνη και Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης σε σχέση με την αντίστοιχη μεταχείριση με 0,3% αιθέριο έλαιο (μόνο του). Ωστόσο, αυτές οι μεταχειρίσεις που περιείχαν Νισίνη και Λυσοζύμη σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης είχαν ελαφρώς πιο χαμηλές τιμές D-values σε σχέση με αυτές που τα αντιμικροβιακά σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Ακόμη, κατά τη 0η ημέρα δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων χοιρινού κιμά που περιείχαν Νισίνη και αυτών που περιείχαν Λυσοζύμη.

Τη 12<sup>η</sup> ημέρα για τη θερμοκρασία 60 °C (Πίνακας 4.3.1) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 18,58 sec έως 43,81 sec. Η πιο χαμηλή τιμή είναι εκείνη της μεταχείρισης λυσοζύμη συγκέντρωσης 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 18,58 sec. Αντίθετα, πολύ περισσότερο χρόνο χρειάζεται ο πληθυσμός του παθογόνου στη μεταχείριση με λυσοζύμη συγκέντρωσης 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 43,81 sec. Κατά τη 12η ημέρα ακόμη, οι τιμές D-values των δειγμάτων-control και των δειγμάτων που περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης σημείωσαν αισθητή μείωση της τάξης του 50% περίπου σε σχέση με τη 0η ημέρα. Όμοια, αισθητή μείωση σημειώθηκε και στα δείγματα που

περιείχαν Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Αντίθετα, στα δείγματα με Νισίνη η μείωση του D-value ήταν μικρότερη της τάξης του 0 με 36,2%. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η Νισίνη έδρασε ενάντια στην ενδογενή χλωρίδα (Gram-θετικά) π.χ.: γαλακτικά βακτήρια (εξαιτίας της ύπαρξης κενού) του μπιφτεκιού, με αποτέλεσμα τα κύτταρα του παθογόνου δεν στρεσσαρίστηκαν από τον ανταγωνισμό της ενδογενούς μικροχλωρίδας. Έτσι, η ενδογενής μικροχλωρίδα άφησε το περιθώριο στον παθογόνο *E. coli* O157:H7 να επιβιώσει και να αυξηθεί ο πληθυσμός του λίγο παραπάνω σε σχέση με την προσθήκη 0,1% ή 0,3% αιθέριο έλαιο (μόνο του). Ο ανταγωνισμός της ενδογενούς μικροχλωρίδας συνέβη στα δείγματα-control, για αυτό το λόγο ο παθογόνος ήταν πιο ευαίσθητος σε αυτά. Παράλληλα, την ίδια μέρα το μήκος της ευθείας γραμμής πριν την καμπύλη (shoulder), δηλαδή η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (SI-Shoulder length) έχει εύρος από 5,53 sec έως 87,04 sec, με μικρότερα εκείνα των μεταχειρίσεων: 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης και Λυσοζύμη 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 5,53 sec και 10,07 sec, αντίστοιχα. Μεγαλύτερο Shoulder length έχουν οι μεταχειρίσεις: 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης και Λυσοζύμη 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 87,04 sec και 81,14 min, αντίστοιχα. Αυτή τη μέρα, τα δείγματα που περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,3%, εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερες τιμές SI σε σχέση με αυτά της 0ης ημέρας. Το ίδιο συνέβη και με τα δείγματα που περιείχαν Λυσοζύμη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Ωστόσο, μικρή αύξηση παρουσίασαν τα δείγματα που περιείχαν Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% και μείωση της τάξης του 50% περίπου τα δείγματα που περιείχαν Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Μείωση επίσης παρουσίασαν τα δείγματα που περιείχαν Λυσοζύμη 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι αυξήθηκε τόσο η συγκέντρωση των αντιμικροβιακών, όσο και η συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, και όσο αυξάνονται αυτά τα εμπόδια, τόσο μειώνεται το Shoulder.

**Πίνακας 4.3.1:** Χρόνοι πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (Shoulder length σε δευτερόλεπτα), μέγιστος ρυθμός αδρανοποίησης (kmax) και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (D-values σε δευτερόλεπτα) του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 που επιβίωσαν κατά την θερμική επεξεργασία στους 60 °C σε δείγματα χοιρινού κιμά τα οποία είχαν παρασκευαστεί με την προσθήκη ή μη μιγμάτων αντιμικροβιακών ουσιών και είχαν συντηρηθεί στους 5 °C τη 0η και τη 12η ημέρα συντήρησης.

Μεταχειρίσεις	0η ημέρα						12η ημέρα					
	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)
Μάρτυρας	2,22	47,68	0,02	0,00	0,9732	59,82	57,48	32,12	0,03	0,00	0,9735	29,61
0,1% A.E.P.*	12,28	96,99	0,02	0,00	0,8955	57,97	72,85	17,81	0,04	0,00	0,9893	24,65
0,3% A.E.P.	12,11	79,86	0,02	0,00	0,9282	54,69	87,04	23,61	0,04	0,00	0,9843	24,31
0,5% A.E.P.	5,68	61,53	0,02	0,00	0,9597	60,71	5,53	10,65	0,05	0,00	0,9975	21,24
Νισίνη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	25,60	92,18	0,02	0,00	0,8836	45,39	39,74	26,63	0,03	0,00	0,9851	35,47
Νισίνη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	27,49	86,72	0,02	0,00	0,9154	56,49	40,01	29,08	0,03	0,00	0,9835	36,27
Νισίνη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.	24,10	97,41	0,02	0,00	0,8884	49,41	45,20	33,15	0,04	0,00	0,9782	35,33
Νισίνη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	58,71	77,03	0,03	0,00	0,8852	38,46	20,95	50,00	0,03	0,00	0,9526	28,21
Νισίνη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	48,77	65,63	0,03	0,00	0,9156	38,11	25,04	30,46	0,03	0,00	0,9768	28,81
Νισίνη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.	48,54	82,33	0,02	0,00	0,8750	40,42	26,17	35,01	0,03	0,00	0,9732	29,63
Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	27,88	91,83	0,02	0,00	0,8826	43,16	79,71	20,04	0,04	0,00	0,9882	25,32
Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	9,36	77,89	0,02	0,00	0,9281	51,56	82,14	9,96	0,04	0,00	0,9965	24,33
Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.	6,19	87,19	0,02	0,00	0,9111	49,21	80,65	22,03	0,04	0,00	0,9832	24,01
Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	42,83	39,31	0,03	0,00	0,9683	37,77	10,07	69,67	0,02	0,00	0,9322	43,81
Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	35,35	70,47	0,02	0,00	0,9058	55,95	81,63	19,04	0,03	0,01	0,9718	32,96
Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.	16,98	17,55	0,03	0,00	0,9941	37,77	28,28	3,90	0,05	0,00	0,9995	18,58

\*A.E.P.: Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης

Τη 0η ημέρα για τη θερμοκρασία 64 °C (Πίνακας 4.3.2) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 5,34 sec έως 7,67 sec. Οι πιο χαμηλές τιμές είναι εκείνες των μεταχειρίσεων: λυσοζύμη 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 5,34 sec και 5,73 sec, αντίστοιχα και του μάρτυρα με 5,54 sec. Αντίθετα, ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του συγκεκριμένου βακτηριακού πληθυσμού κατά 90% είναι μεγαλύτερος στα δείγματα με νισίνη 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 7,67 και 7,6 sec. Παράλληλα, η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (SI-Shoulder length) έχει εύρος από 38,85 sec έως 78,94 sec, με μικρότερη εκείνη του control με 38,85 sec. Μεγαλύτερο Shoulder length έχουν οι μεταχειρίσεις: Νισίνη συγκέντρωσης 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% και 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 77,68 και 78,94 sec, αντίστοιχα. Οι τιμές SI είναι όμοιες μεταξύ των μεταχειρίσεων Νισίνης και Λυσοζύμης σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και αυξημένες οι τιμές SI των μεταχειρίσεων Νισίνης και Λυσοζύμης σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκριτικά με τον συνδυασμό νισίνη και λυσοζύμη με 0,1% αιθέριου ελαίου.

Τη 12<sup>η</sup> ημέρα για τη θερμοκρασία 64 °C (Πίνακας 4.3.2) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 5,25 sec έως 6,90 sec. Οι πιο χαμηλές τιμές είναι εκείνες των δειγμάτων-control με 5,25 sec. Αντίθετα, σύμφωνα με τα D-values, περισσότερο χρόνο χρειάζεται ο πληθυσμός του παθογόνου στις μεταχειρίσεις με Λυσοζύμη 1500 σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 6,90. Παράλληλα, η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (SI-Shoulder length) έχει εύρος από 39,10 sec έως 83,42 sec, όπως το εύρος της 0ης ημέρας, με μικρότερα εκείνα των μεταχειρίσεων: λυσοζύμη συγκέντρωσης 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 39,10 sec. Μεγαλύτερο Shoulder length είχαν τα δείγματα του μάρτυρα με 83,42 sec, το οποίο ακολουθείται από τη μεταχείριση με νισίνη 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο με 82,47 sec.

**Πίνακας 4.3.2:** Χρόνοι πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (Shoulder length σε δευτερόλεπτα), μέγιστος ρυθμός αδρανοποίησης (kmax) και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (D-values σε δευτερόλεπτα) του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 που επιβίωσαν κατά την θερμική επεξεργασία στους 64 °C σε δείγματα χοιρινού κιμά τα οποία είχαν παρασκευαστεί με την προσθήκη ή μη μιγμάτων αντιμικροβιακών ουσιών και είχαν συντηρηθεί στους 5 °C τη 0η και τη 12η ημέρα συντήρησης.

Μεταχειρίσεις	0η ημέρα						12η ημέρα					
	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)
Μάρτυρας	38,85	3,17	0,18	0,01	0,9928	5,54	83,42	5,41	0,19	0,02	0,9666	5,25
0,1% A.E.P.*	53,05	10,37	0,14	0,01	0,9426	7,27	62,63	11,03	0,16	0,02	0,9392	6,40
0,3% A.E.P.	52,91	5,49	0,15	0,01	0,9847	6,69	54,03	11,97	0,14	0,02	0,9395	5,34
0,5% A.E.P.	56,91	13,60	0,14	0,02	0,9318	7,18	72,81	9,11	0,15	0,02	0,9304	5,71
Νισίνη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	45,18	10,51	0,13	0,01	0,9426	7,50	49,02	12,01	0,13	0,01	0,9276	6,60
Νισίνη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	49,66	9,02	0,13	0,01	0,9603	7,67	77,31	8,63	0,17	0,02	0,9289	6,02
Νισίνη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.	50,12	9,97	0,14	0,01	0,9510	7,03	50,12	9,97	0,14	0,01	0,9510	6,03
Νισίνη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	63,64	12,80	0,15	0,02	0,9186	6,62	82,47	11,67	0,16	0,03	0,8586	6,19
Νισίνη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	51,62	13,12	0,13	0,02	0,9209	7,60	67,99	7,62	0,16	0,02	0,9626	6,23
Νισίνη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.	77,68	11,39	0,17	0,03	0,8979	6,02	46,94	9,16	0,13	0,01	0,9633	5,75
Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	44,53	11,92	0,13	0,01	0,9398	7,51	52,19	13,40	0,16	0,02	0,9071	6,08
Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	45,43	11,56	0,15	0,02	0,9333	6,74	55,09	13,53	0,16	0,02	0,9143	6,08
Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.	49,88	9,96	0,19	0,03	0,9316	5,34	72,54	12,29	0,16	0,03	0,8856	6,07
Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	62,43	10,71	0,15	0,02	0,9566	6,45	75,85	18,28	0,17	0,02	0,9489	5,91
Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	66,34	13,64	0,16	0,03	0,8890	6,18	39,10	18,65	0,11	0,02	0,8583	6,90
Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.	78,94	8,91	0,17	0,02	0,9114	5,73	45,11	17,38	0,12	0,02	0,8636	5,57

\*A.E.P.: Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης

Τη 0η ημέρα για τη θερμοκρασία 68 °C (Πίνακας 4.3.3) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 3,23 sec έως 10,13 sec. Οι πιο χαμηλές τιμές είναι στα δείγματα-control με 3,23 sec. Αντίθετα, περισσότερος χρόνος χρειάζεται ο πληθυσμός του παθογόνου στις μεταχειρίσεις: λυσοζύμη με 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, νισίνη με 5000 IU/g και 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με τιμές 10,13 sec, 9,39 sec και 8,83 sec, αντίστοιχα. Παράλληλα, η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (SI-Shoulder length) έχει εύρος από 8,03 sec έως 26,29 sec, με μικρότερα εκείνα των μεταχειρίσεων: Νισίνη 5000 IU/g και Λυσοζύμη 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 8,03 sec και 9,76 sec, αντίστοιχα. Μεγαλύτερο Shoulder length έχει το control με 26,29 sec.

Τη 12<sup>η</sup> ημέρα για τη θερμοκρασία 68 °C (Πίνακας 4.3.3) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 1,39 sec έως 3,04 sec. Η πιο χαμηλή τιμή είναι εκείνη της μεταχείρισης με Λυσοζύμη 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 1,39 sec. Αντίθετα, περισσότερος χρόνος χρειάζεται ο πληθυσμός του παθογόνου στο control και στα δείγματα με Νισίνη 1500 και 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 2,70 sec, 3,04 sec και 2,94 sec. Παράλληλα, η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (SI-Shoulder length) έχει εύρος από 8,47 sec έως 25,55 sec, με μικρότερα εκείνα των μεταχειρίσεων: 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 8,47 sec και ακολουθεί το control με 14,64 sec. Μεγαλύτερο Shoulder length έχουν οι μεταχειρίσεις: 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και Λυσοζύμη 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 25,50 και 25,55 sec, αντίστοιχα.



**Πίνακας 4.3.3:** Χρόνοι πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (Shoulder length σε δευτερόλεπτα), μέγιστος ρυθμός αδρανοποίησης (kmax) και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (D-values σε δευτερόλεπτα) του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 που επιβίωσαν κατά την θερμική επεξεργασία στους 68 °C σε δείγματα χοιρινού κιμά τα οποία είχαν παρασκευαστεί με την προσθήκη ή μη μιγμάτων αντιμικροβιακών ουσιών και είχαν συντηρηθεί στους 5 °C τη 0η και τη 12η ημέρα συντήρησης.

Μεταχειρίσεις	0η ημέρα						12η ημέρα					
	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)
<b>Μάρτυρας</b>	26,29	2,18	0,31	0,04	0,9338	3,23	14,64	6,81	0,37	0,05	0,9239	2,70
<b>0,1% A.E.P.*</b>	17,48	7,29	0,15	0,04	0,7683	6,53	25,50	1,06	0,60	0,03	0,9895	1,66
<b>0,3% A.E.P.</b>	20,51	4,49	0,25	0,04	0,8599	4,00	22,35	1,89	0,50	0,04	0,9837	2,00
<b>0,5% A.E.P.</b>	18,62	2,30	0,21	0,02	0,9612	4,67	8,47	12,05	0,38	0,08	0,7543	2,66
<b>Νισίνη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	11,35	4,53	0,11	0,01	0,9384	8,83	18,39	5,05	0,38	0,05	0,9235	2,62
<b>Νισίνη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	16,27	4,56	0,15	0,02	0,9015	6,58	13,92	5,80	0,33	0,03	0,9417	3,04
<b>Νισίνη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	8,03	6,55	0,11	0,02	0,8989	9,39	17,70	5,26	0,34	0,04	0,9294	2,94
<b>Νισίνη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	23,23	0,95	0,24	0,01	0,9903	4,21	19,17	3,80	0,39	0,04	0,9503	2,57
<b>Νισίνη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	19,27	4,24	0,15	0,02	0,9021	6,88	25,13	1,16	0,59	0,03	0,9865	1,70
<b>Νισίνη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	20,73	2,45	0,16	0,01	0,9595	6,26	24,04	2,24	0,56	0,06	0,9564	1,78
<b>Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	21,53	2,55	0,23	0,02	0,9414	4,37	25,55	1,94	0,60	0,06	0,9617	1,67
<b>Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	9,76	7,70	0,10	0,02	0,8893	10,13	24,94	1,83	0,55	0,05	0,9683	1,82
<b>Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	22,72	2,94	0,23	0,03	0,9277	4,30	18,60	4,26	0,51	0,08	0,9284	1,96
<b>Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	21,04	2,67	0,21	0,02	0,9402	4,71	19,06	4,83	0,50	0,08	0,9109	2,01
<b>Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	16,24	2,79	0,17	0,02	0,9539	5,98	20,85	2,34	0,46	0,04	0,9681	2,18
<b>Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	17,25	3,82	0,20	0,03	0,9115	5,11	20,85	0,93	0,72	0,04	0,9943	1,39

\*A.E.P.: Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης

Τη 0η ημέρα για τη θερμοκρασία 71 °C (Πίνακας 4.3.4) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 1,30 sec έως 2,26 sec, με τα δείγματα-control να έχουν D-value ίσο με 1,46 sec και η μεταχείριση με 0,1% αιθέριο έλαιο τιμή D-value ίση με 1,30 sec, που είναι οι μικρότερες τιμές των D-value. Παράλληλα, η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (SI-Shoulder length) έχει εύρος από 18,38 sec έως 22,75 sec, με μικρότερο SI εκείνο της μεταχείρισης Νισίνη 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 18,38 sec και μεγαλύτερο εκείνο της μεταχείρισης Λυσοζύμη 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 22,75 sec.

Τη 12<sup>η</sup> ημέρα για τη θερμοκρασία 71 °C (Πίνακας 4.3.4) το εύρος των τιμών D-value που προέκυψε είναι από 0,87 sec έως 1,50 sec. Η πιο χαμηλή τιμή D-value είναι εκείνη της μεταχείρισης Λυσοζύμη 500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 0,87 sec και πιο υψηλή τιμή D-value είναι εκείνη της μεταχείρισης Λυσοζύμη 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο με 1,30 sec. Όλες οι υπόλοιπες μεταχειρίσεις έχουν D-value ίσο με 1,30-1,40 sec. Παράλληλα, η χρονική διάρκεια πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (SI-Shoulder length) έχει εύρος από 18,84 sec έως 22,59 sec, σχεδόν ίδιο με το SI της 0ης ημέρας. Μικρότερο έχει η μεταχείριση 0,5% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 18,84 sec και μεγαλύτερο η μεταχείριση Νισίνη 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης με 22,59 sec.

**Πίνακας 4.3.4:** Χρόνοι πριν ξεκινήσει η μείωση του πληθυσμού (Shoulder length σε δευτερόλεπτα), μέγιστος ρυθμός αδρανοποίησης (kmax) και χρόνοι υποδεκαπλασιασμού (D-values σε δευτερόλεπτα) του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 που επιβίωσαν κατά την θερμική επεξεργασία στους 71 °C σε δείγματα χοιρινού κιμά τα οποία είχαν παρασκευαστεί με την προσθήκη ή μη μιγμάτων αντιμικροβιακών ουσιών και είχαν συντηρηθεί στους 5 °C τη 0η και τη 12η ημέρα συντήρησης.

Μεταχειρίσεις	0η ημέρα						12η ημέρα					
	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)	Shoulder length (SI)	St.error	kmax	St.error	R <sup>2</sup>	D-value (sec)
Μάρτυρας	22,21	2,07	0,69	0,10	0,8946	1,46	22,08	1,40	0,78	0,08	0,9462	1,28
0,1% A.E.P.*	22,65	0,99	0,77	0,06	0,9728	1,30	21,54	1,50	0,70	0,08	0,9427	1,42
0,3% A.E.P.	21,61	1,14	0,62	0,05	0,9681	1,60	21,83	0,95	0,73	0,05	0,9757	1,37
0,5% A.E.P.	20,80	1,24	0,61	0,05	0,9654	1,65	18,84	1,43	0,96	0,13	0,9545	1,04
Νισίνη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	20,21	2,39	0,50	0,08	0,8999	2,02	21,91	1,03	0,76	0,06	0,9709	1,32
Νισίνη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	21,84	2,38	0,45	0,07	0,8889	2,20	22,59	1,27	0,75	0,07	0,9563	1,34
Νισίνη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.	22,48	1,45	0,51	0,05	0,9516	1,96	21,23	1,17	0,75	0,06	0,9641	1,33
Νισίνη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	21,92	1,87	0,65	0,09	0,9206	1,54	20,57	2,00	0,72	0,10	0,9107	1,39
Νισίνη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	21,69	2,10	0,44	0,06	0,9143	2,26	20,72	1,65	0,74	0,09	0,9356	1,35
Νισίνη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.	18,38	2,51	0,45	0,06	0,9162	2,22	21,13	1,38	0,77	0,08	0,9534	1,30
Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	23,22	0,78	0,65	0,04	0,9846	1,54	21,64	0,96	0,76	0,05	0,9763	1,32
Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.	22,75	0,39	0,68	0,03	0,9955	1,46	21,52	1,00	0,76	0,05	0,974	1,32
Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.	19,01	3,45	0,45	0,09	0,8419	2,24	21,13	1,38	0,77	0,08	0,9534	1,30
Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	21,25	1,80	0,57	0,07	0,9282	1,75	20,37	0,75	1,15	0,09	0,9782	0,87
Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.	20,23	2,61	0,45	0,08	0,8864	2,20	19,42	1,36	0,67	0,06	0,9666	1,50
Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.	21,33	1,43	0,61	0,06	0,952	1,65	21,13	1,38	0,77	0,08	0,9534	1,30

\*A.E.P.: Αιθέριο Έλαιο Ρίγανης

Συνοψίζοντας, οι τιμές D-value της 0ης ημέρας δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων για τις θερμοκρασίες 64 και 68 °C, αλλά και μεταξύ της 12<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης της θερμοκρασίας 68 °C με τις τιμές D-value των μεταχειρίσεων της θερμοκρασίας 71 °C. Γι' αυτό και σε όλες τις μεταχειρίσεις όσον αφορά τη θερμική επεξεργασία στους 71 °C εξετάζοντας τις τιμές D-value συμπεραίνουμε ότι, τα αντιμικροβιακά προκάλεσαν σχεδόν ίδιας τάσης stress στον παθογόνο *E. coli* O157:H7, και άρα ίδιας τάσης ευαισθητοποίηση των κυττάρων στη θέρμανση. Η τιμή D-value των δειγμάτων χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών (μάρτυρας) στις θερμοκρασίες 64, 68 και 71 °C τη 0η ημέρα είναι σχεδόν ίδια με τις τιμές D-value των ίδιων μεταχειρίσεων τη 12<sup>η</sup> ημέρα. Οι τιμές D-value δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων τη 12<sup>η</sup> ημέρα, αλλά και μεταξύ αυτών και της 0ης ημέρας στη θερμοκρασία 71 °C. Επίσης, στη θερμοκρασία 71 °C, είναι τόσο γρήγορη η θανάτωση, που ο χρόνος προσαρμογής (Shoulder) δεν παρουσιάζει διαφορές στατιστικώς σημαντικές μεταξύ των μεταχειρίσεων, γι' αυτό το λόγο και τα D-values δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές.

Ακόμη, τα D-values μπορεί να αποκρύπτουν τις διαφορές (μικρές ή μεγάλες) που παρατηρούμε από τα διαγράμματα κινητικής. Το συμπέρασμα μπορεί να προκύψει από τον συνδυασμό του SL με το D-value και για αυτό δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα μόνο με μία από τις δύο παραμέτρους. Επίσης, τα D-values προκύπτουν μετά από προσαρμογή των μικροβιολογικών δεδομένων σε μία μαθηματική εξίσωση (Weibul) και εφόσον τα δεδομένα δεν προσαρμόζονται αρκετά καλά στην εξίσωση αυτή μπορεί να προκύψουν μικροδιαφορές οι οποίες όμως είναι πλασματικές (οφείλονται δηλαδή στο fitting).

Διαφορές μεταξύ των τιμών D-values που λαμβάνονται σε αυτή τη μελέτη μπορεί να οφείλονται ή να αποδίδονται, σε διαφορές των στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 που χρησιμοποιούνται, στη φάση ανάπτυξης των κυττάρων του παθογόνου, το pH ή ακόμη και στο περιεχόμενο σε λιπαρές ουσίες του κρέατος (κιμάς) που χρησιμοποιείται, στη μεθοδολογία θερμικής επεξεργασίας και / ή στο μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση των επιζώντων (Juneja et al., 2009).

Επίσης, οι καμπύλες επιβίωσης επέδειξαν φάση προσαρμογής (lag period) ή αλλιώς το λεγόμενο “shoulder” (Juneja & Friedman, 2008) πριν συμβεί η θανάτωση και αυτό πιθανόν να οφείλεται είτε σε κακή μεταφορά της θερμότητας σε όλη την επιφάνεια του βοείου κρέατος επιζώντων (Juneja et al., 2009), είτε σε μία αρχική απαίτηση των βακτηριακών κυττάρων να διατηρήσουν τον τραυματισμό πριν από μια εκθετική μείωση του αριθμού (log) των επιζώντων με το χρόνο (Juneja et al., 1999). Οι καμπύλες επιβίωσης με φάση προσαρμογής (shoulder) μπορεί να έχουν σημασία για τη δημόσια υγεία γιατί καμπύλες επιβίωσης σαν κι αυτές είναι πιθανό να παρατηρηθούν στα νωπά και τα έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων μαγειρεμένα και διατηρημένα υπό ψύξη επεξεργασμένα τρόφιμα. Η μικροβιολογική ασφάλεια των τροφίμων αυτών βασίζεται σε ήπιες θεραπείες θέρμανσης ή / και τον συνδυασμό διαφόρων ανασταλτικών εμποδίων (pH, ενεργότητα νερού- $a_w$ , προστιθέμενα αντιμικροβιακά) κατά την παρασκευή τροφίμων. Γι’ αυτό και υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με το μικροβιολογικό κίνδυνο που εμπεριέχεται στην επεξεργασία τέτοιων “νέας γενιάς” προϊόντων διατροφής (Juneja & Friedman, 2008).

Από άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν από ερευνητές, οι τιμές D-value του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 σε δείγματα-control βόειου κρέατος κυμαίνονται από 67,79 min για θερμοκρασία 55 °C έως 2,01 min για θερμοκρασία 62,5 °C (Juneja et al., 2009). Σε μια παρόμοια μελέτη Juneja & Friedman (2008), οι τιμές D-value του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 σε δείγματα-control βόειου κρέατος κυμαίνονται από 63,90 min για θερμοκρασία 55 °C έως 1,79 min για θερμοκρασία 62,5 °C. Ακόμη, σύμφωνα με τους Murphy et al, (2000) αναφέρουν ότι οι τιμές D-value του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* σε δείγματα από στήθος κοτόπουλου είναι 30,1 min για θερμοκρασία 55 °C , είναι 5,88 min για θερμοκρασία 60 °C και 2,51 min για θερμοκρασία 62,5 °C. Οι Juneja et al (2012) αναφέρουν ότι, οι τιμές D-value του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* σε δείγματα-control σε κιμά από κρέας κοτόπουλου κυμαίνονται από 17,45 min για θερμοκρασία 55 °C έως 0,29 min για θερμοκρασία 71 °C. Οι ίδιοι ερευνητές στη συνέχεια αναφέρουν ότι η προσθήκη 0,1% trans-κινναμαλδεΐδης (trans-cinnamaldehyde) ή καρβακρόλης σε κιμά από κρέας κοτόπουλου μείωσε τις τιμές D-value στη θερμοκρασία των 55 °C και των 60

°C σε 14,74 min και 2,25 min, αντίστοιχα, ενώ η προσθήκη 0,5% trans-κινναμαλδεΐδης μείωσε περισσότερο τις τιμές D-value σε 10,73 και 0,90 min, αντίστοιχα στις ίδιες θερμοκρασίες. Αντίθετα, στην ίδια έρευνα, η προσθήκη 0,1% trans-κινναμαλδεΐδης σε κιμά από κρέας κοτόπουλου μείωσε ακόμη περισσότερο τις τιμές D-value στη θερμοκρασία των 65 °C και των 71 °C σε 0,67 min και 0,22 min, αντίστοιχα. Ο Murphy et al. (1999), αναφέρει ότι οι τιμές D-value του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* σε δείγματα από κιμά από στήθος κοτόπουλου είναι 0,286 sec για θερμοκρασία 67,5 °C και 0,176 min για θερμοκρασία 70 °C. Σύμφωνα με το Πρότυπο Επίδοσης της Θνησιμότητας του Τμήματος Γεωργίας των ΗΠΑ, κιμάς από κρέας κοτόπουλου μολυσμένος από *Salmonella* πρέπει να θερμανθεί έχοντας εσωτερική θερμοκρασία 60 °C για τουλάχιστον 44,10 min για να επιτευχθεί μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 7-log.

Επίσης, από τη βιβλιογραφία και πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Juneja & Marmer (1999), ότι οι τιμές D-value του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 σε δείγματα από κρέας γαλοπούλας είναι 11,51 min για θερμοκρασία 55 °C έως 0,29 min για θερμοκρασία 65 °C. Από όμοια ερευνητική μελέτη που διεξήχθη από τον Juneja (2003), οι τιμές D-value του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* (5-στελεχών) σε δείγματα βόειου κρέατος είναι 27,70 min για θερμοκρασία 55 °C, 9,63 min για θερμοκρασία 57,5 °C και 4,18 min για θερμοκρασία 60 °C. Στην ίδια έρευνα βρέθηκε επίσης ότι, οι τιμές D-value του παθογόνου *Salmonella* (8-στελεχών) σε δείγματα ίδιου τύπου κρέατος, έχουν εύρος από 19,31 min για θερμοκρασία 55 °C έως 4,72 min για θερμοκρασία 60 °C, όπως επίσης οι τιμές D-value του παθογόνου *E. coli* O157:H7 (4-στελεχών) σε δείγματα ίδιου τύπου κρέατος, κυμαίνονταν από 20,90 min για θερμοκρασία 55 °C έως 3,39 min για θερμοκρασία 60 °C. Επιπλέον, έρευνα που περιλαμβάνει τους προαναφερθέντες με σειρά οργανισμούς και διεξήχθη από τους μελετητές Murphy et al, (2004), αναφέρει ότι, από θερμοκρασία 55 °C έως 70 °C, οι τιμές D-value του παθογόνου *E. coli* O157:H7 σε δείγματα χοιρινού κιμά κυμαίνονταν από 33,44 min έως 0,048 min, του παθογόνου *Salmonella* από 45,87 min έως 0,083 min και του παθογόνου *L. monocytogenes* οι τιμές D-value είχαν εύρος 47,17 min έως 0,085 min. Τέλος, οι τιμές D-value του παθογόνου *Salmonella* σε εμπορικά τυποποιημένα

μπιφτέκια από κρέας κοτόπουλου (5% λίπος) και σε τρυφερό κρέας (21% λίπος) είχαν εύρος 26,97 min έως 0,32 min για θερμοκρασίες 55 °C έως 70 °C.

#### 4.4 Επίδραση των φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών στις τιμές z-value

Για τον υπολογισμό των τιμών z-values, σχεδιάστηκαν καμπύλες χρόνου θερμικής θανάτωσης χρησιμοποιώντας τις τιμές D-value για τις θερμοκρασίες 60, 64, 68 και 71°C, οι οποίες (τιμές D-value) προέκυψαν από τη θερμική επεξεργασία δειγμάτων εμβολιασμένων με *Escherichia coli* O157:H7 με ή χωρίς (control) φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες. Οι τιμές z-value (σε βαθμούς Κελσίου - °C), ελήφθησαν με γραμμική παλινδρόμηση (log linear regression).

Οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών, πιο συγκεκριμένα, του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value) συναρτήσεως του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 πρέπει να είναι γραμμικές. Αν αυτό το κριτήριο δεν πληρείται, τότε οι συσχετίσεις των μεταβλητών δε θεωρούνται αξιόπιστες. Τα γραφήματα που αφορούν το z-value παρατίθενται στο Παράρτημα I, στα οποία απεικονίζεται η γραμμική συσχέτιση (linearity) του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσεως του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά. Στα γραφήματα, ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2 > 0,90$ ) που προέκυψε είναι  $R^2 = 0,8527$  ο μικρότερος και  $R^2 = 0,9586$  ( $R^2 > 0,90$ ) ο μεγαλύτερος για τη 0η ημέρα, καθώς και  $R^2 = 0,944$  ο μικρότερος και  $R^2 = 0,9941$  ( $R^2 > 0,90$ ) ο μεγαλύτερος για τη 12<sup>η</sup> ημέρα.

Οι τιμές της κινητικής παραμέτρου της σταθεράς θερμικής ανθεκτικότητας z-value παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 4.5.1.

Οι τιμές z-value αυξήθηκαν από τη 0η στη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης (πίνακας 4.5.1) από 7,23 °C σε 8,40 °C στα δείγματα χωρίς την προσθήκη φυσικής αντιμικροβιακής ουσίας. Με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,3% οι τιμές z-value αυξήθηκαν από την 0η στη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης από 7,39 σε 8,47 °C, από 7,63 σε 8,51 °C, ενώ μειώθηκαν με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης συγκέντρωσης 0,5% από 7,47 σε 6,98 °C, αντίστοιχα. Οι υψηλότερες τιμές z-value στις μεταχειρίσεις με τις αντιμικροβιακές ουσίες δείχνει ότι η θερμική αδρανοποίηση των στελεχών του παθογόνου

μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 ήταν λιγότερο εξαρτώμενη από τη θερμοκρασία παρουσία των αντιμικροβιακών, συγκριτικά με τα δείγματα χωρίς την προσθήκη αυτών (Juneja et al., 2012).

Ακόμη, τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν ότι οι τιμές z-value στα δείγματα χοιρινού κιμά μειώνονται από τη 0η ημέρα στη 12<sup>η</sup> στις μεταχειρίσεις με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, από 8,49 σε 7,75 °C, 8,46 σε 8,03 °C και 8,27 σε 7,91 °C, αντίστοιχα. Επίσης, μειώνονται και στα δείγματα χοιρινού κιμά με Νισίνη (500, 1500 και 5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης από 8,53 σε 7,79 °C, από 9,71 σε 8,01 °C και από 9,33 σε 7,76 °C, αντίστοιχα. Τέλος, μειώνονται και στις μεταχειρίσεις: (i) με Λυσοζύμη συγκέντρωσης 5000 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης και με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης, από 8,90 σε 8,52 °C και από 8,79 σε 8,47 °C, αντίστοιχα.

Η ευαισθησία στη θερμοκρασία (που καθορίζεται από το z-value) του παθογόνου *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά των παραπάνω μεταχειρίσεων είναι σημαντικά διαφορετική από εκείνη των δειγμάτων μεταχειρίσεων που ακολουθούν. Έτσι, οι τιμές z-value στα δείγματα χοιρινού κιμά αυξάνονται αντί να μειώνονται (όπως παραπάνω) από τη 0η ημέρα στη 12<sup>η</sup> στις μεταχειρίσεις με Λυσοζύμη συγκέντρωσης 500 και 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,1% αιθέριο έλαιο ρίγανης από 8,08 σε 8,26 °C και από 7,62 σε 8,44 °C, αντίστοιχα. Επίσης, αυξάνονται από τη 0η ημέρα στη 12<sup>η</sup> στις μεταχειρίσεις με Λυσοζύμη συγκέντρωσης 500 και 1500 IU/g σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης από 8,94 σε 9,31 °C και από 8,50 σε 9,55 °C, αντίστοιχα.



**Πίνακας 4.4.1:** Παράθεση των τιμών της κινητικής παραμέτρου της σταθεράς θερμικής ανθεκτικότητας (z-value) από την εξίσωση  $y = - a*x + b$ .

Μεταχειρίσεις	0η ημέρα		12 <sup>η</sup> ημέρα	
	z-value*	b	z-value*	b
<b>Μάρτυρας</b>	7,23	8,1148	8,40	6,7368
<b>0,1% A.E.P.</b>	7,36	8,021	8,47	6,6246
<b>0,3% A.E.P.</b>	7,63	7,6797	8,51	6,6174
<b>0,5% A.E.P.</b>	7,47	7,9187	6,98	8,3693
<b>Νισίνη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	8,49	6,8321	7,75	7,4523
<b>Νισίνη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	8,46	6,9293	8,03	7,1458
<b>Νισίνη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	8,27	7,0311	7,91	7,2829
<b>Νισίνη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	8,53	6,7788	7,79	7,3902
<b>Νισίνη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	9,71	5,8833	8,01	7,0887
<b>Νισίνη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	9,33	6,1107	7,76	7,3693
<b>Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	8,08	7,1976	8,26	6,8227
<b>Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	7,62	7,6888	8,44	6,652
<b>Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,1% A.E.P.</b>	8,90	6,4638	8,52	6,5894
<b>Λυσοζύμη (500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	8,94	6,3983	9,31	5,8144
<b>Λυσοζύμη (1500 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	8,50	6,3569	9,55	5,7741
<b>Λυσοζύμη (5000 IU/g) + 0,3% A.E.P.</b>	8,79	6,504	8,47	6,5778

\* z-value: Ισούται με την απόλυτη τιμή του  $1/a$  από την εξίσωση  $y = - a*x + b$  και μετριέται σε βαθμούς Κελσίου (°C).

Μια πιθανή εξήγηση για τις διαφορετικές τιμές του z-value στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών μπορεί να είναι το ότι τα κύτταρα του παθογόνου *E. coli* O157:H7 εμφανίζουν ποικίλες φάσεις προσαρμογής στα δείγματα αυτά, επειδή τα βακτηριακά αυτά κύτταρα θερμαίνονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (60, 64, 68 και 71 °C) (Juneja et al., 2009). Μια υψηλή τιμή z-value σημαίνει μια πιο αργή απόκριση της θερμοκρασίας στην αύξηση ενός λογαρίθμου στον δεκαδικό χρόνο μείωσης (D-value), δηλαδή σε μια υψηλότερη τιμή z-value, είναι απαραίτητη μια μεγαλύτερη αύξηση της θερμοκρασίας για να ανταποκριθεί σε μια αύξηση κατά 90% στον δεκαδικό χρόνο μείωσης (D-value). Ως εκ τούτου, όταν ο παθογόνος *E. coli* O157:H7 έχει υψηλή τιμή z-value, τα κύτταρα

του είναι περισσότερο ανθεκτικά (και ανεκτικά) στις μεταβολές της θερμοκρασίας (Murphy et al., 2004<sup>a</sup>), και άρα απαιτείται μεγαλύτερη θερμοκρασία για να θανατωθεί ο μικροοργανισμός. Αυτό σημαίνει ότι πιθανότατα τη 0η ημέρα που τα αντιμικροβιακά δεν έχουν προλάβει να δράσουν στα δείγματα χοιρινού κιμά σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες της θερμικής επεξεργασίας στις οποίες εκτίθενται τα δείγματα αυτά οδηγούν στο να προκύψουν υψηλές τιμές z-value. Αντίθετα, μετά το πέρας 12 ημερών που τα αντιμικροβιακά έχουν δράσει τα δείγματα χοιρινού κιμά σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες της θερμικής επεξεργασίας στις οποίες εκτίθενται τα δείγματα αυτά οδηγούν στο να προκύψουν χαμηλές τιμές z-value και άρα ο παθογόνος *E. coli* O157:H7 είναι λιγότερο ανθεκτικός.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τη μελέτη αυτή με αποτελέσματα από άλλες ερευνητικές μελέτες διαφορετικών βιβλιογραφικών πηγών, διαπιστώνουμε ότι υπάρχουν διαφορετικές τιμές z-value για το ίδιο παθογόνο και γενικά για διαφορετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς σε διαφορετικούς τύπους κρέατος. Τέτοια αποτελέσματα μπορεί να είναι: (i) οι τιμές z-value μετά από θερμική επεξεργασία βόειου κρέατος εμβολιασμένο με *E. coli* O157:H7 κυμάνθηκαν από 5,40 °C (σε βόειο κρέας χωρίς πρόσθετα) σε 3,96 °C (σε βόειο κρέας με 1% κινναμαλδεΐδης) (Juneja & Friedman, 2008), (ii) οι τιμές z-value μετά από θερμική επεξεργασία κρέατος γαλοπούλας και βόειου κιμά εμβολιασμένο με *E. coli* O157:H7, *Salmonella* και *L. monocytogenes* είναι 5,15 °C, 5,83 °C και 5,90 °C, αντίστοιχα (Murphy et al., 2004<sup>b</sup>) και (iii) οι τιμές z-value μετά από θερμική επεξεργασία χοιρινού κιμά εμβολιασμένο με *E. coli* O157:H7, *Salmonella* και *L. monocytogenes* είναι 4,94 °C, 5,89 °C και 5,92 °C, αντίστοιχα (Murphy et al., 2004<sup>b</sup>).

#### 4.5 pH

Η πρακτική της θερμικής επεξεργασίας είχε άμεση επίδραση στο pH των μαγειρεμένων δειγμάτων από χοιρινό κιμά (μπιφτέκια), η οποία οδήγησε σε αύξηση του pH των τελικών προϊόντων.

Η αύξηση του pH των δειγμάτων από χοιρινό κιμά (μπιφτέκια) κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας (μαγείρεμα) μπορεί πιθανότατα να σχετίζεται

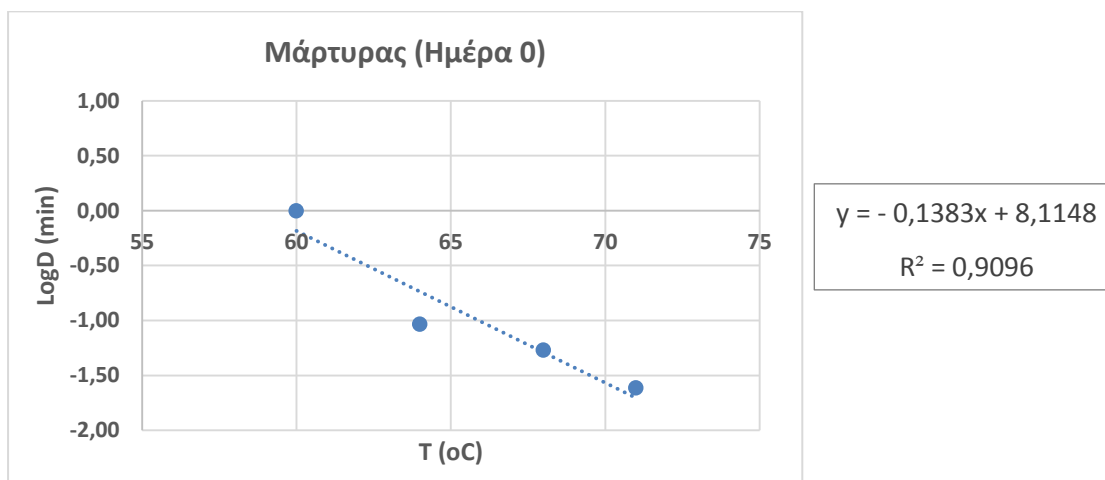
με την απώλεια όξινων ενώσεων (Vasanthi et al., 2007). Πιθανολογείται ότι η έκθεση στη θερμότητα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκαλεί μεγαλύτερη απελευθέρωση των όξινων ενώσεων και, ως εκ τούτου αυξάνεται το pH του τελικού προϊόντος, τουλάχιστον τοπικά δηλαδή στο εξωτερικό μέρος των μπιφτεκιών. Αυτή η αύξηση του pH μπορεί να μην έχει καμία σημαντική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, ωστόσο, αυτή η παράμετρος χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο ως δείκτης και ως μέσο επιβεβαίωσης της επαναληψιμότητας της μεθόδου και της μεταχείρισης (Manios, 2012). Οι τιμές του pH (Μ.Ο. των δειγμάτων στις μεταχειρίσεις και η τυπική τους απόκλιση) παρατίθενται στο Παράρτημα II.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

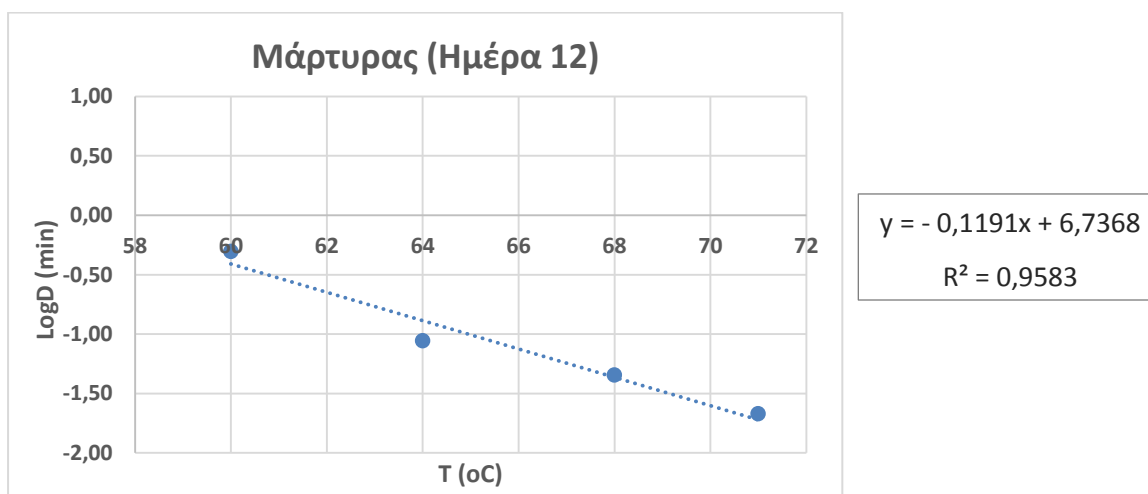
- Η ποσοτική εκτίμηση της κινητικής της αδρανοποίησης του παθογόνου, όπως ορίζεται από τις τιμές D- και z-value, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθοριστούν πιθανότατα θερμοκρασίες μαγειρέματος που θα μειώσουν την πιθανότητα του κινδύνου τροφιμογενών μολύνσεων και λοιμώξεων από το παθογόνο βακτήριο *Escherichia coli* O157:H7.
- Η προσθήκη αιθέριου ελαίου περιεκτικότητας 0,5% στα δείγματα χοιρινού κιμά κατέστησε τον παθογόνο μικροοργανισμό λιγότερο ανθεκτικό στη θανατηφόρα επίδραση της θέρμανσης, μετά το πέρας 12 ημερών συντήρησης υπό ψύξη, όπως αποδεικνύεται από την γρήγορη θανάτωση του παθογόνου. Παρ' όλο που η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης περιεκτικότητας 0,5% στον χοιρινό κιμά είχε σημαντική δράση εναντίον του παθογόνου *E. coli* O157:H7, υπάρχουν αμφιβολίες για το αν από οργανοληπτικής απόψεως (οσμή, γεύση και συνολική αποδοχή) θα είναι αποδεκτή από τους καταναλωτές.
- Η προσθήκη του συνδυασμού Νισίνη (500 ή 1500 IU/g) με αιθέριο έλαιο ρίγανης 0,1% και 0,3%, αντίστοιχα, αλλά και Λυσοζύμη (500 ή 1500 IU/g) με αιθέριο έλαιο ρίγανης 0,1% και 0,3%, αντίστοιχα, στον χοιρινό κιμά δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση κατά του Gram-αρνητικού βακτηρίου *E. coli* O157:H7 κατά τη συντήρηση στους 5 °C για 0 και 12 ημέρες.
- Αντίθετα, η παρουσία της Νισίνης και της Λυσοζύμης (5000 IU/g) σε συνδυασμό με 0,3% αιθέριο έλαιο ρίγανης προκάλεσε stress στον παθογόνο και κατ' επέκταση μεγαλύτερη ευαισθητοποίηση των κυττάρων του στη θέρμανση. Άρα, η θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου σε αυτή την περίπτωση ήταν μικρή. Αυτή η δράση γίνεται περισσότερο αντιληπτή στις πιο ήπιες θερμικές επεξεργασίες (60 ή 64°C), καθώς στις υψηλότερες θερμοκρασίες η επίδραση της θερμοκρασίας επικαλύπτει πιθανές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων.
- Βασιζόμενοι στα ευρήματα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης, ως μελλοντικός στόχος προτείνεται η μελέτη της συνεργιστικής δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών Νισίνη και Λυσοζύμη ή και η συνεργιστική δράση

του αιθέριου ελαίου ρίγανης που ήδη μελετήσαμε, με ένα εναλλακτικό αντιμικροβιακό το οποίο ενδέχεται να εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά στα μικροβιολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου. Θα μπορούσε ως αντιμικροβιακό να χρησιμοποιηθεί το EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ), το οποίο έχει αποδειχθεί ότι επιφέρει καλά αποτελέσματα στην ελάττωση του μικροβιακού φορτίου, και ιδιαίτερα εναντίων των αρνητικών κατά Gram-αρνητικών βακτηρίων (όπως ο παθογόνος μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7 (Ko et al, 2010)).

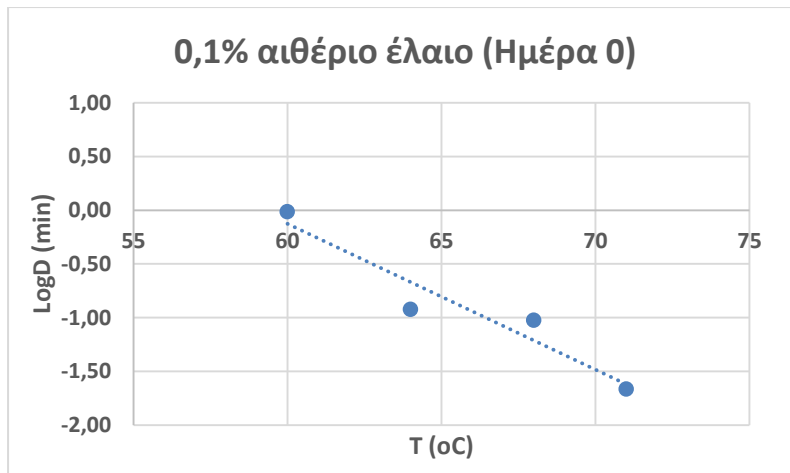
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



**Γράφημα Ι.1 α:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών (μάρτυρας) τη 0η ημέρα συντήρησης.



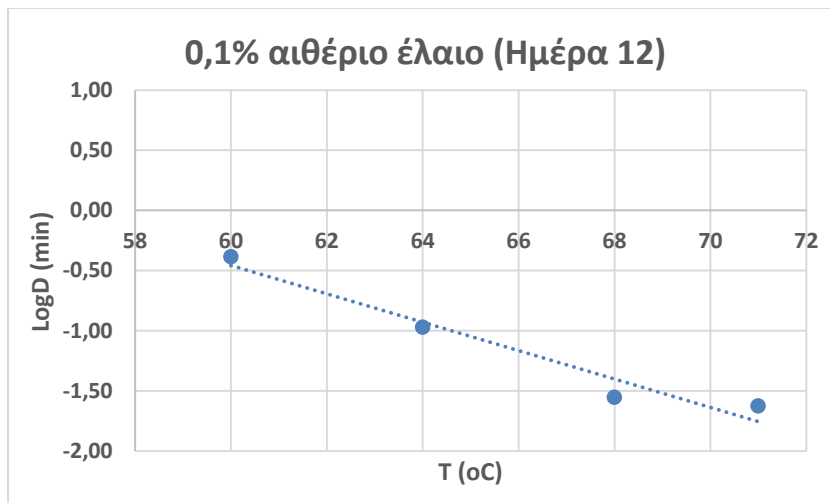
**Γράφημα Ι.1 β:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά χωρίς την προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών (μάρτυρας) τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1358x + 8,0241$$

$$R^2 = 0,9171$$

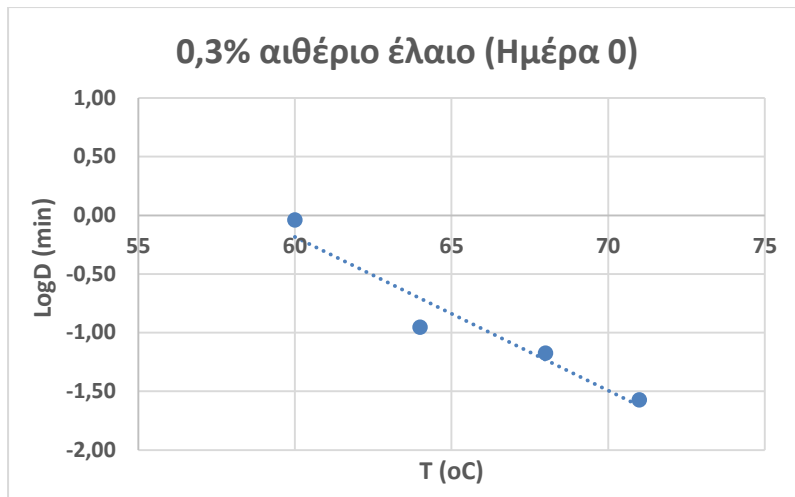
**Γράφημα I.2 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κινά με την προσθήκη 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,118x + 6,6246$$

$$R^2 = 0,9529$$

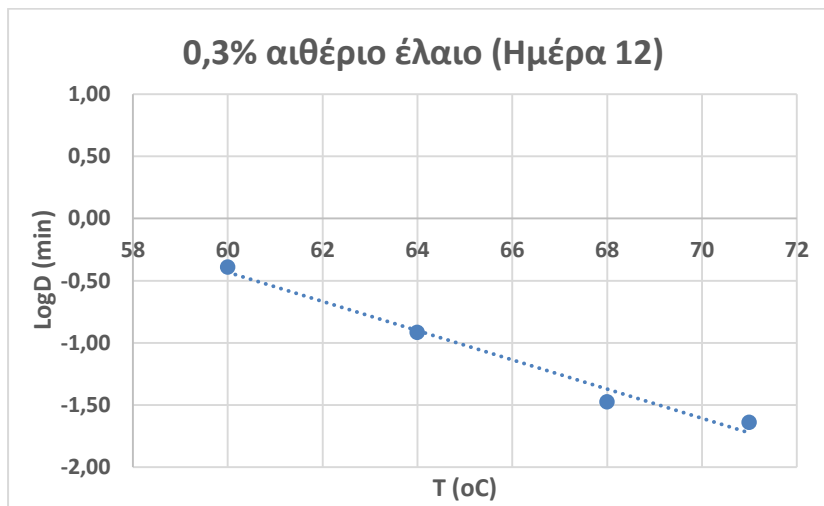
**Γράφημα I.2 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κινά με την προσθήκη 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,131x + 7,6797$$

$$R^2 = 0,9314$$

**Γράφημα Ι.3 α:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κινά με την προσθήκη 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.

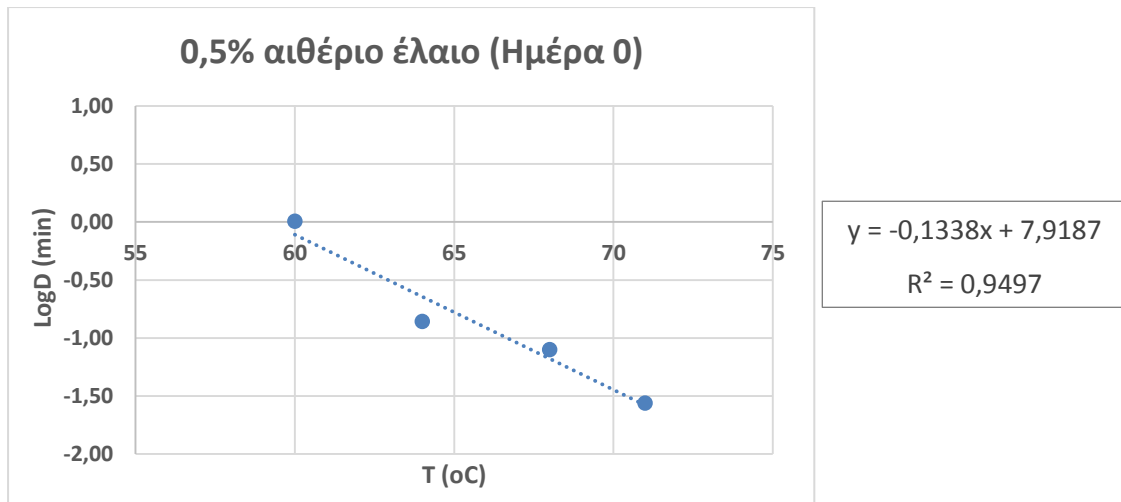


$$y = -0,1175x + 6,6174$$

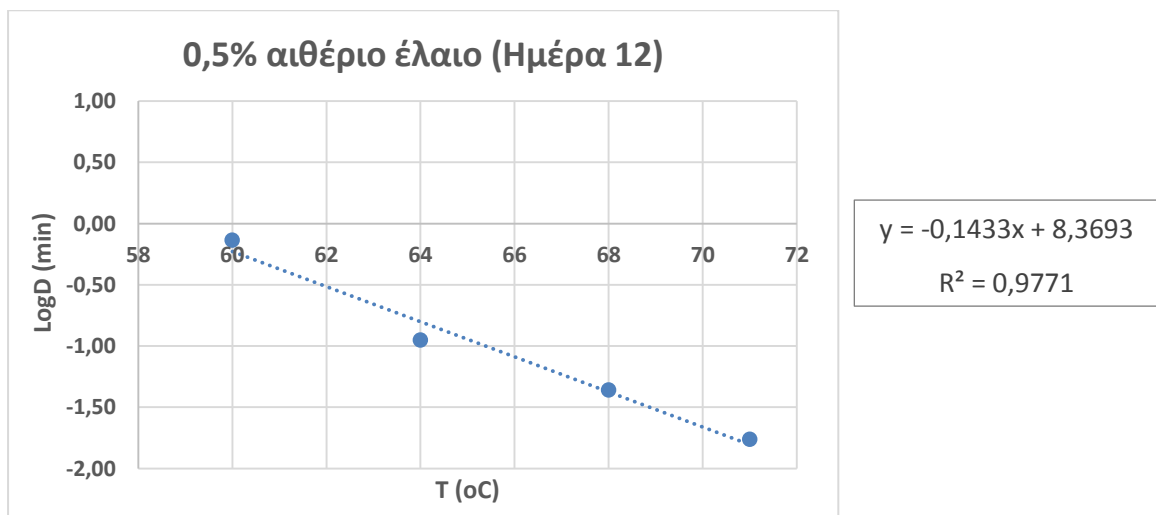
$$R^2 = 0,9796$$

**Γράφημα Ι.3 β:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60-71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κινά με την προσθήκη 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

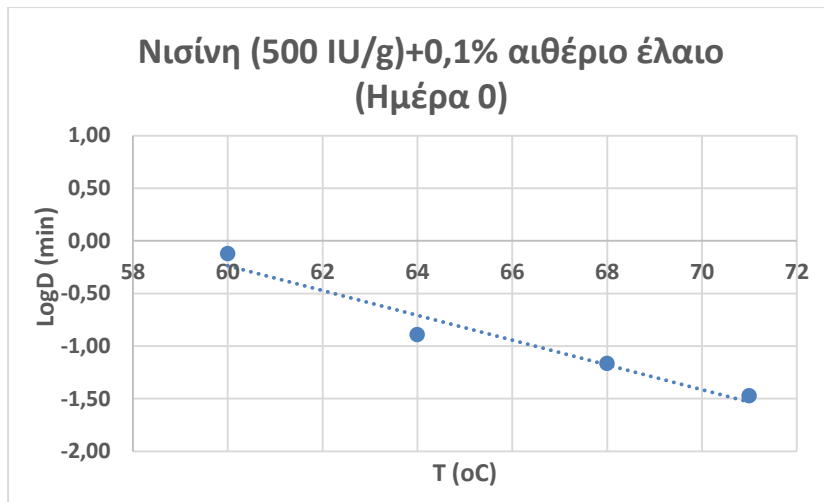




**Γράφημα I.4 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσεως του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κινά με την προσθήκη 0,5% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



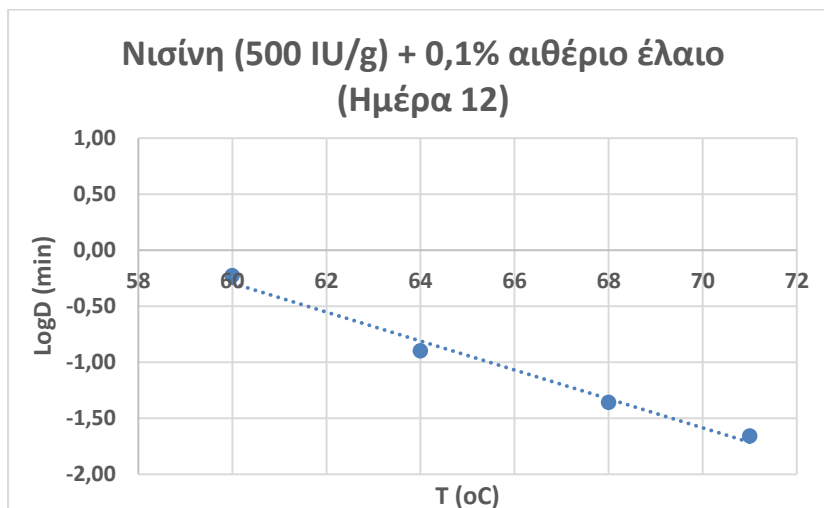
**Γράφημα I.4 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσεως του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κινά με την προσθήκη 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1178x + 6,8321$$

$$R^2 = 0,9493$$

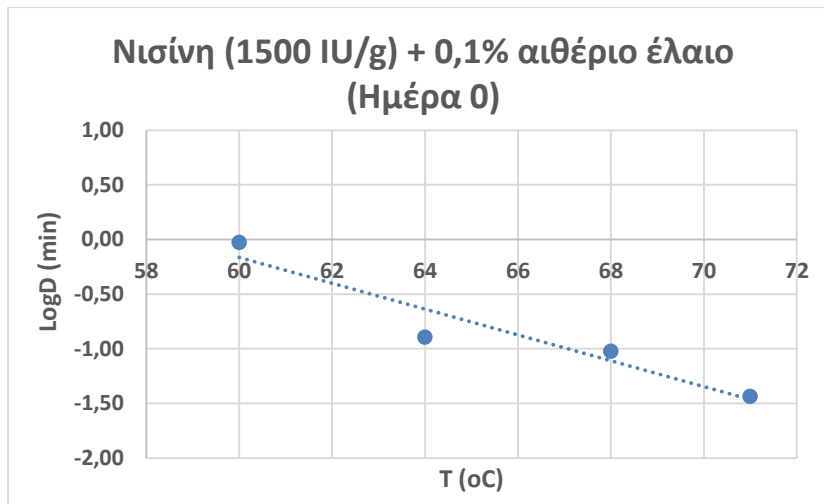
**Γράφημα I.5 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1291x + 7,4523$$

$$R^2 = 0,9862$$

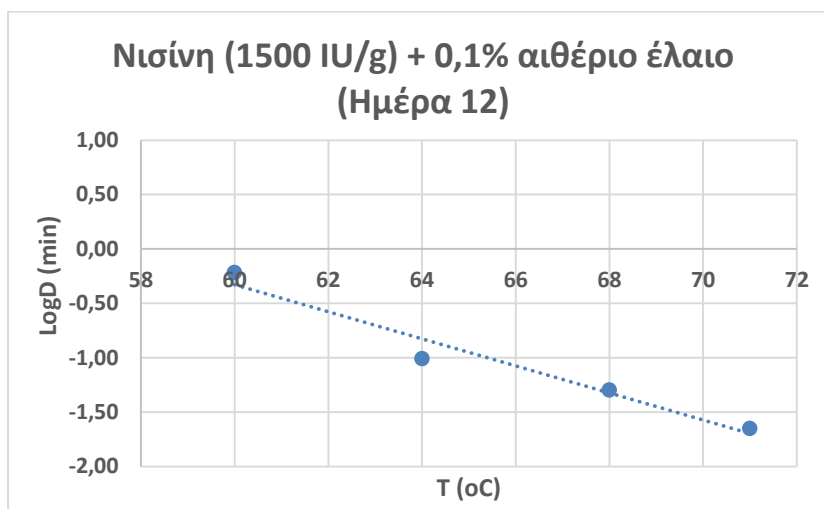
**Γράφημα I.5 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1182x + 6,9293$$

$$R^2 = 0,9119$$

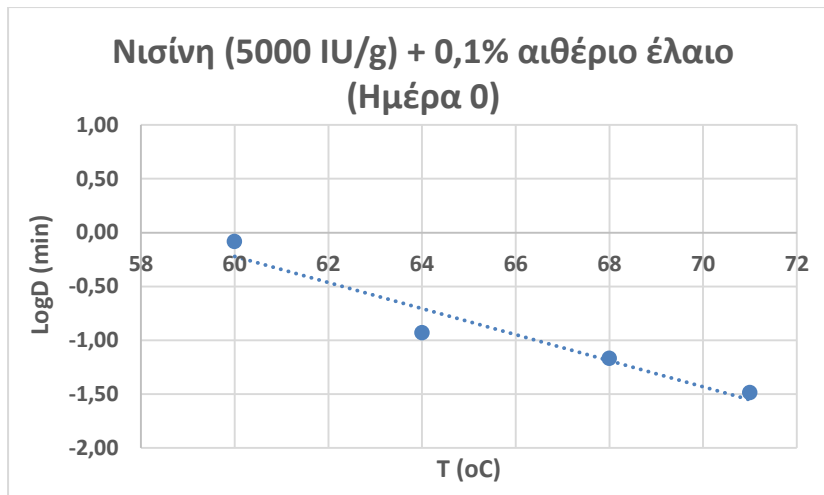
**Γράφημα I.6 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (1500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1246x + 7,1458$$

$$R^2 = 0,9567$$

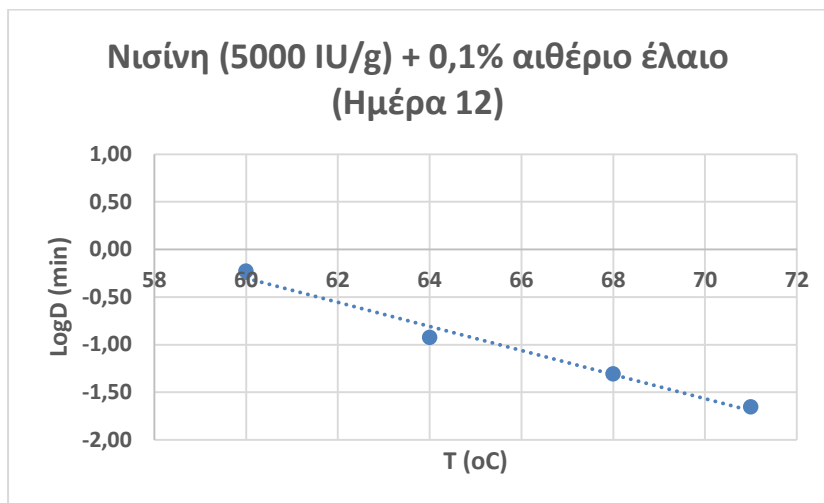
**Γράφημα I.6 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (1500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1209x + 7,0311$$

$$R^2 = 0,9307$$

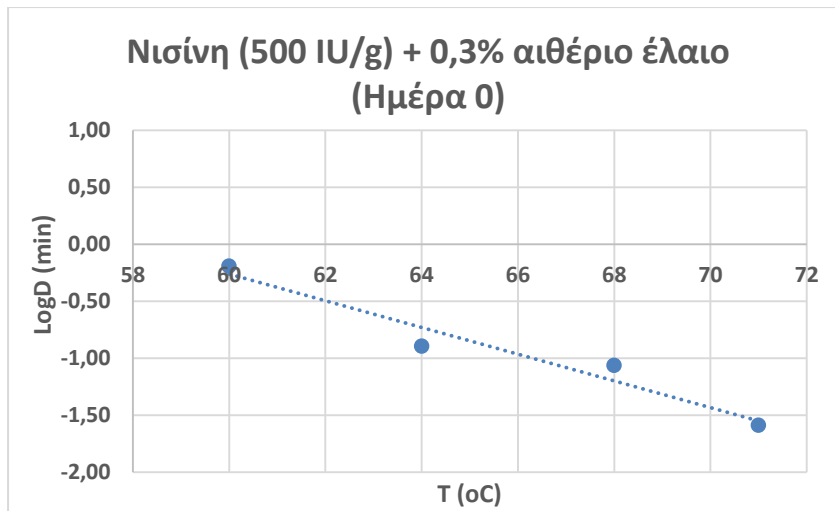
**Γράφημα I.7 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (5000 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1264x + 7,2829$$

$$R^2 = 0,9819$$

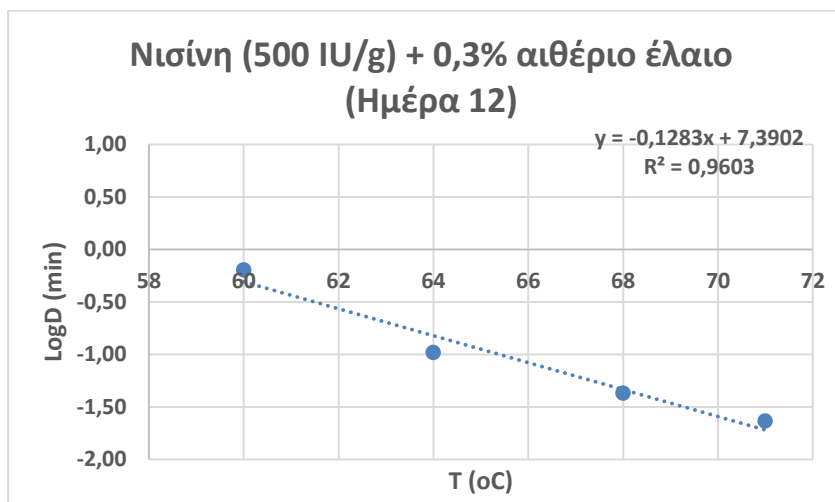
**Γράφημα I.7 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (5000 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1173x + 6,7788$$

$$R^2 = 0,948$$

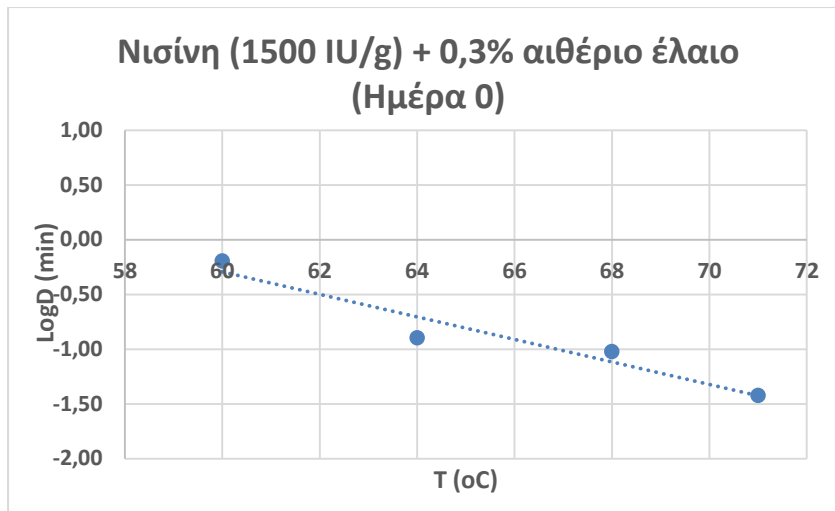
**Γράφημα I.8 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1283x + 7,3902$$

$$R^2 = 0,9603$$

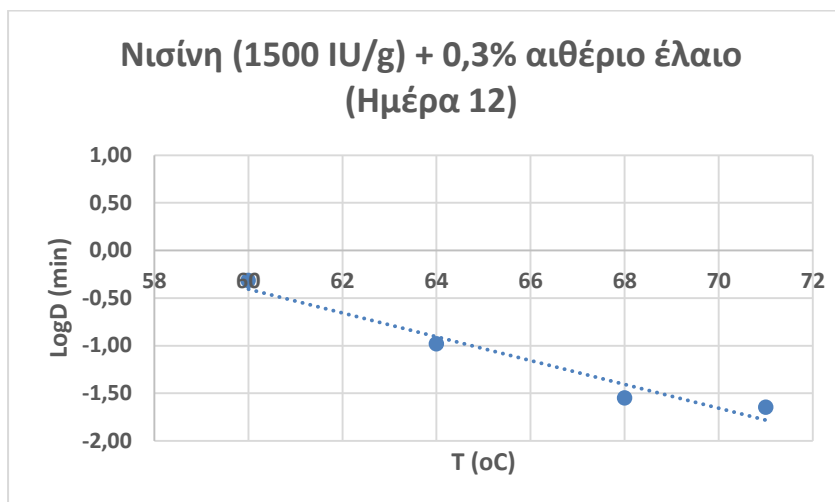
**Γράφημα I.8 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,103x + 5,8833$$

$$R^2 = 0,9302$$

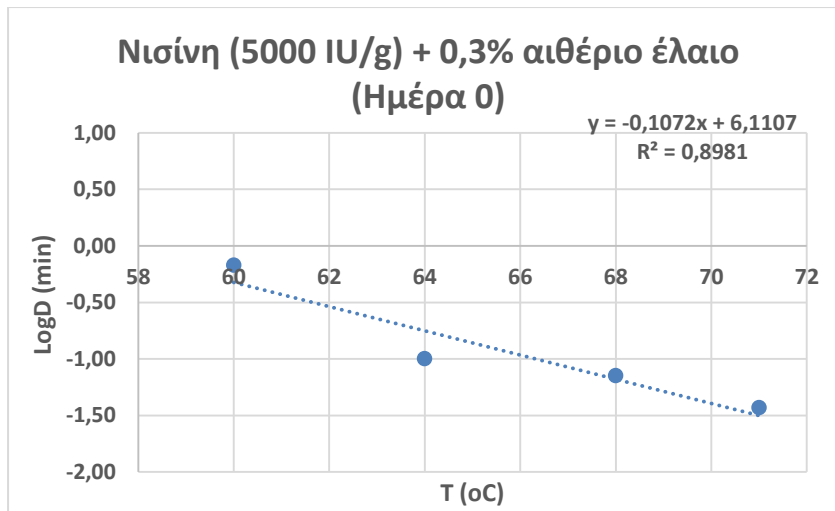
**Γράφημα I.9 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (1500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1249x + 7,0887$$

$$R^2 = 0,9538$$

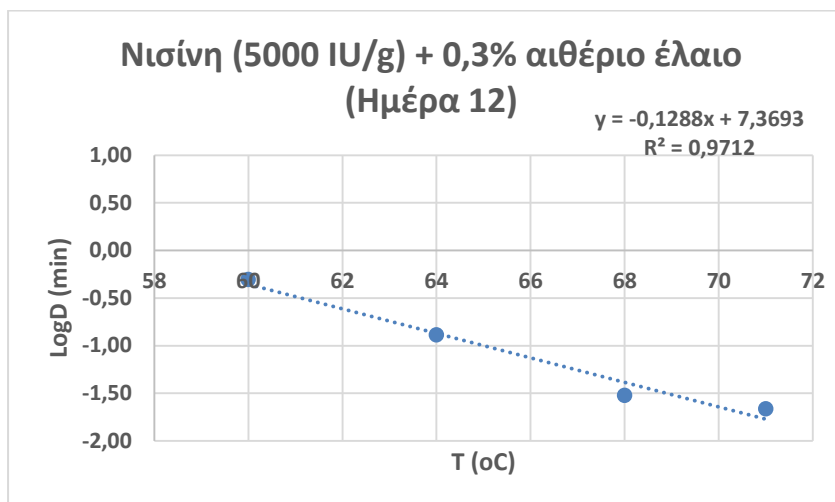
**Γράφημα I.9 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (1500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1072x + 6,1107$$

$$R^2 = 0,8981$$

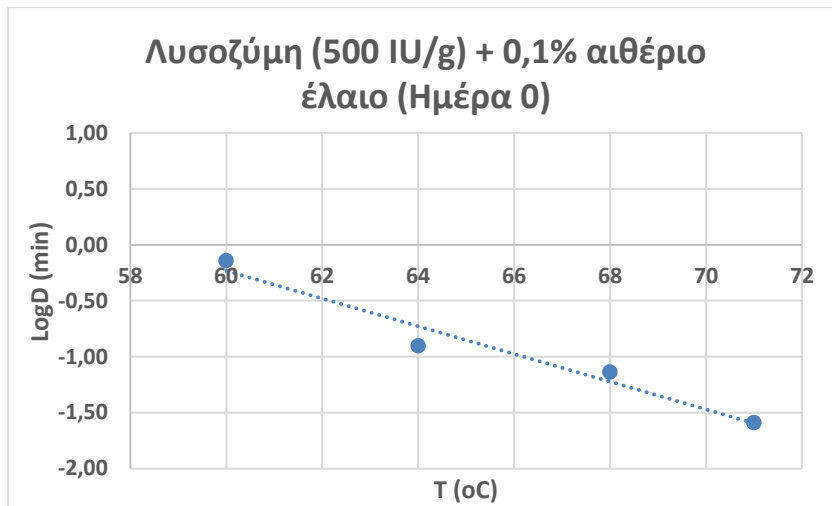
**Γράφημα I.10 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσεως του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (5000 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1288x + 7,3693$$

$$R^2 = 0,9712$$

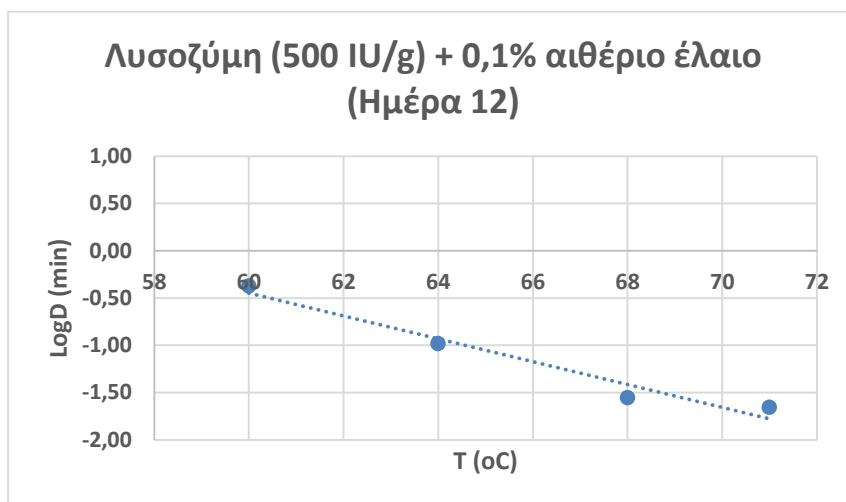
**Γράφημα I.10 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσεως του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Νισίνης (5000 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1238x + 7,1976$$

$$R^2 = 0,9586$$

**Γράφημα I.11 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.

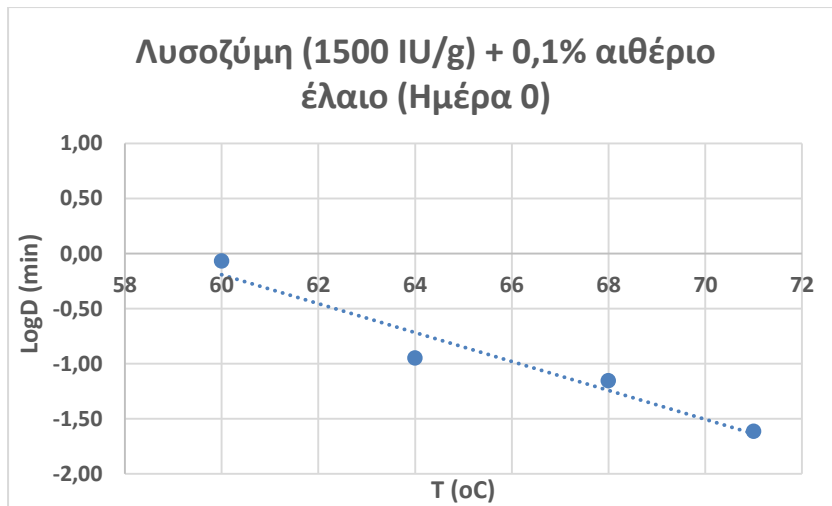


$$y = -0,1211x + 6,8227$$

$$R^2 = 0,96$$

**Γράφημα I.11 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

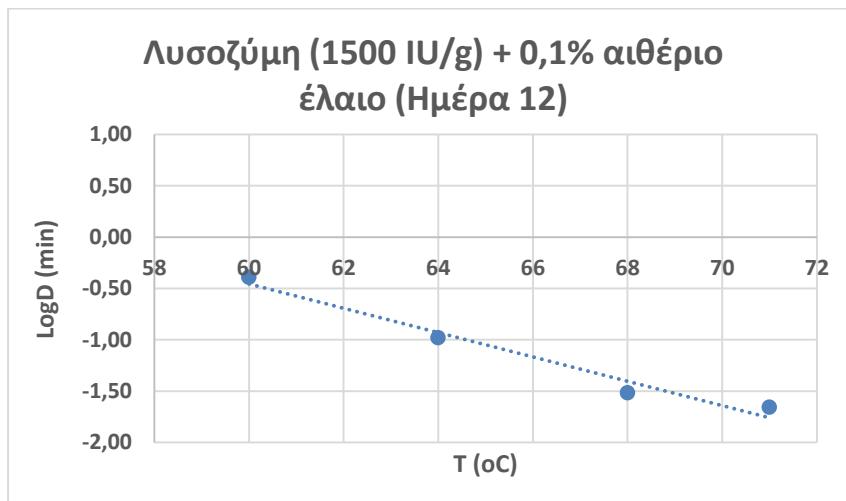




$$y = -0,1313x + 7,6888$$

$$R^2 = 0,9382$$

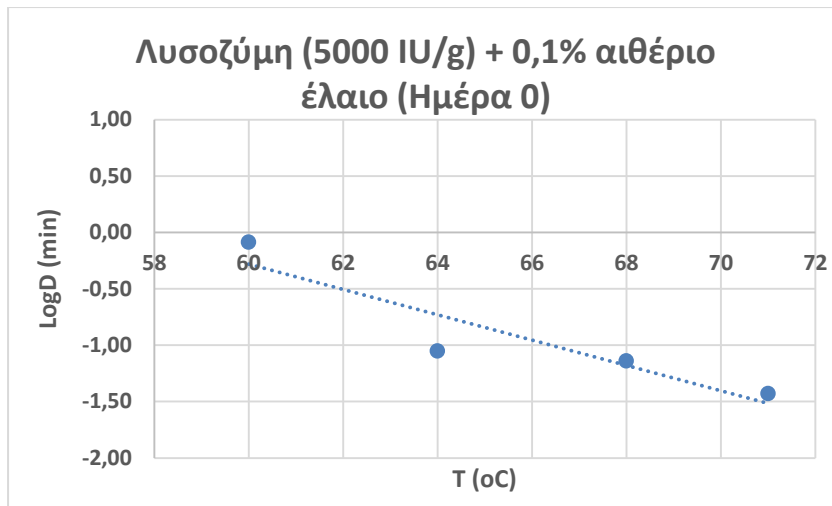
**Γράφημα I.12 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (1500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



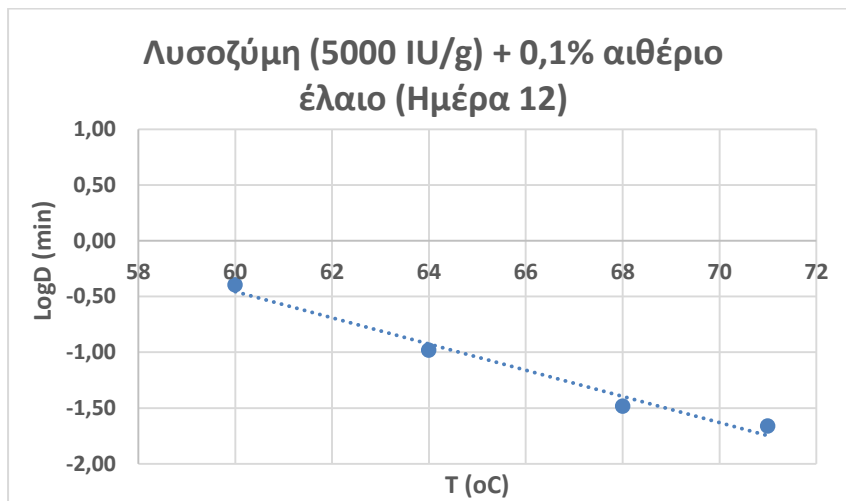
$$y = -0,1185x + 6,652$$

$$R^2 = 0,9696$$

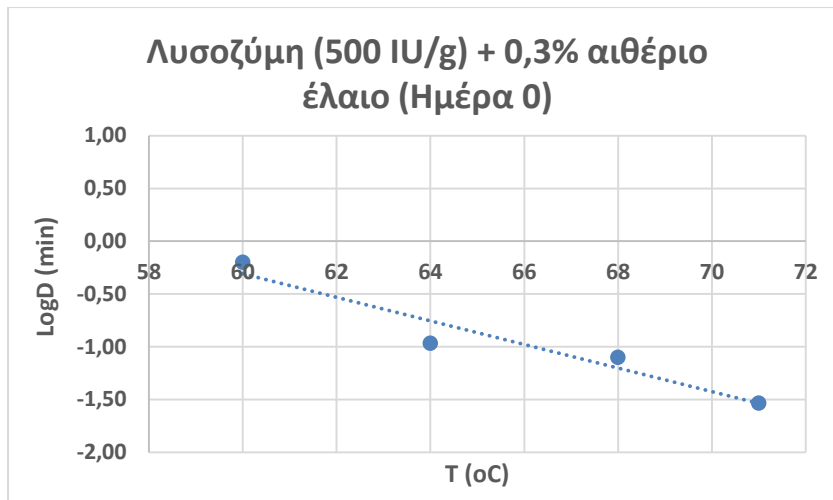
**Γράφημα I.12 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (1500 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



**Γράφημα I.13 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (5000 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



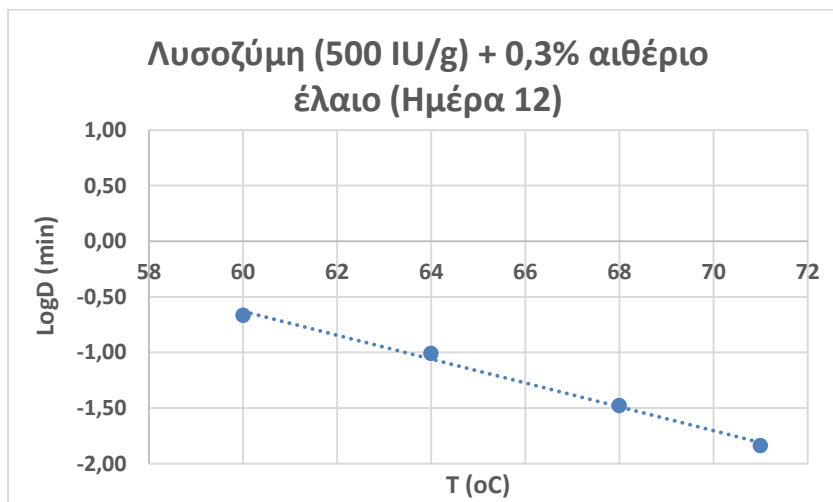
**Γράφημα I.13 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (5000 IU/g) και 0,1% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1118x + 6,3983$$

$$R^2 = 0,9273$$

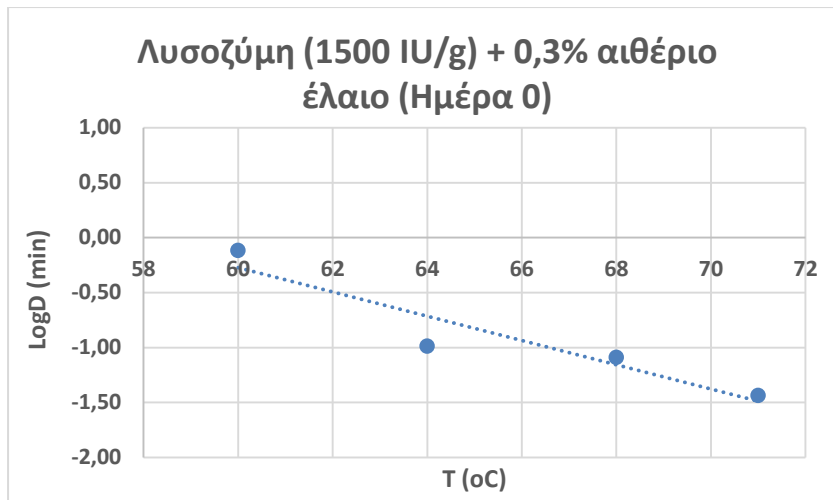
**Γράφημα I.14 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1074x + 5,8144$$

$$R^2 = 0,9941$$

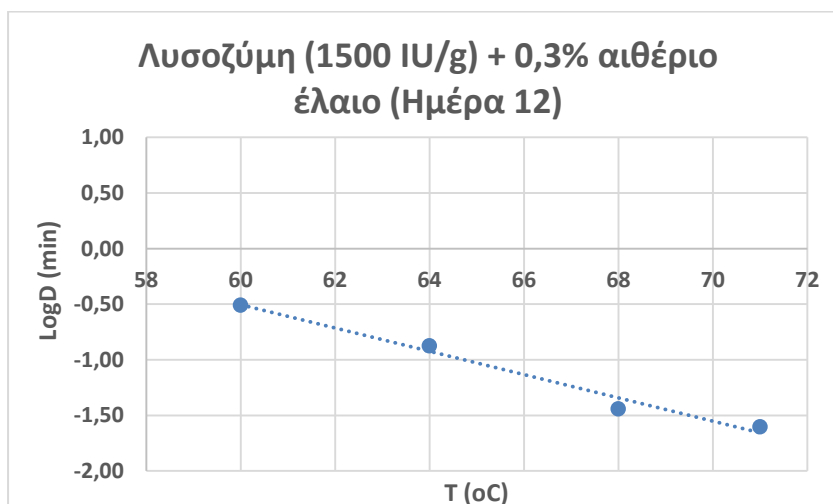
**Γράφημα I.14 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



$$y = -0,1105x + 6,3569$$

$$R^2 = 0,8877$$

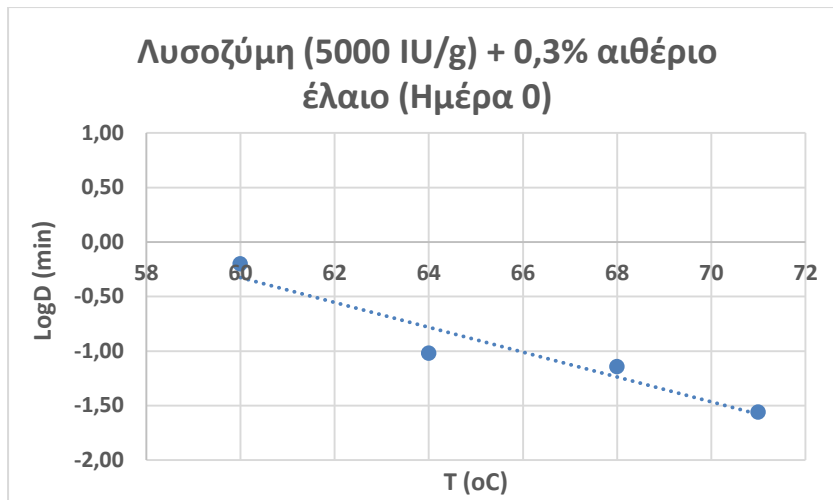
**Γράφημα I.15 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (1500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



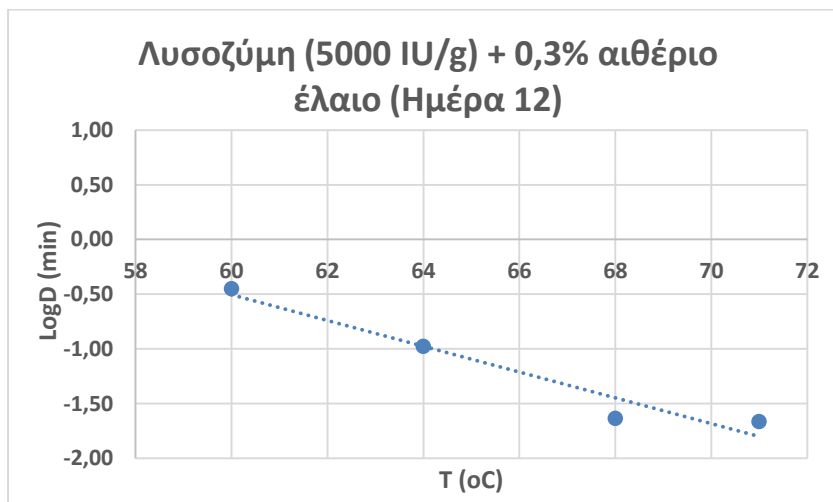
$$y = -0,1047x + 5,7741$$

$$R^2 = 0,9803$$

**Γράφημα I.15 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (1500 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.



**Γράφημα I.16 a:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (5000 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 0η ημέρα συντήρησης.



**Γράφημα I.16 b:** Γραφική απεικόνιση του χρόνου υποδεκαπλασιασμού (D-value), συναρτήσει του θερμοκρασιακού εύρους 60 - 71 °C για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* O157:H7 στα δείγματα χοιρινού κιμά με την προσθήκη Λυσοζύμης (5000 IU/g) και 0,3% αιθέριου ελαίου ρίγανης ενσωματωμένο σε λυοφιλοποιημένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος τη 12<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

60 °C					
Treatment	Seconds	Day 0		Day 12	
		Average	StDev	Average	StDev
<b>Control</b>	0	5,68	0,01	6,22	0,02
	2,5	5,77	0,04	6,37	0,00
	5	5,88	0,04	6,37	0,01
	7,5	5,83	0,08	6,39	0,01
	10	5,84	0,05	6,39	0,02
	15	5,95	0,01	6,40	0,01
	20	5,88	0,06	6,41	0,01
<b>0.1% E.O.</b>	0	5,70	0,01	5,16	0,00
	2,5	5,90	0,02	5,34	0,01
	5	5,90	0,01	5,36	0,01
	7,5	5,91	0,01	5,39	0,03
	10	5,94	0,03	5,40	0,03
	15	5,94	0,02	5,42	0,01
	20	5,95	0,01	5,39	0,00
<b>0.3% E.O.</b>	0	5,75	0,03	5,28	0,00
	2,5	5,90	0,01	5,52	0,04
	5	5,92	0,00	5,52	0,01
	7,5	5,93	0,01	5,51	0,03
	10	5,95	0,03	5,54	0,00
	15	5,94	0,02	5,58	0,04
	20	5,96	0,00	5,56	0,02
<b>0.5% E.O.</b>	0	5,78	0,01	5,42	0,01
	2,5	5,93	0,01	5,68	0,02
	5	5,95	0,01	5,68	0,01
	7,5	5,97	0,01	5,66	0,03
	10	5,98	0,01	5,66	0,01
	15	5,98	0,01	5,73	0,02
	20	6,00	0,02	5,73	0,04
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,70	0,01	5,54	0,01
	2,5	5,89	0,02	5,75	0,04
	5	5,90	0,01	5,80	0,01
	7,5	5,92	0,01	5,76	0,05
	10	5,93	0,01	5,77	0,03
	15	5,93	0,01	5,78	0,04
	20	5,94	0,00	5,81	0,00
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,72	0,01	5,58	0,02
	2,5	5,92	0,01	5,86	0,03

	5	5,94	0,02	5,86	0,04
	7,5	5,93	0,02	5,87	0,02
	10	5,95	0,01	5,87	0,02
	15	5,95	0,00	5,85	0,00
	20	5,95	0,00	5,89	0,02
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,75	0,01	5,76	0,01
	2,5	5,93	0,01	5,85	0,09
	5	5,95	0,01	5,89	0,06
	7,5	5,96	0,01	5,88	0,06
	10	5,97	0,01	5,94	0,01
	15	5,97	0,01	5,94	0,04
	20	5,98	0,02	5,94	0,03
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,74	0,01	5,69	0,01
	2,5	5,89	0,01	5,85	0,02
	5	5,92	0,02	5,87	0,01
	7,5	5,76	0,32	5,88	0,04
	10	5,94	0,02	5,90	0,01
	15	5,95	0,00	5,90	0,00
	20	5,95	0,00	5,92	0,01
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,71	0,01	5,71	0,01
	2,5	5,88	0,00	5,86	0,01
	5	5,89	0,01	5,87	0,00
	7,5	5,90	0,01	5,88	0,02
	10	5,91	0,01	5,89	0,01
	15	5,92	0,01	5,90	0,03
	20	5,95	0,01	5,90	0,00
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,90	0,01	5,84	0,06
	2,5	6,17	0,20	6,06	0,02
	5	6,08	0,01	6,06	0,02
	7,5	6,09	0,01	6,08	0,01
	10	6,10	0,02	6,09	0,01
	15	6,10	0,01	6,12	0,01
	20	6,10	0,01	6,12	0,01
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,84	0,00	5,42	0,04
	2,5	6,02	0,06	5,62	0,01
	5	6,04	0,03	5,62	0,01
	7,5	6,05	0,01	5,65	0,01
	10	6,07	0,00	5,63	0,04
	15	6,07	0,04	5,64	0,01
	20	6,07	0,03	5,66	0,01
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,88	0,00	5,52	0,04
	2,5	6,10	0,01	5,70	0,03
	5	6,09	0,05	5,70	0,01

	7,5	6,11	0,06	5,71	0,02
	10	6,14	0,03	5,73	0,04
	15	6,14	0,02	5,77	0,03
	20	6,16	0,02	5,77	0,01
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,79	0,01	5,34	0,03
	2,5	5,97	0,07	5,56	0,02
	5	6,05	0,03	5,55	0,01
	7,5	6,05	0,03	5,59	0,04
	10	6,07	0,06	5,56	0,03
	15	6,05	0,00	5,60	0,01
	20	6,08	0,06	5,59	0,01
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,86	0,01	5,51	0,03
	2,5	6,03	0,02	5,71	0,01
	5	6,04	0,01	5,70	0,03
	7,5	6,04	0,01	5,74	0,01
	10	6,06	0,01	5,79	0,03
	15	6,07	0,00	5,77	0,01
	20	6,09	0,01	5,80	0,04
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,87	0,02	5,51	0,01
	2,5	6,04	0,02	5,67	0,21
	5	6,04	0,00	5,80	0,01
	7,5	6,04	0,02	5,77	0,04
	10	6,27	0,38	5,82	0,02
	15	6,07	0,00	5,76	0,01
	20	6,05	0,01	5,83	0,01
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,73	0,01	5,41	0,02
	2,5	5,90	0,01	5,69	0,06
	5	5,90	0,01	5,66	0,05
	7,5	5,91	0,01	5,73	0,11
	10	5,94	0,02	5,67	0,08
	15	5,94	0,01	5,62	0,01
	20	5,95	0,02	5,63	0,04



64 °C		
Treatment	seconds	Day 0 pH
<b>Control</b>	0	5,76
	60	-
	90	-
	120	6,16
	150	-
	210	6,2
<b>0.1% E.O.</b>	0	5,87
	60	-
	90	-
	120	6,27
	150	-
	210	6,22
<b>0.3% E.O.</b>	0	5,95
	60	-
	90	-
	120	6,26
	150	-
	210	6,28
<b>0.5% E.O.</b>	0	5,85
	60	-
	90	-
	120	6,25
	150	-
	210	6,24
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,02
	60	-
	90	-
	120	6,22
	150	-
	210	6,24
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,07
	60	-
	90	-
	120	6,28
	150	-
	210	6,26
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,97
	60	-
	90	-
	120	6,18
	150	-
	210	6,19

<b>Nisin (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,08
	60	-
	90	-
	120	6,26
	150	-
	210	6,28
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,76
	60	-
	90	-
	120	6,19
	150	-
	210	6,25
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,82
	60	-
	90	-
	120	6,24
	150	-
	210	6,31
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,87
	60	-
	90	-
	120	6,26
	150	-
	210	6,29
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,67
	60	-
	90	-
	120	6,14
	150	-
	210	6,18
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,5
	60	-
	90	-
	120	6,09
	150	-
	210	6,14
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,61
	60	-
	90	-
	120	6,09
	150	-
	210	6,14
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,64
	60	-
	90	-

	120	6,14
	150	-
	210	6,18
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,63
	60	-
	90	-
	120	6,12
	150	-
	210	6,18

64 °C			
Treatment	Seconds	Day 12	
		Average	StDev
<b>Control</b>	0	5,94	0,08
	60	6,15	0,01
	90	6,09	0,04
	120	6,14	0,01
	150	6,14	0,06
	210	6,12	0,01
<b>0.1% E.O.</b>	0	5,94	0,05
	60	6,10	0,02
	90	6,09	0,02
	120	6,12	0,01
	150	6,11	0,02
	210	6,14	0,02
<b>0.3% E.O.</b>	0	6,02	0,02
	60	6,12	0,03
	90	6,15	0,02
	120	6,16	0,01
	150	6,14	0,03
	210	6,16	0,01
<b>0.5% E.O.</b>	0	5,97	0,06
	60	6,08	0,05
	90	6,08	0,03
	120	6,13	0,03
	150	6,10	0,01
	210	6,11	0,02
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,10	0,03
	60	6,24	0,01
	90	6,22	0,02
	120	6,26	0,07
	150	6,25	0,05
	210	6,25	0,07
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,15	0,03
	60	6,29	0,01
	90	6,29	0,01
	120	6,29	0,03
	150	6,31	0,02
	210	6,32	0,03
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,20	0,00
	60	6,31	0,02
	90	6,31	0,03
	120	6,30	0,04
	150	6,32	0,02
	210	6,33	0,02

<b>Nisin (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,14	0,01
	60	6,25	0,01
	90	6,26	0,02
	120	6,27	0,00
	150	6,27	0,02
	210	6,27	0,01
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,09	0,03
	60	6,24	0,01
	90	6,23	0,03
	120	6,27	0,02
	150	6,27	0,02
	210	6,27	0,01
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,19	0,05
	60	6,32	0,02
	90	6,29	0,03
	120	6,28	0,03
	150	6,34	0,04
	210	6,29	0,02
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,04	0,01
	60	6,19	0,03
	90	6,20	0,03
	120	6,20	0,02
	150	6,20	0,03
	210	6,22	0,02
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,87	0,02
	60	6,02	0,01
	90	6,06	0,01
	120	6,06	0,03
	150	6,07	0,03
	210	6,07	0,01
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,87	0,01
	60	5,97	0,02
	90	5,99	0,03
	120	6,01	0,02
	150	6,05	0,02
	210	6,04	0,03
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,86	0,02
	60	6,03	0,04
	90	6,06	0,03
	120	6,04	0,02
	150	6,04	0,04
	210	6,05	0,02
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,90	0,00
	60	6,02	0,04
	90	6,02	0,03

	120	6,02	0,03
	150	6,05	0,06
	210	6,03	0,04
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,83	0,01
	60	5,99	0,02
	90	6,02	0,06
	120	6,02	0,01
	150	6,01	0,03
	210	6,03	0,01

68 °C						
Treatment	Day 0			Day 12		
	Seconds	Average	StDev	Seconds	Average	StDev
<b>Control</b>	0	5,87	0,04	0	5,51	0,02
	8	5,90	0,01	15	5,62	0,05
	16	5,94	0,01	30	5,71	0,02
	24	6,03	0,01	40	5,71	0,02
	32	6,07	0,01	50	5,69	0,02
	40	6,08	0,01	60	5,71	0,01
	50	6,11	0,01	70	5,73	0,01
<b>0.1% E.O.</b>	0	5,87	0,00	0	5,55	0,00
	8	5,87	0,01	15	5,73	0,01
	16	5,94	0,02	30	5,77	0,02
	24	5,98	0,01	40	5,79	0,01
	32	6,03	0,03	50	5,82	0,01
	40	6,07	0,01	60	5,83	0,00
	50	6,10	0,04	70	5,82	0,01
<b>0.3% E.O.</b>	0	5,93	0,02	0	5,62	0,06
	8	5,94	0,01	15	5,74	0,03
	16	6,02	0,04	30	5,85	0,01
	24	6,04	0,01	40	5,86	0,03
	32	6,34	0,40	50	5,88	0,04
	40	6,13	0,02	60	5,89	0,01
	50	6,09	0,01	70	5,86	0,02
<b>0.5% E.O.</b>	0	5,87	0,01	0	5,41	0,00
	8	5,87	0,02	15	5,51	0,02
	16	5,93	0,01	30	5,57	0,07
	24	6,00	0,01	40	5,61	0,01
	32	6,02	0,01	50	5,68	0,02
	40	6,04	0,00	60	5,67	0,01
	50	6,03	0,01	70	5,68	0,02
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,82	0,00	0	5,46	0,02
	8	5,82	0,01	15	5,58	0,02
	16	5,85	0,01	30	5,69	0,03
	24	5,94	0,01	40	5,71	0,01
	32	5,97	0,01	50	5,71	0,02
	40	5,99	0,01	60	5,67	0,09
	50	6,00	0,00	70	5,71	0,01
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,85	0,00	0	5,63	0,01
	8	5,86	0,01	15	5,75	0,01
	16	5,91	0,01	30	5,81	0,01
	24	5,95	0,02	40	5,85	0,02
	32	5,97	0,03	50	5,87	0,06
	40	6,03	0,01	60	5,86	0,01

	50	6,04	0,01	70	5,97	0,16
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,82	0,01	0	5,65	0,04
	8	5,84	0,00	15	5,75	0,01
	16	5,91	0,01	30	5,82	0,03
	24	5,95	0,02	40	5,83	0,02
	32	5,99	0,01	50	5,85	0,01
	40	6,00	0,04	60	5,85	0,01
	50	6,01	0,01	70	5,85	0,01
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,86	0,00	0	5,63	0,00
	8	5,86	0,00	15	5,76	0,01
	16	5,90	0,00	30	5,81	0,07
	24	5,97	0,01	40	5,83	0,05
	32	5,99	0,02	50	5,87	0,02
	40	6,05	0,01	60	5,90	0,02
	50	6,05	0,00	70	5,85	0,03
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,84	0,01	0	5,75	0,01
	8	5,86	0,01	15	5,87	0,01
	16	5,90	0,01	30	5,95	0,01
	24	5,97	0,01	40	5,97	0,02
	32	6,00	0,02	50	5,98	0,00
	40	6,03	0,00	60	5,98	0,00
	50	6,05	0,01	70	6,00	0,02
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,79	0,04	0	5,79	0,01
	8	5,81	0,01	15	5,87	0,02
	16	5,86	0,02	30	5,97	0,01
	24	5,93	0,02	40	5,96	0,03
	32	5,97	0,01	50	6,00	0,05
	40	5,99	0,01	60	6,00	0,01
	50	6,00	0,01	70	6,00	0,03
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,79	0,01	0	5,26	0,00
	8	5,79	0,01	15	5,40	0,03
	16	5,84	0,01	30	5,48	0,01
	24	5,90	0,02	40	5,52	0,01
	32	5,95	0,01	50	5,52	0,01
	40	5,98	0,01	60	5,52	0,01
	50	5,99	0,00	70	5,54	0,01
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,83	0,01	0	5,31	0,01
	8	5,83	0,01	15	5,46	0,01
	16	5,87	0,01	30	5,54	0,01
	24	5,93	0,02	40	5,57	0,01
	32	6,00	0,02	50	5,57	0,02
	40	6,01	0,00	60	5,57	0,01
	50	6,03	0,01	70	5,58	0,01
<b>Lysozyme (5000</b>	0	5,77	0,00	0	5,27	0,01



<b>IU/g) + 0,1% E.O.</b>	8	5,79	0,00	15	5,40	0,03
	16	5,85	0,03	30	5,48	0,01
	24	5,92	0,01	40	5,51	0,00
	32	5,97	0,01	50	5,51	0,01
	40	5,98	0,00	60	5,53	0,01
	50	5,99	0,00	70	5,54	0,01
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,80	0,01	0	2,83	3,54
	8	5,82	0,01	15	5,44	0,02
	16	5,87	0,02	30	5,55	0,02
	24	5,92	0,02	40	5,57	0,02
	32	5,98	0,01	50	5,58	0,02
	40	5,99	0,01	60	5,58	0,01
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,83	0,01	0	5,35	0,01
	8	5,86	0,01	15	5,49	0,00
	16	5,92	0,02	30	5,57	0,01
	24	5,99	0,03	40	5,58	0,01
	32	6,02	0,02	50	5,60	0,01
	40	6,23	0,25	60	5,61	0,01
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	5,82	0,01	0	5,33	0,01
	8	5,83	0,03	15	5,46	0,03
	16	5,88	0,04	30	5,52	0,01
	24	5,94	0,06	40	5,56	0,03
	32	5,96	0,02	50	5,55	0,02
	40	6,06	0,00	60	5,57	0,00
	50	6,44	0,52	70	5,57	0,00

71 °C					
Treatment	Seconds	Day 0		Day 12	
		Average	StDev	Average	StDev
<b>Control</b>	0	6,11	0,01	5,91	0,01
	8	6,13	0,01	5,95	0,02
	16	6,17	0,03	5,99	0,04
	24	6,23	0,02	6,04	0,05
	32	6,27	0,01	6,12	0,02
	40	6,29	0,00	6,13	0,01
	50	6,31	0,01	6,15	0,01
<b>0.1% E.O.</b>	0	6,08	0,02	5,76	0,00
	8	6,11	0,07	5,85	0,03
	16	6,16	0,03	5,95	0,04
	24	6,19	0,01	6,06	0,02
	32	6,25	0,03	6,07	0,03
	40	6,28	0,05	6,07	0,01
	50	6,25	0,06	6,06	0,04
<b>0.3% E.O.</b>	0	6,21	0,01	6,02	0,01
	8	6,25	0,01	6,09	0,01
	16	6,27	0,00	6,12	0,02
	24	6,34	0,01	6,16	0,01
	32	6,38	0,01	6,19	0,01
	40	6,65	0,36	6,21	0,01
	50	6,40	0,01	6,22	0,01
<b>0.5% E.O.</b>	0	6,14	0,01	5,99	0,03
	8	6,17	0,02	6,03	0,01
	16	6,22	0,01	6,21	0,25
	24	6,24	0,02	6,15	0,01
	32	6,30	0,02	6,17	0,00
	40	6,33	0,00	6,17	0,03
	50	6,33	0,00	6,18	0,01
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,14	0,01	6,04	0,00
	8	6,18	0,01	6,08	0,02
	16	6,21	0,02	6,14	0,01
	24	6,28	0,01	6,18	0,01
	32	6,33	0,02	6,18	0,02
	40	6,34	0,01	6,20	0,03
	50	6,35	0,00	6,21	0,05
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,15	0,00	5,99	0,02
	8	6,17	0,02	6,07	0,01
	16	6,21	0,02	6,12	0,01
	24	6,26	0,02	6,17	0,01
	32	6,29	0,02	6,19	0,02
	40	6,33	0,01	6,18	0,04

	50	6,32	0,01	6,18	0,02
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	5,90	0,00	5,76	0,01
	8	5,72	0,36	5,82	0,01
	16	5,99	0,02	5,87	0,02
	24	6,07	0,01	5,95	0,02
	32	6,09	0,01	5,98	0,02
	40	6,12	0,00	5,97	0,01
	50	6,13	0,01	5,97	0,02
<b>Nisin (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,07	0,00	5,97	0,01
	8	6,08	0,00	5,99	0,02
	16	6,15	0,01	6,04	0,02
	24	6,19	0,02	6,13	0,06
	32	6,24	0,00	6,16	0,01
	40	6,24	0,00	6,14	0,02
	50	6,25	0,02	6,17	0,01
<b>Nisin (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,08	0,02	5,99	0,02
	8	6,12	0,01	6,02	0,01
	16	6,16	0,01	6,09	0,02
	24	6,21	0,01	6,15	0,03
	32	6,24	0,02	6,18	0,01
	40	6,26	0,00	6,17	0,03
	50	6,27	0,01	6,20	0,03
<b>Nisin (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,11	0,03	6,02	0,01
	8	6,12	0,02	6,07	0,02
	16	6,17	0,02	6,12	0,03
	24	6,21	0,02	6,18	0,01
	32	6,26	0,01	6,19	0,03
	40	6,27	0,01	6,21	0,03
	50	6,29	0,01	6,20	0,01
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,02	0,03	5,75	0,00
	8	6,05	0,01	5,84	0,06
	16	6,11	0,01	5,89	0,01
	24	6,17	0,03	6,00	0,01
	32	4,21	3,48	6,02	0,01
	40	6,23	0,02	6,04	0,00
	50	6,26	0,01	6,03	0,04
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,1% E.O.</b>	0	6,16	0,00	5,96	0,00
	8	6,18	0,00	5,99	0,02
	16	6,20	0,01	6,04	0,04
	24	6,26	0,03	6,11	0,03
	32	6,29	0,01	6,13	0,03
	40	6,34	0,01	6,16	0,02
	50	6,34	0,01	6,19	0,01
<b>Lysozyme (5000)</b>	0	6,33	0,02	6,11	0,01

<b>IU/g) + 0,1% E.O.</b>	8	6,36	0,02	6,14	0,02
	16	6,38	0,04	6,19	0,03
	24	6,41	0,02	6,25	0,03
	32	6,47	0,01	6,28	0,00
	40	6,47	0,01	6,31	0,04
	50	6,39	0,12	6,29	0,01
<b>Lysozyme (500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,20	0,02	6,00	0,01
	8	6,19	0,03	6,03	0,03
	16	6,24	0,02	6,09	0,01
	24	6,29	0,02	6,16	0,02
	32	6,31	0,02	6,17	0,02
	40	6,35	0,01	6,22	0,01
	50	6,35	0,02	6,18	0,01
<b>Lysozyme (1500 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,23	0,02	6,06	0,00
	8	6,28	0,03	6,10	0,04
	16	6,31	0,00	6,15	0,01
	24	6,33	0,03	6,20	0,03
	32	6,37	0,01	6,23	0,01
	40	6,40	0,01	6,24	0,02
	50	6,39	0,02	6,24	0,02
<b>Lysozyme (5000 IU/g) + 0,3% E.O.</b>	0	6,15	0,01	5,94	0,02
	8	6,17	0,01	6,01	0,03
	16	6,18	0,01	6,06	0,02
	24	6,24	0,01	6,10	0,01
	32	6,28	0,02	6,12	0,01
	40	6,29	0,00	6,14	0,00
	50	6,29	0,01	6,16	0,01

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aasen, I. M., Markusse, S., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, L., Nsterstad, K., 2003, Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 35-43.
2. Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995, Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int. J. Food Microbiology* 28, 169-185.
3. Adams M.R., Moss M.O. (2008). *Food Microbiology* 3rd Ed. © The Royal Society of Chemistry, 2008, RSC Publishing.
4. Ahmed, N.M., Conner, DE, Huffman, DL. 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J Food Sci* 60(3):606–10.
5. Arocha, M.M., McVey, M., Loder, S.D., Rupnow, J.H., and Bullerman, L. 1992. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. *J. Food Protect.* 55: 379–381.
6. Aureli, P., Costantini, A., Zolea, S., 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 55 (5), 344–348.
7. Awuah, G. B., Ramaswamy, H. S. & Economides, A., 2007. *Thermal Processing and Quality: Principles and Overview.*, ELSEVIER, Chemical Engineering and Processing 46:58-602.
8. Bach, S. J., McAllister, T. A., Veira, D. M., Grannon, V. P. J. & Holley, R. A., 2002. Transmission And Control of O157:H7 – A review, *Canadian Journal of Animal Science*.
9. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, et al. 1999. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. *JAMA*. 272:1349–53.
10. Bera, A. Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W. & Gotz, F., 2005. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major detersecant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 55, 778-787.
11. Bhaduri, S, Smith PW, Palumbo, SA, Turner-Jones, CO, Smith, JL, Marmer. BS, Buchanan, RL, Zaika, LL, Williams, AC. 1991. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. *Food Microbiol* 8:75–8.
12. Blackburn C. W., MacClure P. J., 2002. *Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control*, Woodhead Publishing Limited.
13. Boziaris, I. S., Humpherson, L. & Adams, M. R., 1998. Effect of nisin on heat injury and inactivation of *Salmonella enteritidis* PT4, *International Journal of Food Microbiology* 43:7-13.

14. Brewer, R., Adams, M. R. & Park, S. F., 2002. Enhancement inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol, *Letters and Applied Microbiology*, 34:18-21.
15. Buchanan, R.L. and Bagi, L.K. 1994. Expansion of response surface models for the growth of *Escherichia coli* O157:H7 to include sodium nitrite as a variable. *Intl. J. Food Microbiol.* 23: 317–322.
16. Buchanan, R. L. & Doyle, M. P., 1997. Foodborne Disease Significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other Enterohemorrhagic *E. coli.*, Institute of Food Technologists, Vol. 51, No 10.
17. Buchanan, R. L. & Michael P. D., 1997. Foodborne Disease Significance of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Enterohemorrhagic *E. coli.* *Sci. Status Summ.*; 51:69–76.
18. Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *International Journal of Food Microbiology* 94: 223– 253.
19. Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6), 1914–1920.
20. Carter, A. O., Borezyk, A. A., Carlson, J. A. K., Harvey, B., Hockin, J. C., Karmali, M. A., Krishnan, C., Korn, D. A., & Lior, H. 1987. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis in a nursing home. *New England Journal of Medicine*, 317:1496-1500.
21. Centers for Disease Control and Prevention, 1994, *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami—Washington and California, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 44:157–60.
22. Centers for Disease Control and Prevention, 1999. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter* among attendees of the Washington County Fair—New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 48:803–5.
23. CFSPH, 2004. *Escherichia coli* O157:H7 infections. Institute for international cooperation in animal biologics, Iowa State University.
24. Cheville, A.M., Arnold K.W., Buchrieser, C., Cheng C.M., Kaspar C.W., 1996. rpoS regulation of acid, heat and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*; 62: 1822–1824.
25. Chikindas, M. L. & Montville, T. J., 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: *Control of foodborne microorganisms*, Marcel Dekker, New York,: 303-321.
26. Chung, K. T., Dickson, J. S. & Crouse, J. D., 1989. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat, *Applied and Environmental Microbiology* 55(6):1329.

27. Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernández, P. E., Nes, I. F., Håvarstein, L. S., 1998. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J. Bacteriol.* 180, 1988-1994.
28. Cody SH, Glynn MK, Farrar JA, Cairns KL, Griffin PM, Kobayashi J, et al, 1999. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med.*, 130:202–9.
29. Conner, D. E., 1993. Naturally occurring compounds. In *Antimicrobials in Foods*, Davidson, P. M. and Braner, A. L. (eds.) Marcel Dekker Incorporation, New York, 441-468.
30. Cotter, P. D, Hill, C, Ross, R. P., 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3, 777-788.
31. Cutter, C. N. & Siragusa, G. R., 1994. Decontasecation of beef carcasses tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer, *Food Microbiology*, 11:481-489.
32. Cutter, C. N. & Siragusa, G. R., 1998. Incorporation of nisin into meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 27:19-23.
33. Deans, S.G., Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 5, 165– 180.
34. Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: biological tools for bio preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16, 1058-1071.
35. Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. & Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriosin, Nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 69:193-202, Kluwer Academic Publishers.
36. Dorman, H.J.D., Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88, 308– 316.
37. Doyle, M. P. & Schoeni, J. L., 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied Environmental Microbiology*, 53:2394-2396.
38. During, K., P. Porsch, A. Mahn, O. Brinkmann, and W. Gieffers, 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Lett.* 449:93–100.
39. Dykes, G. A., Amarowicz, R. & Pegg, R. B., 2003. Enhancement of Nisinantibacterial activity by a bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaf extract. *Food Microbiology*, 20:211-216.
40. Eijsink, V. G., Axelsson, L., Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Holo, H., Nes, I. F., 2002. Production of class lia bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek* 81 , 639-654.

41. Faith, N.G., Shere, J.A., Brosch, R., Arnold, K.W., Ansay, S.E., Lee, M.-S., Luchansky, J.B., and Kaspar, C.W. 1996. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1519–1525.
42. FDA (US Food & Drug Administration) / Federal Register, 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human ingredient. 21 CFR Part 184, Fed Reg 53: 11247-11251.
43. Fellows, P.J., 2000. *Food Processing Technology: Principles and Practice*, second ed., CRC Press, New York.
44. Fern´andez-Pan, I., & Ignacio Mat´, J., 2012. Antimicrobial Activity of Whey Protein Isolate Edible Films with Essential Oils against Food Spoilers and Foodborne Pathogens,
45. Frazer, A. C., Sharratt, M. & Hickman, J. R., 1962. The biological effects of food additives. I. Nisin, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 13:32-42.
46. Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E. & Mandrell, R., 2004. Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6042-6048.
47. Galvez, A., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Ben Omar, N., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51-70.
48. Gill, A. O. and Holley, R. A., 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research Internationa*, 33, 83-90.
49. Guenther, E., 1948. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand, New York.
50. Han, J. H., 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54, 56-65.
51. Hao, Y.Y., Brackett, R.E., Doyle, M.P., 1998a. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiology* 15, 367–378.
52. Holdsworth, S.D., 1997. *Thermal Processing of Packaged Foods*, Blackie Academic & Professional, London.
53. Hurst, A., 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27, 85-123.
54. Hurst, A. & Hoover, D. G., 1993. Nisin, In: *Antimicrobials in foods*, Marcel Dekker Inc, New York,: 369-407.
55. Ibrahim, J. O. and Pearson, A. M., 1979. Role of phospholipids and triglycerides in warmed-over flavor development in meat model systems. *Journal of Food Science*, 44, 1285-1290.
56. Ibrahim, H. R., K. Kobayashi, and A. Kato. 1993. Length of hydrocarbon chain and antimicrobial action to gram-negative bacteria of fatty acylated lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* 41:1164–1168.
57. Ibrahim, H., S. Higashiguchi, M. Koketsu, F. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, Y. Sugimoto, and T. Aoki. 1996. Partially unfolded lysozyme at neutral pH



- agglutinates and kills gram-negative and gram-positive bacteria through membrane damage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 44:3799–3806.
58. Jack, R. W, Sahl, H. G., 1995. Unique peptide modifications involved in the biosynthesis of lantibiotics. *TIBiotech.* 13, 269-278.
  59. James, J. & Simpson, B. K., 1996. Application of enzymes in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 437-463.
  60. Jay, J. M., 2000. *Modern Food Microbiology*, 6th Edition, Aspen Publication®
  61. Jay, J. M., 1996. *Modern Food Microbiology*. Helman, D. R. (ed), International Thomson Publications, New York.
  62. Joerger, R. D., Hoover, D. G., Barefoot, S. F., Harmon, K. M., Grinstead, D. A. & Nettles-Cutter, C. G., 2000. Bacteriocins, In: *Encyclopeia of microbiology*, vol 1, 2<sup>nd</sup> ed, Academic Press, San Pharmacology Science, 52:261-264.
  63. Johnson. E. A., 1994. Egg white lysozyme as a preservative for use in foods. In: *Egg Uses Processing Technologied-New Developments*. Sim, J. S. and Nakai, S. (eds.), CAB International, Walingford Oxon, 177-91.
  64. Judge, R., Forsythe, E. L. and Pusey, M. L., 1998. The effect of protein impurities on lysozyme crystal growth. *Biotechnology and Bioengineering*, 59, 776-785.
  65. Juneja, V. K., 2003. A comparative heat inactivation study of indigenous microflora in beef with that of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* serotypes and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 292-298.
  66. Juneja, V. K., Bari M. L., Inatsu, Y., Kawamoto, S. & Friedman, M., 2009. Thermal Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in Sous-Vide Coked Ground Beef as Affected by Tea Leaf and Apple Skin Powders. *Journal of Food Protetion*, Vol. 72, No. 4, Pages: 860-865.
  67. Juneja, V. K. & Eblen, B. S., 1999. Predictive thermal inactivation model for *Listeria monocytogenes* with temperature, pH, NaCl, and sodium pyrophosphate as controlling factors. *Journal of Food Protection*, 62(9):986–93.
  68. Juneja, V. K., Eblen, B.S. & Ransom, G. M., 2001. Thermal Inactivation of *Salmonella spp.* In Chicken Broth, Beef, Pork, Turkey, and Chicken: Detersecation of D- and Z-values, *Journal of Food Science—Vol. 66, No. 1.*
  69. Juneja, V. K. & Friedman, M., 2008. Carvacrol and Cinnamaldehyde Facilitate Thermal Destruction of *Escherischia coli* O157:H7 in Raw Beef. *Journal of Food Protection*, Vol. 71, No 8, pages: 1604-1611.
  70. Juneja, V. K., Klein, P. G. & Marmer, B. S., 1998. Heat shock and thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in a model beef gram system and ground beef. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 677-684.
  71. Juneja, V. K. & Marmer, B. S., 1999. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-and z- value detersecations in turkey, lamb and pork, (ELSEVIER), *Food Research International* 32:23-28.

72. Juneja, V. K., Yadav, A. S., Hwang C. – A., Sheen, S., Mukhopadhyay, S. & Friedman, M., 2012. Kinetics of Thermal Destruction of *Salmonella* in Ground Chicken Containing *trans*-Cinnamaldehyde and Carvacrol. *Journal of Food Protection*, Vol. 75, No 2, pages: 289-296.
73. Jung, G., 1991, Lantibiotics: a survey, nisin and novel lantibiotics. Jung G Sahl HG, Editors. ESCOM Science Publishers, Leiden, The Netherlands, 1-34.
74. Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 626– 631.
75. Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. P., Ray, B., 1994, Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4174-4177.
76. Keene, W.E., McAnulty, J.M., Hoesley, F.C., Williams, L.P., Hedberg, K., Oxman, G.L., Barrett, T.J., Pfaller, M.A., and Fleseceg, D.W. 1994. A swimsecg-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. *N. Engl. J. Med.* 331:579–584.
77. Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N., 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research* 1, 119– 128.
78. Konowalchuk, J., Dickie, N. Stavric, S. and Speirs, J. I., 1978. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect. Immun.* 20:575–577.
79. Kotrola, J.S., Conner, D.E., Mikel, W.B., 1997. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cooked turkey products. *Journal of Food Science* - 62(4):875–7, 905.
80. Kubitschek H. E., 1990. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media, *Journal of Bacteriology*, 172 (1): 94-101.
81. Leistner, L., 1978. Hurdle effect and energy saving. In: Downey, W.K. (Ed.), *Food Quality and Nutrition*. Applied Science Publ., London, p. 553.
82. Losso, J. N., Nakai, S. Charter, E. A., 2000. Lysozyme. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. Naidu, A. S. (ed.), CRC Press LLC, Florida, 185-210.
83. Manios, S. G., 2012. Investigating the impact of retail and household practices on the quality and safety of ready-to-eat and ready-to-cook foods. PhD Thesis CRANFIELD UNIVERSITY
84. Masschalck, B. and Michiels, C. W., 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Review of Microbiology*, 29, 191-214.
85. Mathur, N. B., A. M. Dwarkadas, V. K. Sharma, K. Saha, and N. Jain. 1990. Anti-infective factors in preterm human colostrum. *Acta Paediatr. Scand.* 79:1039–1044.
86. Mead, P. S. and Griffin, P. M., (1998). *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352:1207–1212.

87. Mecitoglu, H., Yemenicioglu, A., Arsanoglu, A., Elmaci, Z. S., Korel, F. and Certin, A. E., 2006. Incorporation of partially purified hen egg white lysozyme into zein films for antimicrobial food packaging. *Food Research International*, 39, 12-21.
88. Mermelstein, N. H., 1993. Controlling *Escherichia coli* O157:H7 in meat, *Food Technol*, 47(4):90-91.
89. Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R., Chikindas, M.L., 2007. The synergistic effect of nisin and lactoferin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 44, 255–261
90. Murphy, R. Y., Beard, B. L., Martin, Dunkan, L. K. & Marcy, I. A., 2004<sup>b</sup>. Comparative Study of Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in Ground Pork, *Journal of Food Science*, Vol. 69, Nr. 4.
91. Murphy, R. Y., Beard, B. L., Martin, E. M., Keener, A. E. & Osaili, T., 2004<sup>a</sup>. Predicting Process Lethality of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground formulated, and formed beef/turkey links cooked in an air impingement oven, *Food Microbiology* 21:493-499.
92. Murphy, R. Y., Dunkan, L. K., Johnson, E. R., Davis, M. D. & Smith, J. N, 2002. Thermal inactivation D-and z-values of *Salmonella* serotypes and *Listeria innocua* in chicken patties, chicken tenders, franks, beef patties, and blended beef and turkey patties. *Journal of Food Protection*, 65: 53-60.
93. Murphy, R. Y., Marks, B. P., Johnson, E. R. & Johnson, M. G., 1999. Inactivation of *Salmonella* and *Listeria* in ground chicken breast meat during thermal processing. *Journal of Food Protection*, 62:980-985.
94. 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 Protection*, 65:706-710.
95. Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Anim, G. and Michiels, C. W., 2006. Inactivation of gram-negative bacteria in milk and banana juice by hen egg white and lambda lysozyme under high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 112:19-25.
96. Neill, M. A. 1997. Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 60:1444–1446.
97. Nettles, C. G., Barefoot, S. F., 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 56, 338-356.
98. Nikaido, H., 1996. Outer membrane, In:*Escherichia coli* and *Salmonella*. *Cellular and Molecular Biology*, ASM Press, Washington DC:29-47.

99. Nychas, G. J. E., 1995. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 58– 89.
100. O'Brien, A.D. and Holmes, R.K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51:206–220.
101. O'Brien, A.D. and La Veck, G.D. 1983. Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 40:675–683.
102. Oteiza, J., Gianuzzi, L. & Califano, A. N., 2003. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* isolated from morcilla as affected by composition of the product. *Food Research International* 36: 703–712
103. Ouattara, B., Sabato, S.F., Lacroix, M., 2001. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre-cooked shrimp (*Penaeus* spp.). *International Journal of Food Microbiology* 68, 1– 9.
104. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. & Lacroix, M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. (ELSEVIER), *Food Control* 18:414-420.
105. Ouwehand, A. C., 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects*. Salsecen S, Wright A, editors. 2nd ed. 139- 160.
106. Papagianni, M., 2003. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol. Adv.* 21, 465-499.
107. Park, S. I., Daeschel, M. A. and Zhao, Y., 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Scienc*, 69, 215-221.
108. Peleg, M.,. Penchina, C.M., 2000. Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity, *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 40 (2):159–172
109. Proctor, V. A. and Cunningham, F. E. 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26:359–395.
110. Rajkowski, K.T. & Marmer, B.S., 1995. Growth of *Escherichia coli* O157:H7 at fluctuating incubation temperatures. *J. Food Protect.* 58:1307–1313.
111. Rangel, M. J., Sparling, H. P., Crowe, C., Griffin, M. P. & Swerdlow, L. P., 2005. Epidimiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002, *Emerging Infectious Diseases*, Vol.11, No 4,603-609.

112. Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. An overview of microbial lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial Lipids*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 3– 22.
113. Ray, B., 1993. Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. *ASM News* 59, 285-291.
114. Reitsma, C.J. and Henning, D.R. 1996. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *J. Food Protect.* 59: 460–464.
115. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, C. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A. and Cohen, M. L. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681–685.
116. Robertson, G.L., 1993. *Food packaging-Principles and practice*. Marcel Dekker, Inc. N. York.
117. Rogers, L. A. & Whittier, E. O., 1928. Limiting factors in lactic fermentation. *Journal of Bacteriology*, 16:211-229.
118. Royo, M., Fern' adez-Pan, I. & IMat, J., 2010. Antimicrobial effectiveness of oregano and sage essential oils incorporated into whey protein films or cellulose-based filter paper, *J Sci Food Agric*, 90: 1513–1519
119. Ryan, M .P, Jack, R. W., Josten, M., Sahl, H. G., Ross, R. P., Hill, C., 1999, Extensive post-translational modification, including serine to Dalanine conversion, in the two-component lantibiotic lactacin 3147. *J. Biol. Chem.* 274, 37544-37550,
120. Sato T., Shimizu T., Watarai M., Kobayashi M., Kano S., Hamabata T., Takeda Y., Yamasaki S., 2003. Distinctiveness of the genomic sequence of Shiga toxin 2 – converting phage isolated from *Escherichia coli* O157:H7 Okayama strain as compared to other Shiga toxin 2 - converting phages, *Gene*, 309, 35 – 48.
121. Sagdic, O., Kuseu, A., Ozean, M., Ozcelik, S., 2002. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* 19:473-480.
122. Sahl, H. G., Bierbaum, G., 1998, Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 52, 41-79.
123. Sahl, H. G., Jack, R. W., Bierbaum, G., 1995, Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *Eur. J. Biochem.* 230, 827-853.
124. Seydim, A. C. & Sakirus, G., 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils, *Food Research International* 39:639–644.
125. Shelef, L.A., 1983. Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety* 6, 29– 44.

126. Sikkema, J., De Bont, J. A. M., Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59 (2), 201– 222.
127. Singh, B., Falahee, B. & Adams, M. R., 2001. Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. *Food Microbiology*, 18:133-139.
128. Skandamis P., Koutsoumanis K., Fasseas K., Nychas G.J.E., 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157: H7. *Italian of Food Science*. 13, 65-75.
129. Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., 2000. Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4), 1646–1653.
130. Skandamis, P. & Nychas, G.J.E., 2000. Development and validation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157: H7 in a home-made eggplant under various temperatures, pH and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 1646-1653.
131. Skandamis, P.N., Nychas, G.-J.E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of secced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1011 –1022.
132. Skandamis P., Tsigarida E., Nychas G. J. E., 2002. The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 °C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*. 19, 97-103.
133. Smid, E.J., Gorris, L.G.M., 1999. Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman, M.S. (Ed.), *Handbook of Food Preservation*. Marcel Dekker, New York, pp. 285–308.
134. Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008b. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in secced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80, 159–166.
135. Sonomi Hikima, Jun-ichi Hikima, Jiraporn Rojtinakorn, Ikuo Hirono and Takashi Aoki, 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. *Gene* 316, 187-195.
136. Spickler, A. R., Roth, J. A., Galyon, J. & Lofstedt, J., 2010. *Emerging and Exotic Diseases of Animals*, 4th Edition, 2nd Printing, Center for Food Security And Public Health, p. 145-148.
137. Stecchini, M. L., Sarais, I., Giavedoni, P., 1993. Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *Journal of Food Protection* 56 (5), 406– 409.
138. Stergiou, V. A., Thomas, L. V., Adams, M. R., 2006. Interactions of nisin with glutathione in a model protein system and meat. *Journal of Food Protection*, 69, 951-956.

139. Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes., N. A. & Klaenhammer, T. R., 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:3612-3615.
140. Strockbine, N. A., Marques, L. R. M., Newland, J. W., Smith, H. W., Holmes, R. K. & O'Brien, A. D., 1986. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encodes antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.* 53:135–140.
141. Stryer, L., 1988. *Biochemistry*. 3rd Edition, Freeman, M. H. and Company.
142. Swerdlow, D.L., Woodruff, B.A., Brady, R.C., Griffin, P.M., Tippen, S., Donnell, H.D. Jr., Gelreich, H.D., Payne, B.J., Meyer, A. Jr., Wells, J.G., Greene, K.D., Bright, M., Bean, N.H., & Blake, P.A., 1992. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann. Intern. Med.* 117: 812–819.
143. Szabo, R. A., Todd, E. C., Ean A., 1986. Method to isolate *E. coli* O157:H7 from food. *J. Food Prot.*; 10: 768–772.
144. Tarr, P. I., 1994. Review of 1993 *Escherichia coli* O157:H7 outbreak: Western United States. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 14:372±373.
145. Tassou, C., Drosinos, E.H., Nychas, G.-J.E., 1995. Effects of essential oil from sect (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 593– 600.
146. Taylor, A. J. and Leach, R. M., 1995. Enzymes in the food industry. In *Enzymes in Food Processing*. Tucker, G. A. and Woods, L. F. J. (eds.), Blackie Academic and Professional, Glasgow, 26-40.
147. Tsigarida, E., Skandamis, P., Nychas, G.-J.E., 2000. Behavior of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *Journal of Applied Microbiology* 89, 901–909.
148. Tuley de Silva, K. (Ed.), 1996. *A Manual on the Essential Oil Industry*. United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
149. Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J. G., Zhao, T., Tauxe, R.V, et al. 1999. Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiol. Infect.* 122:185–92.
150. U.S. Department of Agriculture, 1999. Performance Standards for the production of certain meat and poultry products. Food safety and Inspection Service, Fed. Regist. 64: 732-749.
151. U.S. Department of Agriculture, 2001. Standards for the production of processed meat and poultry products. [Docket no. 97-013P] RIN no. 0583-AC46. Washington: The Department.

152. Vaara, M., 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56 (3), 395–411.
153. Van de Braak, S. A. A. J. & Leijten, G. C. J. J., 1999. *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.
154. Vasanthi, C., Venkataramanujam, V., & Dushyanthan, K. (2007). Effect of cooking temperature and time on the physico-chemical, histological and sensory properties of female carabeef (buffalo) meat. *Meat Science*, 76:274–280.
155. Venema, K., Venema, G. & Kok, J., 1995. Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *TI Microbiol.* 3, 299-304.
156. Voet, D. and Voet, J. G., 1995. *Biochemistry*, 2nd Edition.
157. Wachsmuth, I. K., Sparling, P. H., Barrett, T. J. & Potter, M. E., 1997. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the United States. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18:233–239.
158. Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, I. K., Riley, L. W., Remis, R. S., Sokolow, R. & Morris, G. K. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* 18: 512–520.
159. Wells, J. G., Shipman, L. D., Greene, K. D., Sowers, E. G., Green, J. H., Cameron, D. N., Downes, F. P., Martin, M. L., Griñin, P. M., Ostro, S. M., Potter, M. E., Tauxe, R. V. & Wachsmuth, I. K., 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 29:985-989.
160. Whittam, T. S., Wachsmuth, I. K., Wilson, R. A., 1988. Genetic evidence of clonal descent of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.*; 157: 1124–1133
161. Whittam, T. S., Wolfe, M. L., Wachsmuth, I. K., Ørskov, F., Ørskov, I. & Wilson, R. A., 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 61:1619–1629.
162. Wilkins, K. M. and Board, R. G., 1989. Natural antimicrobial systems. In *mechanisms of Action of Food Preservation Procedure*. Gould, G. W. (ed.), Elsevier, London, 285-362.
163. Ko, K. Y., Mendonca, A. F. & Ahn, D. U., 2010. EDTA and Lysozyme Improves Antimicrobial Activities of Ovotransferrin against *Escherichia coli* O157:H7. *Animal Industry Report: AS 656, ASL R2498*.
164. Yousef, E. A. & Juneja, V. K., 2003. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*, CRC Press, Chapter 1; p. 1-30.



165. Zhao, T., Doyle, M.P., & Besser, R.E. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2526–2530.
166. Zhao, T., Doyle, M.P., Shere, J., & Garber, L. 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1290–1293.
167. Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P. & Biliaderis, C. G., 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef, *Meat Sci* 82:338–45.
168. Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα, 1998.
169. Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης
170. Κανονισμός (ΕΚ) 853/2004 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.
171. Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 2073/2005 της επιτροπής της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, L 338 της 22/12/2005, σελ. 1-26.
172. Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 2079/2005 της Επιτροπής της 15<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.
173. Κατάλογος πρόσθετων τροφίμων E, *Codex Alimentarius*, INS
174. Οδηγία 95/2/ΕΚ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου για τα πρόσθετα τροφίμων πλην των χρωστικών και των γλυκαντικών υλών.
175. ISO 16654:2001 (E)
176. ISO 16649-2:2001 (E)

#### Διαδίκτυο

- [www.bd.com](http://www.bd.com)
- (Institute of Food Technologists) [www.ift.org](http://www.ift.org)
- (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) [www.niaid.nih.gov](http://www.niaid.nih.gov)
- World Health Organization, (WHO)., 1993. Food Additives Series 30. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je04.htm>