



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**«Ενσωμάτωση του χρωμογόνου μικροοργανισμού *Janthinobacterium sp.* σε εδώδιμες μεμβράνες και εφαρμογή τους σε τρόφιμα ως δείκτης αλλοίωσης»**

**Χρυσαφούλα Δ. Δούσκα**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Σκανδάμης, Επικ. Καθηγητής ΓΠΑ**

**Αθήνα, 2016**

# **ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**«Ενσωμάτωση του χρωμογόνου μικροοργανισμού *Janthinobacterium sp.* σε εδώδιμες μεμβράνες και εφαρμογή τους σε τρόφιμα ως δείκτης αλλοίωσης»**

**Χρυσάφουλα Δ. Δούσκα**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Παναγιώτης Σκανδάμης, Επικ. Καθηγητής ΓΠΑ**

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ**

**Καναβούρας Αντώνιος, Λέκτορας ΓΠΑ**

**Ευαγγελίου Βασιλική, Επίκουρη Καθηγήτρια ΓΠΑ**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα μαζί τους και έπαιξαν πολύ σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης. Πρώτον από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, κ. Παναγιώτη Σκανδάμη για την πολύτιμη καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη και εκτίμηση που μου έδειξε. Τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στους καθηγητές κ. Αντώνιο Καναβούρα και κα. Βασιλική Ευαγγελίου που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Βασιλική Μπικούλη για την καθοριστική της βοήθεια, η οποία στάθηκε σημαντικός αρωγός στην προσπάθειά μου και με υποστήριξε σε κάθε φάση της ερευνητικής μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων για την αμέριστη βοήθεια και υποστήριξη τους καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, που με υπομονή και κουράγιο πρόσφεραν την απαραίτητη ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα, οι καταναλωτές, ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες, αναζητούν τρόφιμα υψηλής ποιότητας, ασφαλή, με λιγότερα συντηρητικά και εκτεταμένη διάρκεια ζωής με αποτέλεσμα οι βιομηχανίες τροφίμων να αναζητούν εναλλακτικές μορφές συντήρησης και συσκευασίας των τροφίμων. Μια εναλλακτική λύση μπορεί να είναι η εφαρμογή δείκτη που αλλάζει χρώμα στην συσκευασία, γεγονός που σημαίνει ότι το προϊόν έχει αρχίσει να αλλοιώνεται. Σκοπός της παρούσας ερευνητικής μελέτης είναι η χρήση της χρωμογόνου ιδιότητας του βακτηρίου *Janthinobacterium* sp. ως δείκτη αλλοίωσης τροφίμων.

Παρασκευάστηκαν μεμβράνες αλγινικού νατρίου (1% w/v) και εξετάστηκαν οι συνθήκες που θα οδηγήσουν στην παραγωγή μωβ χρώματος. Οι συνθήκες που μελετήθηκαν ήταν τα συστατικά των μεμβρανών (extracts), η συγκέντρωση, η ποσότητα, ο τρόπος εφαρμογής του εμβολίου, οι συνθήκες ανάπτυξης (αέρας, κενό, MAP), η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα και η τιμή pH της μεμβράνης, προκειμένου να βρεθούν οι ιδανικές για την επίτευξη του στόχου της παρούσας εργασίας.

Οι μεμβράνες εφαρμόστηκαν σε εργαστηριακό γενικό θρεπτικό υπόστρωμα (Tryptone Soy Agar-TSA) και σε χοιρινό κιμά. Οι μεμβράνες συντηρήθηκαν στους 5°C ώστε να προσομοιαστεί η θερμοκρασία ψύξης του κιμά. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν μικροβιολογικές, μέτρηση pH και προσδιορισμός χρώματος με τη χρήση Bioscreen.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε ότι καλύτερος χρωματισμός (απόδοση χρώματος και ομοιομορφία) επιτεύχθηκε στις μεμβράνες με προσθήκη ενισχυτικών ανάπτυξης yeast extract σε συγκέντρωση 0,6% w/v και στο TSA και στο χοιρινό κιμά. Η καλύτερη συγκέντρωση εμβολίου φάνηκε να είναι οι 7 Log CFU/g. Με βάση τον τρόπο εφαρμογής του εμβολίου φάνηκε να έχει καλύτερα αποτελέσματα η ενσωμάτωση, ενώ ιδανική ποσότητα του εμβολίου ήταν τα 100 μl/film. Όσον αφορά τις συνθήκες συντήρησης μόνο οι μεμβράνες που ήταν υπό αερόβιες συνθήκες εκδήλωσαν χρωματισμό αν και σε όλες τις περιπτώσεις το *Janthinobacterium* sp. παρουσίασε ανάπτυξη στις μεμβράνες. Από τα αποτελέσματα της ρύθμισης του pH των μεμβρανών, φάνηκε ότι οι μεμβράνες με pH 7 και 8 εκδήλωσαν μωβ χρωματισμό κατά την 4<sup>η</sup> ημέρα όταν η ενδογενής μικροχλωρίδα του κιμά ήταν ~ 8 Log CFU/g, ενώ στην μεμβράνη με ρύθμιση του pH στο 6 η εκδήλωση του μωβ χρώματος έγινε την 6<sup>η</sup> ημέρα όταν η αλλοιογόνος μικροχλωρίδα του κιμά ήταν ~9,6 Log CFU/g.

Λέξεις κλειδιά: μεμβράνες αλγινικών, *Janthinobacterium* sp., δείκτης αλλοίωσης, βιολασεΐνη.

## **ABSTRACT**

Nowdays, consumers, especially in developed countries seeking high quality food, safe, with fewer preservatives and extended shelf life. So food industries are seeking alternative forms of food preservation and packaging. One of them can be the application of an indicator that changes colour in the package, which means that the product has begun to deteriorate. The aim of this study is the use of *Janthinobacterium* sp. as food spoilage indicator.

Films with sodium alginate (1% w/v) were prepared. Several factors were tested in order to find the ideal film for achieving the objective of this project. These factors were: the components of the membranes (extracts), the concentration, the quantity and the way of application of the inoculum, growth conditions (air, vacuum, MAP), the competitive microflora and the pH of the film. The films were applied at laboratory general nutrient medium (Tryptone Soy Agar - TSA) and minced pork. The samples were stored at 5°C to equate the cooling temperature. The analysis which performed were microbiological, pH measurement and colour determination using Bioscreen.

The results of this study showed that better purple colour was achieved on films with added yeast extract at a concentration of 0.6% w/v. The best inoculum concentration appeared to be 7 Log CFU/g. Based on the inoculum application, better results appeared with incorporation of the inoculum, while the ideal inoculum quantity was 100 µL / film. Regarding storage conditions only membranes were aerobically exhibited coloration. Violet colour appeared at fourth day when the film's pH was 7 or 8 and minced pork's microflora was ~ 8 Log CFU / g. When film's pH was 6, the purple colour appeared on the 6th day and microflora of minced pork was ~ 9.6 Log CFU / g.

**Keywords:** alginate films, *Janthinobacterium* sp., violacein, spoilage indicator

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I) ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1. Κρέας.....	1
1.1.1. Κιμάς .....	2
1.2. Συσκευασία.....	4
1.2.1. Συσκευασία κρέατος.....	5
1.2.2. Συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) .....	6
1.2.3. Συσκευασία υπό κενό (Vacuum Packaging - VP).....	7
1.2.4. Ενεργός συσκευασία.....	7
1.2.5. Έξυπνη συσκευασία .....	9
1.2.5.1. Δείκτες .....	9
1.2.5.1.1. Χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες TTIs.....	10
1.2.5.1.2. Δείκτες νοψότητας .....	10
1.3. Εδώδιμες μεμβράνες.....	11
1.3.1. Είδη μεμβρανών .....	12
1.3.1.1. Πολυσακχαρίτες.....	12
1.3.1.1.1. Καραγενάνη.....	13
1.3.1.1.2. Αλγινικά.....	13
1.3.2. Ενσωμάτωση ουσιών σε εδώδιμες μεμβράνες.....	17
1.3.2.1. Αντιμικροβιακές ουσίες.....	17
1.3.2.1.1. Αιθέρια έλαια.....	18
1.3.2.1.2. Ε-πολυσίνη .....	19
1.3.2.1.3. Βακτηριοσίνες .....	20
1.3.2.1.4. Λακτουπεροξειδάση .....	20
1.3.2.2. Αντιοξειδωτικές ουσίες.....	21
1.3.2.3. Παράγοντες μη αμαύρωσης (Antibrowning).....	22
1.3.2.4. Άλλες ουσίες .....	22
1.3.2.5. Προσθήκη ζωντανών μικροοργανισμών.....	22
1.4. <i>Janthinobacterium</i> sp. ....	23
1.4.1. Βιολασεΐνη.....	24
1.5. Στόχος μελέτης .....	26
II) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	28
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός .....	28
2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	30

A) Σκεύη: .....	30
B) Αναλώσιμα υλικά.....	30
2.3. Ανανέωση μικροοργανισμού.....	31
2.4. Προετοιμασία εμβολίου.....	32
2.5. Παρασκευή μεμβρανών αλγινικού άλατος.....	32
2.6. Παρασκευή δειγμάτων.....	34
2.6.1. Σε εργαστηριακό υπόστρωμα (TSA).....	34
2.6.2. Σε χοιρινό κιμά .....	34
2.7. Δείγματα σε κενό (Vacuum Packaging – VP) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Packaging - MAP).....	34
2.8. Ρύθμιση pH μεμβρανών .....	34
2.9. Αναλύσεις.....	35
2.9.1. Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	35
2.9.2. Ποσοτικοποίηση χρώματος με χρήση Bioscreen.....	35
2.9.3. Λήψη φωτογραφιών .....	36
2.9.4. Μέτρηση pH.....	37
III) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
3.1. Προσδιορισμός καλύτερης μεμβράνης με βάση τα ενισχυτικά ανάπτυξης .....	38
3.1.1. Εφαρμογή μεμβρανών σε TSA .....	38
3.1.2 Σε χοιρινό κιμά.....	40
3.1.3. Τα συστατικά του TSA ως ενισχυτικά εκδήλωσης μωβ χρώματος στις μεμβράνες αλγινικών.....	41
3.2. Προσδιορισμός καλύτερης μεμβράνης με βάση τη συγκέντρωση εμβολίου .....	45
3.3. Προσδιορισμός καλύτερης μεμβράνης με βάση τον τρόπο εφαρμογής και την ποσότητα του εμβολίου.....	48
3.4. Έλεγχος εκδήλωσης μωβ χρωματισμού παρουσία ανταγωνιστικής γλωρίδα .....	51
3.5. Έλεγχος εκδήλωσης μωβ χρωματισμού σε συνθήκες κενού (VP), MAP και αερόβιες συνθήκες.....	53
3.6. Ρύθμιση pH μεμβρανών .....	55
IV) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	62
V) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	63

# Ι) ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1. Κρέας

Ως κρέας ορίζεται το σύνολο των ζωικών ιστών που είναι κατάλληλη για ανθρώπινη βρώση. Περιλαμβάνεται η σάρκα των θερμόαιμων ζώων και πτηνών που αποτελείται κυρίως από μυϊκό ιστό, όπου μετά την σφαγή έχει υποστεί μεταθανάτιες μεταβολές που την καθιστούν εύγεστη και τρυφερή (Μπλούκας, 2007). Στο «νωπό κρέας» περιλαμβάνονται το επεξεργασμένο κρέας, το συσκευασμένο υπό κενό, το συσκευασμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) καθώς και το κρέας που διατηρείται υπό ψύξη χωρίς καμία επιπλέον επεξεργασία.

Το κρέας, λόγω της διατροφικής του αξίας, καταλαμβάνει υψηλό ποσοστό κατανάλωσης. Αποτελεί εξαιρετική πηγή πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας, περιέχει βιταμίνες, σίδηρο, ψευδάργυρο και απαραίτητα λιπαρά οξέα (Μπλούκας, 2007).

Εξαιτίας της πλούσιας σύστασής του σε θρεπτικά συστατικά, προσφέρει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Jääskeläinen et al., 2016), με αποτέλεσμα την ενδεχόμενη δυσμενή επίδραση στην υγεία των καταναλωτών (Sanchez-Ortega et al., 2014). Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί κορυφαία προτεραιότητα για τους καταναλωτές. Σήμερα, οι καταναλωτές, ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες, αναζητούν κρέατα υψηλής ποιότητας, ασφαλή, με λιγότερα συντηρητικά και εκτεταμένη διάρκεια ζωής (Jääskeläinen et al., 2016).

Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί που σχετίζονται με την υποβάθμιση της ποιότητας του κρέατος και τη μείωση της διάρκειας ζωής του. Η μικροβιακή αλλοίωση, η οξειδωση των λιπιδίων και η ενζυμική αυτόλυση (Sanchez-Ortega et al., 2014).

Η μικροχλωρίδα του νωπού κρέατος αντιπροσωπεύει τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο περιβάλλον από το οποίο προέρχεται το τρόφιμο ή από επιμόλυνση κατά την διάρκεια της σφαγής, της επεξεργασίας, της αποθήκευσης και της μεταφοράς του προϊόντος. Οι κύριοι μικροοργανισμοί που συναντάται στο κρέας είναι: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* (όπως το *Escherichia coli*), *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB), *Brochothrix thermosphacta*, ζύμες και μύκητες (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009). Μεταξύ όλων των τροφιμογενών παθογόνων, τα περισσότερα κρούσματα έχουν αναφερθεί για τα *Campylobacter* spp. και *Salmonella* spp., με 198.252 και 108.614, αντίστοιχα, και συνδέονται σε



μεγάλο βαθμό με φρέσκα κρέατα, πουλερικά και αυγά (Jääskeläinen et al., 2016).

Η οξείδωση των λιπιδίων εξαρτάται από τη σύσταση των λιπαρών οξέων και την συγκέντρωση της βιταμίνης E. Η ενζυμική αυτόλυση οδηγεί στο μαλάκωμα των ιστών και στον αποχρωματισμό του κρέατος (Sanchez-Ortega et al., 2014).

Το νωπό κρέας αποτελεί ένα από τα πιο ευαλλοιώτα τρόφιμα για τους εξής λόγους:

- Εμπεριέχει άφθονα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

- Έχει υψηλή ενεργότητα ύδατος ( $a_w \sim 0.99$ ), η οποία επιτρέπει την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών.

- Το pH είναι ευνοϊκό για την πλειοψηφία των μικροβίων, συγκεκριμένα κυμαίνεται από 5 – 7 (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009).

Οι οργανοληπτικές αλλοιώσεις των κρεάτων μπορεί να διαφέρουν, ανάλογα με την μικροβιακή χλωρίδα του και τις συνθήκες αποθήκευσής του. Η εμφάνιση οργανοληπτικής αλλοίωσης συνδέεται με την μικροβιακή κατανάλωση θρεπτικών στοιχείων, όπως σάκχαρα και αμινοξέα και την απελευθέρωση πτητικών μεταβολιτών (Ercolini et al., 2006).

Οι κρεατοβιομηχανίες προβάλλουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών με στόχο την αύξηση της διάρκειας ζωής των προϊόντων τους και την μέγιστη αποδοχή των καταναλωτών. Η παράταση της διάρκειας ζωής των κρεάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους: ψύξη, χρήση συσκευασίας υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα, συσκευασία υπό κενό, κονσερβοποίηση, κατάψυξη και προσθήκη συντηρητικών. Ωστόσο, δεδομένης της ζήτησης των καταναλωτών για ολοένα πιο “φυσικά” προϊόντα, προτιμάται η χρήση κυρίως συσκευασίας υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα ως πιο ιδανική τεχνολογία (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

### 1.1.1. Κιμάς

Ο κιμάς φέρει μεγαλύτερο μικροβιακό φορτίο σε σύγκριση με το κρέας σε κομμάτια διότι:

- Έχει μεγαλύτερη επιφάνεια. Έτσι ευνοείται η ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων που είναι οι πιο σημαντικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί στα τρόφιμα που συντηρούνται σε ψύξη.
- Τα μηχανήματα κοπής του κιμά αποτελούν πηγή επιμόλυνσής του με κολοβακτηρίδια, εντερόκοκκους, μικρόκοκκους και άλλους μικροοργανισμούς.

- ☉ Η αύξηση της περιεκτικότητας του κιμά σε λίπος, συντελεί την αύξηση του μικροβιακού του φορτίου.
- ☉ Θεωρείται ότι ο κιμάς φέρει 10-100 φορές υψηλότερο μικροβιακό φορτίο από τα αυτοτελή κομμάτια κρέατος (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 2009).

**Πίνακας 1:** Σύσταση άπαχου μυϊκού ιστού (%) (Vernam & Sutherland, 1999).

Είδος κρέατος	Νερό	Πρωτεΐνες	Λιπίδια	Τέφρα
Βοδινό	70-73	20-22	4,8	1
Ορνίθιο	73-76	20-23	4,7	1
Πρόβειο	73	20	5-6	1,4
Χοιρινό	68-70	19-20	9-11	1,4

**Πίνακας 2:** Μικροοργανισμοί που εμφανίζονται σε νωπό και επεξεργασμένο κρέας (Nychas et al., 2008)

Μικροοργανισμοί	Αντίδραση Gram	Νωπό	Επεξεργασμένο
<i>Achromobacter</i>	-	X*	
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX	X
<i>Alcaligenes</i>	-	X	
<i>Alteromonas</i>	-	X	X
<i>Arthrobacter</i>	±	X	X
<i>Bacillus</i>	+	X	X
<i>Brochothrix</i>	+	X	X
<i>Campylobacter</i>	-	X	
<i>Carnobacterium</i>	+	X	
<i>Chromobacterium</i>	-	X	
<i>Citrobacter</i>	-	X	
<i>Clostridium</i>	+	X	
<i>Corynebactenum</i>	+	X	X
<i>Enterobacter</i>	-	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X
<i>Escherichia</i>	-	X	
<i>Flavobacterium</i>	-	X	
<i>Hafnia</i>	-	X	X
<i>Janthinobacterium</i>	-		X
<i>Klebsiella</i>	-	X	
<i>Kluyvera</i>	-	X	
<i>Kocuria</i>	+	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX
<i>Lactococcus</i>	+	X	
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X

<i>Listeria</i>	+	X	X
<i>Microbacterium</i>	+	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X
<i>Moraxella</i>	-	XX	
<i>Paenibacillus</i>	+	X	X
<i>Pantoea</i>	-	X	
<i>Proteus</i>	-	X	
<i>Providencia</i>	-	X	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX	X
<i>Shewanella</i>	-	X	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X
<i>Streptococcus</i>	+	X	X
<i>Vibrio</i>	-	X	
<i>Weissella</i>	+	X	X
<i>Yersinia</i>	-	X	

\*X = Δύναται να υπάρχει, XX = Υπάρχει σε μεγάλη συχνότητα.

**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά παθογόνων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στο κρέας σε θερμοκρασίες ψύξης (Bell, 2001).

Π AN = προαιρετικά αναερόβιο, Y AN = υποχρεωτικά αναερόβιο.

E = ευαίσθητο, A = αναστέλλεται η ανάπτυξη του.

Παθογόνα βακτήρια	Απαιτήσεις σε		Ευαισθησία σε	Ελάχιστη
	O <sub>2</sub>	pH	CO <sub>2</sub>	θερμοκρασία
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Π AN	E σε pH>6	Μεγάλη	0-4 °C
<i>Clostridium botulinum</i>	Y AN	A σε pH<4,8	Μικρή	2-3 °C
<i>Listeria monocytogenes</i>	Π AN	E σε pH<5	Μέτρια	0-4 °C
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Π AN	A σε pH<5,8	Μεγάλη	0-4 °C

## 1.2. Συσκευασία

Ως συσκευασία τροφίμων ορίζεται το σύνολο των δραστηριοτήτων που περιλαμβάνουν τον σχεδιασμό, και την τοποθέτηση του προϊόντος σε κατάλληλο περιέκτη ο οποίος προστατεύει το προϊόν από εξωτερικούς παράγοντες που μπορεί να το επηρεάσουν δυσμενώς το τρόφιμο, ενημερώνει αποτελεσματικά τον καταναλωτή και συμβάλλει στην εμπορία τους (Μπλούκας, 2004).

Γενικά, ο κυριότερος σκοπός της συσκευασίας των τροφίμων είναι να προστατεύει τα τρόφιμα από την χημική και μικροβιακή μόλυνση, το νερό, τους ατμούς, το οξυγόνο, το φως και έχει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής των τροφίμων (Otlés & Yalcin,

2008). Η συσκευασία προστατεύει και διατηρεί φρέσκο το προϊόν καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησής του, ενώ ενισχύει την εμφάνιση του (Charles et al., 2006).

Η συσκευασία τροφίμων είναι ένας δυναμικός κλάδος της βιομηχανίας που συνεχώς μεταβάλλεται και εξελίσσεται. Τα υπάρχοντα υλικά συσκευασίας βελτιώνονται ή εμφανίζονται νέα στο προσκήνιο. Σημαντική ώθηση στην συνεχή εξέλιξη της συσκευασίας αποτελεί το καλύτερο επίπεδο ζωής των καταναλωτών που αναζητούν όλο και περισσότερο ασφαλή τρόφιμα, όπως επίσης και το γεγονός ότι είναι ευαισθητοποιημένοι με θέματα προστασίας του περιβάλλοντος. (Μπλούκας, 2004).

Η αποφυγή της μικροβιακής επιμόλυνσης του τροφίμου από το εξωτερικό περιβάλλον είναι μία από τις σημαντικότερες λειτουργίες της συσκευασίας των τροφίμων (Παπαδάκης, 2012). Η συσκευασία μπορεί να επηρεάσει την μικροβιολογική σταθερότητα με δύο τρόπους:

- Ⓢ Αποτρέπει την επιμόλυνση του τροφίμου με μικροοργανισμούς που δύναται να αλλοιώσουν το τρόφιμο και να δημιουργήσουν δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Για παράδειγμα, εξασφάλιση αποτροπής διείσδυσης μικροοργανισμών από το εξωτερικό περιβάλλον.
- Ⓢ Εξασφαλίζει κατάλληλες συνθήκες εντός του εσωτερικού στις συσκευασίας που θα εμποδίζουν την ανάπτυξη και την αύξηση των μικροοργανισμών (όπως η υγρασία και το οξυγόνο) (Μπλούκας, 2004).

### **1.2.1. Συσκευασία κρέατος**

Οι δύο κύριοι μηχανισμοί αλλοιώσεων που σχετίζονται με την μείωση της διάρκειας ζωής των νωπών κρεάτων είναι η μικροβιακή αύξηση και οξείδωση της οξυμοσφαιρίνης σε μεταμοσφαιρίνη που οδηγεί στην αμαύρωση τους. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητες οι υψηλές συγκεντρώσεις  $O_2$  προκειμένου να διατηρηθεί το επιθυμητό φωτεινό κόκκινο χρώμα.

Για την διατήρηση του κόκκινου χρώματος και την παράταση της διάρκειας ζωής του κρέατος πρέπει το μίγμα στην συσκευασία να περιέχει 15-30%  $CO_2$  και 70-85%  $O_2$  (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011).

### 1.2.2. Συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP)

Η συσκευασία υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Packaging, MAP) είναι μία τεχνολογία συσκευασίας και συντήρησης τροφίμων με ευρεία χρήση τα τελευταία χρόνια. Εφαρμόζεται σε πολλά είδη τροφίμων, όπως κρέατα, ψάρια, φρούτα, λαχανικά και ζυμαρικά με στόχο την παράταση της διάρκειας ζωής τους (Παπαδάκης 2012). Οι εφαρμογές MAP στα τρόφιμα συνεχώς αυξάνονται καθώς οι εταιρίες τροφίμων προσπαθούν να ανταποκριθούν στις ανάγκες των καταναλωτών για νωπά τρόφιμα με παρατεταμένη διάρκεια ζωής (Rajikumar et al., 2007).

Η συσκευασία σε MAP περιλαμβάνει την αφαίρεση του εσωτερικού αέρα της συσκευασίας και αντικατάστασή του με αέρα διαφορετικής σύστασης από τον ατμοσφαιρικό αέρα. Βέβαια, η σύσταση της ατμόσφαιρας στο εσωτερικό της συσκευασίας συνεχώς μεταβάλλεται μέσω της ανταλλαγής αερίων, της αναπνοής ορισμένων τροφίμων και των βιοχημικών αντιδράσεων (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011).

Τα αέρια που κυρίως χρησιμοποιούνται είναι:

- Το διοξείδιο του άνθρακα. Χρησιμοποιείται πολύ συχνά εξαιτίας των βακτηριοστατικών και μυκητοστατικών ιδιοτήτων που διαθέτει (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012). Επιπλέον μπορεί να μειώσει το pH των τροφίμων και μπορεί να αναστείλει τη δράση πολλών βακτηρίων και ιδιαίτερα των gram-αρνητικών αερόβιων βακτηρίων όπως οι ψευδομονάδες που είναι κοινά αλλοιογόνα βακτήρια κρεάτων και ψαριών (Παπαδάκης, 2012).
- Το οξυγόνο. Γενικά αποφεύγεται η χρήση του για τη διατήρηση των τροφίμων διότι συμβάλλει στην ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η παρουσία του σε νωπά φρούτα και λαχανικά, όπου συμβάλλει στην αναπνοή τους και στα κόκκινα κρέατα, που συμβάλλει στη διατήρηση του χρώματός τους (Παπαδάκης, 2012).
- Το άζωτο. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την απομάκρυνση του οξυγόνου, αλλά αποτρέπει και την κατάρρευση της συσκευασίας λόγω της περιορισμένης διαλυτότητάς του στο νερό και το λίπος (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011).
- Το μονοξείδιο του άνθρακα. Χρησιμοποιείται μόνο στη Νορβηγία και στις ΗΠΑ για τη συσκευασία κόκκινου κρέατος και λαχανικών. Στην Ε.Ε απαγορεύεται η χρήση του λόγω

της έντονης τοξικότητάς του (Παπαδάκης, 2012).

- Άλλα αέρια που έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματικό επίπεδο είναι το οξείδιο του αζώτου, το αιθάνιο, το χλώριο, το μονοξείδιο και διοξείδιο του θείου, το ήλιο, το αργό, το ξένο και το νέο που είναι πολύ αδρανή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως αέρια.

Η καλύτερη ενδεδειγμένη αναλογία αερίων για τα κόκκινα κρέατα είναι 60-80% O<sub>2</sub>, 20-30% CO<sub>2</sub> και μέχρι 20% N<sub>2</sub>. Σε αντίθεση με το κρέας των πουλερικών που η συνιστώμενη αναλογία αερίων είναι 20-35% CO<sub>2</sub> και 65-80% N<sub>2</sub>. (Μπλούκας, 2007).

### 1.2.3. Συσκευασία υπό κενό (Vacuum Packaging - VP)

Η συσκευασία υπό κενό περιλαμβάνει την απομάκρυνση του αέρα από τη συσκευασία προτού σφραγιστεί, μειώνοντας την μερική πίεση των αερίων της ατμόσφαιρας μέσα στη συσκευασία (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011). Εξαιτίας της διαφοράς πίεσης μέσα κι έξω από τη συσκευασία, η συσκευασία παίρνει το σχήμα του τροφίμου. Αποτελεί είδος τροποποιημένης ατμόσφαιρας, αφού διαφοροποιεί την κανονική ατμόσφαιρα από το περιβάλλον του τροφίμου (Παπαδάκης, 2012). Δεν θεωρείται κατάλληλη για μαλακά τρόφιμα γιατί δημιουργεί εξωτερικές παραμορφώσεις στο προϊόν (Fontana et al., 2006).

**Πίνακας 4:** Κύριοι μικροοργανισμοί που εμφανίζονται σε συσκευασμένο κρέας με διάφορες αναλογίες αερίων στους 0-4°C (Nychas et al., 2008).

Σύσταση αερίων	Κρέας και πουλερικά
Αέρας	<i>Pseudomonas</i> spp.
>50% CO <sub>2</sub> και O <sub>2</sub>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
50% CO <sub>2</sub>	<i>Enterobacteriaceae</i> , Οξυγαλακτικά βακτήρια
<50% CO <sub>2</sub> και O <sub>2</sub>	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , Οξυγαλακτικά βακτήρια
100% CO <sub>2</sub>	Οξυγαλακτικά βακτήρια
Υπό κενό	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i>

### 1.2.4. Ενεργός συσκευασία

Η ενεργός συσκευασία τροποποιεί τις συνθήκες του συσκευασμένου τροφίμου για να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του και να βελτιώσει τις οργανοληπτικές ιδιότητες του. Έτσι η

συσκευασία αλληλεπιδρά με το περιβάλλον του τροφίμου και διαδραματίζει έναν ενεργό ρόλο στη συντήρησή του (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011), σε αντίθεση με άλλες συσκευασίες που απλά αποτελούν ένα φράγμα αλληλεπίδρασης με το εξωτερικό περιβάλλον. Η ενεργός συσκευασία περιλαμβάνει προσροφητές και αποδεσμευτές οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα και οσμών και αντιμικροβιακή συσκευασία (Kerry et al., 2006).

Η ενεργός συσκευασία είναι μία από τις πιο δυναμικές τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των τροφίμων. Ένας δραστικός παράγοντας μπορεί να ενσωματωθεί στην επιφάνεια των υλικών συσκευασίας, ή σε ξεχωριστά τμήματα της συσκευασίας, όπως φακελάκια, ετικέτες ή πώματα μπουκαλιών αντί της εφαρμογής τους άμεσα στα τρόφιμα, για την επίτευξη χαμηλότερων συγκεντρώσεων του δραστικού παράγοντα, περιορίζοντας έτσι ανεπιθύμητες γεύσεις και οσμές στα τρόφιμα (Salgado et al., 2015).

**Πίνακας 5:** Τύποι προσροφητών και οι εμπορικές εφαρμογές τους σε διάφορα είδη τροφίμων (Bilska, 2011).

ΤΥΠΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΗ	ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΤΙΘΕΝΤΑΙ	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ
Προσροφητής οξυγόνου	Ενώσεις σιδήρου, ασκορβικό οξύ, μεταλλικά άλατα	Τυρί, κρέας, γάλα σε σκόνη, δημητριακά
Προσροφητής υγρασίας	Γλυκερόλη	Κρέας, ψάρι, φρούτα, λαχανικά
Προσροφητής διοξειδίου του άνθρακα	Υδροξείδιο του καλίου, νατρίου ή ασβεστίου	Καφές
Ουσίες που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση	Αιθανόλη, σορβικό οξύ, βενζοϊκό οξύ, λυσοζύμη, βακτηριοσίνες, βότανα, μπαχαρικά	Λίπη, δημητριακά
Προσροφητές αιθυλενίου	Υπερμαγγανικό κάλιο, οξείδιο του αργιλίου, ενεργός άνθρακας	Φρούτα (μήλα, βερίκοκα, μπανάνες), λαχανικά (καρότα, ντομάτες, πατάτες)
Προσροφητές αρώματος	Κιτρικό οξύ, εστέρες κυτταρίνης, πολυαμίδη	Χυμοί φρούτων, τρόφιμα που οξειδώνονται εύκολα, π.χ λίπος ιχθυηρών

**Πίνακας 6:** Τύποι ενεργούς συσκευασίας και εφαρμογές του στη βιομηχανία τροφίμων (Kerry et al., 2006).

<b>Προσροφητές - Αποδεσμευτές</b>	Οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υγρασία, αιθυλένιο, αρώματα, UV
	Αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, αντιοξειδωτικά, συντηρητικά, φυτοφάρμακα, διοξείδιο του θείου, αρώματα
<b>Αφαίρεση συστατικών του τροφίμου</b>	Λακτόζη, χοληστερόλη

<b>Έλεγχος θερμοκρασίας</b>	Μονωτικά υλικά. Συσκευασίες αυτο-θέρμανσης και αυτο-ψύξης, θερμαντήρες μικροκυμάτων και θερμοευαίσθητες συσκευασίες
<b>Μικροβιακός έλεγχος</b>	UV και επιφανειακά επεξεργασμένα υλικά συσκευασίας.

### 1.2.5. Έξυπνη συσκευασία

Η έξυπνη συσκευασία παρακολουθεί την κατάσταση των συσκευασμένων τροφίμων και παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων κατά τη μεταφορά και αποθήκευσή τους. Αν και είναι διαφορετική από την ενεργή συσκευασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελέγξει την αποτελεσματικότητα και την ακεραιότητα της ενεργής συσκευασίας (Kerry et al., 2006).

Έχει τη δυνατότητα να παρέχει πληροφορίες για την υπολειπόμενη διάρκεια ζωής του προϊόντος με βάση της πραγματικές συνθήκες διατήρησής του (θερμοκρασία περιβάλλοντος, χρόνος αποθήκευσης). (Μπλούκας 2004).

Εφαρμογές της έξυπνης συσκευασίας:

- ένδειξη παραβίασης,
- ανάπτυξη μικροοργανισμών,
- συσκευές ανίχνευσης αερίων,
- ανίχνευση παθογόνων,
- ανίχνευση αυθεντικότητας,
- ιχνηλασιμότητα (Otlés & Yalcin, 2008).

Οι κύριες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται είναι δείκτες (χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες TTIs, οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα, χρώματος, νωπότητας), οι ετικέτες RFID και οι αισθητήρες (αερίων, βιοαισθητήρες, έξυπνοι αισθητήρες, αισθητήρες οξυγόνου) που βασίζονται στον φθορισμό (Otlés & Yalcin, 2008).

#### 1.2.5.1. Δείκτες

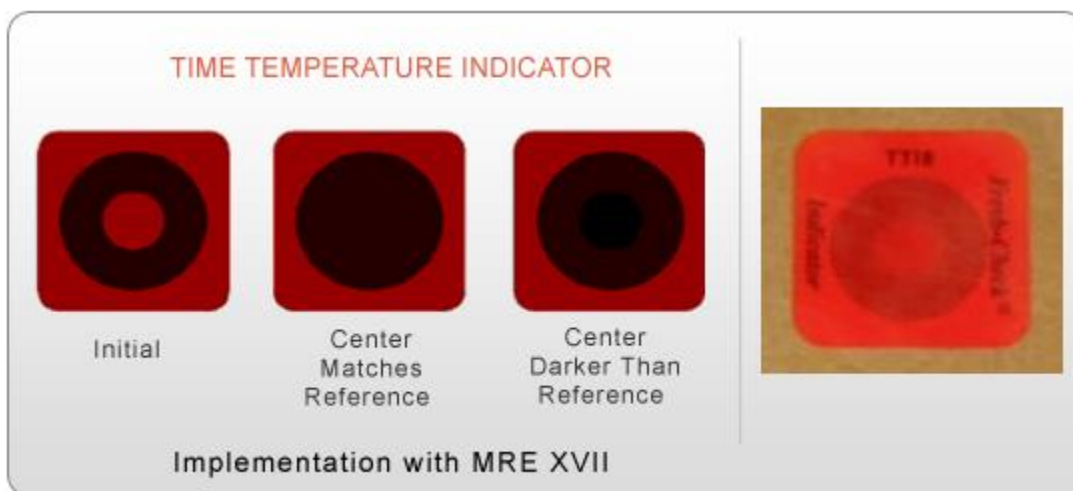
Ως δείκτης ορίζεται μια ουσία που υποδεικνύει την ύπαρξη ή απουσία μιας άλλης ένωσης μέσω μίας χαρακτηριστικής αλλαγής, όπως το χρώμα (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011). Εφαρμογή δεικτών μπορεί να γίνει στην συσκευασία τροφίμων, συγκεκριμένα τοποθετούνται εξωτερικά σε κάθε συσκευασία και αποτελούνται από μεμβράνη εμποτισμένη με κατάλληλη ουσία (ένζυμο, μικροοργανισμό) η οποία ενεργοποιείται όταν κάποιο χαρακτηριστικό (pH, ολική μικροχλωρίδα) αποκτήσει συγκεκριμένη τιμή. Ο δείκτης



αλλάζει χρώμα, γεγονός που σημαίνει ότι το προϊόν έχει αρχίσει να αλλοιώνεται (Μπλούκας, 2004).

#### 1.2.5.1.1. Χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες TTIs

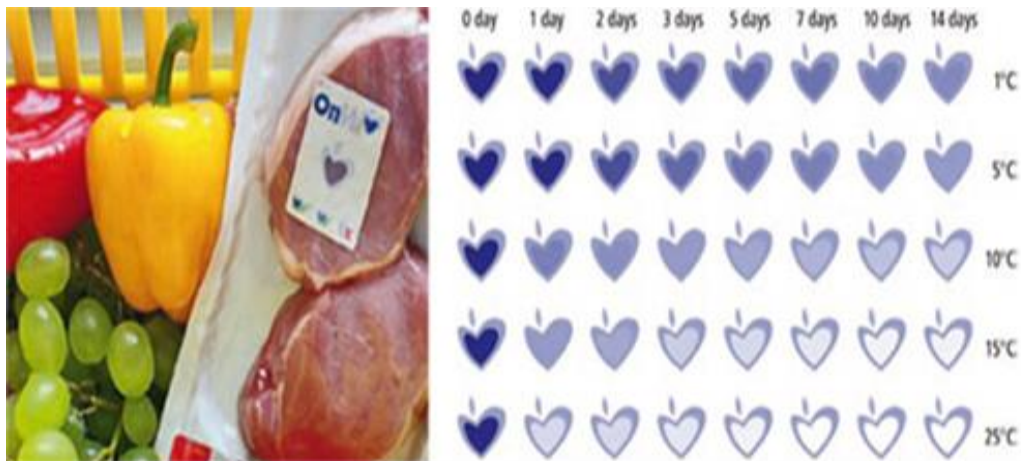
Οι χρονοθερμοκρασιακοί δείκτες είναι ετικέτες που καταγράφουν την χρονοθερμοκρασιακή ιστορία του προϊόντος από το στάδιο της παραγωγής ως το στάδιο της πώλησής του (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011). Χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά για τη σήμανση κατά τη μεταφορά και αποθήκευση των τροφίμων. Πολλές φορές κάποια τρόφιμα αποθηκεύονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από τις κατάλληλες, με αποτέλεσμα την ταχεία ανάπτυξη μικροοργανισμών, που συνεπάγεται την αλλοίωση του τροφίμου πριν από την προβλεπόμενη ημερομηνία λήξεως του (Otlés & Yalcin, 2008).



**Εικόνα 1:** Χρονοθερμοκρασιακός δείκτης.

#### 1.2.5.1.2. Δείκτες νωπότητας

Οι δείκτες αυτοί δύναται να ανιχνεύουν ουσίες που αποτελούν μεταβολικά προϊόντα διαφόρων μικροοργανισμών, όπως αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα, αμίνες, υδρόθειο και να μεταβάλλουν το χρώμα ώστε να γίνονται αντιληπτοί έστω και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Μπλούκας, 2004). Έτσι, δίνεται η δυνατότητα να παρέχονται άμεσα πληροφορίες σχετικά με την ασφάλεια του τροφίμου ως αποτέλεσμα μικροβιολογικών ή χημικών μεταβολών (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011).



**Εικόνα 2:** Συσκευασία νοπού κρέατος με δείκτη νοπότητας.

### **1.3. Εδώδιμες μεμβράνες**

Η παγκόσμια αγορά τα τελευταία χρόνια αναζητά όλο και περισσότερο φυσικά προϊόντα που είναι ταυτόχρονα ασφαλή και υψηλής ποιότητας. Έτσι, οι εταιρίες επιδιώκουν να εφαρμόζουν νέες πρακτικές που θα βελτιώνουν την παραγωγικότητά τους και θα διασφαλίζουν ασφαλή και φρέσκα τρόφιμα (Pérez Espitia et al., 2014). Η ποσότητα των υλικών συσκευασίας έχει αυξηθεί κατά 8% ετησίως. Λιγότερο από το 5% όλων των πλαστικών ανακυκλώνονται, κι έτσι οδηγεί σε μια υψηλή συγκέντρωση πλαστικών στο περιβάλλον (Tavassoli-Kafrani et al., 2016).

Οι εδώδιμες μεμβράνες αποτελούνται από ένα λεπτό στρώμα βρώσιμου υλικού που τοποθετείται απευθείας στο τρόφιμο, με ψεκασμό, επάλειψη ή με εμβάπτιση του τροφίμου σε αυτό και θεωρείται μέρος του τελικού προϊόντος (Sanchez-Ortega et al., 2014). Η ιδέα της χρήσης τους προέκυψε από τις φυσικές μεμβράνες που διαθέτουν κάποια τρόφιμα, όπως φρούτα και λαχανικά (Αρβανιτογιάννης & Στρατάκος, 2011).

Μια ιδανική εδώδιμη μεμβράνη σχηματίζει ένα λεπτό στρώμα στην επιφάνεια του τροφίμου και παρέχει έναν αποτελεσματικό φραγμό σε νερό, ατμούς, υγρασία ή/και θερμοκρασία (Tavassoli-Kafrani et al., 2016). Αποτελεί εναλλακτική μέθοδο για την παράταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων, δρώντας ως εμπόδιο διείσδυσης νερού, ατμού, οξυγόνου, διοξειδίου του άνθρακα, αρωματικών ενώσεων κλπ, αλλά και για τη δράση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Επιπλέον, οι εδώδιμες μεμβράνες διατηρούν την υγρασία στα νοπά κρέατα και μειώνουν την οξείδωση της μυογλοβίνης (Sanchez-Ortega et al., 2014).

Οι εδώδιμες μεμβράνες θεωρούνται φιλικές προς το περιβάλλον, δεδομένου ότι αποδομούνται εύκολα σε σύγκριση με τα κοινά συνθετικά πλαστικά. Οι ιδιότητες αυτών των βιοπολυμερών μπορούν να τροποποιηθούν με την προσθήκη πλαστικοποιητών, αντιμικροβιακών παραγόντων, χρωστικών ουσιών με σκοπό τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους (Gutierrez et al., 2016).

Στις εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να ενσωματωθούν και άλλα ουσίες, όπως αρωματικές ενώσεις, αντιοξειδωτικά, αντιμικροβιακοί παράγοντες, χρωστικές, βιταμίνες (Evageliou et al., 2015).

Η χρήση εδώδιμων μεμβρανών και επικαλύψεων ως φορείς δραστικών συστατικών είναι ελπιδοφόρα τεχνική. Θα πρέπει όμως να πληρούν ειδικές απαιτήσεις: καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, υψηλούς φραγμούς, καλές μηχανικές ιδιότητες, βιοχημική, φυσικοχημική και μικροβιακή σταθερότητα, ασφάλεια, απλή τεχνολογία και χαμηλό κόστος πρώτων υλών και επεξεργασίας (Salgado et al., 2015).

Κάποια από τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης των εδώδιμων μεμβρανών στα τρόφιμα είναι:

- βιοδιασπασιμότητα,
- εδωδιμότητα,
- βιοσυμβατότητα,
- καλή εμφάνιση,
- αποτελεί εμπόδιο αλληλεπίδρασης με το εξωτερικό περιβάλλον (Kerry et al., 2006).

### **1.3.1. Είδη μεμβρανών**

#### **1.3.1.1. Πολυσακχαρίτες**

Διάφοροι θαλάσσιοι οργανισμοί, όπως φύκια, βακτήρια και μικροφύκη έχουν θεωρηθεί σημαντικές πηγές πολυσακχαριτών και αποτελούν σημαντικά βιοϋλικά. Μέχρι στιγμής τρία είδη πολυσακχαριτών που προέρχονται από θαλάσσιους οργανισμούς έχουν εμπορικά αξιοποιηθεί: το άγαρ, τα αλγινικά, και η καραγενάνη (Paula et al., 2015)

#### **1.3.1.1.1. Καραγενάνη**

Η καραγενάνη παράγεται από ορισμένα είδη ροδοφυκών. Ανήκει στην οικογένεια των υδρόφιλων γραμμικών θειωμένων γαλακτανών, και αποτελείται από γραμμικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες 3-συνδεδεμένων μορίων β-γαλακτοπυρανόζης και 4-συνδεδεμένων α-D-γαλακτοπυρανόζης (α-Gal, μονάδα D), με τη μονάδα A συχνά να εμφανίζεται ως μορφή του 3,6-άνυδρο (Angal, μονάδα A), που σχηματίζει το δισακχαρίτη ως επαναλαμβανόμενη μονάδα καρραγενανών (Paula et al., 2015).

Οι εδώδιμες μεμβράνες με βάση την καραγενάνη έχει παρατηρηθεί ότι μπορούν να παρατείνουν τη διάρκεια ζωής φρεσκοκομμένων ή/και ολόκληρων φρούτων. Παρουσιάζουν χαμηλότερη διαπερατότητα σε οξυγόνο και υγρασία από ότι οι μεμβράνες που παρασκευάζονται από άμυλο με αποτέλεσμα να παρατηρείται μικρότερη απώλεια βάρους και διατήρηση της σφριγηλότητας στα φρεσκοκομμένα φρούτα (Paula et al., 2015).

#### **1.3.1.1.2. Αλγινικά**

Τα αλγινικά απομονώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα διαφόρων ειδών καφέ φυκιών (φαιοφυκών), αλλά μπορούν να παραχθούν και από ορισμένα βακτήρια (Brownlee et al., 2009), και αποτελούνται από άλατα αλγινικού οξέος. Το αλγινικό οξύ είναι γραμμικό, μη διακλαδιζόμενο πολυμερές που συντίθεται από δύο μονοσακχαρίτες τους 1,4-(β-D)-μανουρονικό οξύ (M) και 1,4-(α-L)-γουλουρονικό οξύ (G). Οι μονοσακχαρίτες αυτοί βρίσκονται σε διαφορετικές αναλογίες στο αλγινικό οξύ, ανάλογα με την πηγή προέλευσής του. Το αλγινικό οξύ και τα άλατά του είναι πολυσακχαρίτες που περιέχουν ομοπολυμερικά 'block', με περιοχές μαννουρονικού οξέος (block M) και περιοχές γουλουρονικού οξέος (block G), αλλά και ανάμικτα 'block' που περιέχουν ακανόνιστες σειρές μονάδων μαννουρονικού και γουλουρονικού οξέος (MG) (Paula et al., 2015).

Τα αλγινικά έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν ομοιόμορφα, διαφανή, αδιάλυτα στο νερό και θερμο-αναστρέψιμα πηκτώματα σε θερμοκρασία δωματίου, με εγκάρσια σύνδεση με δι- ή τρι-δύναμα ιόντα (Comaposada et al., 2015). Επίσης, αποτελούν εξαιρετικά εμπόδια στο οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα λόγω των δεσμών υδρογόνου. Έτσι, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επέκταση της διάρκειας ζωής των τροφίμων με την πρόληψη της αφυδάτωσης, του οξειδωτικού ταγγίσματος και της επιφανειακής αμαύρωσης

(Tavassoli-Kafrani et al., 2016).

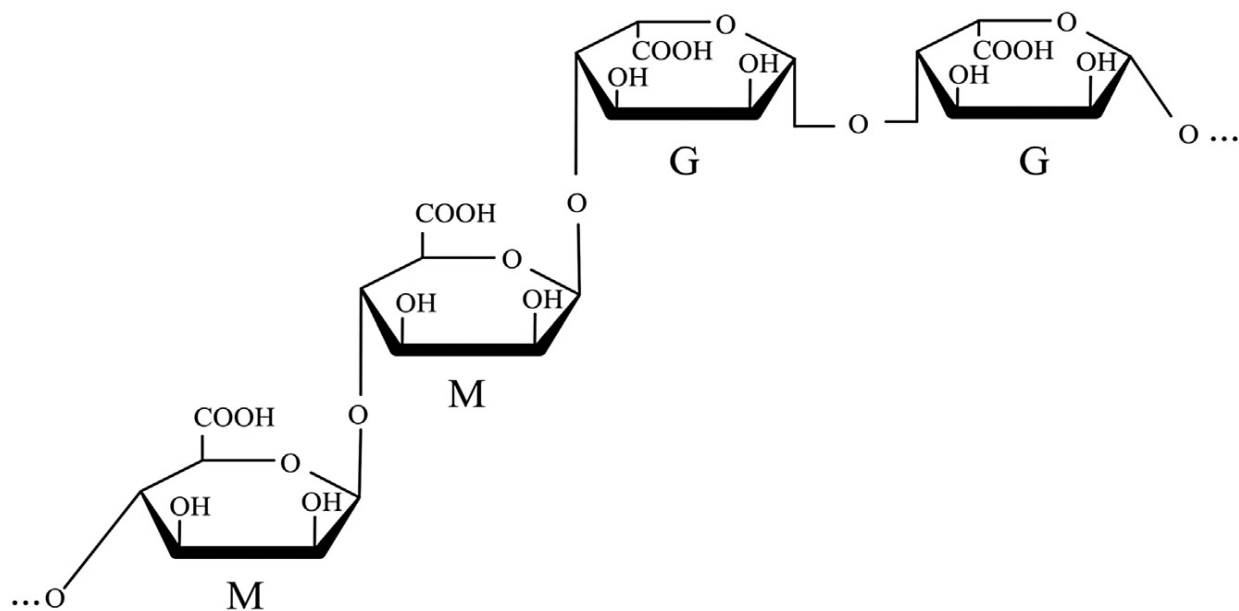
Η πιο χρήσιμη ιδιότητα των αλγινικών είναι ο σχηματισμός πηκτώματος. Ο σχηματισμός αυτός πραγματοποιείται όταν σε διάλυμα αλγινικού νατρίου εισαχθούν δισθενή κατιόντα όπως για παράδειγμα ιόντα ασβεστίου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε μονάδα γουλουρονικού ή μανουρονικού οξέος περιέχει μια καρβοξυλομάδα η οποία σε ουδέτερο και όξινο pH είναι αρνητικά φορτισμένη καθιστώντας το αλγινικό ένα αρνητικά φορτισμένο πολυηλεκτρολύτη. Με την προσθήκη λοιπόν ενός δισθενούς κατιόντος για παράδειγμα  $Ca^{++}$  πραγματοποιείται αντικατάσταση των ιόντων  $Na^{+}$  από ιόντα  $Ca^{++}$  που οδηγεί στο σχηματισμό πηκτώματος του οποίου τα ρεολογικά χαρακτηριστικά, το πορώδες και γενικά η μορφολογία του εξαρτώνται από τον τύπο του αλγινικού άλατος δηλαδή την αναλογία M/G και το μοριακό του βάρος, την συγκέντρωση του αλγινικού άλατος, την συγκέντρωση του κατιόντος και τον τρόπο εισαγωγής του, την θερμοκρασία κατά την οποία σχηματίζεται το gel και πιθανές προσμίξεις άλλων ουσιών που μπορούν να επηρεάσουν την διαδικασία. Το μήκος των block G προσδιορίζει την ικανότητα και την επιλεκτικότητα αλγινικού για να σχηματίζει αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Η διάχυση των ιόντων μέσα στο διάλυμα αλγινικού προκαλεί διαδικασία ανταλλαγής ανιόντων όπου το υδατοδιαλυτό αλγινικό άλας (για παράδειγμα μορφή νατρίου ή καλίου) ανταλλάσσει αντι-ιόντα με  $Ca^{2+}$  για να ληφθεί πηκτή. Αυτή η ιοντική σταυροσύνδεση θα σχηματίσει μια θερμοσταθερό πήκτωμα. Όταν σχηματιστούν πηκτώματα αλγινικού, δύο γειτονικές περιοχές συνδέονται και σχηματίζουν μία κοιλότητα η οποία δρα ως θέση πρόσδεσης ιόντων ασβεστίου. Αυτή η διάταξη απεικονίζεται ως "eggbox" model (Tavassoli-Kafrani et al., 2016).

Οι μεμβράνες μπορούν να σχηματιστούν είτε με εξάτμιση του νερού από ένα αλγινικό πήκτωμα ή με μία διαδικασία δύο σταδίων που περιλαμβάνει ξήρανση του αλγινικού διαλύματος και έπειτα προσθήκη διαλύματος άλατος του ασβεστίου για την πρόκληση σταυροσύνδεσης (Paula et al., 2015).

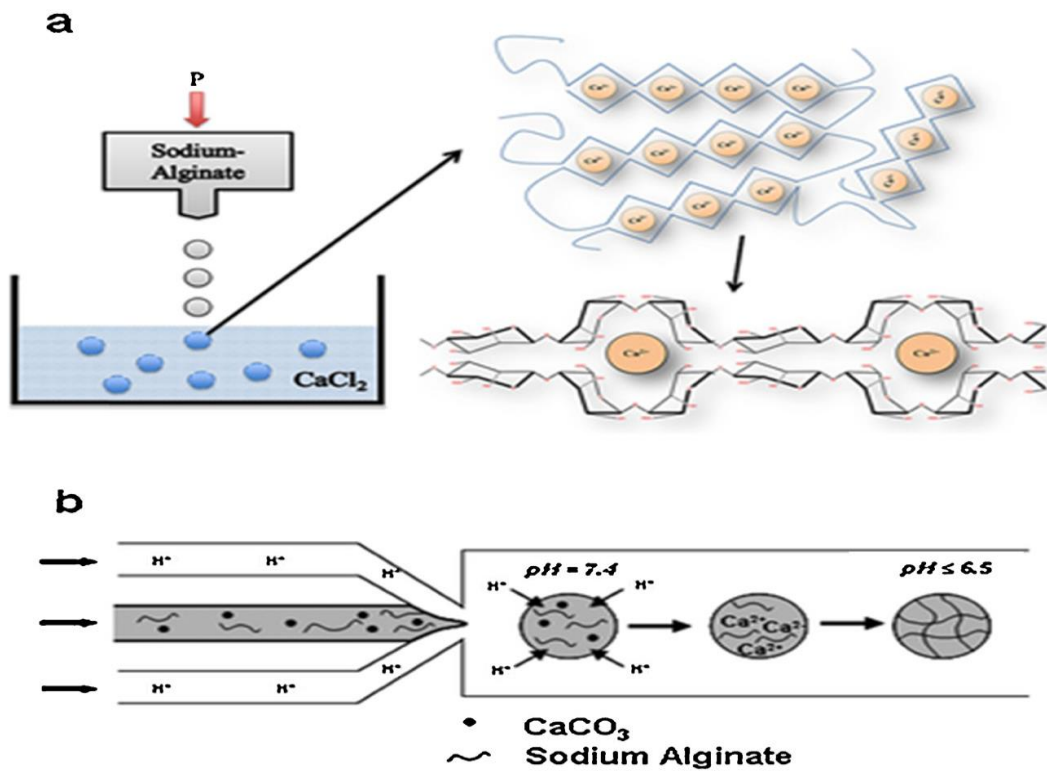
Το αλγινικό άλας είναι «ελκυστικό» διότι είναι μη τοξικό, βιοαποικοδομήσιμο και βιοσυμβατό (Alboofetileh et al., 2014). Τα αλγινικά, επιπλέον, διαθέτουν διαιτητικές ίνες κι έτσι συνδέονται με την καλή υγεία του παχέος εντέρου (Tavassoli- Kafrani et al., 2016). Γι αυτό τα αλγινικά έχουν ευρεία χρήση στην ιατρική και στη βιομηχανία τροφίμων (Brownlee et al., 2009). Σύμφωνα με την FDA, τα αλγινικά είναι GRAS υλικά και θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση (Tavassoli- Kafrani et al., 2016).

Τα αλγινικά χρησιμοποιούνται και ως πυκνωτικά μέσα σε μαρμελάδες και κομπόστες, όπου

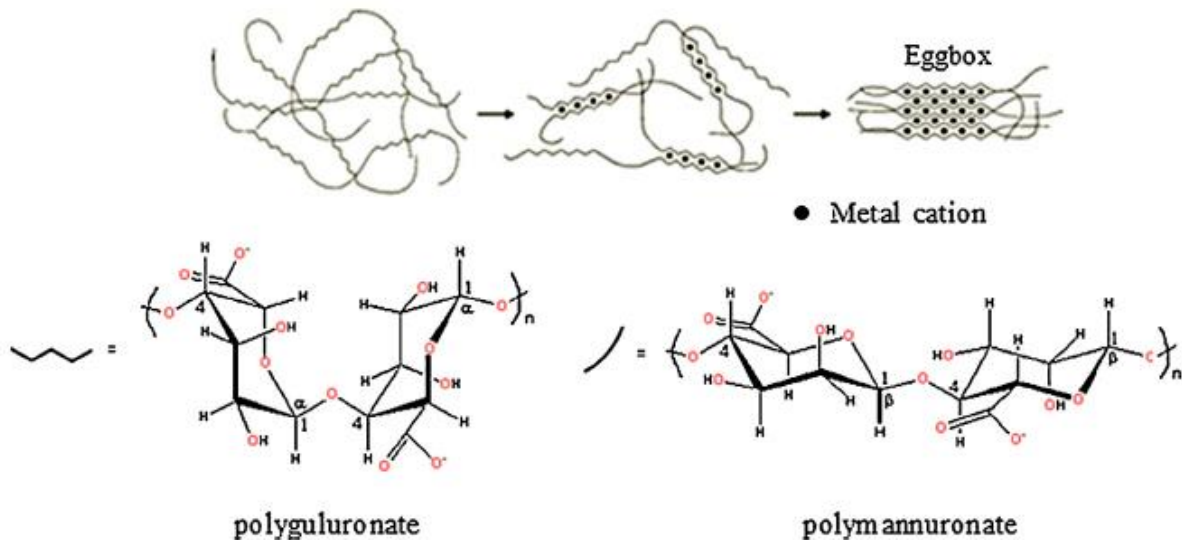
οι αλληλεπιδράσεις αλγινικών - πηκτίνης είναι θερμικά αναστρέψιμες και μπορεί να δώσουν ένα υψηλότερο ιξώδες. Επίσης, χρησιμοποιούνται και ως πυκνωτικά μέσα σε γλυκές και αλμυρές σάλτσες, συμπεριλαμβανομένης και της μαγιονέζας. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σταθεροποιητικοί παράγοντες στην επεξεργασία τροφίμων. Η χρήση των αλγινικών σε κρέμες προσδίδει σταθερότητα κατά την ψύξη/απόψυξη του τροφίμου και μειώνει το διαχωρισμό των στερεών και υγρών συστατικών (συναίρεση). Επιπλέον, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα υδροκολλοειδή ως πυκνωτικά και σταθεροποιητικά μέσα στο παγωτό. Η χρήση τους επιτρέπει τον έλεγχο του ιξώδους του προϊόντος, αυξάνει την αντοχή του τροφίμου σε θερμικό σοκ, ελαττώνει τον σχηματισμό παγοκρυστάλλων και του προσδίδει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά τήξης (Brownlee et al., 2009).



**Εικόνα 3:** Σχηματική απεικόνιση ενός τμήματος αλγινικού με τα δύο μονομερή του, το D-μαννουρονικό (M) και L-γουλουρονικό (G) οξύ (Tavassoli- Kafrani et al., 2016).



**Εικόνα 4:** Αντιδράσεις σχηματισμού πηκτωμάτων με προσθήκη  $\text{CaCO}_3$  (Tavassoli- Kafrani et al., 2016).



**Εικόνα 5:** Σχηματισμός "eggbox" κατά τη διάρκεια πήξης του αλγινικού (Tavassoli- Kafrani et al., 2016).

### **1.3.2. Ενσωμάτωση ουσιών σε εδώδιμες μεμβράνες**

#### **1.3.2.1. Αντιμικροβιακές ουσίες**

Οι αντιμικροβιακές βιοδιασπώμενες μεμβράνες έχουν λάβει ολοένα και μεγαλύτερη προσοχή κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, λόγω της δυνατότητας να καθυστερούν την μικροβιακή αλλοίωση των τροφίμων και να μειώνουν τον κίνδυνο της επιμόλυνσης των τροφίμων από παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Alboofetileh et al., 2014).

Η χρήση χημικών συντηρητικών είναι πολύ αμφιλεγόμενη, διότι έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί αναπνευστικά και άλλα προβλήματα υγείας (Alboofetileh et al., 2014). Κάποιοι από τους πιο κοινούς χημικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι το βενζοϊκό οξύ, βενζοϊκό νάτριο, προπιονικό οξύ, σορβικό οξύ, όμως η χρήση τους είναι πολύ περιορισμένη λόγω των ανησυχιών για την υγεία των καταναλωτών (Tavassoli-Kafrani et al., 2016).

Επιπλέον, οι καταναλωτές επιθυμούν όλο και περισσότερο φυσικά προϊόντα. Επομένως, η έρευνα στηρίζεται στην αναζήτηση εναλλακτικών φυσικών προσθέτων στη βιομηχανία τροφίμων (Alboofetileh et al., 2014).

Τα βιοσυντηρητικά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά σε αντιμικροβιακή συσκευασία είναι η λυσοζύμη και η νισίνη. Στις αντιμικροβιακές ενώσεις περιλαμβάνονται επίσης τα οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό, μηλικό και κιτρικό οξύ), η χιτοζάνη, η λακτοϋπεροξειδάση, και διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών, όπως αιθέρια έλαια, γαρίφαλο, σκόρδο, φασκόμηλο, ρίγανη, μπαχάρι, θυμάρι, δεντρολίβανο, λεμονόχορτο (Tavassoli-Kafrani et al., 2016), βακτηριοσίνες, ένζυμα, αλκοόλες και λιπαρά οξέα (Pranoto et al., 2005).

Οι αντιμικροβιακές ουσίες θα μπορούσαν να εφαρμόζονται άμεσα στο τρόφιμο με εμφύσηση ή ψεκασμό, ωστόσο, η άμεση εφαρμογή αντιβακτηριακών ουσιών στην επιφάνεια του τροφίμου έχει περιορισμένα οφέλη, διότι οι δραστικές ουσίες εξουδετερώνονται με την επαφή ή διαχέονται γρήγορα στο μεγαλύτερο μέρος των τροφίμων (Pranoto et al., 2005). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες, που ενσωματώνονται στις εδώδιμες μεμβράνες, απελευθερώνονται αργά στην επιφάνεια των τροφίμων, και ως εκ τούτου, παραμένουν σε υψηλές συγκεντρώσεις για μεγάλες χρονικές περιόδους (Pranoto et al., 2005, Zinoviadou et al., 2011).



### 1.3.2.1.1. Αιθέρια έλαια

Πολλά αιθέρια έλαια (αιθοξύλια) έχουν βακτηριοκτόνο δράση ενάντια σε ένα ευρύ φάσμα τροφιμογενών παθογόνων και, συνεπώς, έχουν χρησιμοποιηθεί ως "φυσικά" αντιμικροβιακά (Zhang et al, 2015). Τα αιθοξύλια είναι πτητικά ελαιώδη υγρά που έχουν εκχυλιστεί από διάφορα μέρη του φυτού και χρησιμοποιούνται ευρέως ως αρωματικά τροφίμων (Alboofetileh et al., 2014). Τα αιθέρια έλαια (αιθοξύλια) και τα μπαχαρικά είναι πλούσιες πηγές βιολογικά δραστικών ενώσεων όπως τερπενοειδή και φαινολικά οξέα (Zinoviadou et al., 2011). Γενικά, τα αιθέρια έλαια με τις ισχυρότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες κατά παθογόνων μικροοργανισμών, προέρχονται κυρίως από φυτά που περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις σε φαινολικές ενώσεις όπως η καρβακρόλη, ευγενόλη (2-μεθοξυ-4-(2-προπενυλ)φαινόλη) και θυμόλη. Ο τρόπος δράσης τους θεωρείται πως είναι η διατάραξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, διαταράσσοντας την κινητήρια δύναμη πρωτονίων, την ροή ηλεκτρονίων, την ενεργό μεταφορά, και την πήξη του περιεχομένου των κυττάρων. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης είναι αποτελεσματικό έναντι διαφόρων τροφιμογενών βακτηρίων, όπως *Salmonella* sp. και *Escherichia coli* O157: H7 (Seydim & Sarikus, 2006).

Υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον για την ενσωμάτωση αιθοξυλίων σε μεμβράνες για τη βελτίωση της διάρκειας ζωής και τη μικροβιολογική ασφάλεια των τροφίμων (Zhang et al, 2015). Μεταξύ άλλων, τα αιθέρια έλαια από γαρύφαλλο, ρίγανη, δεντρολίβανο, θυμάρι και φασκόμηλο είναι αυτά που εμφανίζουν την υψηλότερη αποτελεσματικότητα έναντι μικροοργανισμών. Παρόλο που τα περισσότερα αιθοξύλια θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση, η χρήση τους ως συντηρητικά τροφίμων είναι συχνά περιορισμένη λόγω ότι σε κάποιες περιπτώσεις για να υπάρξει αντιμικροβιακή δράση, θα πρέπει το αιθοξύλιο να είναι σε υψηλές συγκεντρώσεις με αποτέλεσμα να υπερβαίνει τα αποδεκτά επίπεδα από τους καταναλωτές (Alboofetileh et al., 2014). Ένα ακόμη πιθανό μειονέκτημα των αιθοξυλίων είναι η υψηλή μεταβλητότητά τους, έτσι ώστε να δύναται να χαθούν κατά την αποθήκευση, μειώνοντας την αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητά τους (Zhang et al., 2015).

Πλήθος μελετών έχουν πραγματοποιηθεί για την αποτελεσματικότητα της ενσωμάτωσης διαφόρων αιθέριων ελαίων σε εδωδιμες μεμβράνες. Οι Zhang et al, (2015), μελέτησαν την επίδραση του αιθέριου ελαίου κανέλας και του ηλιέλαιου, ως προς την ποιότητα και την μικροβιακή αλλοίωση, σε φρεσκοκομμένο πεπόνι. Οι Jiang et al., (2013) ερεύνησαν την επίδραση της προσθήκης τριών αιθέριων ελαίων (μαντζουράνα, γαρύφαλλο, κανέλα) σε

εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών στη μικροβιακή και φυσικοχημική ποιότητα κατά την διάρκεια αποθήκευσης.

Οι Azarakhsh et al., (2014) μελέτησαν την επίδραση της προσθήκης αιθέριου ελαίου λεμονόχορτου σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών στις μικροβιακές και φυσικοχημικές ιδιότητες του φρεσκοκομμένου ανανά.

Οι Seydim & Sarikus, (2006), εξέτασαν την επίδραση αιθέριων ελαίων ρίγανης, σκόρδου και δεντρολίβανου, ενσωματωμένων σε εδώδιμες μεμβράνες πρωτεΐνης ορού γάλακτος, έναντι επιλεγμένων παθογόνων τροφίμων.

Οι Raybaudi-Massilia et al., (2008) εξέτασαν την αποτελεσματικότητα της προσθήκης μηλικού οξέος και αιθέριων ελαίων (κανέλα, λεμονόχορτο, palmarosa) σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών ως προς την διατήρηση της ποιότητας και την αύξηση της διάρκειας ζωής του φρεσκοκομμένου πεπονιού "Piel de Sapo".

Οι Pranoto et al., (2005), μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της αντιβακτηριακής δράσης του ελαίου του σκόρδου, ενσωματωμένου σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών, κατά των παθογόνων βακτηρίων *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus cereus*.

Οι Guerreiro et al., (2015) μελέτησαν την επίδραση της επικάλυψης φρέσκων φρούτων (κούμαρα) με αλγινικά εμπλουτισμένα με ευγενόλη και κιτράλη, ως προς την ποιότητα, την ασφάλεια και την διάρκεια ζωής των κουμάρων.

#### **1.3.2.1.2. Ε-πολυσίνη**

Η ε-πολυλυσίνη (PL), επίσης γνωστή ως κατιονικό ομοπολυμερές 25-30 L-λυσίνης, παράγεται από την αερόβια βακτηριακή ζύμωση του *Streptomyces albulus*. Η PL, είναι υδατοδιαλυτή, εδώδιμη, μη τοξική για τον άνθρωπο, φιλική προς το περιβάλλον, λόγω της βιοδιασπασιμότητας της. είναι και έτσι αποτελεί ένα πρόσθετο τροφίμων που έχει εγκριθεί ασφαλές (GRAS) από το FDA (Cai et al., 2015).

Η ε-πολυλυσίνη είναι ένωση θερμικά σταθερή, ακόμη και κάτω από όξινες συνθήκες και επιδεικνύει μία ευρεία αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram (+) και Gram (-) βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων (Zinoviadou et al., 2011). Η ε-PL σε χαμηλές συγκεντρώσεις θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως συντηρητικό σε τρόφιμα λόγω της ισχυρής της αντιμικροβιακής δράσης. Μερικοί ερευνητές ανέφεραν ότι σε συγκέντρωση 2000-5000 ppm παρουσιάζει εξαιρετικά

αποτελέσματα στη διατήρηση της σάρκας ψαριών, βοδινού και χοιρινού διατηρημένα σε ψύξη (Cai et al., 2015).

Οι Zinoviadou et al., (2011), μελέτησαν την διατήρηση της ποιότητας νωπού βόειου κρέατος στο οποίο εφαρμόστηκαν εδώδιμες μεμβράνες πρωτεΐνη ορού γάλακτος (WPI) που περιείχαν διαφορετικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες (ριγανέλαιο, γαλακτικά άλατα και ε-PL).

Οι Cai et al., (2015), εξέτασαν την επίδραση της ε-πολυλυσίνης ενσωματωμένης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών, στην ποιότητα των ιαπωνικού λαβρακιού κατά τη διάρκεια συντήρησης σε ψύξη.

#### **1.3.2.1.3. Βακτηριοσίνες**

Οι βακτηριοσίνες είναι φυσικές, ριβοσωμικώς παραγόμενες αντιμικροβιακές ουσίες, που συντίθενται από βακτήρια. Λόγω του ευρέως αντιμικροβιακού φάσματος τους κατά διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, λαμβάνουν πολλή προσοχή ως βιοσυντηρητικά τροφίμων. Για παράδειγμα, η νισίνη παρουσιάζει υψηλή αντιμικροβιακή δράση, ενώ δεν επηρεάζει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Οι Narsaiah et al., (2015) μελέτησαν την επίδραση εδώδιμων μεμβρανών με ή χωρίς ενσωμάτωση βακτηριοσινών στην ενίσχυση της σταθερότητας κατά την αποθήκευση φρεσκοκομμένης παπάγιας.

#### **1.3.2.1.4. Λακτοϋπεροξειδάση**

Η λακτοϋπεροξειδάση (LPS) είναι ένα ένζυμο με βακτηριοκτόνο δράση στα Gram-αρνητικά βακτήρια, βακτηριοστατική δράση στα Gram-θετικά βακτήρια και αντιμυκητιακή δράση (Karpetanakou et al., 2014). Διάφορες μελέτες έχουν διεξαχθεί σχετικά με τη χρήση της λακτοϋπεροξειδάσης (LPS) ως αντιμικροβιακό σύστημα στην συντήρηση των τροφίμων.

Το σύστημα LPS είναι μέρος του φυσικού συστήματος διατήρησης που υπάρχει στο γάλα. Έτσι, η προσθήκη του θειοκυανικού ή / και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο γάλα, για την ενεργοποίηση των φυσικώς απαντημένων LPS, χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της μικροβιακής ποιότητας του γάλακτος και του τυριού. Η προσθήκη του συστήματος LPS και άλλων συστατικών αυτού του αντιμικροβιακού συστήματος στην θερμική επεξεργασία αποβουτυρωμένο γάλακτος, προϊόντων κρέατος και λαχανικών και την πρόληψη της ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων έχουν επίσης μελετηθεί (Mecitoğlu et al., 2007).

Ο μηχανισμός δράσης του LPS βασίζεται στη μετατροπή του θειοκυανικού ( $\text{SCN}^-$ ) σε αντιμικροβιακά προϊόντα, όπως υποθειοκυανικό ιόν ( $\text{OSCN}^-$ ), υποθειοκυανικό οξύ ( $\text{HOSCN}$ ) και κάποια άλλα υψηλής δραστηριότητας και βραχύβια προϊόντα οξείδωσης υπό την παρουσία  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Αυτό το σύστημα εμφανίζει γενικά βακτηριοκτόνο δράση στα Gram (-) βακτήρια και βακτηριοστατική δράση στα Gram (+) βακτήρια. Επίσης, έχει αντιμυκητιακές και αντιικές δράσεις (Seifu et al., 2005).

Οι Mecitoğlu et al., (2007) μελέτησαν την επίδραση της ενσωμάτωσης του LPS σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών για να εξεταστεί η δράση του φυσικού αντιμικροβιακού μηχανισμού σε διάφορα τρόφιμα.

### **1.3.2.2. Αντιοξειδωτικές ουσίες**

Το οξυγόνο είναι υπεύθυνο για πολλές διεργασίες υποβάθμισης των τροφίμων όπως η οξείδωση των λιπιδίων, η ανάπτυξη μικροοργανισμών, η ενζυμική αμαύρωση και η απώλεια των βιταμινών (Bonilla et al., 2012). Η ενσωμάτωση των αντιοξειδωτικών στις εδώδιμες μεμβράνες οδηγεί στην επέκταση του χρόνου ζωής του προϊόντος και προστασία των τροφίμων από την οξειδωτική τάγγιση και την υποβάθμιση και αλλοίωση του χρώματος. Είναι ενδιαφέρον ότι οι περισσότεροι αντιμικροβιακοί παράγοντες έχουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Φυσικά και συνθετικά αντιοξειδωτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στις συσκευασίες τροφίμων (Skurtys et al., 2010). Φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες E και C, αιθέρια έλαια (ρίγανη και δενδρολίβανο), ασκορβικό νάτριο, κιτρικό οξύ, φερούλικό οξύ είναι κάποιες από τις πιο κοινές αντιμικροβιακές ενώσεις (Song et al, 2011).

Οι Robles-Sánchez et al., (2013) μελέτησαν την επίδραση της ενσωμάτωσης αντιοξειδωτικών ουσιών (ασκορβικό και κιτρικό οξύ) σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών στην διατήρηση της ποιότητας φρεσκοκομμένου μάνγκου στους  $4^\circ\text{C}$ .

Οι Song et al. (2011) εξέτασαν την επίδραση της ενσωμάτωσης διαφόρων αντιοξειδωτικών (βιταμίνης C και πολυφαινόλες τσαγιού) σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών ως προς τη διάρκεια ζωής και την ποιότητα της τσιπούρας (*Megalobrama amblycephala*). Η βιταμίνη C είχε το καλύτερο αποτέλεσμα ως προς την μείωση της χημικής αλλοίωσης, επιβραδύνοντας την απώλεια ύδατος και βελτιώνοντας τις οργανοληπτικές ιδιότητες της τσιπούρας.

### **1.3.2.3. Παράγοντες μη αμαύρωσης (Antibrowning)**

Τα αντιοξειδωτικά συστατικά των φρούτων, όπως οι φαινολικές ενώσεις και το ασκορβικό οξύ, σχετίζονται με την ενζυματική αμαύρωση. Οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται στις ιδιαίτερα ασταθείς κινόνες, οι οποίες πολυμερίζονται σε καφέ, κόκκινες και μαύρες χρωστικές ουσίες (Oms-Oliu et al., 2008).

Η ενσωμάτωση παραγόντων ενάντια στην αμαύρωση (antibrowning) στις μεμβράνες μπορεί να βελτιώσει τη διατήρηση του χρώματος των φρούτων και των λαχανικών. Ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ, και κάποια αμινοξέα που περιέχουν θείο οξέα (κυστεΐνη και η γλουταθειόνη) έχουν ενσωματωθεί σε εδώδιμες μεμβράνες για την πρόληψη της ενζυματικής αμαύρωσης (Tavassoli-Kafrani et al., 2016).

Οι Rojas-Grau et al., (2007) μελέτησαν την ικανότητα ενσωμάτωσης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών παραγόντων ενάντια στην αμαύρωση (N-ακετυλοκυστεΐνη και γλουταθειόνη) και την επίδραση τους στη διάχυση υδρατμών σε φρεσκοκομμένα μήλα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο παράγοντες ενάντια στην αμαύρωση θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στις μεμβράνες και είχαν θετική επίδραση στην αποφυγή της αμαύρωσης των φρούτων.

Οι Oms-Oliu et al., (2008) μελέτησαν την επίδραση της ενσωμάτωσης N-ακετυλοκυστεΐνης και γλουταθειόνης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών στην διατήρηση της ποιότητας φρεσκοκομμένου μήλου και παπάγιας και στην αποφυγή της ενζυματικής αμαύρωσης.

### **1.3.2.4. Άλλες ουσίες**

Στις εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να προστεθούν λειτουργικά συστατικά, όπως προβιοτικά (Tarja et al., 2007), πρεβιοτικά (Röbkle et al., 2011), μέταλλα (Rhim & Wang, 2014), και βιταμίνες (Robles-Sánchez et al., 2013) για ενίσχυση λειτουργικών ιδιοτήτων τους. Επιπλέον, ενισχυτικά γεύσης και χρωστικές ουσίες μπορούν επίσης να ενσωματωθούν στις εδώδιμες μεμβράνες για τη βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων (Skurtys et al., 2010).

### **1.3.2.5. Προσθήκη ζωντανών μικροοργανισμών**

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, καινοτόμες βιοδραστικές συσκευασίες εμπλουτισμένες με αντιμικροβιακούς παράγοντες έχουν ευρέως αναπτυχθεί. Ωστόσο, σοβαρό πρόβλημα αποτελεί η μείωση της αντιμικροβιακής δράσης τους κατά τη διάρκεια της

συντήρησης των τροφίμων. Λύση αυτού του προβλήματος αποτελεί η άμεση ενσωμάτωση βακτηριακών στελεχών (Léonard et al., 2015). Η προσθήκη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) μπορεί να ελέγξει την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων έχοντας ανταγωνιστική δράση που οφείλεται σε διαφορετικούς μηχανισμούς όπως ανταγωνισμό για τις θρεπτικές ουσίες, μείωση του pH (που προκύπτει από την παραγωγή οργανικών οξέων), παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, διοξειδίου του άνθρακα, ρευτερίνης, διακετυλίου, βακτηριοσινών (Gialamas et al., 2010).

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τα περισσότερα από τα LAB θεωρούνται ασφαλή (GRAS) από τον FDA. Ιδιαίτερα, το *Lactococcus lactis* είναι ένα είδος LAB που χρησιμοποιείται για τη συντήρηση τροφίμων λόγω της ικανότητάς του να παράγει βακτηριοσίνες όπως νισίνη (η μόνη βακτηριοσίνη που η χρήση της ως πρόσθετο τροφίμων επιτρέπεται στην Ευρωπαϊκή Ένωση), λακτικίνη, και λακτοκοκκίνη. Κατά τον ίδιο τρόπο, προκαλούν ενδιαφέρον κι άλλα είδη LAB, όπως στελέχη του *Lactobacillus paracasei* (Léonard et al., 2015).

Οι Gialamas et al., (2010) διερεύνησαν τη δυνατότητα χρήσης εδώδιμων μεμβρανών ως φορέων βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι επιλεγμένων παθογόνων, ως μια φυσική μέθοδο συντήρησης.

Οι Léonard et al., (2015) εξέτασαν τη δράση ενάντια στη *Listeria* των *Lactobacillus paracasei* και *Lactococcus lactis*, ενσωματωμένα σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και αλγινικών/καζεϊνών.

Οι López de Lacey et al., (2012), αξιολόγησαν την επιβίωση των ενσωματωμένων σε εδώδιμες μεμβράνες, *Lactobacillus acidophilus* και *Bifidobacterium bifidum*. Η εφαρμογή των μεμβρανών έγινε σε ψάρια για να προσδιοριστεί η επίδρασή τους στην μικροβιακή αλλοίωση και στη διάρκεια ζωής κατά την αποθήκευση σε ψύξη.

Οι Tavera-Quiroz et al., (2015) μελέτησαν την επίδραση της προσθήκης προβιοτικών βακτηρίων (*Lactobacillus plantarum*) σε μεμβράνες μεθυλοκυτταρίνης, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε σνακ μήλου.

#### **1.4. *Janthinobacterium* sp.**

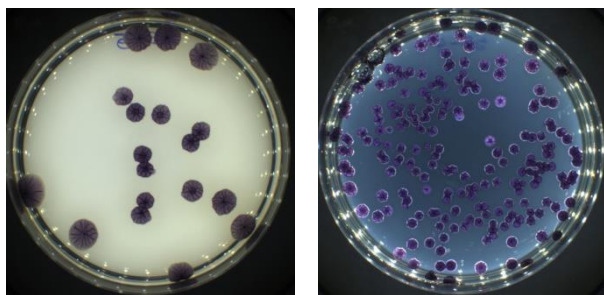
Το *Janthinobacterium* sp. είναι ένα Gram-αρνητικό, κινητικό, αερόβιο βακτήριο που συνήθως απομονώνεται από εδάφη και ύδατα ποταμών, λιμνών και πηγών (Pantanella et al.,

2007). Κατατάσσεται στην οικογένεια των Οξαλοβακτηρίων και στην τάξη των β-πρωτεοβακτηρίων . Παράγει μια σειρά από δευτερεύοντες μεταβολίτες όπως είναι η βιολασεΐνη, μια μωβ, αδιάλυτη στο νερό, χρωστική (Hornung et al., 2013)

Το *Janthinobacterium* sp. είναι γνωστό για την αντιμυκητιακή του δράση στο δέρμα βατράχου. Με τον σχηματισμό βιοϋμενίου στο δέρμα βατράχων απελευθερώνεται η βιολασεΐνη και άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες που συμβάλλουν στην μείωση της θνησιμότητας και νοσηρότητας των ζώων (Hornung et al., 2013). Παρόλα αυτά, το *J. lividum* μερικές φορές μπορεί να προκαλέσει ευκαιριακές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένης της θανατηφόρας σηψαιμίας (Pantanella et al., 2007).

Η ανάπτυξη βιοϋμενίων είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται από συστήματα quorum sensing. Πολλά Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, παράγουν κάποια ποσότητα εξωπολυσακχαριτών (EPS) μόνο όταν διεγείρονται από μόρια-σήματα “quorum sensing”, που καλούνται «αυτο-επαγωγείς». Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, ως γενικό κανόνα, τέτοια «σήματα-μόρια» είναι οι acylhomoserine λακτόνη (εξ) [AHL (s)] που διαφέρουν στη δομή της N-ακυλο πλευρική τους αλυσίδας (Pantanella et al., 2007).

Η παραγωγή βιολασεΐνης και βιοϋμενίων από το *J. lividum* εξαρτάται από την πηγή άνθρακα, τη φάση της ανάπτυξης και από την παρουσία αντιβιοτικών (Pantanella et al., 2007).



**Εικόνα 6:** Ανάπτυξη αποικιών του *Janthinobacterium* sp. Σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA.

#### **1.4.1. Βιολασεΐνη**

Με την αυξανόμενη παγκόσμια απειλή των πολυανθεκτικών (MDR) μικροβίων, όπως επίσης και η αυξανόμενη επιθυμία για φυσικά προϊόντα, είναι επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη εναλλακτικών, νέων αντιμικροβιακών παραγόντων (Wang et al., 2012). Η βιολασεΐνη έχει προσελκύσει τους επιστήμονες, λόγω της ευρείας γκάμας των βιολογικών ιδιοτήτων της

(Wang et al., 2012). Κατ' επέκταση και τα βακτήρια που παράγουν βιολασεΐνη έχουν αναμφισβήτητα κεντρίσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων (Choi et al., 2015).

Οι χρωστικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε τρόφιμα, υφάσματα, καλλυντικά, φαρμακευτικά προϊόντα και πλαστικά. Στα τρόφιμα, στα καλλυντικά στα φάρμακα λόγω της φύσης των συγκεκριμένων προϊόντων και των προβλημάτων στην ασφάλεια που προκαλούνται από πολλές τεχνητές συνθετικές χρωστικές, οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην παραγωγή ασφαλών, φυσικών χρωστικών ουσιών από φυσικές πηγές. Φυσικές χρωστικές ουσίες μπορούν να ληφθούν από μεταλλεύματα, έντομα, φυτά και μικροοργανισμούς. Μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι η παραγωγή χρωστικών από τα μικρόβια, λόγω του υψηλού ρυθμού ανάπτυξής τους (Lu et al., 2009).

Η βιολασεΐνη είναι μια φυσική μώβ χρωστική που απομονώνεται από Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των *Chromobacterium violaceum*, *Collimonas* sp., *Duganella* sp., *Janthinobacterium lividum*, και *Microbulbifer* sp. (Wang et al., 2012). Τα στελέχη αυτά διαφέρουν φυλογενετικά και έτσι διαφέρουν και οι περιοχές από τις οποίες έχουν απομονωθεί. Τα βακτηρίδια έχουν απομονωθεί από επιφάνειες σφουγγαριών, ριζόσφαιρα ελαιώνων και παγετώνων. Το πιο γνωστό γένος είναι το *Chromobacterium* στο οποίο περιλαμβάνεται το στέλεχος *C. violaceum* (Choi et al., 2015).

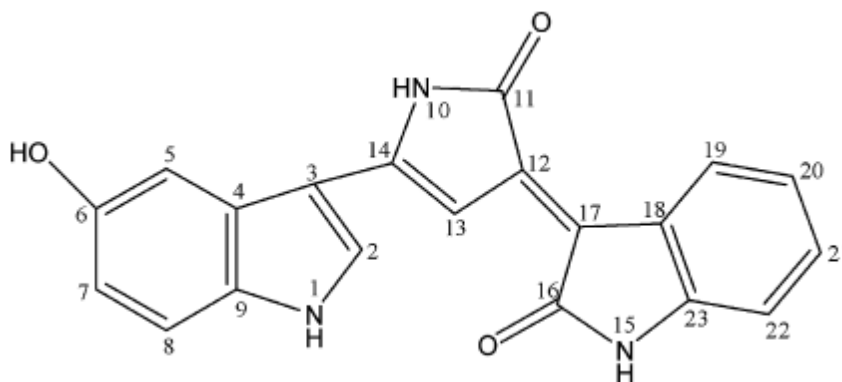
Μέχρι στιγμής, μικρή προσοχή έχει δοθεί στην απομόνωση της βιολασεΐνης και κυρίως από το βακτήριο *Chromobacterium violaceum*, παρόλο που έχει παρατηρηθεί να έχει αντικαρκινική, αντιβακτηριδιακή, αντιελκογόνη, αντιλεισμνιακή, αντιυική δράση (Mojib et al., 2011), δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* (Choi et al., 2015), *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, αντινεοπλασματική δράση, και γενοτοξική δραστηριότητα σε καλλιεργούμενες κυτταρικές σειρές (Pantanella et al., 2007). Διάφοροι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από χρωμογόνα βακτήρια φαίνεται να έχουν τοξικές ιδιότητες σε άλλα ανταγωνιστικά είδη δίνοντας τους ανταγωνιστικό πλεονέκτημα. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων πολλοί δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν βρεθεί να έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες και κατά συνέπεια έχουν ενδιαφέρον για κλινική χρήση (Choi et al., 2015).

Η βιολασεΐνη σχηματίζεται από τη συμπύκνωση δύο μορίων τρυπτοφάνης μέσω της δράσης πέντε πρωτεϊνών (Choi et al., 2015). Η τρυπτοφάνη εμφανίζεται να είναι το μόνο πρόδρομο μόριο στη βιοσύνθεση της βιολασεΐνης. Η παραγωγή της τρυπτοφάνης είναι απαραίτητη για την παραγωγή χρωστικής. Η βιοσύνθεση της βιολασεΐνης εξαρτάται επίσης από το μεταβολισμό των



υδατανθράκων. Ωστόσο, η μεταβολική οδός της βιοσύνθεσης της βιολασεΐνης δεν είναι πολύ σαφής ακόμη. Η παραγωγή της φαίνεται να είναι ευνοϊκή υπό χαμηλή θερμοκρασία. Είναι επομένως ενδιαφέρον η απομόνωση ψυχρότροφων βακτηρίων ικανών να παράγουν τη μωβ χρωστική, βιολασεΐνη (Lu et al., 2009).

Τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή της είναι τα νιο A,B,C,D,E, και οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται έχουν μελετηθεί σε ένα μικρό αριθμό στελεχών που παράγουν βιολασεΐνη (Choi et al., 2015). Στο *Chromobacterium violaceum*, η βιοσύνθεση της βιολασεΐνης κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο που αποτελείται από τα γονίδια νιοD, νιοC, νιοB και νιοA και η έκφραση της ρυθμίζεται από μία πηγή άνθρακα. Η βιολασεΐνη έχει το γενικό τύπο C<sub>20</sub>-H<sub>13</sub>-N<sub>3</sub>-O<sub>3</sub> με μοριακό βάρος 343·33 (Pantanella et al., 2007). Η χρωστική ουσία είναι αδιάλυτη στο νερό και διαλυτή σε αλκοόλες, όπως μεθανόλη, αιθανόλη και ακετόνη. Η μέγιστη απορρόφηση σε διάλυμα μεθανόλης είναι στα 585 nm (Pantanella et al., 2007).



**Εικόνα 7:** Δομή της Βιολασεΐνης (Lu et al., 2009).

### 1.5. Στόχος μελέτης

Υποθέτοντας ότι το χρώμα εκδηλώνεται όταν ο μικροοργανισμός βρίσκεται σε κατάσταση στρες, θα εξεταστούν οι συνθήκες κατά τις οποίες εκδηλώνεται ο μωβ χρωματισμός όταν ο μικροοργανισμός είναι ενσωματωμένος σε εδώδιμη μεμβράνη αλγινικών και έρχεται σε επαφή με τρόφιμο. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η χρήση της χρωμογόνου ιδιότητας του βακτηρίου *Janthinobacterium* sp. ως δείκτη αλλοίωσης τροφίμων.

Με βάση την βιβλιογραφική ανασκόπηση, υπάρχουν πολλές μελέτες σχετικές με την χρήση εδώδιμων μεμβρανών με προσθήκη διαφόρων ουσιών (π.χ. αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών), προσθήκη ζωντανών βακτηρίων (π.χ. προβιοτικά), ωστόσο, υπάρχει έλλειψη σε μελέτες σχετικά

με την προσθήκη χρωμογόνων βακτηρίων ως δείκτες αλλοίωσης, αλλά και οι ενδεχόμενες αντιμικροβιακές ιδιότητές τους από τους παραγόμενους μεταβολίτες.

## II) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Οι συνθήκες που εξετάστηκαν είναι τα συστατικά των μεμβρανών, οι συνθήκες ανάπτυξης (αέρας, κενό, MAP), η ανταγωνιστική μικροχλωρίδα του κιμά, η τιμή pH των μεμβρανών, προκειμένου να βρεθούν οι ιδανικές για την επίτευξη του στόχου της παρούσας μελέτης.

### 2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Παρασκευή μεμβρανών αλγινικού νατρίου με προσθήκη:

- ⊗ διαφόρων ενισχυτικών ανάπτυξης (extracts) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις,
- ⊗ διαφορετική συγκέντρωση εμβολίου,
- ⊗ διαφορετικό τρόπο εφαρμογής του εμβολίου,
- ⊗ διαφορετική ποσότητα του εμβολίου,
- ⊗ ρύθμιση των μεμβρανών σε διαφορετικά pH,
- ⊗ εφαρμογή των μεμβρανών σε εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar (TSA), αλλά και σε τρόφιμα.

Αναλυτικά, οι διάφορες κατηγορίες μεμβρανών που παρασκευάστηκαν φαίνονται στους **Πίνακες 1 και 2**.

Εξετάστηκαν πολλές διαφορετικές παράμετροι ώστε να διαπιστωθούν οι βέλτιστες συνθήκες που οδηγούν στην εκδήλωση του μώβ χρωματισμού κατά την διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων σε θερμοκρασίες ψύξης.

Τα ενισχυτικά ανάπτυξης προστέθηκαν στις μεμβράνες, ώστε να ενισχύσουν τα θρεπτικά συστατικά των μεμβρανών και να επιτρέψουν στον μικροοργανισμό να αναπτυχθεί.

Αρχικά, οι μεμβράνες κάθε κατηγορίας εφαρμοζότανε μόνο σε TSA, ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητά τους και έπειτα γινότανε επιλογή των καλύτερων μεμβρανών οι οποίες και θα εφαρμοζόντουσαν σε πραγματικό τρόφιμο.

**Πίνακας 1:** Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των ενισχυτικών ανάπτυξης και της συγκέντρωσής τους που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μεμβρανών.

Ενισχυτικό ανάπτυξης	Συγκέντρωση (% w/v)
Yeast extract	0,6
	1,2
Meat extract	0,6
	1,2
Tryptophan	0,074
	0,6
Beef extract	0,6
Milk extract	0,6
NaCl	0,5
Tryotone Soy Broth	0,6
Peptone	0,5
Tryptone	1,5
Tryptone + Peptone + NaCl	1,5 + 0,5 + 0,5
Yeast + Meat extracts	0,6 + 0,6
Yeast + Meat + Tryptophan	0,6 + 0,6 + 0,6
Yeast + Meat + Tryptophan	0,2 + 0,2 + 0,2
Yeast + NaCl	1,2 + 0,85
Yeast + Meat + NaCl	0,2 + 0,2 + 3,5
Yeast + Starch	0,6 + 1,3
Potassium nitrate 0,118 + ammonium ferrous sulphate 0,008 + dipotassium hydrogen phosphate 0,025 + magnesium sulphate 0,075 + beef extract 0,153 + <b>L-tryptophan 0,074</b> + starch 1,3 (Wang et al, 2012)	
Potassium nitrate 0,118 + ammonium ferrous sulphate 0,008 + dipotassium hydrogen phosphate 0,025 + magnesium sulphate 0,075 + beef extract 0,153 + starch 1,3	

**Πίνακας 2:** Συγκεντρωτικός πίνακας των διαφορετικών μεμβρανών που παρασκευάστηκαν.

Εμβόλιο		
2 log	4 log	7 log
Εφαρμογή εμβολίου		
Ενσωμάτωση		ψεκασμός
Συγκέντρωση εμβολίου		
100 µl / film		500 µl / film
pH μεμβρανών		
6	7 (μάρτυρας)	8
Εφαρμογή σε		
TSA		Χοιρινός κιμάς

## 2.2. Εργαστηριακός εξοπλισμός

Η εργαστηριακή υποδομή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας περιελάμβανε τα σκεύη, όργανα και συσκευές που αναφέρονται παρακάτω:

### A) Σκεύη:

1. γυάλινες φιάλες duran
2. δοκιμαστικοί σωλήνες
3. κωνικές φιάλες
4. γυάλινες πιπέττες μετρήσεως
5. γυάλινα σφαιρίδια (beads)
6. λύχνος υγραερίου εργαστηριακός
7. μαγνήτες αναδεύσεως
8. μικροβιολογικός κρίκος
9. ογκομετρικοί κύλινδροι
10. μικροβιολογικό τρίγωνο
11. πλαστικοί περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 και 50 ml)
12. τρυβλία Petri (Sarstedt)
13. πλαστικά Honeycomb 2 Microplates 100 οπών για το Bioscreen
14. ποτήρια ζέσεως
15. ρύγχη (tips) μεταβλητού όγκου
16. στατό δοκιμαστικών σωλήνων
17. υδροβολέας

### B) Αναλώσιμα υλικά

Ως θρεπτικά υλικά σε όλη την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα:

- ☉ Tryptic Soy Broth (TSB) (Biolife, 4012302, Milano, Italia),
- ☉ Tryptone Soy Agar (TSA, LAB M 011)

**Πίνακας 3:** Συγκεντρωτικός πίνακας των οργάνων – συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν.

Όργανο – συσκευή	Μοντέλο	Εταιρεία
Αναλυτικοί ζυγοί	Mark (0,01g)	BEL ENGINEERING
	BP 3105 (0,001g)	Sartorius
Επωαστικοί θάλαμοι	BE 500	Memmert
Κλίβανος αποστείρωσης	OT 4060	Nüve
Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής	NU-425-400E	NuAire
Μετρητής αποικιών	C5	Stuart Scientific
Αυτόματος μετρητής αποικιών	Scan 1200	Interscience
Πεχάμετρο	pH 526	WTW
Πιπέττες μεταβλητού όγκου	Pipetman	Gilson
	Labopette 20-200 µl	Hirschmann Laborgerate
Συσκευή ανάμιξης	K-550-GE	Vortex-GENIE
Συσκευή Microbiology Reader Bioscreen	Bioscreen C MBR System	Growth Curves
Συσκευή ανάδευσης με θέρμανση	ARE VELP	Scientifica
Συσκευή ομογενοποίησης	Stomacher 400	Seward
Φούρνος μικροκυμάτων	Easy Grill,	Whirlpool
Υδατόλουτρο	WB 14	Memmert
Φυγόκεντροι	Megafuge 1.0 R	Heraeus instruments
Συσκευή αεροστεγούς θερμοσυγκόλλησης	VC 999	Inauen Maschinen

### 2.3. Ανανέωση μικροοργανισμού

Πριν τη χρήση των μικροοργανισμών και την υποβολή τους στις διάφορες δοκιμές, απαραίτητη θεωρείται η ανανέωση αυτών σε υγρό θρεπτικό διάλυμα, ώστε να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους. Στην περίπτωση του *Janthinobacterium* sp. χρησιμοποιείται το TSB σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 10ml TSB μεταφέρονται 100µl της αρχικής καλλιέργειας

(stock, -22 °C) και τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 25°C. Κατά την πρώτη ανανέωση παραμένουν σε αυτόν για 48 ώρες. Στη συνέχεια γίνεται streaking σε τρυβλία TSA, και αυτά επωάζονται στους 25°C για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών πραγματοποιείται η δεύτερη ανανέωση, όπου κάτω από ασηπτικές συνθήκες λαμβάνεται μία απομονωμένη αποικία από τα τρυβλία και τοποθετείται σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα με 10ml TSB. Ο μικροοργανισμός μετά από 48 ώρες στους 25°C, σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν βρέθηκε ότι βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής και στην αρχή της στατικής του φάσης ανάπτυξης και είναι πλήρως ανακτημένος και έτοιμος για χρήση.

#### **2.4. Προετοιμασία εμβολίου**

Για να χρησιμοποιηθεί ο μικροοργανισμός στα επιμέρους πειράματα, είναι απαραίτητη η απομάκρυνση των παραπροϊόντων του μικροοργανισμού που παρήχθησαν κατά την ανάπτυξή του στο θρεπτικό υπόστρωμα. Στις 48 ώρες της τελευταίας ανανέωσης, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση 4.629 \*g για 10 min στους 4 °C, ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου και προσθήκη 10 ml Ringer. Η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα δυο φορές. Μετά την τρίτη φυγοκέντριση, η τελική επαναιώρηση έγινε σε 1 ml Ringer ώστε να πραγματοποιηθεί συμπύκνωση του εμβολίου και να επιτύχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση εμβολίου (~9.5 log CFU/ml).

#### **2.5. Παρασκευή μεμβρανών αλγινικού άλατος**

Διαλύματα αλγινικού νατρίου 1% παρασκευάστηκαν με προσθήκη σκόνης αλγινικού νατρίου (Applichem A 3249) σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό υπό ανάδευση και σταθερή θερμοκρασία (60-65°C). Όταν τα συσσωματώματα του αλγινικού νατρίου διαλύθηκαν και απέκτησε το διάλυμα μία ομοιόμορφη υφή, προστέθηκε 1% γλυκερόλη ως πλαστικοποιητής, σύμφωνα με τους Karpetanaku et al., 2016.

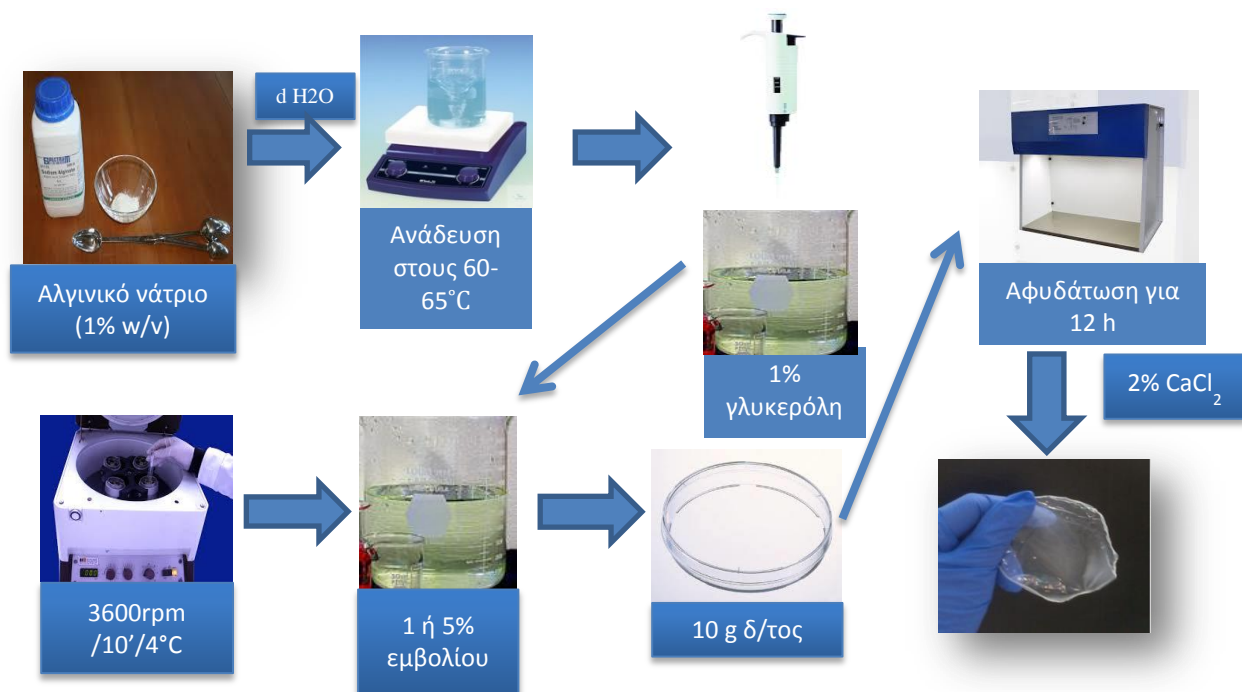
Επιπλέον, στα διαλύματα προστέθηκαν και ενισχυτικά ανάπτυξης σε διάφορες συγκεντρώσεις, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.1. Όταν τα διαλύματα απέκτησαν θερμοκρασία περιβάλλοντος, έγινε προσθήκη του βακτηρίου *Janthinobacterium* sp. στις επιθυμητές τελικές συγκεντρώσεις (2 ή 7 Log CFU/g) και αναδεύτηκαν τα διαλύματα μέχρι να ομογενοποιηθούν.

Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν 10 g του διαλύματος αλγινικού νατρίου σε στρογγυλά τρυβλία Petri, και τοποθετήθηκαν στον θάλαμο κάθετης νηματικής ροής (laminar) για 12 ώρες

προκειμένου να αφυδατωθούν οι μεμβράνες. Έπειτα από 12 ώρες προστέθηκαν 10 ml διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου 2% σε κάθε τρυβλίο προκειμένου να αφαιρεθούν οι μεμβράνες. Σε περίπτωση που οι μεμβράνες δεν χρησιμοποιούνταν την συγκεκριμένη στιγμή, αποθηκεύονταν στους 5°C.

Στην περίπτωση της εφαρμογής του εμβολίου με ψεκάσμο, αρχικά παρασκευάστηκαν οι μεμβράνες όπως αναφέρθηκε παραπάνω, χωρίς όμως την προσθήκη του εμβολίου. Μετά από 12 ώρες στο θάλαμο νηματικής ροής και ενώ είχαν αφαιρεθεί οι μεμβράνες, και είχαν τοποθετηθεί μεμονωμένα σε διαφορετικά τρυβλία Petri, έγινε ο ψεκάσμος του εμβολίου στις μεμβράνες.

Το εμβόλιο τοποθετήθηκε σε πλαστικό αποστειρωμένο ψεκάστρι, στο οποίο είχε υπολογιστεί ότι ένας ψεκάσμος ισοδυναμεί με ~ 150 μl. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με εφαρμογή ενός ή τριών ψεκασμών πάνω στις μεμβράνες. Ο ψεκάσμος γινότανε από απόσταση περίπου 10 cm από την μεμβράνη και όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφος.



Σχήμα 1 : Σχηματική απεικόνιση παρασκευής μεμβρανών.



## **2.6. Παρασκευή δειγμάτων**

### **2.6.1. Σε εργαστηριακό υπόστρωμα (TSA)**

Πραγματοποιήθηκε εφαρμογή των μεμβρανών αλγινικού άλατος σε εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα TSA. Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία TSA στα οποία εφαρμόστηκαν με την βοήθεια δύο λαβίδων οι μεμβράνες. Η όλη διαδικασία λάμβανε χώρα υπό ασηπτικές συνθήκες.

Στα πειράματα με την ανταγωνιστική μικροχλωρίδα, έγινε επιφανειακή επίστρωση των επιθυμητών αραιώσεων από δειγματοληψία κρέατος στα τρυβλία TSA, και στην συνέχεια τοποθέτηση στην επιφάνειά τους, των μεμβρανών με ενσωματωμένο το *Janthinobacterium* sp..

Τα δείγματα συντηρήθηκαν σε κλίβανους των 5°C.

### **2.6.2. Σε χοιρινό κιμά**

Η εφαρμογή των μεμβρανών σε χοιρινό κιμά, αρχικά περιελάμβανε την ζύγιση του κιμά σε τρυβλία (10 g), πλάσιμο/ζύμωμα του και στη συνέχεια την τοποθέτηση των μεμβρανών με την βοήθεια λαβίδων και υπό ασηπτικές συνθήκες στην επιφάνεια του.

Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 5°C.

## **2.7. Δείγματα σε κενό (Vacuum Packaging - VP) και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified Atmosphere Packaging - MAP)**

Δείγματα μεμβρανών με προσθήκη yeast extract (0,6%) εφαρμόστηκαν σε τρυβλία TSA και στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε κενό και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Χρησιμοποιήθηκαν σακούλες κατάλληλων διαστάσεων (διαστάσεις ξέρουμε; Αν ναι, τις βάζεις εδώ) στις οποίες τοποθετήθηκαν τα δείγματα (TSA με τις μεμβράνες) χωρίς το καπάκι τους. Ακολούθησε αφαίρεση του ατμοσφαιρικού αέρα και αντικατάσταση του με 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> (MAP) ή εφαρμογή 90% συνθήκης κενού. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 5 °C.

## **2.8. Ρύθμιση pH μεμβρανών**

Πραγματοποιήθηκε ρύθμιση pH των αλγινικών διαλυμάτων στις τιμές 6, 7 και 8 ώστε να διερευνηθεί η συσχέτιση του pH των μεμβρανών με την εκδήλωση χρώματος αλλά και την ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp. στις μεμβράνες. Η ρύθμιση του pH γινόταν στα διαλύματα αλγινικών προτού γίνει ο ενοφθαλμισμός του *Janthinobacterium* sp.. Για την τιμή 7 δεν έγινε ρύθμιση, γιατί η τιμή αυτή συμπίπτει με το αρχικό pH του διαλύματος αλγινικών, ενώ για την

επίτευξη της τιμής 6 έγινε σταδιακή ρίψη HCl 6 N με συνεχή ανάδευση του διαλύματος. Η τιμή 8 επιτεύχθηκε με σταδιακή ρίψη NaOH 5 N.

## **2.9. Αναλύσεις**

### **2.9.1. Μικροβιολογικές αναλύσεις**

Σε κάθε δείγμα τροφίμου και μεμβράνης πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις για την εκτίμηση του πληθυσμού της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX) και του *Janthinobacterium* sp. στα διάφορα στάδια της συντήρησης. Στην περίπτωση του κιμά, δείγμα 10 g ζυγίστηκε ασηπτικά σε σακούλα Stomacher, προστέθηκαν 90 ml αποστειρωμένου αραιωτικού διαλύματος (1/4 strength Ringer's), ώστε να γίνει αραιώση 1:10. Το δείγμα ομογενοποιήθηκε σε συσκευή Stomacher για 60 sec. Στην περίπτωση των μεμβρανών, ζυγίστηκαν μεμονωμένα και ασηπτικά σε σακούλες Stomacher και προστέθηκε αντίστοιχη ποσότητα αποστειρωμένου αραιωτικού διαλύματος (1/4 strength Ringer's), ώστε να γίνει αραιώση 1:10. Στην συνέχεια, τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Stomacher για 5 min. Και στις δύο περιπτώσεις, ακολούθησαν κατάλληλες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με μεταφορά 1 ml δείγματος προηγούμενης αραιώσης σε 9 ml διαλύματος Ringer. Στη συνέχεια έγινε επίστρωση 0,1ml των κατάλληλων αραιώσεων σε γενικό υπόστρωμα TSA (επώαση στους 25°C για 48-72 ώρες) και καταμέτρηση των αποικιών.

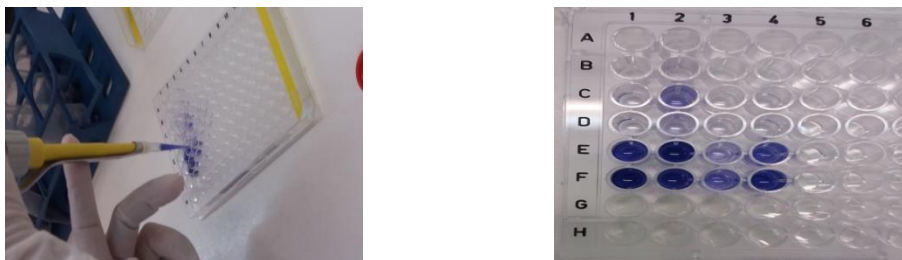
### **2.9.2. Ποσοτικοποίηση χρώματος με χρήση Bioscreen**

Η ποσοτική εκτίμηση του χρώματος των μεμβρανών έγινε με τη χρήση φασματοφωτομέτρου και συγκεκριμένα με τη συσκευή Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System στα 570 και 585 nm. Στην συσκευή εισάγονταν microplates των 100 κελιών.

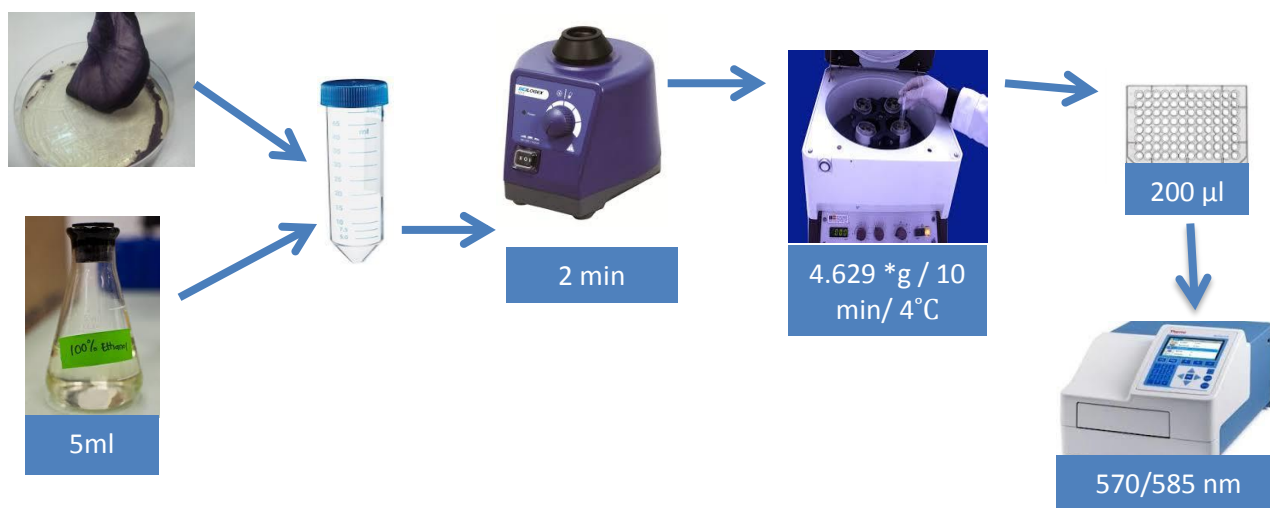
Σύμφωνα με την βιβλιογραφία για την εκχύλιση της βιολασεΐνης, απαιτείται οργανικός διαλύτης, όπως καθαρή αιθανόλη (Lu et al., 2009). Για την εκχύλιση της χρωστικής (βιολασεΐνης) πραγματοποιήθηκαν τα εξής στάδια (Σχήμα 2):

- ☉ Σε falcon των 50 ml τοποθετήθηκαν περίπου 20 γυάλινα beads,
- ☉ Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 ml αιθανόλης 100%,
- ☉ Έπειτα, στο falcon με την βοήθεια λαβίδων, τοποθετήθηκε μία μεμβράνη,

- Έγινε χρήση vortex για 2 min, για την καλύτερη ανάδευση και εκχύλιση της χρωστικής,
- Το περιεχόμενο του falcon τοποθετήθηκε σε falcon των 15 ml και στην συνέχεια έγινε μία φυγοκέντριση στα 4.629 \*g για 10 min στους 4°C.
- Λήφθηκαν 200 μl υπερκείμενου από το κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε microplate για να γίνει μέτρηση της απορρόφησής τους στα 570nm και 585nm με τη βοήθεια του Bioscreen.



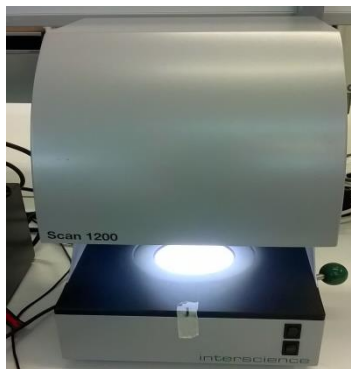
**Εικόνα 1:** Ετοιμασία δειγμάτων για προσδιορισμό χρώματος με Bioscreen.



**Σχήμα 2:** Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης βιολασεΐνης και ποσοτικοποίησης του χρώματός της.

### **2.9.3. Λήψη φωτογραφιών**

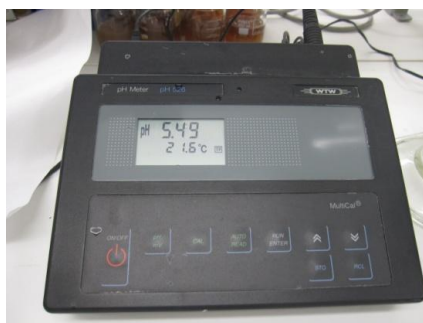
Σε κάθε δείγμα (μεμβρανών-TSA ή μεμβρανών-κιμά) κατά τις ημέρες δειγματοληψίας πραγματοποιείται και λήψη φωτογραφιών για την οπτική παρατήρηση και εκτίμηση της πορείας του χρωματισμού των μεμβρανών. Η λήψη γίνεται με την συσκευή Scan 1200 της εταιρείας Interscience.



**Εικόνα 2:** Απεικόνιση του αυτόματου μετρητή αποικιών που χρησιμοποιήθηκε.

#### **2.9.4. Μέτρηση pH**

Σε κάθε δείγμα τροφίμου και μεμβρανών μετρήθηκαν οι τιμές pH με την χρήση ψηφιακού πεχάμετρου (pH 526 WTW, Multical). Για κάθε δείγμα λαμβανόταν ο μέσος όρος δύο τιμών.



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση του πεχάμετρου που χρησιμοποιήθηκε.

## III) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### **3.1. Προσδιορισμός καλύτερης μεμβράνης με βάση τα ενισχυτικά ανάπτυξης**

Η εκτίμηση της καλύτερης μεμβράνης έγινε με βάση την εκδήλωση μωβ χρωματισμού και της επιβίωσης και ανάπτυξης του μικροοργανισμού καθ' όλη την διάρκεια της συντήρησής του.

Κρίθηκε αναγκαίος ο προσδιορισμός των κατάλληλων συστατικών-πρόσθετων στις αλγινικές μεμβράνες που συνεργούν στην εκδήλωση του μωβ χρωματισμού. Η αρχική εκτίμηση έγινε σε τρυβλία TSA για να μην υπάρχουν εξωτερικοί παράγοντες όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις των τροφίμων. Η μεμβράνη με την καλύτερη εκδήλωση μωβ χρώματος στα τρυβλία TSA δοκιμάστηκε στη συνέχεια και σε χοιρινό κιμά.

#### **3.1.1. Εφαρμογή μεμβρανών σε TSA**

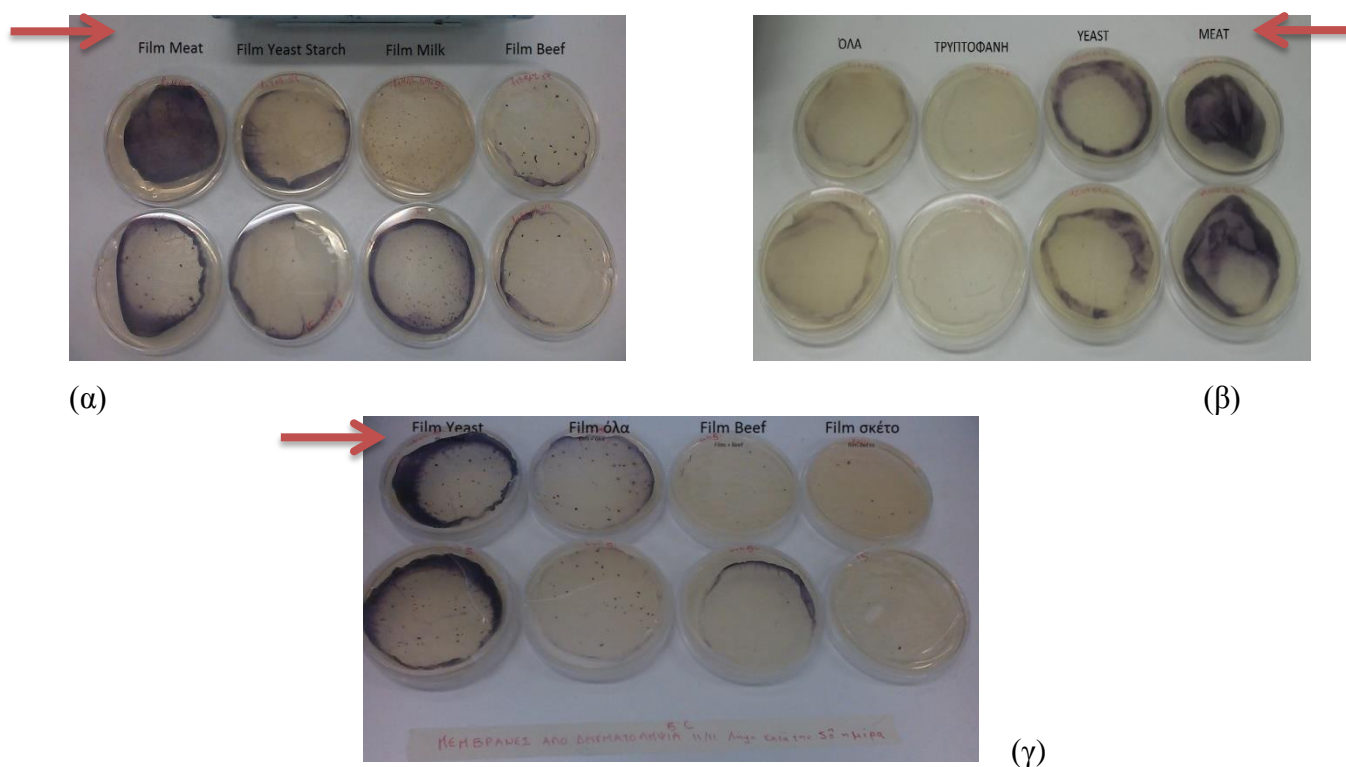
Παρασκευάστηκαν μεμβράνες αλγινικών αλάτων με επιπλέον προσθήκη συστατικών σε διάφορες συγκεντρώσεις όπως αναφέρθηκε στον πίνακα 1. Με βάση τα ενισχυτικά ανάπτυξης και για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή των μεμβρανών φαίνεται ότι καλύτερος χρωματισμός (απόδοση χρώματος και ομοιομορφία) επιτεύχθηκε στις μεμβράνες με προσθήκη ενισχυτικών ανάπτυξης yeast και meat extract σε συγκέντρωση 0,6%.

Σύμφωνα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, κατά την μηδενική ημέρα, ο πληθυσμός του *Janthinobacterium* sp. κυμαίνονται από  $6,1 \pm 0,3$  Log CFU/g στην μεμβράνη με milk extract έως  $6,9$  Log CFU/g στην μεμβράνη με beef extract. Δεν παρουσίασαν αξιόλογες διαφορές στην ανάπτυξή τους κατά την συντήρησή τους, ανεξάρτητα με τα ενισχυτικά ανάπτυξης που έχουν προστεθεί σε αυτές. Την 10<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 5°C, οι πληθυσμοί κυμαίνονται από  $10,1 \pm 0,3$  Log CFU/g στην μεμβράνη με milk extract έως  $10,7 \pm 0,2$  Log CFU/g στην μεμβράνη με yeast extract (Διάγραμμα 1α). Φαίνεται ότι καθ' όλη την διάρκεια συντήρησης των μεμβρανών, παρατηρείται μία υστέρηση ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. Στις μεμβράνες με προσθήκη του milk extract.

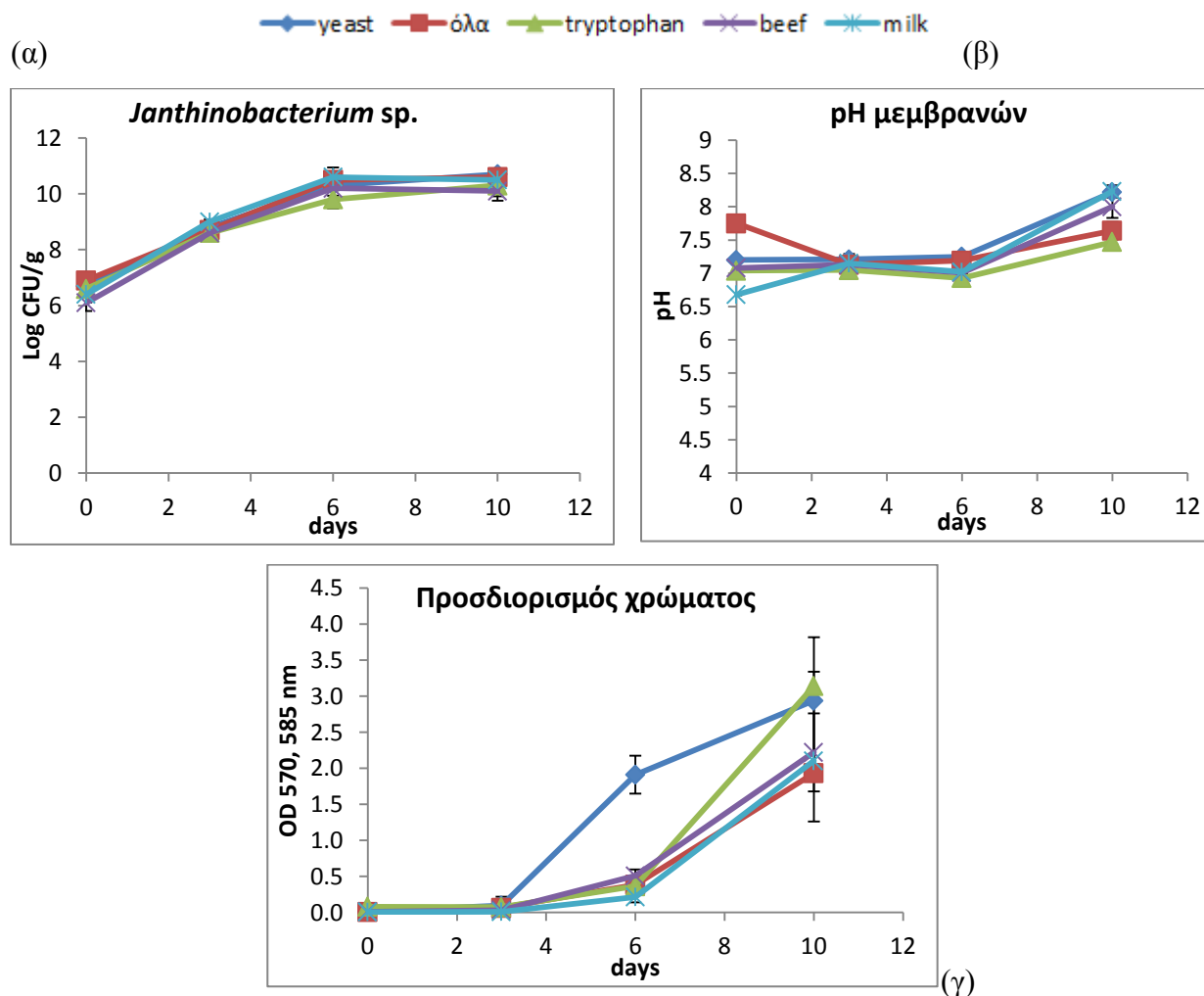
Με βάση το Διάγραμμα 1β, και τις μετρήσεις του pH των μεμβρανών, κατά την μηδενική ημέρα φάνηκε πως η μεμβράνη με το χαμηλότερο pH είναι η μεμβράνη με προσθήκη των συστατικών από την μελέτη των Wang et al., 2012 (όλα), με τιμή  $6,68 \pm 0,01$ , ενώ η υψηλότερη τιμή του pH παρατηρήθηκε στην μεμβράνη με beef extract με τιμή  $7,75 \pm 0,05$ . Σε όλα τα είδη μεμβρανών (εκτός από αυτή με yeast extract), παρατηρείται μία μικρή πτώση του pH κατά την

6<sup>η</sup> ημέρα και μεγάλη αύξηση της τιμής κατά την 10<sup>η</sup> ημέρα (εκτός από αυτή με beef extract). Την 10<sup>η</sup> ημέρα το χαμηλότερο pH φαίνεται να εμφανίζεται στην μεμβράνη με προσθήκη τρυπτοφάνης με τιμή  $7,47 \pm 0,04$ , ενώ το υψηλότερο pH παρατηρήθηκε στις μεμβράνες με yeast extract και με προσθήκη των συστατικών από την μελέτη των Wang et al., 2012 (όλα) με τιμές  $8,22 \pm 0,04$  και  $8,23 \pm 0,09$  αντίστοιχα.

Με βάση τον προσδιορισμό του χρώματος με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των μεμβρανών, έως την 3<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας οι τιμές της απορρόφησης της βιολασεΐνης ήταν πολύ χαμηλές. Την 6<sup>η</sup> ημέρα, ενώ όλων των ειδών οι μεμβράνες κυμαίνονται από 0,2-0,5, οι μεμβράνες με yeast extract παρουσίασαν πολύ υψηλότερη τιμή και συγκεκριμένα  $1,91 \pm 0,26$ . Την 10<sup>η</sup> ημέρα την υψηλότερη τιμή εμφάνισαν οι μεμβράνες με τρυπτοφάνη και yeast extract με τιμές  $3,14 \pm 0,20$  και  $2,94 \pm 0,88$  αντίστοιχα. Την χαμηλότερη τιμή παρουσίασαν οι μεμβράνες «όλα» με τιμή  $1,93 \pm 0,61$ .



**Εικόνα 1:** Φωτογραφίες μεμβρανών με προσθήκη διαφόρων ενισχυτικών ανάπτυξης κατά την 5<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης στους 5°C. \*Ο συμβολισμός «όλα» αναφέρεται στα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν από την μελέτη των Wang et al., 2012. \*\*Ο συμβολισμός «σκέτο» αναφέρεται στην Παρασκευή μεμβρανών χωρίς προσθήκη κάποιου ενισχυτικού ανάπτυξης.

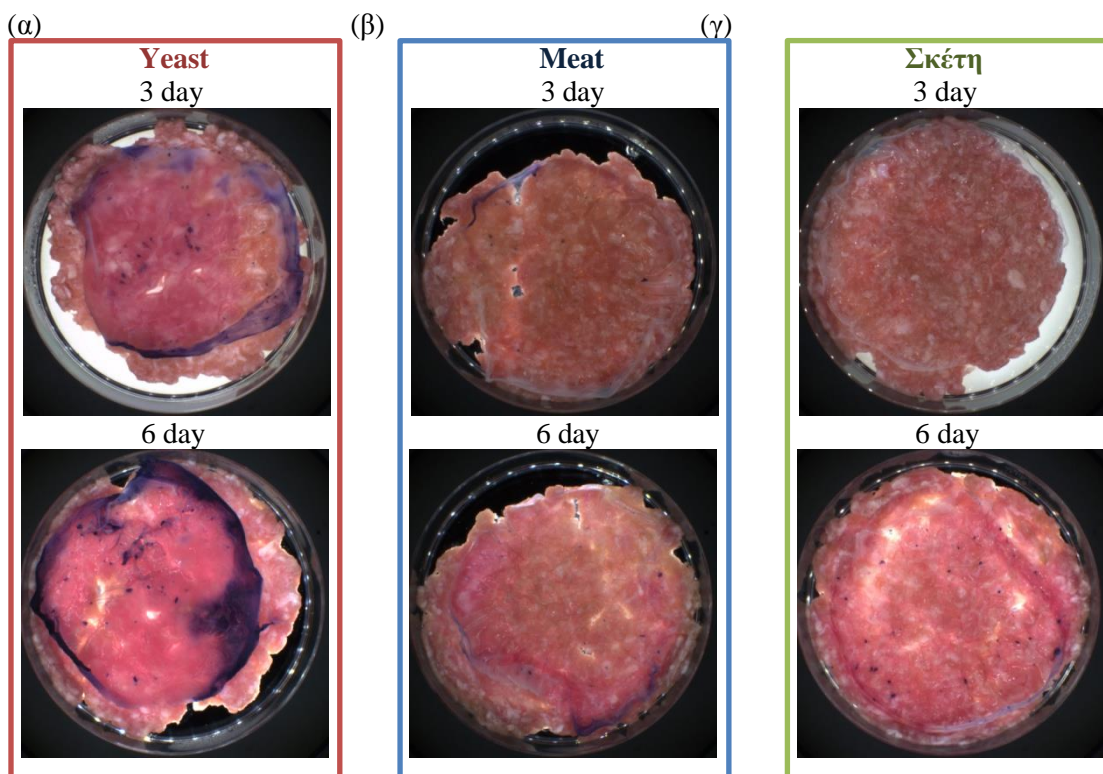


**Διάγραμμα 1:** Αποτελέσματα από δειγματοληψίες μεμβρανών, (α) μικροβιολογικά, (β) pH, (γ) προσδιορισμό χρώματος.

### 3.1.2 Σε χοιρινό κιμά

Από τις μεμβράνες που εφαρμόστηκαν σε χοιρινό κιμά φάνηκε ότι το καλύτερο ενισχυτικό ανάπτυξης είναι το yeast extract. Η σκέτη μεμβράνη δεν εμφάνισε μωβ χρωματισμό ούτε κατά την έκτη ημέρα συντήρησης (αρχή αλλοίωσης του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες), ενώ οι μεμβράνες με το meat extract εμφάνισαν ελάχιστο χρωματισμό.

Από τα παρόντα αποτελέσματα καθώς και από τα αποτελέσματα από τις μεμβράνες που εφαρμόστηκαν σε TSA, λαμβάνεται το συμπέρασμα ότι η καλύτερη μεμβράνη για την εκδήλωση μωβ χρώματος ήταν αυτή με την προσθήκη yeast extract.



**Εικόνα 2:** Φωτογραφίες μεμβρανών με προσθήκη διαφόρων ενισχυτικών ανάπτυξης (yeast, beef extract) κατά την 3<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης στους 5°C.

### 3.1.3. Τα συστατικά του TSA ως ενισχυτικά εκδήλωσης μωβ χρώματος στις μεμβράνες αλγινικών

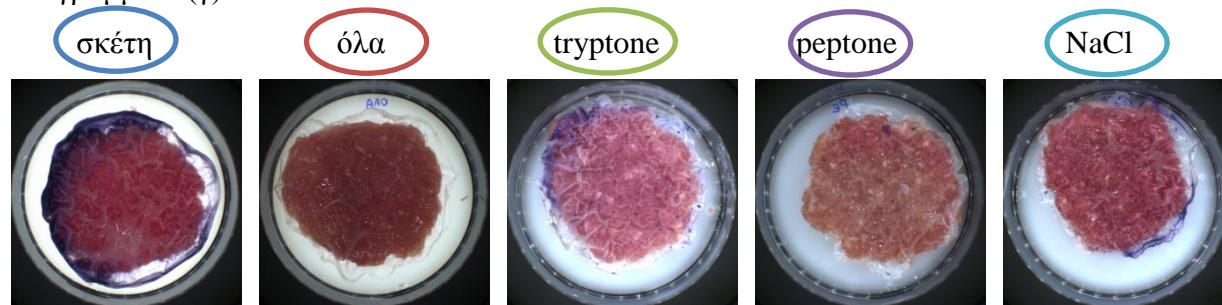
Στην προσπάθεια ενίσχυσης του μωβ χρωματισμού των μεμβρανών κατά την εφαρμογή τους σε χοιρινό κιμά, και λόγω της παρατήρησης ότι ο μωβ χρωματισμός εκδηλώθηκε περισσότερο όταν οι μεμβράνες εφαρμόστηκαν σε TSA, από ότι σε πραγματικά τρόφιμα, έγινε εμπλουτισμός των μεμβρανών με τα συστατικά του TSA και στην συνέχεια εφαρμογή τους σε χοιρινό κιμά.

Με βάση τα μικροβιολογικά Διάγραμμα 2 (α), την μηδενική ημέρα δειγματοληψίας από 5,3 Log CFU/g στην μεμβράνη με προσθήκη όλων των συστατικών του TSA έως 7,7 Log CFU/g στην μεμβράνη με προσθήκη τρυπτόνης. Κατά την έκτη ημέρα δειγματοληψίας ο υψηλότερος πληθυσμός εμφανίστηκε στην μεμβράνης με προσθήκη NaCl 9,1 Log CFU/g, ενώ ο χαμηλότερος παρατηρήθηκε στην μεμβράνη με προσθήκη όλων των συστατικών 8,4 Log CFU/g. Η σκέτη μεμβράνη, στην οποία δεν έγινε προσθήκη συστατικών TSA κατά την μηδενική ημέρα είχε πληθυσμό 6,6 Log CFU/g ενώ τελικό πληθυσμό 8,9 Log CFU/g.

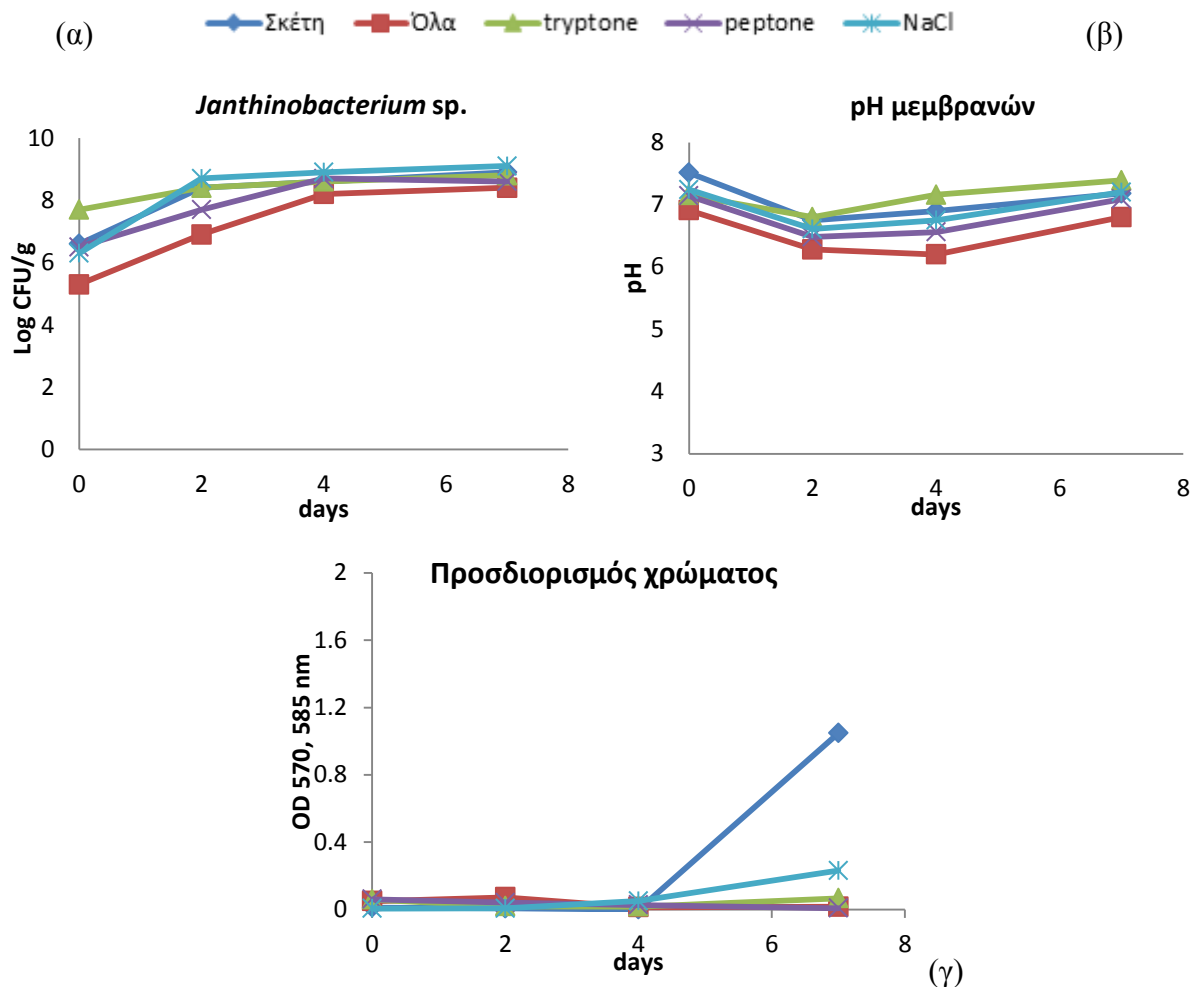


Το pH των μεμβρανών Διάγραμμα 2 (β), κατά την μηδενική ημέρα κυμάνθηκε από 6,91 στην μεμβράνη με όλα τα συστατικά έως 7,51 στην σκέτη μεμβράνη. Την δεύτερη ημέρα δειγματοληψίας παρατηρήθηκε σε όλες τις μεμβράνες πτώση του pH, ενώ από την τέταρτη ημέρα άρχισε μία μικρή σταθερή αύξηση με αποτέλεσμα το pH της έκτης ημέρας να είναι περίπου ίδιο με της μηδενικής ημέρας. Την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας, το χαμηλότερο pH παρατηρήθηκε στην μεμβράνη με όλα τα συστατικά, ενώ το υψηλότερο στην μεμβράνη με τρυπτόνη. Το pH της μεμβράνης με όλα τα συστατικά παρέμεινε όλες τις ημέρες χαμηλότερο και φαίνεται να υπήρχε συσχέτιση και με το χαμηλότερο μικροβιακό πληθυσμό στις ίδιες μεμβράνες. Η πτώση του pH κατά την δεύτερη ημέρα συνδέεται με την αλληλεπίδραση με το χαμηλό pH του κιμά, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3 (β).

Μωβ χρωματισμός στις μεμβράνες κατά την έκτη ημέρα εμφανίστηκε στην σκέτη μεμβράνη με τιμή  $1,05 \pm 0,24$  και την αμέσως επόμενη τιμή  $0,23 \pm 0,01$  εμφάνισε η μεμβράνη με προσθήκη NaCl. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού χρώματος συμπίπτουν και με τις φωτογραφίες. Σε όλες τις άλλες κατηγορίες μεμβρανών οι τιμές ήταν σχεδόν μηδενικές, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2 (γ).



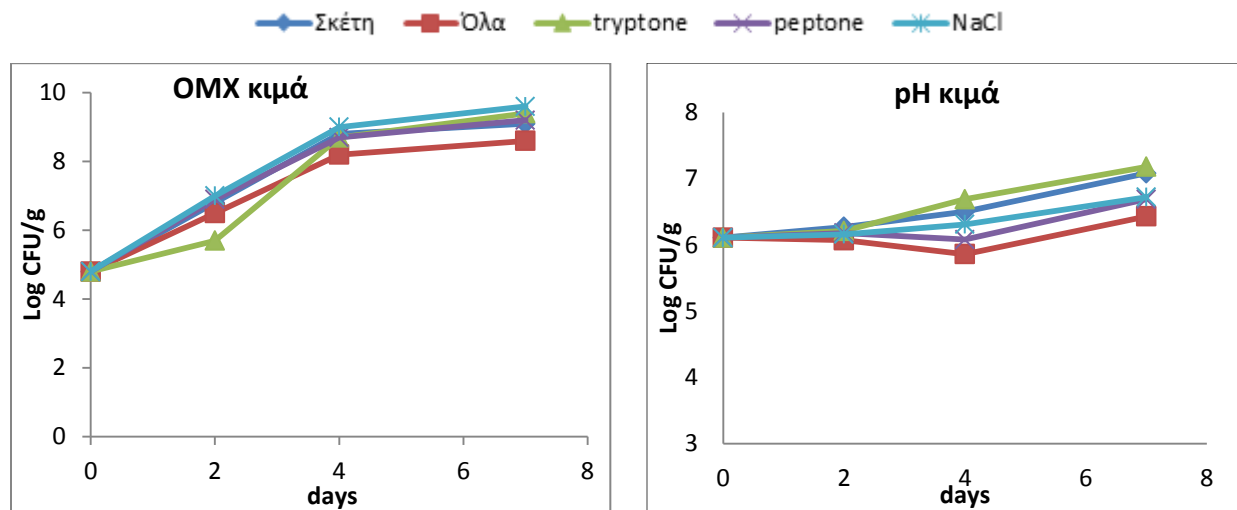
**Εικόνα 2:** Φωτογραφίες μεμβρανών με **yeast extract** και επιμέρους προσθήκη συστατικών του TSA, εφαρμοσμένων σε χοιρινό κιμά κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 5°.



**Διάγραμμα 2:** . Αποτελέσματα (α) μικροβιολογικά, (β) pH, (γ) προσδιορισμό χρώματος από δειγματοληψίες μεμβρανών με yeast extract και επιμέρους προσθήκη συστατικών του TSA, εφαρμοσμένων σε χοιρινό κιμά. Συντήρηση στους 5 °C υπό αερόβιες συνθήκες.

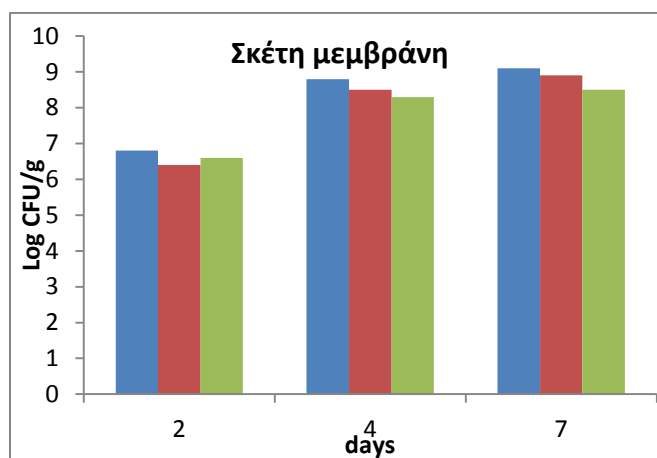
Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις δειγματοληψίες του κιμά. Ο αρχικός πληθυσμός της OMX του ήταν 4,8 Log CFU/g, ενώ την έκτη ημέρα οι πληθυσμοί κυμάνθηκαν από 8,6 Log CFU/g στον κιμά που είχε εφαρμοστεί η μεμβράνη με όλα τα συστατικά έως 9,6 Log CFU/g στο δείγμα που είχε μεμβράνη με προσθήκη NaCl.

Το pH του κιμά αυξήθηκε από μισή έως μία μονάδα από την αρχή έως το τέλος της συντήρησης. Το χαμηλότερο pH (βάλτε εδώ την τιμή) παρατηρήθηκε στον κιμά που είχε εφαρμοστεί η μεμβράνη με όλα τα συστατικά.



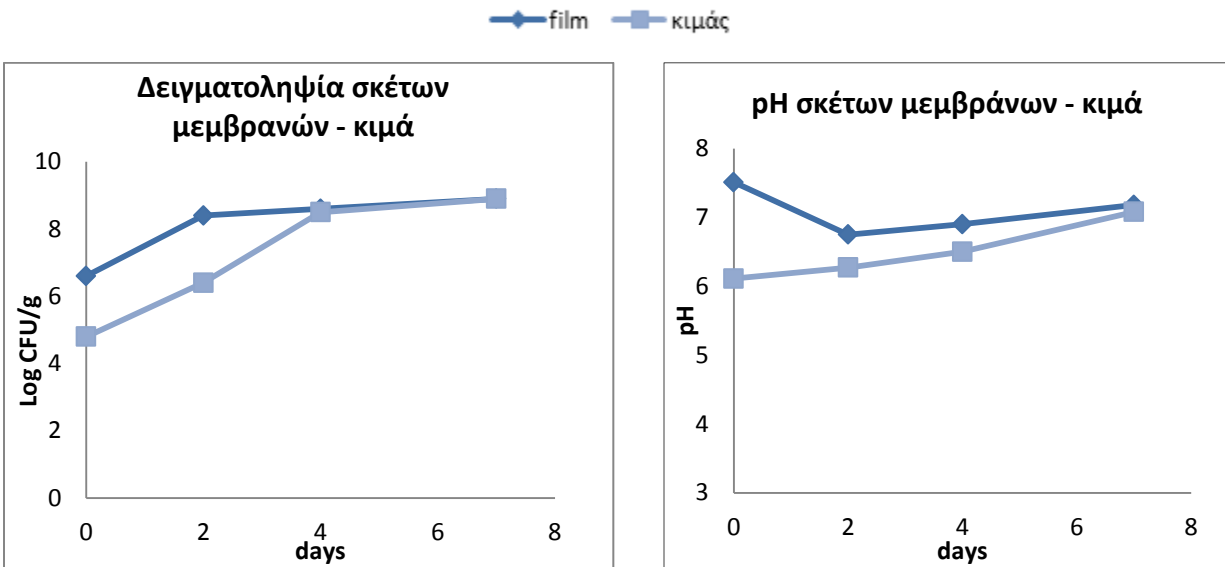
**Διάγραμμα 3:** Αποτελέσματα από δειγματοληψίες χοιρινού κιμά, (α) μικροβιολογικά, (β) pH

■ Συνολο ■ αλλοιογόνοι ■ *Janthinobacterium sp.*



**Διάγραμμα 4:** Αποτελέσματα από δειγματοληψίες κιμά στον οποίο έχουν εφαρμοστεί σκέτες μεμβράνες.

Στο Διάγραμμα 5, φαίνεται η συσχέτιση του πληθυσμού του *Janthinobacterium sp.* στην σκέτη μεμβράνη με την αλλοιογόνο χλωρίδα του κιμά. Κατά την τέταρτη ημέρα δειγματοληψίας φαίνεται ότι ο κιμάς και η μεμβράνη έχουν τον ίδιο πληθυσμό ~8 Log CFU/g.



(α)

(β)

**Διάγραμμα 5:** Αποτελέσματα α) μικροβιολογικά και β) pH από δειγματοληψίες σκέτων μεμβρανών (με yeast extract) και κιμά όπου και είχαν εφαρμοστεί οι μεμβράνες. Η συντήρηση των δειγμάτων έγινε στους 5 °C υπό αερόβιες συνθήκες.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η καλύτερη μεμβράνη είναι αυτή με yeast extract 0,6% χωρίς να βοηθάει η προσθήκη άλλων συστατικών.

### 3.2. Προσδιορισμός καλύτερης μεμβράνης με βάση τη συγκέντρωση εμβολίου

Η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα, στις μεμβράνες, στις επιφάνειες ή σε άλλες εφαρμογές (βιοαντιδραστήρες) είναι καθοριστική για την εξέλιξη του πληθυσμού τους και την επιτυχή εφαρμογή τους. Κρίθηκε αναγκαίο να προσδιοριστεί η ιδανική συγκέντρωση του *Janthinobacterium* sp. στις μεμβράνες αλγινικών προκειμένου να υπάρξει μωβ χρωματισμός τους και να επιτευχθεί ο στόχος της μελέτης. Εξετάστηκαν 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις εμβολίου *Janthinobacterium* sp. στις μεμβράνες, οι 2 Log CFU/g και οι 7 Log CFU/g. Οι μεμβράνες αυτές εφαρμόστηκαν σε TSA και συντηρήθηκαν στους 5° C υπό αερόβιες συνθήκες. Στις μεμβράνες έγινε προσδιορισμός του πληθυσμού του *Janthinobacterium* sp., της τιμής pH, της οπτικής πυκνότητας της παραγόμενης χρωστικής όπως επίσης και λήψη φωτογραφιών καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησής τους. Από τα προηγούμενα πειράματα της

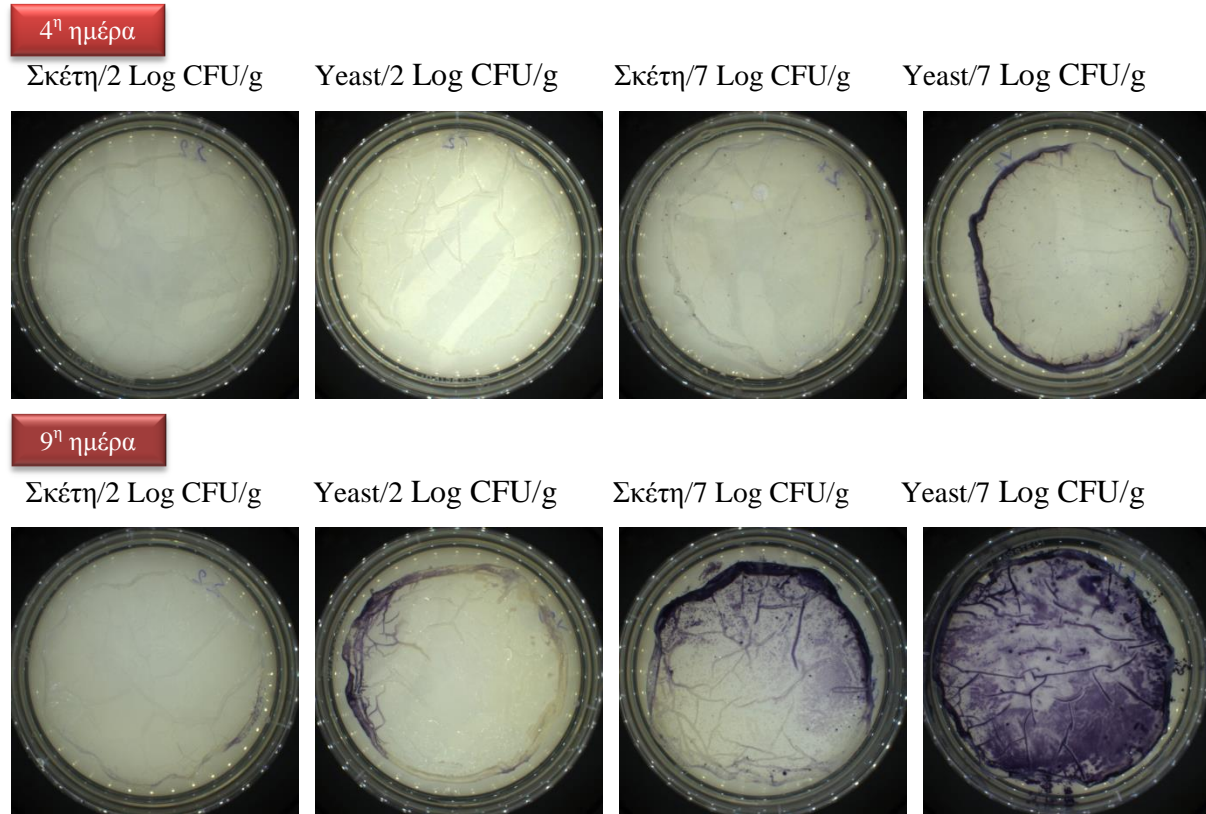
παρούσας εργασίας διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη yeast extract στις μεμβράνες με το *Janthinobacterium* sp. ήταν η πιο αποτελεσματική όσον αφορά την εκδήλωση μωβ χρωματισμού. Οπότε στην συνέχεια των πειραμάτων, στη σύσταση των μεμβρανών συμπεριλαμβάνεται και το yeast extract.

Από την οπτική παρακολούθηση (Εικόνα 3) φάνηκε ότι περισσότερο και πιο ομοιόμορφο μωβ χρωματισμό εκδήλωσε η μεμβράνη με προσθήκη yeast extract και συγκέντρωση εμβολίου 7 Log CFU/g. Το χρώμα ξεκίνησε να εκδηλώνεται κατά την 4<sup>η</sup> ημέρα, ενώ την 9<sup>η</sup> ήταν έντονο και ομοιόμορφο. Στην περίπτωση της σκέτης μεμβράνης με συγκέντρωση εμβολίου 2 Log CFU/g, χρώμα δεν εκδηλώθηκε ούτε την 9<sup>η</sup> ημέρα, ενώ στην περίπτωση της μεμβράνης με προσθήκη yeast extract και συγκέντρωση εμβολίου 2 Log CFU/g χρωματισμός εκδηλώθηκε κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα, αλλά δεν ήταν ούτε έντονος ούτε ομοιόμορφος. Η σκέτη μεμβράνη με συγκέντρωση εμβολίου 7 Log CFU/g, εκδήλωσε χρωματισμό την 9<sup>η</sup> ημέρα. Τα αποτελέσματα της οπτικής παρατήρησης συμπίπτουν με τα αποτελέσματα του προσδιορισμού χρώματος. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η μεμβράνη με yeast extract των 7 Log CFU/g, είχε τις υψηλότερες τιμές σε όλες τις δειγματοληψίες. Συγκεκριμένα, κατά την 9<sup>η</sup> ημέρα είχε τιμή 2,76, ενώ η σκέτη μεμβράνη των 7 Log CFU/g είχε την τιμή 1,47. Οι μεμβράνες των 2 Log CFU/g είχαν σχεδόν μηδενικές τιμές καθ' όλη την διάρκεια των δειγματοληψιών.

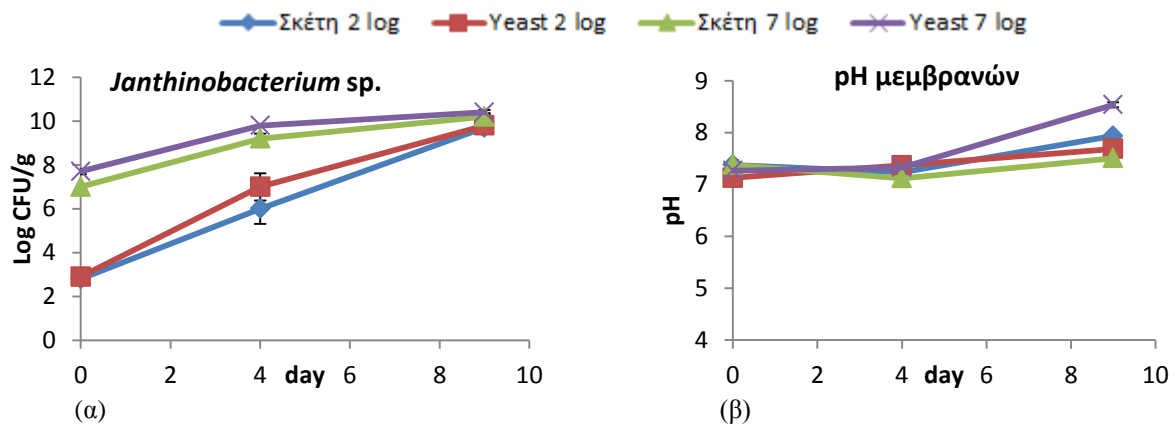
Όσον αφορά τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, η συγκέντρωση του εμβολίου δεν φάνηκε να επηρεάζει ιδιαίτερα τον πληθυσμό του *Janthinobacterium* sp. στις μεμβράνες κατά την ένατη ημέρα δειγματοληψίας. Οι τιμές κυμάνθηκαν από  $9,7 \pm 0,1$  Log CFU/g στην σκέτη μεμβράνη με εμβόλιο 2 Log CFU/g έως  $10,4 \pm 0,1$  Log CFU/g στην μεμβράνη με yeast extract με εμβόλιο 7 Log CFU/g. Κατά την μηδενική ημέρα, οι μεμβράνες των 2 Log CFU/g είχαν αρχικό πληθυσμό 2,8-2,9 Log CFU/g, ενώ οι μεμβράνες των 7 Log CFU/g είχαν αρχικό πληθυσμό 7 – 7,7 Log CFU/g. Κατά την τέταρτη ημέρα δειγματοληψίας παρατηρείται μεγάλη πληθυσμιακή απόκλιση μεταξύ των μεμβρανών με διαφορετική συγκέντρωση εμβολίου, περίπου κατά 2 Log CFU/g. Όλες τις ημέρες δειγματοληψίας, οι μεμβράνες με yeast extract τόσο στους 2 όσο και στους 7 Log CFU/g, είχαν υψηλότερο πληθυσμό.

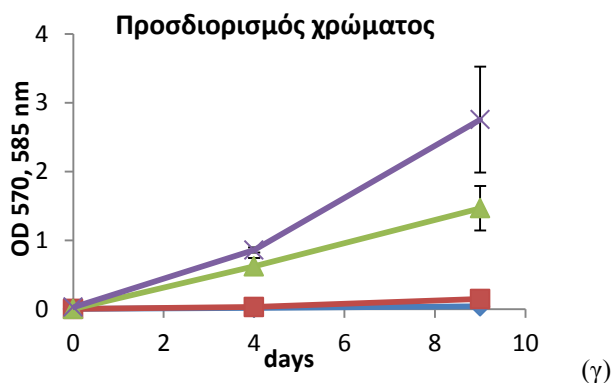
Η αρχική τιμή pH των μεμβρανών κυμάνθηκε από 7,14 έως 7,38. Παρατηρήθηκε σταθερότητα μέχρι την τέταρτη ημέρα δειγματοληψίας και αύξηση σε όλες τις περιπτώσεις κατά την ένατη ημέρα. Την τελευταία ημέρα το μεγαλύτερο pH παρατηρήθηκε στη μεμβράνη με yeast extract των 7 Log CFU/g με τιμή  $8,54 \pm 0,05$ .

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται ότι καλύτερη μεμβράνη είναι με προσθήκη **yeast extract** και συγκέντρωση εμβολίου **7 Log CFU/g**. Επιπλέον, φαίνεται ότι η προσθήκη yeast extract ενισχύει την εκδήλωση του μωβ χρωματισμού στις μεμβράνες, αλλά και την ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp..



**Εικόνα 3:** Φωτογραφίες μεμβρανών με και χωρίς προσθήκη yeast extract με ενσωμάτωση εμβολίου σε συγκέντρωση 2 Log CFU/g και 7 Log CFU/g κατά την 4<sup>η</sup> και 9<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 5°.





**Διάγραμμα 6:** Αποτελέσματα α) μικροβιολογικά, β) pH, γ) προσδιορισμός χρώματος από δειγματοληψίες μεμβρανών με και χωρίς προσθήκη yeast extract σε συνδυασμό με 2 ή 7 Log CFU/g εμβόλιο *Janthinobacterium* sp.. Εφαρμόστηκαν σε τρυβλία TSA και συντηρήθηκαν στους 5 °C.

### 3.3. Προσδιορισμός καλύτερης μεμβράνης με βάση τον τρόπο εφαρμογής και την ποσότητα του εμβολίου

Εξετάστηκε η περίπτωση εφαρμογής του εμβολίου στις μεμβράνες με ψεκάσμο και με ενσωμάτωση. Από τις φωτογραφίες (Εικόνα 4) φαίνεται ότι οι μεμβράνες με ενσωμάτωση εμβολίου εκδηλώνουν πιο έντονο και ομοιόμορφο χρωματισμό, ενώ δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διαφορά μεταξύ μεμβρανών με διαφορετική ποσότητα εμβολίου (100 και 500 μl/film) την έβδομη ημέρα. Τα ίδια αποτελέσματα διακρίνονται και στο διάγραμμα προσδιορισμού του χρώματος (Διάγραμμα 6γ), όπου η μεμβράνη με 100 μl/film είχε τιμή οπτικής πυκνότητας  $1,83 \pm 0,44$  κατά την έβδομη ημέρα, ενώ η μεμβράνη με 500 μl/film είχε τιμή  $1,88 \pm 0,41$ . Διαφορά παρατηρήθηκε, όμως, κατά την τέταρτη ημέρα, όπου εκδηλώθηκε πιο έντονος μωβ χρωματισμός και τιμή  $0,34 \pm 0,25$  στη μεμβράνη με 500 μl/film, ενώ η αντίστοιχη τιμή της μεμβράνης με 100 μl/film ήταν σχεδόν μηδενική.

Από τη δειγματοληψία των μεμβρανών ως προς την ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp., φάνηκε ότι ο ψεκάσμος πέτυχε μεγαλύτερο αρχικό πληθυσμό στις μεμβράνες συγκεκριμένα 7,8 Log CFU/g στην μεμβράνη με 150 μl/film και 8,1 Log CFU/g στη μεμβράνη με 450 μl/film, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της ενσωμάτωσης του εμβολίου ήταν 6 Log CFU/g στη μεμβράνη με 100 μl/film και 6,4 Log CFU/g στη μεμβράνη με 500 μl/film. Την 7<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας όμως οι διαφορές μεταξύ του τρόπου εφαρμογής και της ποσότητας του εμβολίου είχαν μειωθεί στο 0,5 Log CFU/g και δεν υπήρχε καμία διαφορά μεταξύ της ποσότητας του εμβολίου.

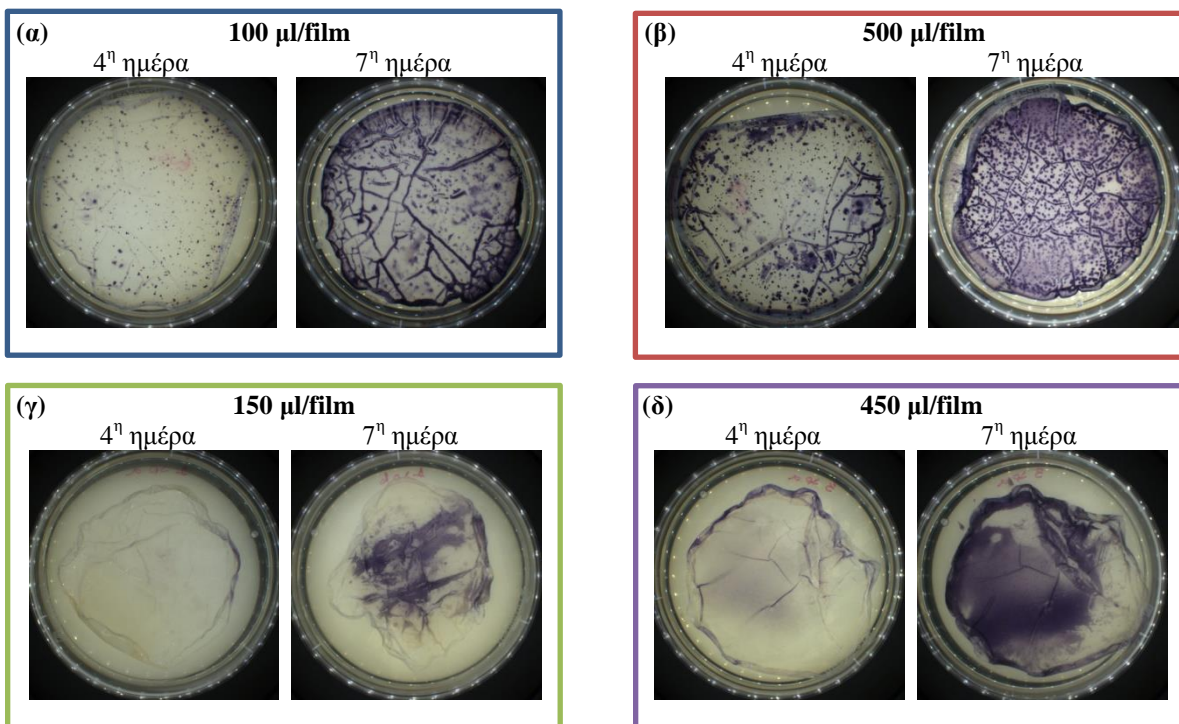
Στην μελέτη των (Gialamas et al., 2010 ) εξετάστηκε η βιωσιμότητα του *Lactobacillus sakei* που προστέθηκε σε μεμβράνες καζείνης. Φάνηκε, ότι όταν τα βακτηριακά κύτταρα ψεκάστηκαν στην επιφάνεια των μεμβρανών, παρατηρήθηκε μια μείωση του πληθυσμού κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου. Από την άλλη πλευρά, η ενσωμάτωση των βακτηριακών κυττάρων στην μεμβράνη οδήγησε σε μεγαλύτερη βιωσιμότητα. Το *L. sakei* αυξήθηκε από 5,7 Log CFU/g σε 7 Log CFU/g κατά την 4<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας. Από τα δεδομένα της βιωσιμότητας των *Lactobacillus acidophilus* και *Bifidobacterium bifidum*, με αρχική συγκέντρωση 10<sup>9</sup> CFU / ml, οι πληθυσμοί τους παρέμειναν αρκετά σταθερά για 6 ημέρες. Και τα δύο είδη παρέμειναν βιώσιμα και ήταν σε θέση να αναπτυχθούν.

Στην μελέτη των (Sánchez-González et al., 2014) εξετάστηκε η βιωσιμότητα του *L. acidophilus* και *L. reuteri* προστιθέμενα σε μεμβράνες μεθυλοκυτταρίνης και καζεϊνικού νατρίου κατά την περίοδο ενός μηνός στους 5°C και 75% RH. Η βιωσιμότητα του *L. acidophilus* ήταν μεγαλύτερη από εκείνη του *L. reuteri* και στα δύο είδη μεμβρανών. Στην περίπτωση του *L. reuteri*, σημαντική μείωση του αρχικού πληθυσμού παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας της αποθήκευσης, η οποία υποδεικνύει ότι αυτό το στέλεχος είναι πιο ευαίσθητο στο στρες.

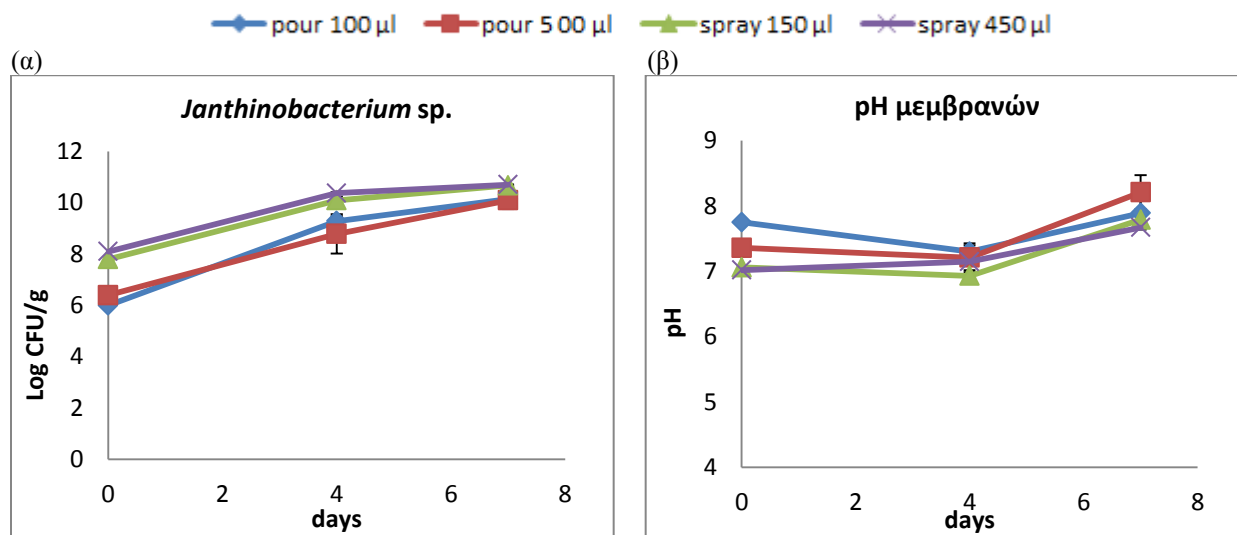
Στην μελέτη των Tapia et al. (2007) φάνηκε ότι το *B. lactis* (σε συγκέντρωση 10<sup>9</sup> CFU/ g) που ενσωματώθηκε σε επιστρώσεις αλγινικού άλατος και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν σε μήλο και παπάγια, μειώθηκε κατά περίπου 2 Log CFU/g μετά την αφυδάτωση της μεμβράνης , και παρέμεινε σταθερός ο πληθυσμός για 10 ημέρες στους 2° C.

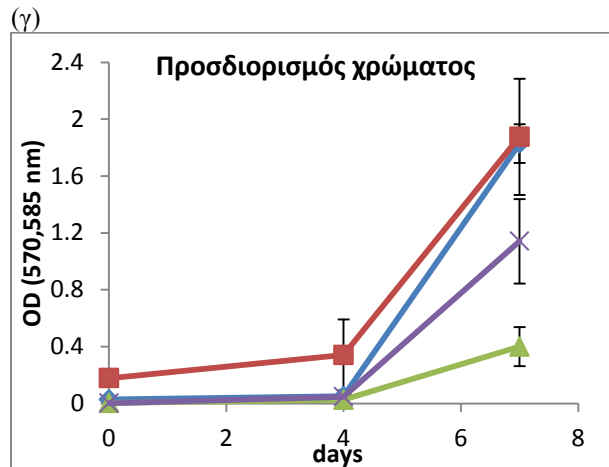
Το pH στις μεμβράνες που ενσωματώθηκε το εμβόλιο (Διάγραμμα 7β) φάνηκε να είναι λίγο υψηλότερο καθ' όλη τη διάρκεια των δειγματοληψιών τους . Συγκεκριμένα, κατά τη μηδενική ημέρα δειγματοληψίας, οι τιμές pH των μεμβρανών κυμάνθηκαν από 7,02±0,10 στην μεμβράνη με ψεκασμό 450 μl/film έως 7,75±0,06 στην μεμβράνη με ενσωμάτωση 100 μl/film. Την έβδομη ημέρα, το χαμηλότερο pH εμφανίστηκε πάλι στη μεμβράνη με ψεκασμό 450 μl/film με τιμή 7,67±0,03, ενώ το υψηλότερο στη μεμβράνη με ενσωμάτωση 500 μl/film με τιμή 8,21±0,26.





**Εικόνα 4:** Φωτογραφίες μεμβρανών πάνω σε TSA με α) ενσωμάτωση 100  $\mu\text{l}/\text{film}$ , β) ενσωμάτωση 500  $\mu\text{l}/\text{film}$ , γ) ψεκασμό 150  $\mu\text{l}/\text{film}$ , δ) ψεκασμό 450  $\mu\text{l}/\text{film}$  μετά από συντήρησή τους στους 5 °C.





**Διάγραμμα 7:** Αποτελέσματα α) μικροβιολογικά, β) pH, γ) προσδιορισμός χρώματος από δειγματοληψίες μεμβρανών με διαφορετικούς τρόπους εφαρμογής και διαφορετικές ποσότητες εμβολίου.

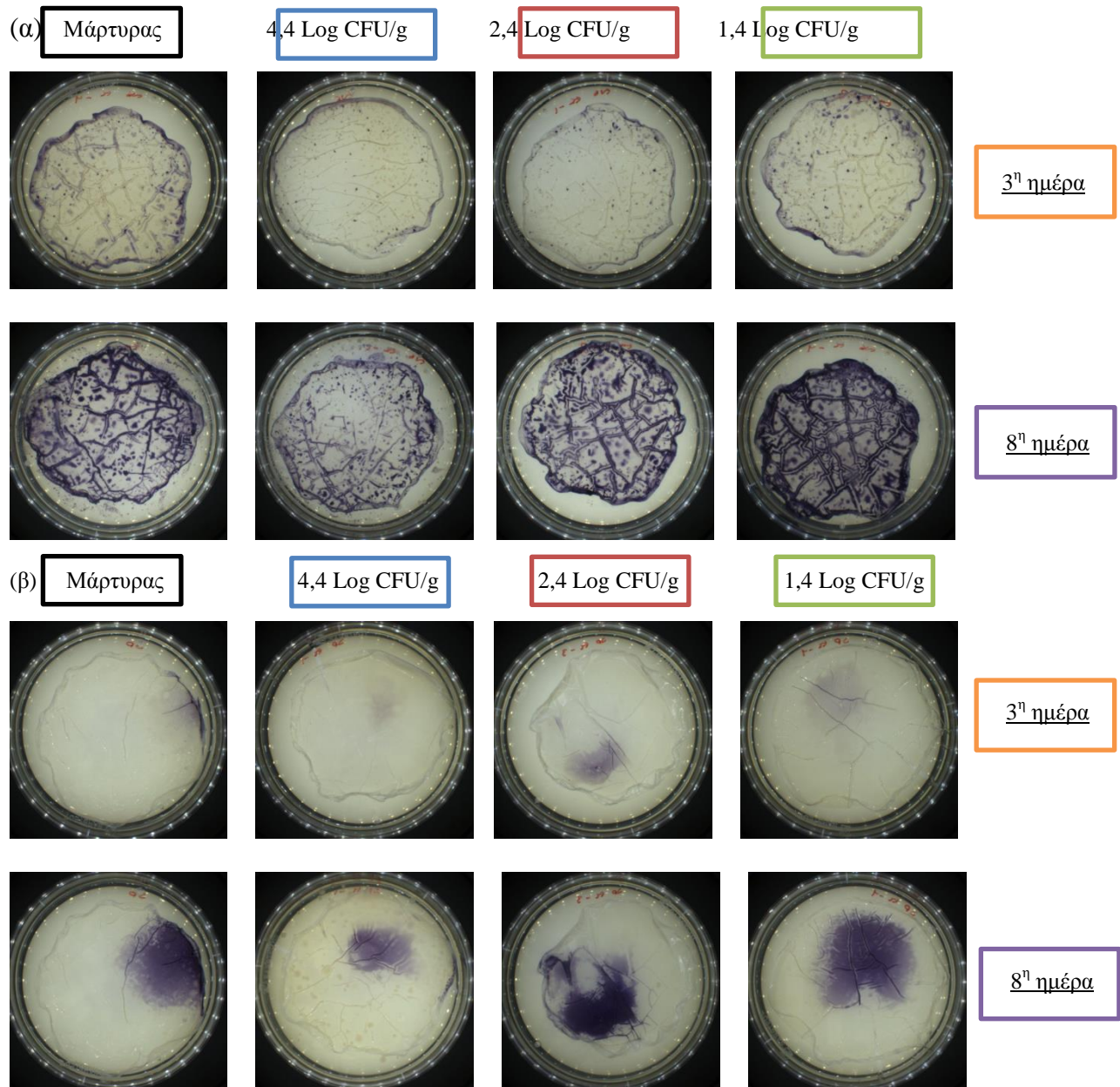
Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα **καλύτερος τρόπος εφαρμογής του εμβολίου φαίνεται να είναι η ενσωμάτωση**, ενώ ιδανική ποσότητα του εμβολίου **100 μl/film**.

### 3.4. Έλεγχος εκδήλωσης μωβ χρωματισμού παρουσία ανταγωνιστικής χλωρίδας

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να εφαρμοστεί η μεμβράνη με το *Janthinobacterium* sp. πάνω σε ευαλλοιώτα τρόφιμα (κιμάς) και να μπορέσει να ενημερώσει (με την αλλαγή χρώματος) τους καταναλωτές για την αλλοίωση του τροφίμου. Στο περιβάλλον του τροφίμου η μεμβράνη θα έρθει σε επαφή και με την αλλοιογόνο μικροχλωρίδα του τροφίμου. Έτσι λοιπόν κρίθηκε αναγκαία η μελέτη της συμπεριφοράς της μεμβράνης με *Janthinobacterium* sp. όταν αυτή βρεθεί μαζί με την μικροχλωρίδα του χοιρινού κιμά, έχοντας περιορίσει τους υπόλοιπους παράγοντες (δομή και σύσταση του τροφίμου). Για την απάντηση των παραπάνω ερωτημάτων ακολούθησαν πειράματα όπου σε τρυβλία TSA έγινε επίστρωση αλλοιογόνου χλωρίδας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (-1, -3, -4) και στη συνέχεια εφαρμογή μεμβρανών με ενσωμάτωση ή ψεκασμό του *Janthinobacterium* sp.. Τα δείγματα αυτά συντηρήθηκαν στους 5° C και έγιναν όλες οι προαναφερθέντες μετρήσεις σε όλη τη διάρκεια της συντήρησής τους.

Από τον έλεγχο εκδήλωσης του μωβ χρώματος στη μεμβράνη παρουσία ανταγωνιστικής χλωρίδας βγήκαν τα εξής συμπεράσματα (Εικόνα 5). Πρώτον, φαίνεται ότι ο μωβ χρωματισμός εκδηλώνεται παρουσία ανταγωνιστικής χλωρίδας. Δεύτερον, παρατηρείται μία μικρή αναστολή στην εκδήλωση χρωματισμού στην περίπτωση της παρουσίας υψηλότερου αρχικού φορτίου

ανταγωνιστικής χλωρίδας (4,4 Log CFU/g). Τρίτον, ενισχύεται ο μωβ χρωματισμός παρουσία χαμηλού φορτίου αρχικής ανταγωνιστικής χλωρίδας (1,4 Log CFU/g). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά μπορεί να βοήθησε στην εκδήλωση μωβ χρώματος στις μεμβράνες πάνω στα τρυβλία TSA. Τα αποτελέσματα ταυτίζονται ανεξάρτητα από τον τρόπο εφαρμογής του εμβολίου στις μεμβράνες.



**Εικόνα 4:** Φωτογραφίες μεμβρανών που έχουν εφαρμοστεί σε τρυβλία TSA ενοφθαλμισμένα με εκχυλίσματα χοιρινού κιμά σε διάφορες αραιώσεις ώστε να επέλθουν οι κατάλληλες συγκεντρώσεις μικροβιακού φορτίου. α) μεμβράνες με ενσωμάτωση εμβολίου, β) μεμβράνες με

ψεκασμό εμβολίου. Τα δείγματα ‘‘Μάρτυρας’’ είναι οι περιπτώσεις όπου μεμβράνες με *Janthinobacterium* sp. εφαρμόστηκαν σε τρυβλία TSA χωρίς αυτά να έχουν εκχύλισμα κιμά.

### **3.5. Έλεγχος εκδήλωσης μωβ χρωματισμού σε συνθήκες κενού (VP), MAP και αερόβιες συνθήκες**

Εφαρμόστηκαν μεμβράνες με προσθήκη yeast extract και συγκέντρωση εμβολίου 7 Log CFU/g σε TSA, με σκοπό την εξέταση εμφάνισης μωβ χρωματισμού σε συνθήκες κενού και MAP. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους 5°C.

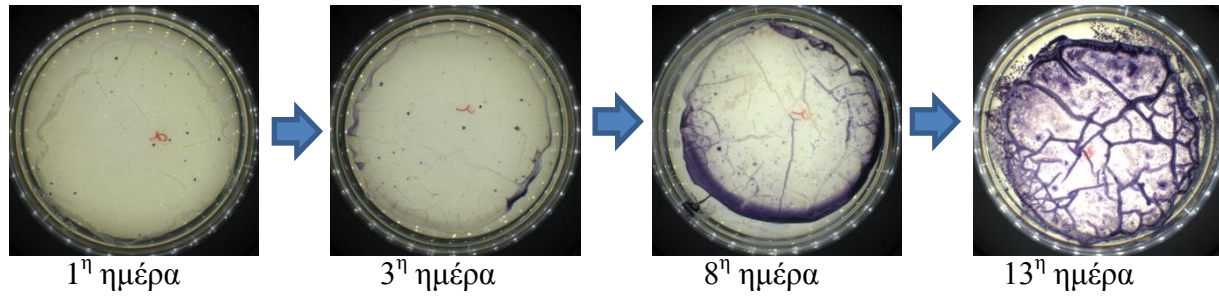
Από την οπτική παρακολούθηση (Εικόνα 5) φαίνεται ότι μόνο οι μεμβράνες που ήταν συντηρημένες σε αερόβιες συνθήκες εκδήλωσαν χρωματισμό. Ο μωβ χρωματισμός ξεκίνησε να εκδηλώνεται κατά την 3η ημέρα συντήρησης στους 5°C, ενώ είναι εντονότερος την 8η και 13η ημέρα. Οι μεμβράνες που ήταν συντηρημένες στο κενό και στο MAP δεν εκδήλωσαν καθόλου χρώμα κατά τη διάρκεια της συντήρησης τους. Η οπτική παρακολούθηση συμβαδίζει με τον προσδιορισμό του χρώματος με τη χρήση Bioscreen, όπου η μεμβράνες την 8<sup>η</sup> και 13<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας είχαν τιμή 1 και 3 αντίστοιχα, ενώ οι τιμές των μεμβρανών σε κενό και MAP παρέμειναν μηδενικές καθ’ όλη την διάρκεια των δειγματοληψιών.

Ως προς τα μικροβιολογικά αποτελέσματα (Διάγραμμα 8) τη μεγαλύτερη αύξηση του *Janthinobacterium* sp. , όπως ήταν και αναμενόμενο παρουσίασε η μεμβράνη που συντηρήθηκε στον αέρα, ενώ τη μικρότερη, η μεμβράνη στο κενό, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι το *Janthinobacterium* sp. προτιμά αερόβιες συνθήκες (Pantarella et al., 2007). Ο αρχικός πληθυσμός των μεμβρανών ήταν 6,3±0,3 Log CFU/g, ενώ ο πληθυσμός των μεμβρανών κατά την 13<sup>η</sup> ημέρα έφτασε τους 9,9 Log CFU/g, 8,4±0,3 Log CFU/g, 8,7±0,2 Log CFU/g για τον αέρα, κενό και MAP αντίστοιχα. Η μεμβράνη που αποθηκεύτηκε σε MAP φαίνεται να έχει πιο αργή ανάπτυξη, αφού την 3<sup>η</sup> ημέρα διαφέρει κατά 1 Log CFU/g από τη μεμβράνη στο κενό και 2 Log CFU/g από τη μεμβράνη στον αέρα, ενώ την 8<sup>η</sup> και 13<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός στην μεμβράνη στο MAP είχε παρόμοια αύξηση με τη μεμβράνη στο κενό.

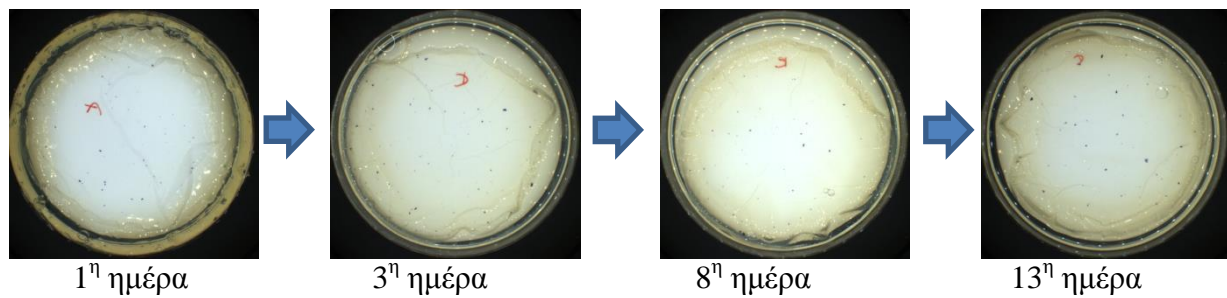
Το pH των μεμβρανών παρουσίασε διαφορές ανάλογα με τις συνθήκες συντήρησης. Το υψηλότερο pH εμφανίστηκε στην μεμβράνη στον αέρα, ενώ το χαμηλότερο στην μεμβράνη σε MAP. Στην περίπτωση του αέρα αυξήθηκε η τιμή από 6,88±0,09 την μηδενική ημέρα σε 8,29 την 13<sup>η</sup> ημέρα. Στην μεμβράνη στο κενό, παρατηρήθηκε μία αύξηση στην τιμή 7,51±0,01 την 3<sup>η</sup> ημέρα και στην συνέχεια πτώση με αποτέλεσμα την 13<sup>η</sup> ημέρα να έχει τιμή 7,18±0,13. Το pH

στην μεμβράνη στο MAP εμφάνισε την μεγαλύτερη τιμή  $7,69 \pm 0,03$  την 8<sup>η</sup> ημέρα, ενώ την 13<sup>η</sup> ημέρα μειώθηκε στο  $7,11 \pm 0,06$ .

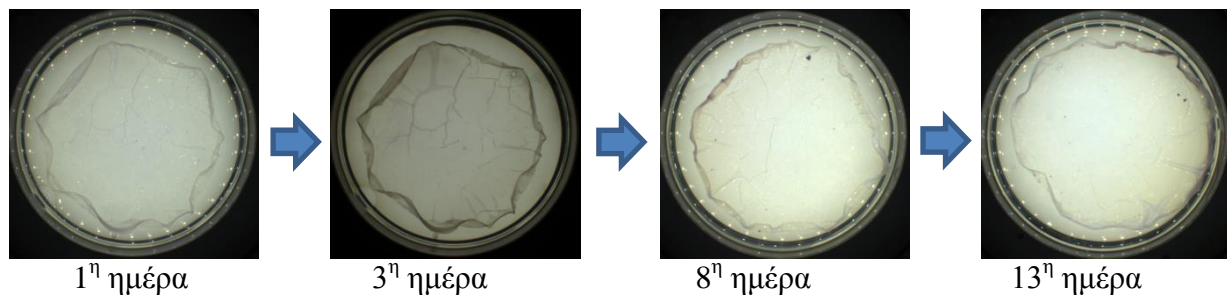
### Αέρας



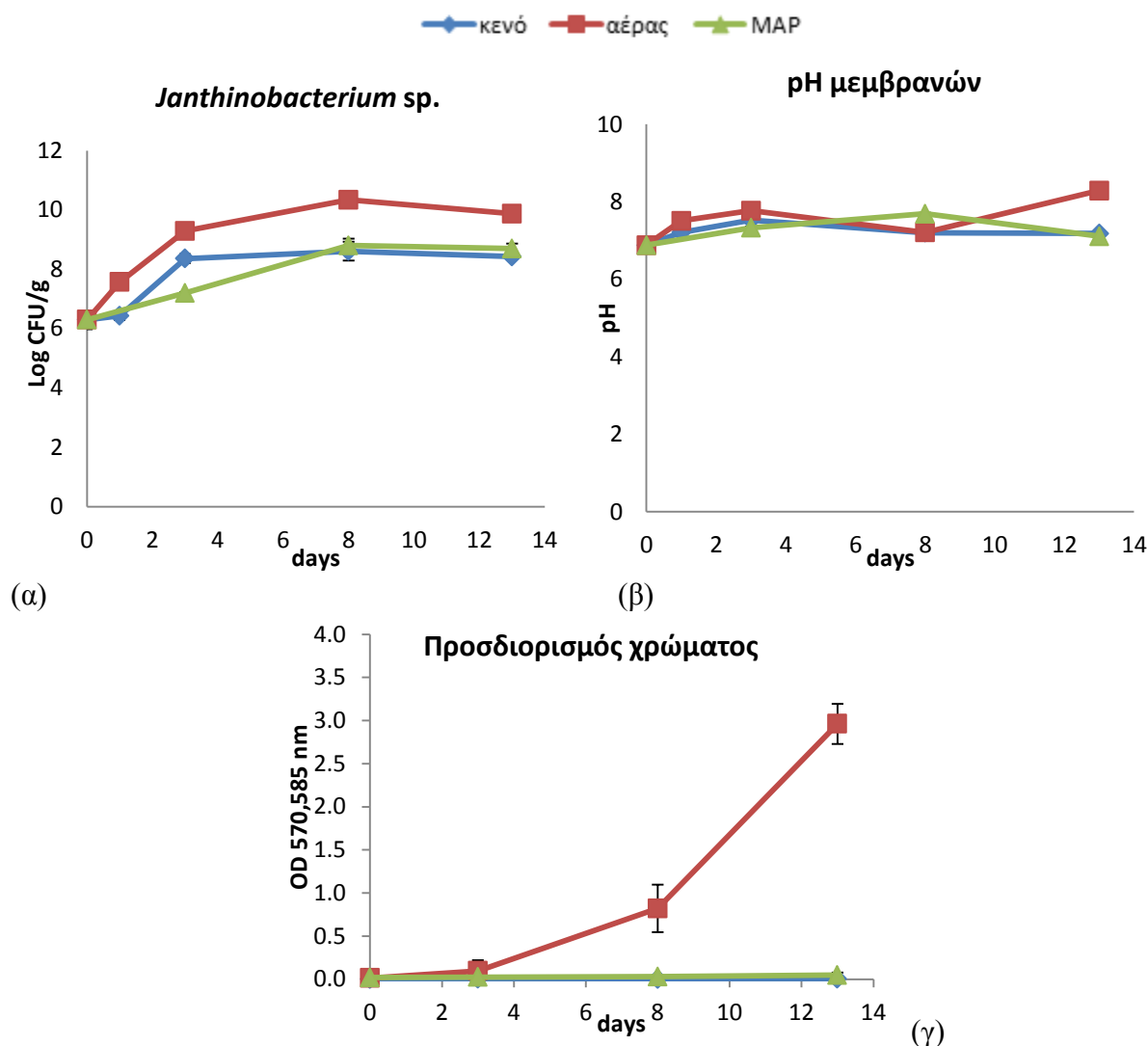
### Κενό



### MAP



**Εικόνα 5:** Φωτογραφίες μεμβρανών που έχουν εφαρμοστεί σε τρυβλία TSA και αποθηκεύτηκαν σε αερόβιες συνθήκες, κενό και MAP στους 5°C.



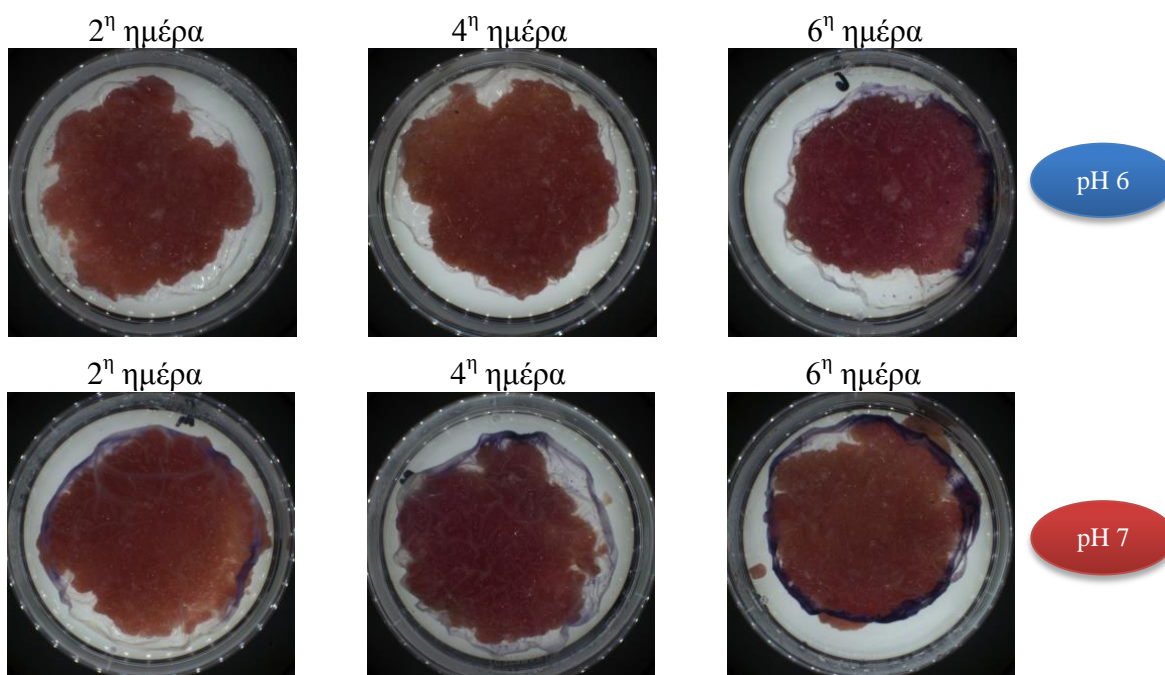
**Διάγραμμα 8:** Αποτελέσματα α) μικροβιολογικά, β) pH, γ) προσδιορισμός χρώματος από δειγματοληψίες μεμβρανών εφαρμοσμένων σε TSA και αποθηκευμένων σε αέρα, κενό και σε MAP στους 5 °C.

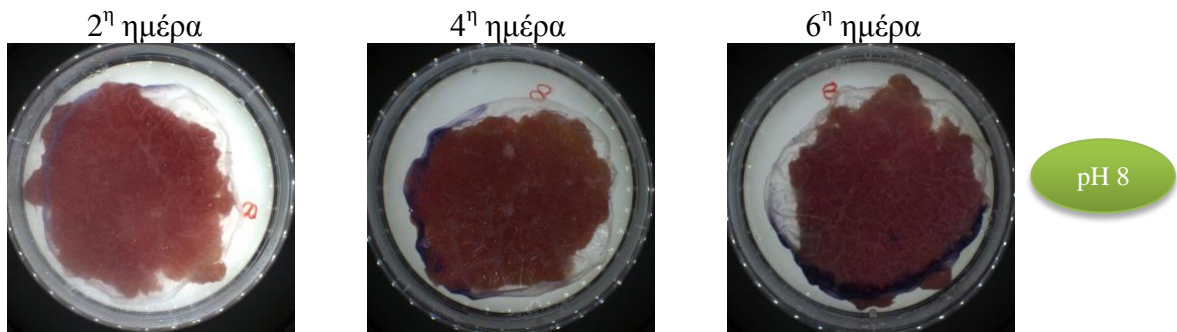
### 3.6. Ρύθμιση pH μεμβρανών

Από τα αποτελέσματα της ρύθμισης του pH των μεμβρανών, όσον αφορά την οπτική παρακολούθηση φαίνεται ότι στα pH 7 και 8 η μεμβράνη άρχισε να εκδηλώνει μωβ χρωματισμό κατά την 4<sup>η</sup> ημέρα, ενώ την 6<sup>η</sup> ημέρα είναι ακόμα πιο έντονος. Αντίθετα στην περίπτωση της μεμβράνης με pH 6 ο χρωματισμός εκδηλώθηκε την 6<sup>η</sup> ημέρα και ήταν ανεπαίσθητος. Τα αποτελέσματα αυτά συμπίπτουν και με τον προσδιορισμό χρώματος με Bioscreen όπου φαίνεται ότι εντονότερο χρωματισμό εκδήλωσε η μεμβράνη με pH 7, αφού την 6<sup>η</sup> ημέρα είχε την τιμή  $0,71 \pm 0,11$ , ενώ η μεμβράνη με pH 6 και 8 είχαν τιμές  $0,01 \pm 0,00$  και  $0,31 \pm 0,08$  αντίστοιχα.

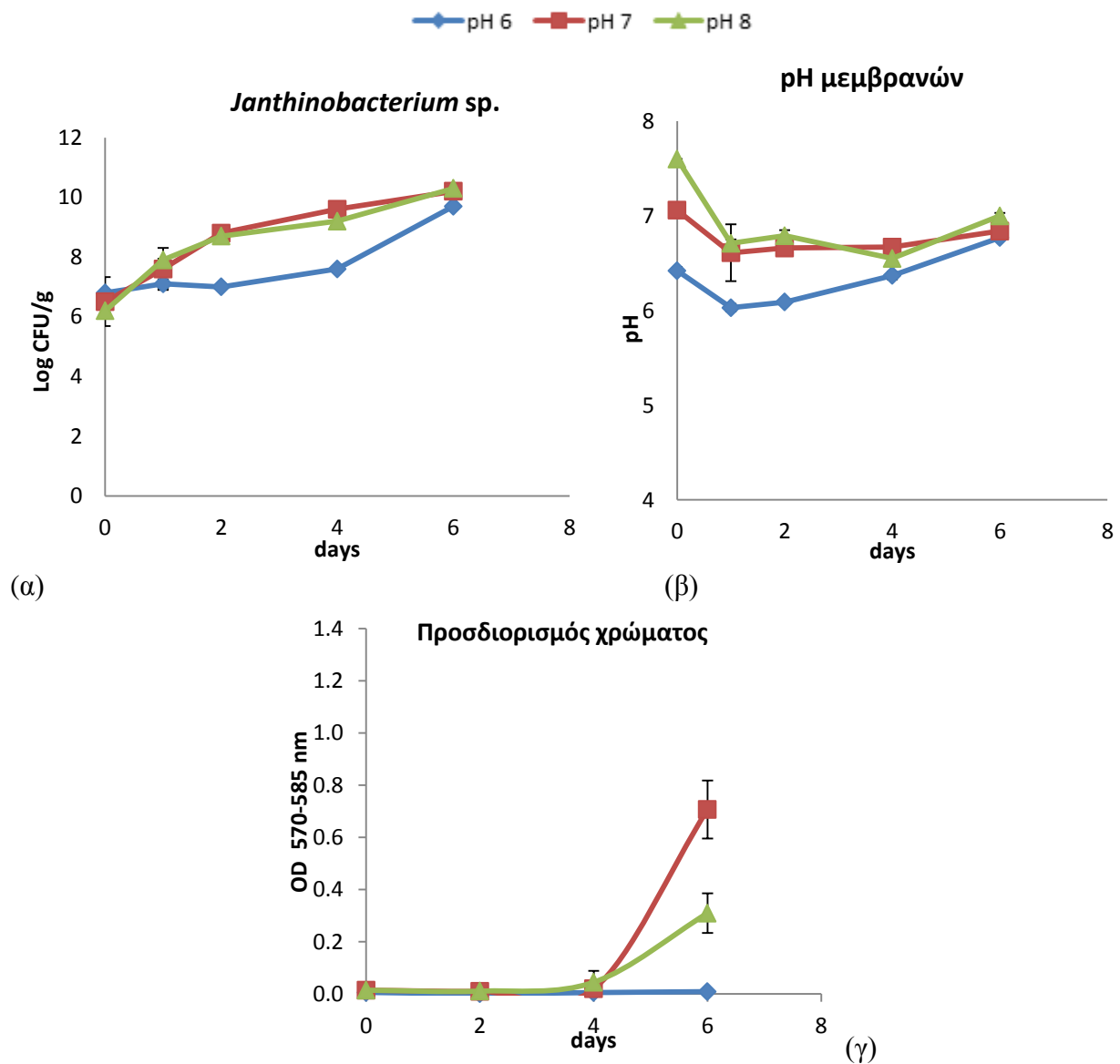
Όσον αφορά το μικροβιολογικό φορτίο των μεμβρανών, δεν παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των μεμβρανών με pH 7 και 8, ενώ η μεμβράνη με pH 6 είχε αργή αύξηση μέχρι την 4<sup>η</sup> ημέρα, ενώ την 6<sup>η</sup> ημέρα αυξήθηκε πολύ. Ο αρχικός πληθυσμός της μεμβράνης με pH 6 ήταν  $6,8 \pm 0,5$  Log CFU/g, ενώ ο πληθυσμός κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα είχε φτάσει τους  $9,7 \pm 0,1$  Log CFU/g. Η μεμβράνη με pH 7 είχε αρχικό πληθυσμό  $6,5 \pm 0,4$  Log CFU/g και τελικό πληθυσμό  $10,3 \pm 0,1$  Log CFU/g, ενώ η μεμβράνη με pH 8 εκδήλωσε αρχικό μικροβιακό φορτίο  $6,2 \pm 0,5$  Log CFU/g και τελικό πληθυσμό  $10,2 \pm 0,1$  Log CFU/g. Σε καμία από τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε μεταφορά της αλλοιογόνου χλωρίδας του κιμά στις μεμβράνες, γεγονός που οφείλεται πιθανόν στον υψηλό πληθυσμό του *Janthinobacterium* sp. στις μεμβράνες.

Όσον αφορά το pH των μεμβρανών, η μεμβράνη με pH 6 είχε την μηδενική ημέρα  $6,42 \pm 0,04$ , την 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> ημέρα σημείωσε πτώση  $6,03 \pm 0,04$  και  $6,09 \pm 0,01$  αντίστοιχα, ενώ την 6<sup>η</sup> ημέρα είχε τιμή  $6,77 \pm 0,01$ . Η μεμβράνη με pH 7 είχε αρχικό pH  $7,06 \pm 0,07$ . Παρατηρήθηκε πτώση από την 1<sup>η</sup> ημέρα και την 6<sup>η</sup> ημέρα είχε τιμή  $6,84 \pm 0,04$ . Η μεμβράνη με pH 8 είχε αρχική τιμή 7,60. Από την 1<sup>η</sup> ημέρα εκδηλώθηκε πτώση του pH και την 6<sup>η</sup> ημέρα είχε τιμή  $7,00 \pm 0,03$ .





**Εικόνα 6:** Μεμβράνες με yeast extract, *Janthinobacterium* sp. και με ρυθμισμένα pH (6,7 και 8) εφαρμοσμένες σε χοιρινό κιμά.

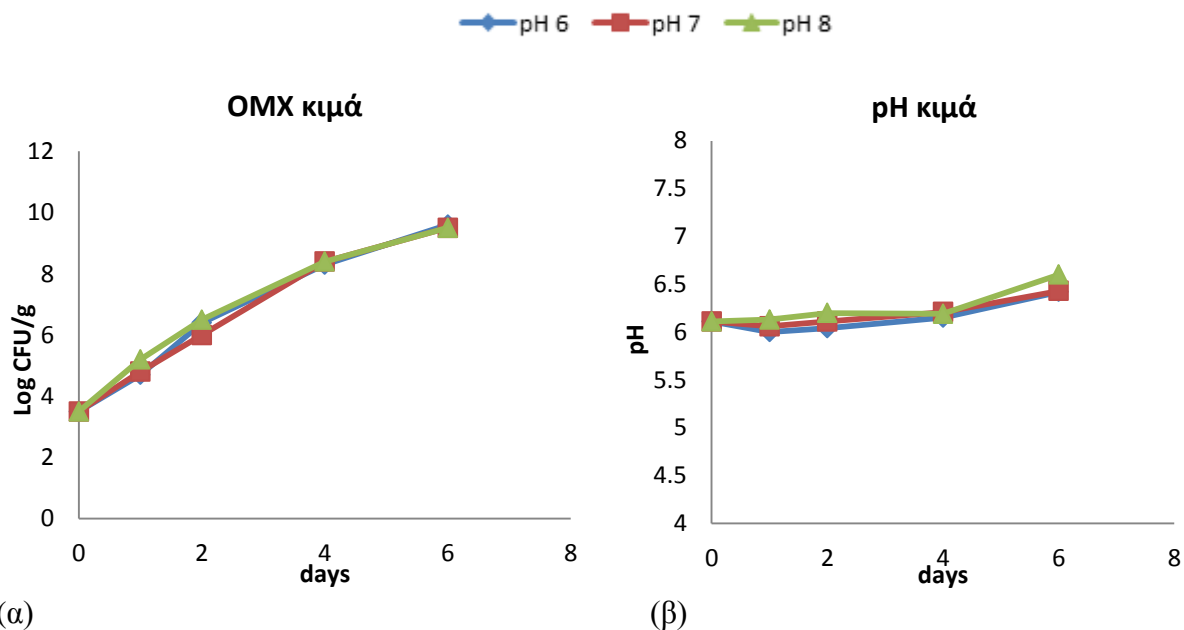


**Διάγραμμα 9:** Αποτελέσματα α) μικροβιολογικά, β) pH, γ) προσδιορισμός χρώματος, από δειγματοληψίες μεμβρανών με ρυθμισμένο pH (6,7 και 8), εφαρμοσμένων σε χοιρινό κιμά και συντηρημένων στους 5 °C.

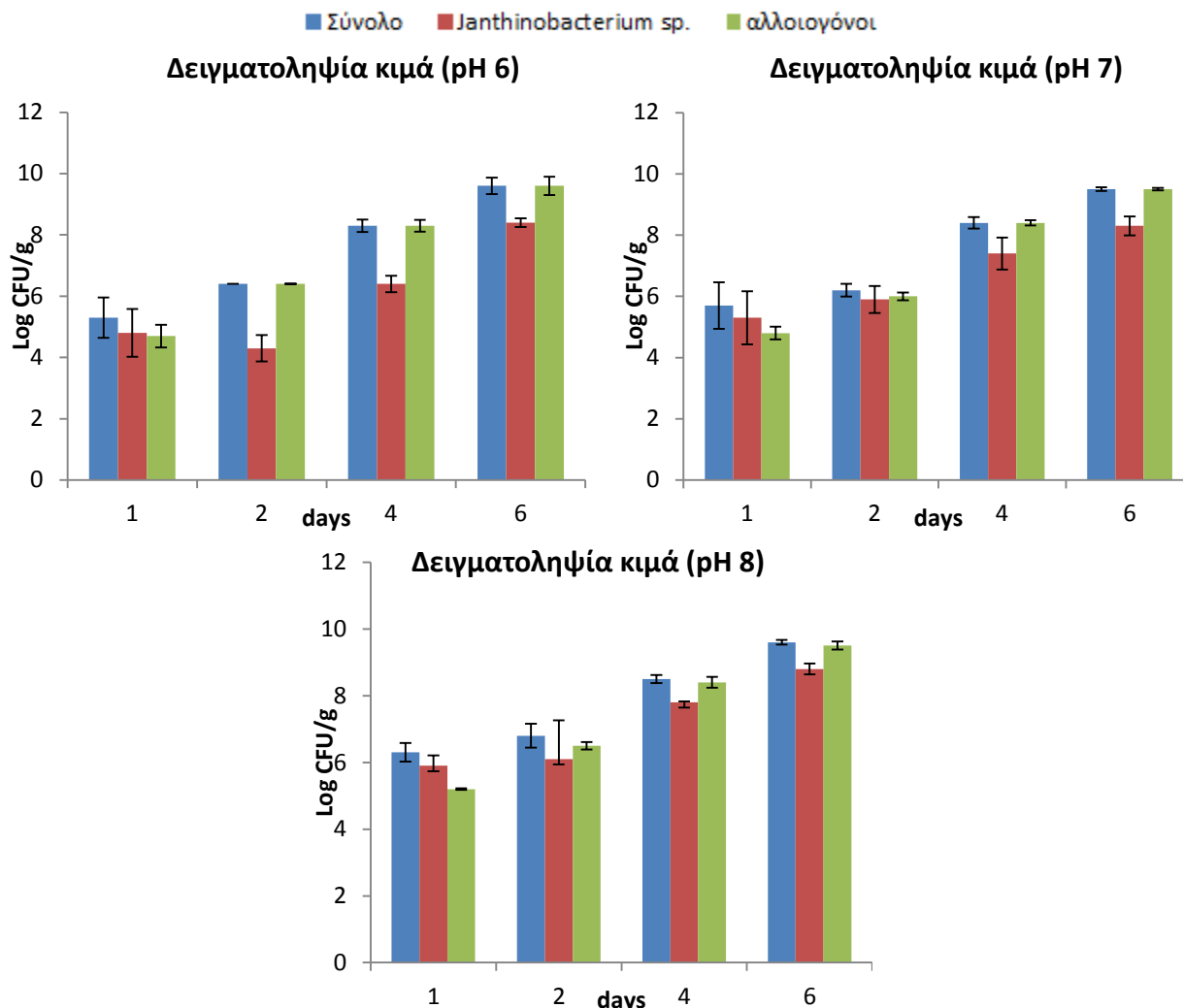


Από τα αποτελέσματα της δειγματοληψίας του κιμά δεν παρατηρούνται διαφορές ανάλογα με την κατηγορία της μεμβράνης που του είχε εφαρμοστεί, ούτε στο μικροβιακό φορτίο ούτε στο pH. Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του χοιρινού κιμά ήταν  $3,5 \pm 0,2$  Log CFU/g και έφτασε  $9,5 \pm 0,1$  Log CFU/g την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησης στους 5°C. Τη μηδενική ημέρα το pH του κιμά ήταν  $6,11 \pm 0,07$ , ενώ την 6<sup>η</sup> ημέρα αυξήθηκε και έφτασε  $6,43 \pm 0,06$  (Διάγραμμα 10).

Επιπλέον, από τα αποτελέσματα (Διάγραμμα 11) φάνηκε μεγάλη μεταφορά του *Janthinobacterium* sp. από τη μεμβράνη στον κιμά. Ιδιαίτερα παρατηρείται στις μεμβράνες με pH 7 και 8 την 4<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας. Η μεταφορά του *Janthinobacterium* sp., ίσως να οφείλεται στον αρχικό υψηλό πληθυσμό του *Janthinobacterium* sp., σε αντίθεση με το συγκριτικά χαμηλότερο αρχικό μικροβιακό φορτίο του κιμά.



**Διάγραμμα 10:** Αποτελέσματα α) μικροβιακά και β) pH από δειγματοληψίες χοιρινού κιμά που ήταν καλυμμένος με μεμβράνες – *Janthinobacterium* sp. που είχαν ρυθμιστεί σε διαφορετικές τιμές pH (6,7 και 8). Η συντήρηση των δειγμάτων έγινε σε αερόβιες συνθήκες στους 5 °C.

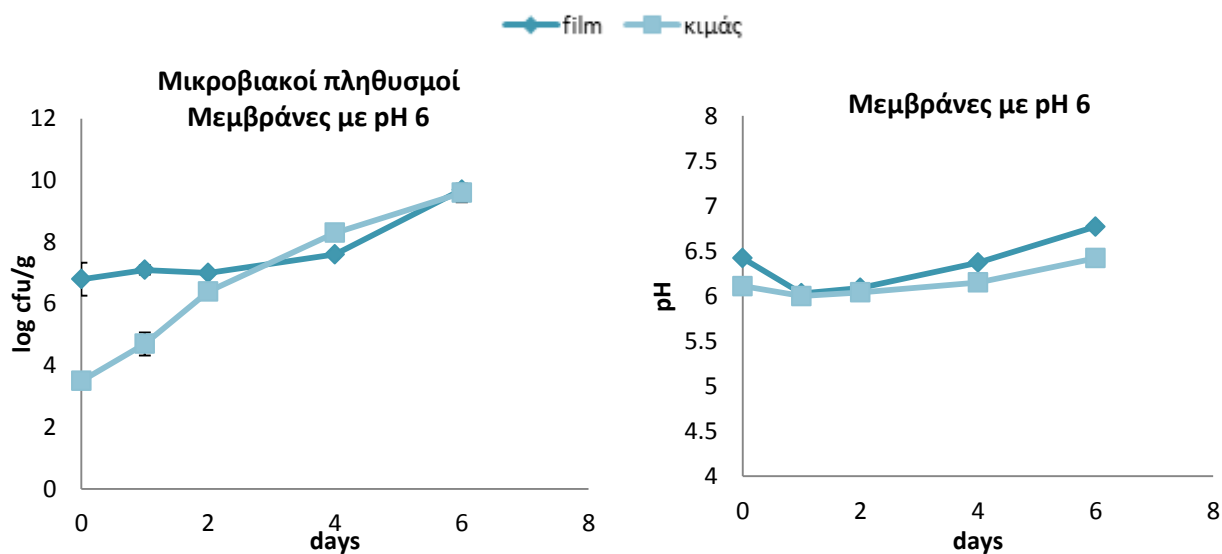


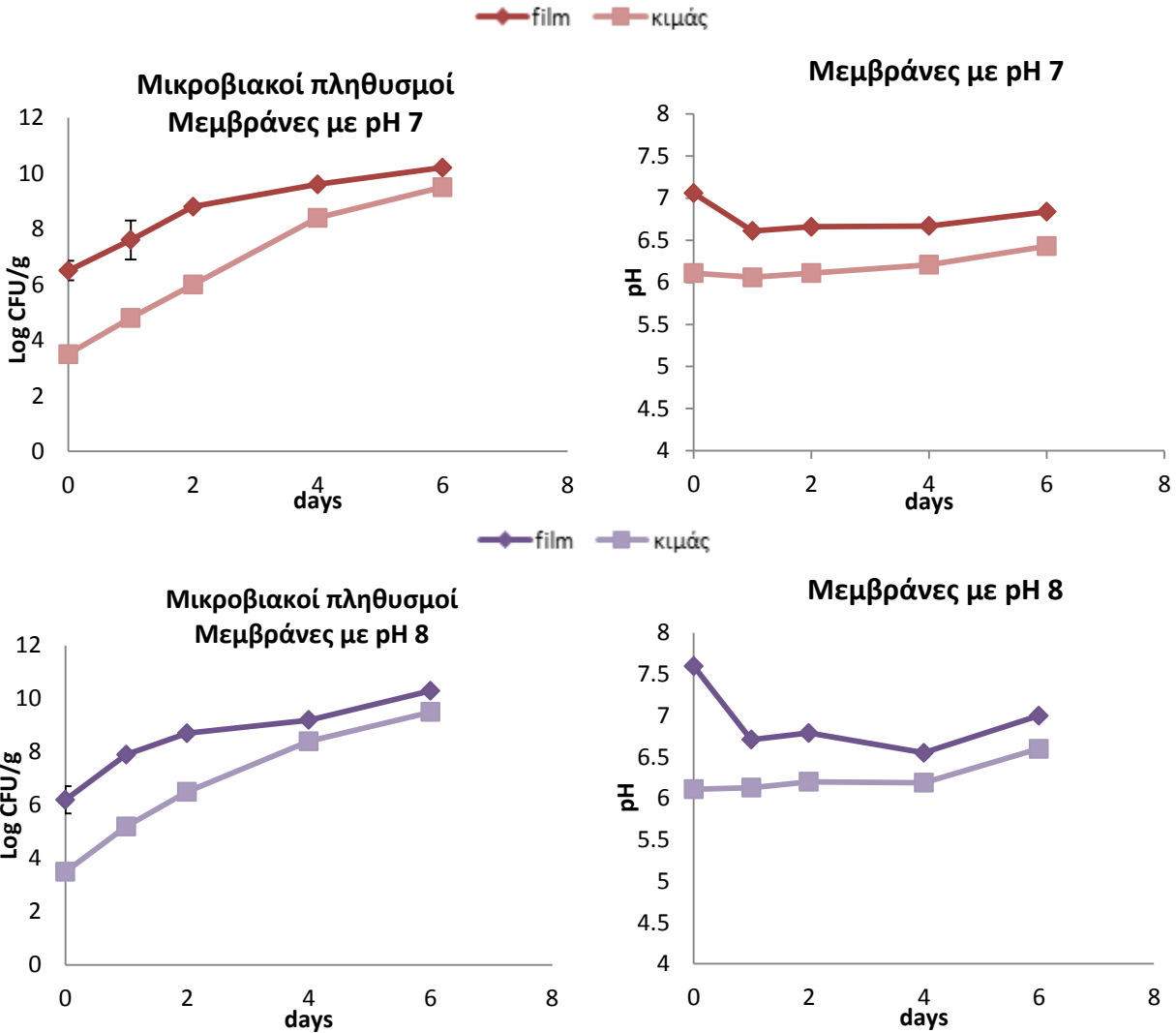
**Διάγραμμα 11:** Μικροβιολογικά αποτελέσματα από δειγματοληψία κιμά (συνολικό μικροβιακό φορτίο -αλλοιογόνος χλωρίδα - *Janthinobacterium* sp.) για κάθε κατηγορία μεμβράνης με την οποία είχε επικαλυφθεί.

Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζεται η συσχέτιση της ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. στη μεμβράνη με την αλλοιογόνο μικροχλωρίδα του κιμά για κάθε είδους μεμβράνη που τον επικάλυπτε. Στη μεμβράνη με pH 6 ο αρχικός πληθυσμός της μεμβράνης είναι μεγαλύτερος κατά περίπου 3 Log CFU/g από τον ενδογενή πληθυσμό του κιμά. Από την 2<sup>η</sup> ημέρα αυξάνεται όμως ο πληθυσμός του κιμά με αποτέλεσμα από την 4<sup>η</sup> ημέρα να έχουν σχεδόν τους ίδιους πληθυσμούς. Το pH παρουσιάζει την ίδια αύξηση στη μεμβράνη και στον κιμά. Παρατηρείται μικρή διαφοροποίηση ανάμεσα στις τιμές των δυο δειγμάτων τη μηδενική, την 4<sup>η</sup> και 6<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας.

Στην περίπτωση της μεμβράνης με pH 7 τη μηδενική ημέρα ο πληθυσμός της μεμβράνης και του κιμά διαφέρουν κατά περίπου 3 Log CFU/g, ενώ σταδιακά παρατηρείται σύγκλιση των πληθυσμών και την 6<sup>η</sup> ημέρα ο πληθυσμός της μεμβράνης ήταν  $10,3 \pm 0,1$  Log CFU/g, ενώ του κιμά  $9,5 \pm 0,1$  Log CFU/g. Όσον αφορά το pH, στην περίπτωση της μεμβράνης παρατηρήθηκε μείωση στην τιμή του κατά τη διάρκεια της συντήρησης, ενώ στον κιμά παρατηρήθηκε αύξηση κατά περίπου 0,3 μονάδες. Κατά την πάροδο του χρόνου παρατηρήθηκε μία μικρή σύγκλιση των τιμών του pH της μεμβράνης και του κιμά γεγονός που δικαιολογείται καθώς η μεμβράνη είναι σε επαφή με τον κιμά και είναι αναμενόμενο να υπάρξει εξισορρόπηση των τιμών του pH τους.

Στην μεμβράνη με pH 8, παρατηρείται από την 4<sup>η</sup> ημέρα σύγκλιση των πληθυσμών της μεμβράνης και του κιμά με διαφορά 0,8 Log CFU/g και την 4<sup>η</sup> και την 6<sup>η</sup> ημέρα δειγματοληψίας. Ως προς το pH, παρατηρείται μία σύγκλιση των τιμών από την 4<sup>η</sup> ημέρα με διαφορά κατά 0,34 μονάδες την 4<sup>η</sup> ημέρα και κατά 0,4 την 6<sup>η</sup> ημέρα.





**Διάγραμμα 12:** Συσχέτιση της ανάπτυξης του *Janthinobacterium* sp. στις μεμβράνες με την αλλοιογόνο μικροχλωρίδα του κιμά όταν οι μεμβράνες που τον καλύπτουν έχουν α) pH 6, β) pH 7 και γ) pH 8. Επίσης σύγκριση των τιμών pH των μεμβρανών και του χοιρινού κιμά κατά την διάρκεια συντήρησης τους, στους 5 °C.

## IV) ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτη προέκυψαν τα εξής:

- ⊗ Η καλύτερη μεμβράνη ως προς την απόδοση και ομοιομορφία του χρώματος φάνηκε να είναι αυτή με προσθήκη **0,6% w/v yeast extract**, με ενσωμάτωση **7 log CFU/g** του βακτηρίου *Janthinobacterium* sp..
- ⊗ Ιδανικότερες τιμές pH για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και την εκδήλωση χρώματος είναι οι 7 και 8, όπου εκδηλώθηκε μωβ χρωματισμός κατά την **4<sup>η</sup> περίπου ημέρα**, όταν η αλλοιογόνος χλωρίδα του κιμά ήταν περίπου στους **8 Log CFU/g** και το pH του τουλάχιστον **6,2**.
- ⊗ Η ρύθμιση του pH στην τιμή 6 επέφερε αναστολή στην ανάπτυξη του *Janthinobacterium* sp. και στην εκδήλωση μωβ χρωματισμού. Επομένως, δεν απαιτείται η ρύθμιση του pH σε διαφορετική τιμή μιας και η μεμβράνη έχει από την φύση της ουδέτερο pH (~7).
- ⊗ Το μωβ χρώμα δεν εμφανίστηκε στις μεμβράνες υπό κενό και τροποποιημένη ατμόσφαιρα (80% O<sub>2</sub> : 20%CO<sub>2</sub>), αν και το βακτήριο παρουσίασε ανάπτυξη κατά την διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων.

**Επιτεύχθηκε η ανάπτυξη δείκτη αλλοίωσης για χοιρινό κιμά όπου με την αλλαγή χρώματος, εκδήλωση μωβ χρωματισμού, έχει τη δυνατότητα να ενημερώνει τους καταναλωτές για την αλλοίωση του χοιρινού κιμά.**

Απαιτούνται επιπλέον μελέτες ώστε να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των αλγινικών μεμβρανών με προσθήκη του *Janthinobacterium* sp. ως δείκτη αλλοίωσης σε άλλα είδη τροφίμων και σε άλλες συνθήκες συντήρησης.

## V) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alboofetileh M., Rezaei M., Hosseini H., Abdollahi M. (2014) Antimicrobial activity of alginate/clay nanocomposite films enriched with essential oils against three common foodborne pathogens. *Food Control*, 36: 1-7.
- Azarakhsh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P., Mohd, A. N. (2014). Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 88: 1–7.
- Bell R.G. (2001) Meat packaging: Protection, preservation and presentation. In *Meat science and applications*. Hui Y.H, Nip Y.H., Rogers R.W., Young O.A., (Eds). Marcel Dekker, Inc N. York, pp. 463-490.
- Bonilla J., Atares L., Vargas M., Chiralt A. (2012) Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 110: 208–213.
- Brownlee I.A., Seal C.J., Wilcox M., Dettmar P.W., Pearson J.P. (2009) Applications of Alginates in Food. B.H.A. Rehm (ed.) In *Alginates: Biology and Applications*, Microbiology Monographs 13 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-19, DOI: 10.1007/978-3-540-92679-5\_9.
- Cai L., Cao A., Bai F., Li J. (2015) Effect of  $\epsilon$ -polylysine in combination with alginate coating treatment on physicochemical and microbial characteristics of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 62: 1053-1059.
- Charles N., Williams S.K., Rodrick G.E. (2006) Effects of Packaging Systems on the Natural Microflora and Acceptability of Chicken Breast Meat. *Poultry Science* 85: 1798-1801.

- Comaposada J., Gou P., Marcos B., Arnau J. (2015) Physical properties of sodium alginate solutions and edible wet calcium alginate coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 64: 212-219.
- Ercolini D, Ferrocino I, Nasi A, Ndagijimana M, Vernocchi P, La Storia A, Laghi L, Mauriello G, Guerzoni ME, Villani F (2011) Monitoring of Microbial Metabolites and Bacterial Diversity in Beef Stored under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7372-7381.
- Evageliou V, Gerolymatou A, Sotirakoglou K, Gardeli G, Yanniotis S (2015) Retention of trans-anethole by single and double layered films based on gelatin. *Food Hydrocolloids* 47: 94-98
- Gialamas, H., Zinoviadou, K.G., Biliaderis, C.G., Koutsoumanis, K.P. (2010) Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43(10): 2402–2408.
- Guerreiro A.C., Gago C.M.L., Maria L. Faleiro M.L., Miguel M.G.C., Antunes M.D.C. (2015) The effect of alginate-based edible coatings enriched with essential oils constituents on *Arbutus unedo* L. fresh fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 100: 226–233.
- Gutiérrez T.J., Suniaga J., Monsalve A., García N.L., (2016) Influence of beet flour on the relationship surface-properties of edible and intelligent films made from native and modified plantain flour. *Food Hydrocolloids*, 54: 234-244.
- Hornung C., Poehlein A., Haack F.S. Schmidt M., Dierking K., Pohlen A., Schulenburg H., Blokesch M., Plener L., Jung K., Bonge A., Krohn-Molt I., Utpatel C., Timmermann G., Eva Spieck E., Pommerening-Röser A., Bode E., Bode H.B., Daniel R., Schmeisser C., Streit W.R. (2013) The *Janthinobacterium* sp. HH01 Genome Encodes a Homologue of the

*V. cholerae* CqsA and *L. pneumophila* LqsA Autoinducer Synthases. *PLoS ONE*, 8 (2): 1-15 Article ID e55045.

Jiang T., Feng L., Wang Y. (2013) Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinusedodes*) during cold storage. *Food Chemistry*, 141(2): 954–960.

Kapetanakou A.E., Manios S.G., Skandamis P.N. (2014) Application of Edible Films and Coatings on Food. In: *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*. CRC Press, pp. 237-274.

Kapetanakou A.E., Karyotis D., Skandamis P.N. (2016) Control of *Listeria monocytogenes* by applying ethanol-based antimicrobial edible films on ham slices and microwave-reheated frankfurters. *Food Microbiology* 54: 80-90.

Kerry J.P., O' Grady M.N., Hogan S.A. (2006) Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*, 74:113-130.

Lu Y., Wang L., Xue Y., Zhang C., Xing X.H., Lou K., Zhang Z., Li Y., Zhang G., Bi J., Su Z. (2009) Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 135–141.

Mecitoğlu C., Yemenicioğlu A. (2007) Partial purification and preparation of bovine lactoperoxidase and characterization of kinetic properties of its immobilized form incorporated into cross-linked alginate films. *Food Chemistry*, 104: 726–733.

Mojib N., Nasti T.H., Andersen D.T., Attigada V.R., Hoover R.B., Yusuf N., Bej A.K. (2011) The antiproliferative function of violacein-like purple violet pigment (PVP) from an Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2 in UV-induced 2237 fibrosarcoma. *International Journal of Dermatology*, 50: 1223–1233.



- Nakamura Y., Sawada T., Morita Y., Tamiya E., (2002) Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. *Biochemical Engineering Journal*, 12(1): 79–86.
- Narsaiah K., Wilson R.A., Gokul K., Mandge H.M., S.N. Jha S.N., Bhadwal S., Anurag R.K., Malik R.K., Vij S. (2015) Effect of bacteriocin-incorporated alginate coating on shelf-life of minimally processed papaya (*Carica papaya L.*). *Postharvest Biology and Technology*, 100: 212–218.
- Nychas G.J., Skandamis P.N., Tassou C.C., Koutsoumanis K.P. (2008) Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78: 77-89
- Otles S, Yalcin B (2008) Intelligent Food Packaging. *LogForum* 4(4):1-9.
- Pantarella F., Berlutti F., Passariello C., Sarli S., Morea C., Schippa S. (2007) Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 102(4): 992–999
- Paula G.A., Benevides N.M.B., Cunha A.P., Vitória de Oliveira A., Pinto A.M.B., Morais J.P.S., Azeredo H.M.C. (2015) Development and characterization of edible films from mixtures of k-carrageenan, i-carrageenan, and alginate *Food Hydrocolloids*, 47: 140-145.
- Pranoto Y, Salokhe V.M., Rakshit S.K. (2005) Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 38: 267–272.
- Rajikumar R., Dushyanthan K, Rajini RA, Sureshkumar S (2007) Effect of Modified Atmosphere Packaging on Microbial and Physical Qualities of Turkey Meat. *American Journal of Food Technology* 2(3): 183-189

- Raybaudi-Massilia R.M., Mosqueda-Melgar J., Martín-Belloso O. (2008) Edible alginate-based coating as carrier of antimicrobials to improve shelf-life and safety of fresh-cut melon. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 313–327.
- Rhim J.W., Wang L.F. (2014) Preparation and characterization of carrageenan-based nanocomposite films reinforced with clay mineral and silver nanoparticles. *Applied Clay Science*, 97–98(1): 174–181.
- Rößle C., Brunton N., Gormley R. T., Wouters R., Butler F. (2011) Alginate coating as carrier of oligofructose and inulin and to maintain the quality of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 76(1): 19–29.
- Robles-Sánchez R.M., Rojas-Graü M.A., Odriozola-Serrano I., González-Aguilar G., Martín-Belloso O. (2013) Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 240-246.
- Salgado P.R., Ortiz C.M., Musso Y.S., Di Giorgio L., Mauri A.N. (2015) Edible films and coatings containing bioactives. *Food Science*, 5: 86–92.
- Sanchez-Ortega I., Garcia-Almendarez B.E., Santos-Lopez E.M., Amaro-Reyes A., Barboza-Corona J.E., Regalado C. (2014) Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. *The Scientific World Journal*, 1-18.
- Seydim A.C., Sarikus G. (2006) Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39: 639–644.
- Skurtys O., Acevedo C., Pedreschi F., Enronoe J., Osorio F., Aguiler J. M. (2010) Food hydrocolloid edible films and coatings. Nova Science Publishers, Inc. (US).

- Song Y, Liu L., Shen H, You J, Luo Y (2011) Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). *Food Control* 22: 608-615.
- Tapia M.S., Rojas-Graü M.A., Rodríguez F.J., Ramírez J., Carmona A., Martín-Belloso O. (2007) Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, 72(4): 190–196.
- Tavassoli-Kafrani E., Hajar Shekarchizadeh H., Masoudpour-Behabadi M. (2016) Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137: 360–374.
- Tavera-Quiroz M.J, Romano N., Mobili P., Pinotti A., Gómez-Zavaglia A., Bertola N. (2015) Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, 16: 164–173.
- Wang H.S., Wang F.Z., Zhu X.F., Yan Y., Yu X., Jiang P., Xing X.H. (2012) “Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities,” *Biochemical Engineering Journal*, 67: 148–155.
- Zhang Y, Ma Q, Critzer F, Davidson P.M., Zhong Q. (2015) Effect of alginate coatings with cinnamon bark oil and soybean oil on quality and microbiological safety of cantaloupe *International Journal of Food Microbiology*, 215: 25–30.
- Zinoviadou K.G., Koutsoumanis K.P.a, Biliaderis C.G. (2011) Biopolymer-based films as carriers of antimicrobial agents. *Procedia Food Science* 1: 190 – 196.
- Αρβανιτογιάννης Ι.Σ., Στρατάκος Α.Χ. (2011) Τεχνολογίες επεξεργασίας και συσκευασίας τροφίμων. University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Κοτζεκίδου-Ρουκά Π. (2009) Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Γιαχούδη. Θεσσαλονίκη.

Μπλούκας ΙΓ (2004) Συσκευασία Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.

Μπλούκας Ι.Γ. (2007) Τεχνολογία Κρέατος. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.

Παπαδάκης ΣΕ (2012) Συσκευασία Τροφίμων. Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.