



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση αιθέριου ελαίου ρίγανης ελεύθερου και εγκλεισμένου σε λιποσώματα καθώς και υπερυψηλής πίεσης στην επιβίωση κατά την συντήρηση και την έψηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόειο κιμά

ΠΑΝΤΕΛΙΔΟΥ Π. ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ, 2016

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

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση αιθέριου ελαίου ρίγανης ελεύθερου και εγκλεισμένου σε λιποσώματα καθώς και υπερυψηλής πίεσης στην επιβίωση κατά την συντήρηση και την έψηση του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόειο κιμά

ΠΑΝΤΕΛΙΔΟΥ Π. ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επίκουρος Καθηγητής Π.Ν. Σκανδάμης (Επιβλέπων)

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καθηγητής Γ.- Ι. Νυχάς

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Καθηγητής Βάιος Θ. Καραθάνος

Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας και Φυσικοχημείας Τροφίμων
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αθήνα, 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με επιβλέποντα τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση της εν λόγω εργασίας, καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγηση και την στήριξη του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μελέτης.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νυχά Γεώργιο - Ιωάννη και τον Καθηγητή κ. Καραθάνο Βάιο για τη συμμετοχή τους και το χρόνο που αφιέρωσαν στην ανάγνωση, διόρθωση και εξέταση της μελέτης. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Γιαλιτάκη Μαρία, μόνιμο μέλος του εργαστηρίου, για το ενδιαφέρον της, τις συμβουλές της και την τεχνική υποστήριξη που παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά, τους διδάκτορες, υποψήφιους διδάκτορες, μεταπτυχιακούς φοιτητές και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία μας, την προθυμία, στήριξη και συμβολή τους, στη διεξαγωγή και ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης. Ειδικότερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδάκτωρ Καπετανάκου Αναστασία και την υποψήφια διδάκτωρ Μακαρίτη Ιφιγένεια για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση τους στην συγγραφή της παρούσας μελέτης. Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τις συναδέλφους και συμφοιτήτριες μου για τη βοήθεια, κατανόηση και στήριξη τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους πιο σημαντικούς ανθρώπους της ζωής μου, τους γονείς μου, για τη συνεχή υποστήριξη, κατανόηση, συμπαράσταση και αγάπη που μου έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

Παντελίδου Μαρία

Αθήνα, 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	10
1. Εισαγωγή	10
1.1 Ο μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i>	10
1.1.2 Ιστορία	11
1.1.3 Επιδημιολογία	11
1.1.4 Μέσα Μετάδοσης.....	13
1.1.5 Χαρακτηριστικά Μικροοργανισμού	14
1.1.6. Παράγοντες τοξικότητας	15
1.1.7 Shiga τοξίνες	15
1.1.8 Μελέτες Σχετικά Με Το Βόειο Κιμά.....	16
1.1.9 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση	17
1.2 Θερμική Επεξεργασία	21
1.2.1 Κινητική Θερμικής Απενεργοποίησης	23
1.2.2 Μελέτες θερμικής απενεργοποίησης του <i>E. coli</i> O157:H7 στο κρέας.....	25
1.2.3 Διαδικασία Επαλήθευσης/Επικύρωσης	31
1.3 Αιθέρια Έλαια.....	32
1.3.1 Αιθέριο Έλαιο ρίγανης.....	35
1.3.2 Μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων.....	36
1.3.3 Ευαισθησία των gram-αρνητικών και των gram-θετικών μικροοργανισμών	38
1.3.4 Νομοθετικά ζητήματα της χρήσης αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους στα τρόφιμα	39
1.4 Λιποσώματα.....	40
1.4.1 Γενικά.....	40
1.4.2 Ιδιότητες λιποσωμάτων.....	42
1.4.3 Μέθοδοι προετοιμασίας λιποσωμάτων.....	47
1.4.3.1 Μηχανικές Μέθοδοι.....	49
1.4.3.2 Μη Μηχανικές Μέθοδοι	51
1.4.4 Μελέτες Ενθυλάκωσης Αντιμικροβιακών Ουσιών σε Λιποσώματα.....	52
1.5 Συσκευασία	54
1.6 Υπερ-υψηλή Πίεση (High Pressure Processing)	56
1.6.1 Γενικά.....	56
1.6.2 Επιδράσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.....	57
1.6.3 Προσέγγιση πολλαπλών εμποδίων: συνδυασμός υψηλής πίεσης και φυσικών αντιμικροβιακών	58
1.6.4 Μελέτες Εφαρμογής Υψηλής Πίεσης	58
1.7 Υπόθεση και Στόχοι Μελέτης.....	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	61
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	61
2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός.....	61

2.2 Προπειράματα	62
2.2.1 1 ^{ος} Πειραματικός Σχεδιασμός	62
2.2.2 2ος Πειραματικός Σχεδιασμός.....	63
2.2.2 3ος Πειραματικός Σχεδιασμός.....	63
2.3 Μικροοργανισμός <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	64
2.4 Φυσική Αντιμικροβιακή Ουσία	64
2.5 Παρασκευή Λιποσωμάτων.....	64
2.6 Υπερυψηλή Πίεση	65
2.7 Πειραματική Διαδικασία.....	65
2.7.1 Ανανέωση του μικροοργανισμού – Προετοιμασία εμβολίου	66
2.7.2 Προετοιμασία δειγμάτων	66
2.7.3 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων	67
2.7.4 Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	68
2.7.5 Μέτρηση pH.....	69
2.7.6 Καταμέτρηση αποικιών	69
2.8 Οργανοληπτική Αξιολόγηση	69
2.9 Στατιστική Ανάλυση	70
2.10 Ανάπτυξη Μοντέλων πρόρρησης.....	70
2.10.1 Πρωτογενές Μοντέλο	70
2.10.2 Δευτερογενές Μοντέλο	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	72
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
3.1 Επίδραση της Αντιμικροβιακής Ουσίας και της Υπερυψηλής Πίεσης κατά τη Συντήρηση	73
3.1.1 Πειράματα κινητικής και ανάπτυξη μοντέλων πρόρρησης.....	81
3.2 Επιβίωση του Παθογόνου Μικροοργανισμού Μετά τη Θερμική Επεξεργασία	84
3.3 pH.....	93
3.4 Οργανοληπτική Αξιολόγηση	94
3.4.1 Οργανοληπτική Αξιολόγηση μη Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων	95
3.4.2 Οργανοληπτική Αξιολόγηση Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων	99
3.4.3 Οργανοληπτική Αξιολόγηση μη Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων (0.1% A.E.P.).....	102
3.4.4 Οργανοληπτική Αξιολόγηση Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων (0.1% A.E.P.)	105
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	108

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ήπιες τεχνολογίες συντήρησης και φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες γίνονται ολοένα και πιο δημοφιλείς στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων, ειδικότερα στα πλαίσια της εφαρμογής πολλαπλών εμποδίων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης (A.E.P.), ελεύθερου ή ενθυλακωμένου σε λιποσώματα και της υπερυψηλής πίεσης (High Pressure Processing - HPP): (i) στην επιβίωση του *Escherichia coli* O157:H7 κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη του βόειου κιμά (ii) στη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου και (iii) στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων βόειου κιμά.

Δείγματα βόειου κιμά (70g) παρασκευάστηκαν ως εξής: (α) μάρτυρας (χωρίς αντιμικροβιακές ουσίες), (β) με 0.1, 0.25, 0.5% v/w A.E.P., (γ) με 0.1, 0.25, 0.5% v/w A.E.P. ενθυλακωμένο σε λιποσώματα (κυστίδια αποτελούμενα από λιπιδικές διπλοστοιβάδες). Όλα τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν με *E. coli* O157:H7 (10^5 CFU/g), συσκευάστηκαν υπό κενό, μεταχειρίστηκαν ή όχι με υπερυψηλή πίεση στα 250 και 400 MPa και συντηρήθηκαν στους 5 °C για 28 ημέρες. Τη 14^η και 28^η μέρα, τα δείγματα επεξεργάστηκαν θερμικά σε προθερμασμένο φούρνο σε τελική θερμοκρασία 65°C στο γεωμετρικό τους κέντρο.

Η προσθήκη 0.1% ελεύθερου A.E.P. προκάλεσε σημαντική μείωση στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 (2.0 log CFU/g) μόνο όταν συνδυάστηκε με υπερυψηλή πίεση στα 400 MPa. Οι μεταχειρίσεις με 0.25% A.E.P. και πίεση 400 MPa είχαν ως αποτέλεσμα να μειωθεί ο πληθυσμός του παθογόνου σε 2.5 και 1 log CFU/g, στα δείγματα με το ενθυλακωμένο και ελεύθερο αιθέριο έλαιο αντίστοιχα, στο τέλος της συντήρησης. Η συγκέντρωση 0.5% A.E.P. επέφερε μειώσεις στον μικροβιακό πληθυσμό από 3 log CFU/g (μόνο A.E.P.) έως και κάτω του ορίου καταμέτρησης των 10 CFU/g (A.E.P. και HPP) κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη. Τα λιποσώματα με το ενθυλακωμένο αιθέριο έλαιο δεν παρουσίασαν σημαντική μείωση μέχρι τις πρώτες 14 μέρες, ωστόσο παρατηρήθηκε απενεργοποίηση του παθογόνου κατά 1.0 - 1.5 log CFU/g στο τέλος της συντήρησης. Η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης 250 MPa μείωσε τον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 σε τελικά επίπεδα του 1 log CFU/g και 1.5 log CFU/g στα δείγματα με 0.5% A.E.P. ελεύθερο και ενθυλακωμένο σε λιποσώματα, αντίστοιχα. Ο συνδυασμός υπερυψηλής πίεσης 400 MPa και 0.5% ελεύθερου A.E.P. είχε την καλύτερη συνεργιστική δράση, ωστόσο επηρέασε αρνητικά την γεύση και το κόκκινο χρώμα του κιμά. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης, μόνο του ή σε συνδυασμό με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) αύξησε την ευαισθησία του παθογόνου κατά τη θέρμανση, οδηγώντας σε

επιπρόσθετες μειώσεις των 2.5 log CFU/g, συγκριτικά με τα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα των μαρτύρων (χωρίς A.E.P. και HPP).

Ο συνδυασμός αιθέριων ελαίων και υπερυψηλής πίεσης μπορεί να είναι αρκετά υποσχόμενος όσον αφορά στην ασφάλεια του βόειου κρέατος. Τα λιποσώματα, ως συστήματα ενθυλάκωσης προσφέρουν ελεγχόμενη απελευθέρωση των αιθέριων ελαίων, βελτιώνοντας παράλληλα τις οργανοληπτικές ιδιότητες του κιμά.

Λέξεις κλειδιά: *Escherichia coli* O157:H7, αιθέριο έλαιο ρίγανης, λιποσώματα, υπερυψηλή πίεση, θερμική επεξεργασία, οργανοληπτική αξιολόγηση, βόειος κιμάς.

ABSTRACT

Mild preservation technologies and natural antimicrobials become increasingly popular in food safety, especially in the context of multiple hurdles.

The aim of the present study was to investigate the impact of oregano essential oil (OEO), free or encapsulated in liposomes, and High Pressure Processing (HPP) on: (i) the survival of *Escherichia coli* O157:H7 during refrigerated storage of ground beef patties (ii) the heat tolerance of the pathogen and (iii) the organoleptic characteristics of the patties.

Ground beef patties (70g) were formulated with (a) no antimicrobials (control), (b) 0.1, 0.25, 0.5% v/w OEO, (c) 0.1, 0.25, 0.5% v/w OEO encapsulated in liposomes (bilayer capsules). All samples were inoculated (10^5 CFU/g) with *E. coli* O157:H7, vacuum packaged, received or not HPP treatment at 250 and 400 MPa and stored at 5°C for 28 days. On day 14 and 28, samples were cooked in a preheated oven to internal temperature of 65°C.

The addition of 0.1% free OEO showed remarkable reduction (2.0 log CFU/g) only in combination with HPP at 400 MPa. 0.25% OEO and HPP (400 MPa) reduced *E. coli* O157:H7 to final population of 2.5 and 1 log CFU/g in samples with encapsulated and free OEO, respectively at the end of storage. Treatment with 0.5% OEO reduced *E. coli* O157:H7 from 3 log CFU/g (OEO only) to below the enumeration limit of 10 CFU/g (OEO and HPP) during refrigerated storage. OEO-loaded liposomes showed no remarkable reduction until the first 15 days; however inactivation by 1.0 - 1.5 log CFU/g was observed on day 28. HPP treatment at 250 MPa reduced the pathogen to final population of 1 log CFU/g and 1.5 log CFU/g in samples with 0.5% OEO free and encapsulated in liposomes, respectively. HP treatment at 400 MPa combined with 0.5% free OEO showed the highest synergistic effect, although affecting the taste and redness of ground meat negatively. OEO alone or in combination with HPP (250, 400 MPa) increased susceptibility of *E. coli* O157:H7 to heat resulting in additional reductions of 2.5 log CFU/g, compared to heated control (without OEO and HPP) samples.

Combination of EOs with HPP treatment may be promising interventions for ground beef safety. Liposomes, as encapsulation systems confer controlled release of the EOs, while markedly improving the sensory properties (juiciness) of ground beef.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, oregano essential oil, liposomes, high pressure, thermal processing, sensory analysis, ground beef.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1. Εισαγωγή

1.1 Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli*

Το βακτήριο *Escherichia coli* είναι ένα αβλαβές μέλος της φυσικής μικροχλωρίδας στους ανθρώπους και σε άλλα ζώα. Ωστόσο, λοιμογόνα γονίδια που αποκτήθηκαν με διάφορα μέσα έχουν απονείμει διαφορετικούς τύπους παθογένειας σε στελέχη *E. coli*. Υπάρχει ένας αριθμός διαφορετικών εντεροπαθογόνων ομάδων *E. coli* τα οποία έχουν δείξει να προκαλούν ποικίλους τύπους γαστροεντερικών μολύνσεων. Έξι κύριοι παθογόνοι τύποι *E. coli* μπορούν να διακριθούν: εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (EPEC), εντεροτοξικογόνα στελέχη *E. coli* (ETEC), εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E. coli* (EIEC), διάχυτα προσκολλημένα στελέχη *E. coli* (DAEC), εντεροσυσσωρευτικά στελέχη *E. coli* (EAEC), και εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* (EHEC). Τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *Escherichia coli* (EHEC) έχουν αναγνωρισθεί ως αιτία σοβαρής ασθένειας και θνησιμότητας σε κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών τα οποία περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία τροφών.

Όλοι αυτοί οι παθογόνοι τύποι *E. coli* χρησιμοποιούν συστήματα παθογένειας πολλαπλών σταδίων, αποτελούμενα σε γενικές γραμμές από την αποίκιση της περιοχής του βλεννογόνου, διαφυγή των αμυντικών μηχανισμών του ξενιστή, τον πολλαπλασιασμό και την βλάβη του ξενιστή. Μετά το πρώτο κρούσμα το 1982, ο μικροοργανισμός *E. coli* και συγκεκριμένα ο ορότυπος O157:H7 έχει γίνει το πιο ευρέως διαδεδομένο εντεροαιμορραγικό στέλεχος (EHEC). Γενικά, πολλά παθογόνα στελέχη συμπεριφέρονται όπως άλλα μη παθογόνα στελέχη *E. coli* από βιοχημικής και οικολογικής άποψης, καθιστώντας την ανίχνευση τους μεταξύ των συμβιωτικών στελεχών *E. coli* ένα σημαντικό πρόβλημα, κυρίως μεταξύ των εντεροαιμορραγικών στελεχών (Bettelheim, 2008). Ο ορότυπος O157 έχει βρεθεί να είναι ανίκανος να ζυμώσει την σορβιτόλη, ένα φαινοτυπικό χαρακτηριστικό το οποίο είναι χρήσιμο για την ανίχνευση του μικροοργανισμού.

Συγκριτικά με άλλα παθογόνα στελέχη *E. coli*, αυτός ο ορότυπος μπορεί να προκαλέσει αιμορραγική κολίτιδα (hemorrhagic colitis - HC) και άλλα σοβαρά συμπτώματα. Άλλοι ορότυποι, όπως οι O26, O111, και O157:NM, έχουν επίσης συσχετισθεί με αιμορραγική κολίτιδα και συνεπώς ταξινομήθηκαν ως εντεροαιμορραγικά στελέχη (EHEC). Η ικανότητα να παράγουν τοξίνες Shiga είναι το κοινό χαρακτηριστικό όλων των εντεροαιμορραγικών στελεχών τα οποία συχνά αναφέρονται ως στελέχη *E. coli* που παράγουν Shiga τοξίνη (Shiga toxin-producing *E. coli* -STEC) (Viazis & Diez-Gonzalez, 2011).

1.1.2 Ιστορία

Ο μικροοργανισμός *E. coli* έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός ανθρώπινος παθογόνος από την ανακάλυψη του το 1885 από τον Theodor Escherich μέσω της έρευνας του σχετικά με τα βακτήρια στα κόπρανα των βρεφών. Η εύρεση του μικροοργανισμού *Shigella dysenteriae* σαν παράγοντα της επιδημιακής βακτηριακής δυσεντερίας από τον Kioshi Shiga καταγράφηκε το 1898 (Shiga, 1898). Το 1955 περιγράφηκε για πρώτη φορά και ορίστηκε το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Haemolytic Uremic Syndrome - HUS), ενώ οι Keusch et al. (1972) έδειξαν ότι οι Shiga τοξίνες συμβάλλουν στην διάρροια με αίμα. Οι Kopowalchuk et al. (1977) βρήκαν ότι συγκεκριμένα παθογόνα στελέχη *E. coli* παράγουν μία τοξίνη ικανή να σκοτώσει τα κύτταρα Vero, και το 1982, υπήρξαν δύο εξάρσεις ενός σοβαρού συνδρόμου με αιματηρή διάρροια στο Oregon και το Michigan συσχετιζόμενων με την κατανάλωση έτοιμα μαγειρεμένων μπιφτεκιών. Οι O'Brien & LaVeck (1983) κατέγραψαν ότι ένα στέλεχος *E.coli* O157:H7 το οποίο ήταν υπεύθυνο για ένα κρούσμα HC στις ΗΠΑ, παρήγαγε μια Shiga τοξίνη, και οι Karmali et al. (1985) πρότειναν ότι στελέχη *E. coli* που παράγουν Shiga τοξίνη (STEC) σχετίζονται επιδημιολογικά με το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (Viazis & Diez-Gonzalez, 2011).

1.1.3 Επιδημιολογία

Κρούσματα και συχνότητα εμφάνισης

Τα στελέχη *E. coli* που παράγουν Shiga τοξίνη (STEC) και συγκεκριμένα ο ορότυπος O157:H7 θεωρούνται ως αναδυόμενοι τροφιογενείς παθογόνοι που εμφανίζονται παγκοσμίως, αλλά είναι πιο συχνοί σε μερικά μέρη του Ηνωμένου Βασιλείου, των ΗΠΑ και του Καναδά. Πρόσφατα, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* είναι υπεύθυνα για τα κρούσματα που συνδέονται με φρέσκα προϊόντα, με το *E. coli* O157:H7 να είναι ένα από τα κύρια αίτια των κρουσμάτων σχετιζόμενων με τα προϊόντα, αντιπροσωπεύοντας το 20% των εξάρσεων στα οποία αναγνωρίστηκε ο αιτιολογικός παράγοντας (Olsen et al., 2000). Παρόλο που μερικά από τα πρώτα κρούσματα του *E. coli* O157:H7 συνδέθηκαν με ανεπαρκώς μαγειρεμένα μπιφτεκία, πολλές εξάρσεις που ακολούθησαν συσχετίστηκαν με την κατανάλωση ωμών λαχανικών, συμπεριλαμβανομένου του μαζικού κρούσματος το 1996 στην Ιαπωνία, όπου σχεδόν 8000 άνθρωποι προσβλήθηκαν από μολυσμένους βλαστούς ραπανάκι (Kaper & Karmali, 2008). Στην Ευρώπη, έχουν συμβεί 14.000 περιπτώσεις σε πάνω από 24 χώρες από το 2000 μέχρι το 2005, από τα οποία το 62% ανήκει στον ορότυπο O157.

Η συχνότητα εμφάνισης της τροφιμογενούς ασθένειας σχετιζόμενης με την κατανάλωση ελάχιστα επεξεργασμένων έτοιμων προς κατανάλωση (ready-to-eat, RTE) σαλατών αυξάνεται σταθερά. Τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά αναγνωρίζονται ολοένα και περισσότερο ως πηγή τροφιμογενών επιδημικών εξάρσεων σε όλο τον κόσμο. Το 2005, ένα μεγάλο κρούσμα από στελέχη *E.coli* που παράγουν Shiga τοξίνη σε μαρούλι STEC συνέβη στη Σουηδία και σε νερό από κοντινό ρυάκι επιβεβαιώθηκε θετικό σε Shiga τοξίνη 2 (Stx2) με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Μεταξύ Αυγούστου και Οκτώβρη του 2006, η ευρέως αναφερόμενη, σε πολλές πολιτείες, έξαρση εντεροαιμορραγικών στελεχών *E.coli* (EHEC) σημειώθηκε στις ΗΠΑ, εξαιτίας συσκευασμένου σπανακιού. Το Δεκέμβρη του 2006, ένα κρούσμα στελεχών *E.coli* που παράγουν Shiga τοξίνη (STEC) στις ΒΑ ΗΠΑ, επηρεάζοντας ανθρώπους στο New Jersey, τη Νέα Υόρκη και την Pennsylvania. Η πηγή της έξαρσης εντοπίστηκε στο μαρούλι "iceberg" που χρησιμοποιούνταν στα εστιατόρια "Taco Bell" (Food and Drug Administration, 2006).

Η αύξηση των τροφιμογενών κρουσμάτων εξαιτίας της κατανάλωσης φρέσκων λαχανικών έχει τονίσει τη σημασία ανάπτυξης αντιμικροβιακών στρατηγικών για τη μείωση του μικροβιακού τους φορτίου. Τα πιο πρόσφατα κρούσματα τροφιμογενούς ασθένειας που προκλήθηκε από συσκευασμένο μαρούλι σπανάκι εκθέτουν την περιορισμένη δράση των τρεχόντων συμβατικών πλυσιμάτων και η βιομηχανία στο σύνολο της θα επωφελούνταν από την έρευνα για εναλλακτικές αποτελεσματικές αντιμικροβιακές μεταχειρίσεις (Calvin, 2007, Maki, 2006). Άλλο κρούσμα σχετικό με *Escherichia coli* O157:H7 που παράγει Shiga τοξίνες, αφορούσε σε μόλυνση από βόειο κιμά και πραγματοποιήθηκε το 2014 στις ΗΠΑ (<http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/>). Το CDC συνεργαζόμενο με στελέχη του τομέα δημόσιας υγείας, το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ και την Υπηρεσία Επιθεώρησης (USDA-FSIS) ερεύνησαν τα περιστατικά που συνδέονταν με τη συγκεκριμένη έξαρση. Συνολικά μολύνθηκαν 12 άτομα με τα στελέχη STEC O157:H7, από 4 πολιτείες των ΗΠΑ, ενώ οι 7 νοσηλεύτηκαν. Το πιο πρόσφατο κρούσμα μόλυνσης από τοξικογόνα στελέχη *Escherichia coli* O157:H7 που έλαβε χώρα στις ΗΠΑ το 2015 αφορούσε σε σαλάτα κοτόπουλου της αλυσίδας καταστημάτων "Costco" (<http://www.cdc.gov/ecoli/2015/o157h7-11-15/>). Ερευνητές σχετικοί με θέματα δημόσιας υγείας χρησιμοποίησαν το σύστημα PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>), το οποίο συντονίζεται από το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC) για να ταυτοποιήσουν ασθένειες που ήταν μέρος αυτής της έξαρσης. Οι ηλικίες των ανθρώπων που νόσησαν ήταν από 5 έως 84 ετών, 5 άτομα (29%) νοσηλεύθηκαν και δύο εκδήλωσαν HUS.

1.1.4 Μέσα Μετάδοσης

Ο πρωταρχικός βιότοπος του μικροοργανισμού *E. coli* είναι ο εντερικός σωλήνας των θερμόαιμων ζώων καθώς επίσης και των ανθρώπων. Οι λοιμώξεις από *E. coli* σε ανθρώπους μεταδίδονται απευθείας από τα ζώα, με διαπροσωπική επαφή ή μέσω μολυσμένων τροφίμων. Οι εντερικοί παθογόνοι διανέμονται από τα ζώα στις καλλιέργειες τροφίμων και μπορεί να συμβούν με διάφορους τρόπους όπως η εφαρμογή κοπριάς, άρδευση με μολυσμένο νερό, διασπορά μέσω του αέρα και διασπορά μέσω βιολογικών φορέων όπως τα άγρια ζώα και τα έντομα. Υπάρχει εκτεταμένη κοπρανώδης μόλυνση του περιβάλλοντος εξαιτίας των αγροκτημάτων και των άγριων ζώων που παρέχουν μια συνεχόμενη πηγή εντεροαιμορραγικών στελεχών *E. coli* (EHEC) στο περιβάλλον (Bell, 2002). Το βόειο κρέας εξακολουθεί να είναι η πιο συχνά εμπλεκόμενη πηγή κρουσμάτων *E. coli* O157:H7, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 75% των εξάρσεων *E. coli* O157:H7 (Gould et al., 2009). Τα γαλακτοκομικά προϊόντα και ο ανεπαρκώς μαγειρεμένος κιμάς από βόειο κρέας μπορούν να μολυνθούν απευθείας από περιττώματα βοοειδών κατά τη διάρκεια είτε του αρμέγματος ή των διαδικασιών σφαγής. Τα ωμά φρούτα και λαχανικά, τα οποία μολύνονται έμμεσα μέσω του νερού άρδευσης ή μέσω εδάφους που μεταχειρίστηκε με λύματα αγροκτημάτων είναι ένα σημαντικό μέσο μόλυνσης εντεροαιμορραγικών στελεχών *E. coli*. Μία μελέτη από τους Voetsch et al. (2006) καθόρισε ότι οι περισσότερες μολύνσεις στελεχών *E. coli* O157 που παράγουν Shiga τοξίνη (STEC O157) το 1999–2000 συσχετιζόνταν με την κατανάλωση μπιφτεκιών, την πόση μη επεξεργασμένου επιφανειακού νερού και την επαφή με βοοειδή. Η κατανάλωση προϊόντων σχετίστηκε αντίστροφα με τη μόλυνση. Επίσης, άμεση ή έμμεση επαφή με τα απόβλητα των βοοειδών ήταν η κύρια προσδιορισμένη πηγή σποραδικών λοιμώξεων STEC O157. Σύμφωνα με τη μελέτη των Mukherjee et al. (2007), η χρήση ζωικών περιττωμάτων για τη γονιμοποίηση φυτικών προϊόντων έθετε αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης οργανικών και ημι-οργανικών προϊόντων με *E. coli*. Ωστόσο, εμπορικά καλλιεργήσιμα φρέσκα προϊόντα που έχουν ελεγχθεί μικροβιολογικά για τον παθογόνο μικροοργανισμό *E. coli* οδηγούν γενικά σε αρνητικά ευρήματα, υποδηλώνοντας ότι η μόλυνση με παθογόνο *E. coli* είναι ένα σχετικά σπάνιο περιστατικό (Delaquis et al., 2007). Επίσης, *E. coli* O157:H7 και Shiga τοξίνες 1 (Stx1) και 2 δεν ανιχνεύθηκαν μέσα σε απομονώσιμα στελέχη *E. coli* που ανακτήθηκαν από οργανικά ή συμβατικά καλλιεργήσιμα προϊόντα (Viazis & Diez-Gonzalez, 2011).

1.1.5 Χαρακτηριστικά Μικροοργανισμού

Μοναδικά Χαρακτηριστικά

Το γένος *E. coli* αποτελείται από Gram-αρνητικούς, προαιρετικά αναερόβιους βακίλους, κοινούς κατοίκους της γαστρεντερικής οδού των θηλαστικών και ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Είναι ανεκτικοί στη χολή, μη απαιτητικοί οργανισμοί οι οποίοι καλλιεργούνται εύκολα σε συνήθη εργαστηριακά μέσα. Ζυμώνουν την λακτόζη και αναπτύσσονται καλύτερα κάτω από μεσόφιλες θερμοκρασίες με βέλτιστη αυτή των 37°C. Τα περισσότερα στελέχη *E. coli* έχουν το ένζυμο β-γλυκορονιδάση το οποίο αποδομεί σύνθετους υδατάνθρακες. Αυτό το ένζυμο χρησιμοποιείται σε μία φθορισμογόνο ανάλυση, η οποία εκμεταλλεύεται την αποδόμηση του 4-methyl-umbeliferone glucoronide (MUG) από τη β-γλυκορονιδάση παράγοντας μια φθορίζουσα ένωση.

Ωστόσο, το *E. coli* O157:H7 δεν έχει β-γλυκορονιδάση. Επιπρόσθετα, το *E. coli* O157:H7 δεν μπορεί να ζυμώσει τη σορβιτόλη μέσα σε 24 ώρες, ενώ το 90% του *E. coli* μπορεί. Η μολυσματική δόση εντεροαιμορραγικών στελεχών *E. coli* (EHEC) είναι πολύ χαμηλή, μεταξύ 1 και 100 CFU (colony-forming unit), η οποία είναι πολύ χαμηλότερη δόση από ότι για τους περισσότερους άλλους παθογόνους των εντέρων. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των στελεχών EHEC τα οποία απαιτούνται για να προκαλέσουν ασθένεια σε ανθρώπους είναι η ικανότητα τους να προσκολλώνται στα εντερικά κύτταρα και να αποικίσουν το ανθρώπινο εντερικό σωλήνα. Από το 1980, στελέχη EHEC έχουν καθιερωθεί ως τροφιμογενείς παθογόνοι σχετιζόμενοι με μια σειρά ανθρώπινων μολύνσεων συμπεριλαμβανομένων της αιμορραγικής κολίτιδας (HC), ηπιότερων μορφών διαρροϊκής ασθένειας και ως κύριο αιτιολογικό παράγοντα υπεύθυνο για τη θανατηφόρο λοίμωξη, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS).

Γενικά, μόλυνση με εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* O157:H7 (EHEC) είναι αυτοπεριοριστική, αλλά εξαρτάται από τη λοιμογόνο δράση του μολυσματικού στελέχους, η έκταση της νόσου μπορεί να ποικίλλει. Η αιμορραγική κολίτιδα είναι η κύρια ασθένεια σχετιζόμενη με EHEC και χαρακτηρίζεται από σοβαρές κοιλιακές συσπάσεις και αιμορραγική διάρροια. Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο μπορεί τελικά να αναπτυχθεί ως επακόλουθο σε μόλυνση με EHEC και αιμορραγική κολίτιδα. Το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο χαρακτηρίζεται από μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, θρομβοκυτταροπενία, νεφρική ανεπάρκεια ή βλάβη και περιστασιακή αζωταιμία. Περίπου το 8% όσων μολύνθηκαν με EHEC O157:H7 θα αναπτύξουν αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Η διάρροια που σχετίζεται με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο είναι σε μεγάλο

βαθμό υπεύθυνη για τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα εξαιτίας των EHEC, έχοντας ως επακόλουθο τον θάνατο σε ποσοστό μέχρι και 5% των μολυσμένων ατόμων και συχνή μόνιμη νεφρική βλάβη σε ποσοστό 25%. Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε διογκωμένα, αποκολλημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία με τη σειρά της εκθέτει τη βασική μεμβράνη. Αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και σε τοπική ενδοαγγειακή θρόμβωση ή θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια, σχηματισμό θρόμβου αίματος εντός του αγγειακού συστήματος και τελικά, μια μείωση του αριθμού των αιμοπεταλίων. Η αιμολυτική αναιμία είναι μια ανώμαλη κατανομή των ερυθροκυττάρων.

Αυτό προκύπτει από θρόμβους και πιθανές παρενέργειες από τα λευκά αιμοσφαίρια στις μεμβράνες των ερυθροκυττάρων. Παιδιά κάτω των 5 ετών έχουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου. Εκφράζουν υψηλότερα επίπεδα του υποδοχέα Gb3 που είναι παρών στα νεφρικά ενδοθηλιακά κύτταρα και σχηματίζουν μία προσκόλληση στη Shiga τοξίνη η οποία μπορεί να κυκλοφορεί εξαιτίας της μόλυνσης. Η νεφρική βλάβη εμφανίζεται από διεισδύσεις λευκοκυττάρων και οι θρόμβοι μπορεί να οδηγήσουν σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια και αζωθαιμία. Η αζωθαιμία χαρακτηρίζεται από την αύξηση αζωτούχων ενώσεων που οφείλονται στο κακό φίλτράρισμα από τα νεφρά. Δεν έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένες θεραπευτικές αγωγές για το *E. coli* O157:H7, αλλά οι υποστηρικτικές κατευθυντήριες γραμμές περίθαλψης και μέριμνας έχουν βελτιωθεί έτσι ώστε τα ποσοστά θνησιμότητας να είναι χαμηλά (Tarr, Gordon, & Chandler, 2005).

1.1.6. Παράγοντες τοξικότητας

Η παθογένεια των στελεχών *E. coli* που παράγουν Shiga τοξίνη (STEC) καθορίζεται από μερικούς ιογενείς παράγοντες, οι οποίοι κωδικοποιούνται από χρωμοσωμικά νησιά παθογένειας, χρωμοσώματα φάγου ενσωματωμένα στο βακτηριακό γονιδίωμα, καθώς επίσης και τα πλασμίδια. Ιογενείς παράγοντες οι οποίοι φαίνεται να είναι απαραίτητοι για την λοιμοτοξικότητα των EHEC O157 είναι οι τοξίνες Shiga, η θέση για την εντεροκυτταρική εξάλειψη (LEE), και το μεγάλο πλασμίδιο pO157.

1.1.7 Shiga τοξίνες

Οι τοξίνες Shiga είναι μέλη μιας οικογένειας τοξινών οι οποίες μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Οι τοξίνες Shiga που ταυτοποιήθηκαν στα εντεροαιμορραγικά στελέχη *E. coli* κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο διακριτές υποομάδες: Stx1 και Stx2. Οι τοξίνες παράγονται από τον παθογόνο στο έντερο και προκαλούν τοπική βλάβη καθώς επίσης

έχουν την ικανότητα να ταξιδεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο νεφρό όπου θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην πρόκληση αιμορραγικής κολίτιδας και αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου. Κοινά χαρακτηριστικά τοξινών Shiga αφορούν στο γεγονός ότι και οι δύο τοξίνες είναι πολυμερή που αποτελούνται από μια A υποομάδα και πενταμερείς B υποομάδες. Και οι δύο κωδικοποιούνται σε ένα οπερόνιο με το γονίδιο της A υποομάδας εγγύτερο στο γονίδιο της B υποομάδας. Επιπρόσθετα, και οι δύο τοξίνες κωδικοποιούνται χρωμοσωμικά και από φάγους. Η B υποομάδα μεσολαβεί στη σύνδεση στους υποδοχείς στις μεμβράνες των ευκαρυωτικών κυττάρων ενώ οι A μονάδες έχουν δράση N-γλυκοζιδάσης, η οποία οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο με την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης στο επίπεδο της 28S υπομονάδας του ριβοσωμικού RNA. Η Stx2 είναι 1000 φορές περισσότερο κυτταροτοξική από την Stx1. Οι φαινότυποι της τοξίνης είναι μεταβλητοί μεταβλητοί μεταξύ των μη O157 στελεχών *E. coli* που παράγουν Shiga τοξίνη, ενώ υπάρχουν αξιοσημείωτα επιδημιολογικά στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι απομονώσιμα στελέχη STEC που παράγουν Stx2 συνδέονται συχνότερα με σοβαρή ασθένεια σε σύγκριση με απομονώσιμα στελέχη που παράγουν μόνο Stx1 (Viazis & Diez-Gonzalez, 2011).

1.1.8 Μελέτες Σχετικά Με Το Βόειο Κιμά

Έχουν διεξαχθεί μερικές μελέτες παγκοσμίως οι οποίες εξετάζουν τον επιπολασμό των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* σε βόειο κρέας και σε προϊόντα του. Μία ανασκόπηση από τους Rhoades et al. (2009) που διεξήχθη στο πλαίσιο του ProSafeBeef (ένα ολοκληρωμένο έργο στα πλαίσια του 6ου Προγράμματος Πλαισίου της Ε.Ε. σχετικά με την ευρωπαϊκή αλυσίδα βόειου κρέατος) ανέφερε ότι ο επιπολασμός των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* κυμάνθηκε από 0 έως 16.8% στο βοδινό κρέας, με τις περισσότερες μελέτες να επικεντρώνονται στον ορότυπο O157. Οι διαφορές στο μαγείρεμα στου βόειου κρέατος και οι καταναλωτικές συνήθειες κατά μήκος των γεωγραφικών περιοχών έχουν επίσης επίδραση στον κίνδυνο που τίθεται από τη μόλυνση με τοξικογόνα στελέχη σε βόεια προϊόντα. Μία ποσοτική αξιολόγηση της επικινδυνότητας του *E. coli* O157 από τους Delignette-Muller & Cornu (2008) σε κατεψυγμένα μπιφτέκια από βοδινό κιμά που καταναλώθηκαν από νεαρά παιδιά στη Γαλλία, εξέτασαν την επίδραση της προτίμησης μαγειρέματος και έδειξαν ότι μόνο ένα καλοψημένο μπιφτέκι είχε αξιοσημείωτη μείωση του κινδύνου για αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο. Σχετικά λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τον επιπολασμό των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* σε έτοιμα προς κατανάλωση βόεια προϊόντα. Μία μελέτη στο Ηνωμένο Βασίλειο δεν ανίχνευσε τοξικογόνα στελέχη *E. coli* O157 σε μαγειρεμένα μπιφτέκια από καταστήματα προετοιμασίας γευμάτων, ενώ έρευνα στον

Καναδά επίσης απέτυχε στο να ανιχνεύσει στελέχη *E. coli* O157 που παράγουν τοξίνη σε μαγειρεμένα βόεια δείγματα (Bohaychuk et al., 2006). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι είναι πολύ δύσκολο να συγκριθούν αποτελέσματα από μελέτες επιπολασμού τοξικογόνων στελεχών εξαιτίας των διαφορών στις μεθοδολογίες που εφαρμόστηκαν (Geraldine Duffy, Burgess, & Bolton, 2014).

1.1.9 Παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση

Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* στην επεξεργασία και διανομή του βόειου κρέατος περιλαμβάνουν τη θερμοκρασία συντήρησης, το pH και την ατμόσφαιρα συσκευασίας. Αρκετές ομάδες έχουν εξετάσει την επίδραση διαφόρων παραμέτρων στην επιβίωση των τοξικογόνων στελεχών αλλά η περισσότερη έρευνα που έχει διεξαχθεί, έχει επικεντρωθεί στα στελέχη *E. coli* O157, με πολύ λίγες μελέτες να εξετάζουν την επίδραση διαφορετικών παραμέτρων μεταποίησης, εστιάζοντας ιδιαίτερα στην επιβίωση στελεχών *E. coli* εκτός του ορότυπου O157 σε βόεια προϊόντα (Geraldine Duffy et al., 2014).

Θερμοκρασία συντήρησης

Η επιβίωση τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157 στις συνήθως χρησιμοποιούμενες θερμοκρασίες συντήρησης στο βόειο κρέας και στα προϊόντα έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Μια μελέτη σε βόειο ταρτάρ (βόειος κιμάς με λιποπεριεκτικότητα λιγότερη από 10%) και σε αμερικάνικο φιλέτο (ταρτάρ αναμεμιγμένο με σάλτσα που έχει ως βάση τη μαγιονέζα) έδειξε ότι τα εμβολιασμένα στελέχη *E. coli* O157 επιβίωσαν και στα δύο προϊόντα που αποθηκεύτηκαν στους -20 , 0 , 5 ή 7 °C για 3 μέρες και στους 7 και 15 °C τα στελέχη παρέμειναν στατικά για 5 ημέρες. Οι Sage & Ingham (1998) εξέτασαν την επιβίωση ενός αριθμού τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157 σε βόεια μπιφτέκια μετά από κατάψυξη στους -20 °C για 24 h και απόψυξη με διάφορες μεθόδους. Έδειξαν ότι υπήρχε επιβίωση των στελεχών αλλά σημείωσαν μια σημαντική διακύμανση μεταξύ της ευαισθησίας των στελεχών στη διαδικασία ψύξης-απόψυξης. Οι Ansay, Darling & Kaspar (1999) έδειξαν ότι ο πληθυσμός του μικροοργανισμού *E. coli* O157 σε βόεια μπιφτέκια μειώθηκε κατά $1.9 \log_{10}$ CFU/g μετά από 4 εβδομάδες στους 2°C και κατά $1.5 \log_{10}$ CFU/g όταν συντηρήθηκαν στους -2°C . Προηγούμενη αποθήκευση στους 15°C για 4h, πριν από τη συντήρηση στους -2°C για 4 εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα μια μείωση $2.7 \log_{10}$ CFU/g. Το συμπέρασμα μιας μελέτης σχετικά με το βόειο κρέας ήταν ότι οι θερμοκρασίες των 4°C ή χαμηλότερες μπορούν να

περιορίσουν την ανάπτυξη *E. coli* O157 αλλά έχουν μικρή επίδραση στην επιβίωση (Guerini, Arthur, Shackelford, & Koohmaraie, 2006). Οι Vold, Holck, Wasteson & Nissen (2000) επικεντρώθηκαν στην επίδραση της φυσικής μικροχλωρίδας του βόειου κρέατος στην επιβίωση τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157, εξετάζοντας την συντήρηση στους 12°C, αντιπροσωπευτική των καταχρηστικών θερμοκρασιών συντήρησης. Η φυσική μικροχλωρίδα βρέθηκε να αναστέλλει μερικώς την ανάπτυξη *E. coli* O157 αλλά παρόλα αυτά, ο πληθυσμός τους αυξήθηκε από 3 log₁₀ CFU/g σε 6 log₁₀ CFU/g μετά από 10 ημέρες συντήρησης κάτω από αερόβιες συνθήκες.

Συμπερασματικά, αυτές οι μελέτες δείχνουν τον κρίσιμο ρόλο της θερμοκρασίας συντήρησης στην ελαχιστοποίηση της ανάπτυξης των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157 στο βόειο κρέας και στα προϊόντα του. Παρόλα αυτά, παρουσιάζουν επίσης ότι η συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες δεν είναι αποτελεσματική παρέμβαση για την εξάλειψη *E. coli* O157 (Geraldine Duffy et al., 2014).

Θερμική Απενεργοποίηση

Ένας αριθμός παραγόντων που επιδρούν στην ικανότητα των βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157, να αντέχουν υψηλές θερμοκρασίες περιλαμβανομένων το σύστημα του τροφίμου, της σύνθεσης του και της παρουσίας της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας (G. Duffy, 2003). Σε μελέτη σχετικά με την επίδραση της μαγειρικής σε τηγάνι ή ψησίματος στους 60 °C σε μη ανέπαφες μπριζόλες εμβολιασμένες με *E. coli* O157 σε διαφορετικά βάθη, η θερμική αδρανοποίηση φάνηκε να επηρεάζεται από τη μέθοδο μαγειρικής που χρησιμοποιήθηκε, το βάθος τους εμβολιασμού, και σε μερικές περιπτώσεις από το πάχος της μπριζόλας αλλά δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ανάκτηση του μικροοργανισμού στις μπριζόλες που μαγειρεύτηκαν από την κατάψυξη έναντι αυτών που είχαν αποψυχθεί στους 4°C ή 25°C.

Οι Yoon et al. (2013) έδειξαν παρομοίως ότι το ψήσιμο με άμεση, υψηλή θερμότητα με θερμική πηγή ακριβώς πάνω από το τρόφιμο ήταν πιο αποτελεσματικό από το ψήσιμο στη σχάρα (εφαρμογή άμεσης θερμότητας κάτω από το τρόφιμο) ή το τηγάνισμα όσο αφορά στη μείωση των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157 σε μπιφτέκια από βόειο κρέας. Η απενεργοποίηση του *E. coli* O157 και στελεχών *E. coli* εκτός του ορότυπου O157 (ορότυποι O111, O45, O145, O121 και O145) εξετάστηκε σε μπριζόλες που μαγειρεύτηκαν στα κάρβουνα (με την άλμη να εγχέεται με μορφή αερίου), σε ένα εύρος θερμοκρασιών από τους 37.8°C έως 71.1°C. Σε όλες τις θερμοκρασίες σημειώθηκαν μειώσεις, με τα στελέχη *E. coli* O157 και τα στελέχη των άλλων οροτύπων να συμπεριφέρονται παρόμοια σε όρους

μετατόπισης και θερμικής απενεργοποίησης. Ωστόσο, η επιβίωση και των δύο ομάδων οροτύπων καταγράφηκε σε τελικό εσωτερικό σημείο θερμοκρασίας 71.1°C ως αποτέλεσμα της μη ομοιόμορφης θέρμανσης του κρέατος (Luchansky et al., 2011).

Μια μελέτη σε βόειο κιμά έδειξε ότι οι χρόνοι δεκαδικής μείωσης (D-values) στους 60°C ήταν χαμηλότεροι για τα στελέχη όπου τα προϊόντα είχαν καταψυχθεί προηγουμένως (D-value των 4.5 min), σε αντίθεση με αυτά που είχαν ψυχθεί (D-value των 11.3 min). Οι Duffy, Walsh, Blair & McDowell (2006) έδειξαν ότι η D-value στους 55°C για στελέχη *E. coli* O157 που δεν υπέστη θερμικό στρες σε βόειο κιμά κυμάνθηκε από 0.9 έως 10.04 min, ανάλογα με το στέλεχος, ενώ η D-value για στελέχη *E. coli* O26 στις ίδιες συνθήκες κυμάνθηκε από 7.2 έως 8.28 min. Ο Wiegand et al. εξέτασαν τις D-values για καρυκευμένο και μη βόειο κιμά, βρήκαν ότι η προθήκη 5% καρυκεύματος μείωσε σημαντικά την θερμοανθεκτικότητα των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157 σε βόειο κιμά στους 54.4°C, αλλά όχι στους 60 ή 65.5°C, με τη D-value στους 54.4°C στο προϊόν χωρίς καρυκεύματα να είναι 50.9 min, σχεδόν διπλάσια από εκείνη του βόειου κιμά με καρυκεύματα (26.9 min). Παρομοίως, εξετάστηκε η θερμική απενεργοποίηση των προσαρμοσμένων και μη προσαρμοσμένων, στο στρες, στελεχών *E. coli* O157 με διαφορετικές συνθέσεις άλμης αυξημένου σε υγρασία μη ανέπαφου βόειου κρέατος και μαγειρεύτηκε στους 65°C. Οι καταπονήσεις ψύξης και ξήρανσης ευαισθητοποίησαν τα στελέχη *E. coli* O157 στη θερμική απενεργοποίηση, ενώ η προσαρμογή σε όξινες συνθήκες παρείχε διασταυρούμενη προστασία, όμως η προσαρμογή στη θερμότητα και την ασιτία δεν είχε επίδραση στη θερμική απενεργοποίηση (Shen, Geornaras, Belk, Smith, & Sofos, 2011). Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη δουλειά των Riordan et al. (2000) οι οποίοι δεν είδαν διασταυρούμενη προστασία από προηγούμενη προσαρμογή σε οξύ σε μελέτες θερμικής απενεργοποίησης σε προϊόντα με βάση το πεπερόνι. Τέτοιες παρατηρήσεις, καθώς επίσης και οι μεγάλες διακυμάνσεις των D-values, ίσως να οφείλονται σε διαφορές στις μεθοδολογίες, στα στελέχη ή στο περιβάλλον του τροφίμου. Αυτές οι μελέτες υπογραμμίζουν τη σημασία επικύρωσης των θερμικών επεξεργασιών χρησιμοποιώντας την κατάλληλη μικροχλωρίδα, τις συνθέσεις των προϊόντων και των τεχνολογιών επεξεργασίας (Geraldine Duffy et al., 2014).

Χαμηλό pH και ζυμούμενα προϊόντα

Ένας καλά αναγνωρισμένος παράγοντας στα τοξικογόνα στελέχη *E. coli* O157 είναι η ικανότητά τους να ανέχονται τις όξινες συνθήκες, επιτρέποντας την επιβίωση στο γαστρικό περιβάλλον. Υπάρχουν επίσης επιπτώσεις σε θέματα ασφάλειας στα έτοιμα προς

κατανάλωση προϊόντα χαμηλού pH. Σε μελέτες βασισμένες σε υγρό θρεπτικό υλικό, το *E. coli* O157 έχει δείξει να είναι ικανό ανάπτυξης σε pH 4.0–4.5 στους 25°C. Αρκετοί συγγραφείς έχουν εξετάσει τη βελτιστοποίηση των σκευασμάτων και των διεργασιών για τη μείωση του *E. coli* O157 σε ζυμούμενα προϊόντα βόειου κρέατος. Οι Heir et al. (2010) έδειξαν ότι η βελτιστοποίηση των μεταβλητών συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων NaCl, γλυκόζης, NaNO₃, τη θερμοκρασία ζύμωσης, το pH και την ενεργότητα νερού (a_w) στην παραγωγή ξηρών αλλαντικών που έχουν υποστεί ζύμωση θα μπορούσε να επιφέρει μειώσεις στον πληθυσμό των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* περίπου 3 log κατά τη διάρκεια της παραγωγής.

Η συντήρηση τέτοιων προϊόντων σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος έχει επίσης δείξει να βελτιώνει μειώσεις του πληθυσμού του παθογόνου και το στάδιο της ωρίμανσης/συντήρησης είναι, επιπρόσθετα στον έλεγχο της ανάπτυξης και στα αρχικά επίπεδα του παθογόνου, ένα κρίσιμο στάδιο στην ασφαλή παραγωγή των ζυμούμενων προϊόντων που δεν υπόκεινται σε θερμική μεταχείριση (Lindqvist & Lindblad, 2009). Ως εκ τούτου, η συνταγή και η βελτιστοποίηση της μεταποίησης είναι ζωτικής σημασίας για να διασφαλιστεί η επαρκής μείωση των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* σε τέτοιου είδους προϊόντα (Geraldine Duffy et al., 2014).

Συσκευασία

Στον τομέα του βόειου κρέατος υπάρχει η κοινή πρακτική για τα σφάγια να τμηματοποιούνται σε βασικά τεμάχια και έπειτα να συσκευάζονται σε κενό για τη διανομή. Το βόειο κρέας και τα προϊόντα του στη συνέχεια διανέμονται και πωλούνται με διαφορετικούς τρόπους, είτε σε κρεοπωλεία ή σουπερμάρκετ και μπορεί να πουληθούν χύμα ή σε συσκευασία. Η χρήση διαφορετικών συστημάτων συσκευασίας μπορεί να αναστείλλει τα αλλοιωγόνα βακτήρια και να αυξήσει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Η επίδραση της ατμόσφαιρας της συσκευασίας, συμπεριλαμβανομένων της συσκευασίας με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) και τη συσκευασία με κενό, στην επιβίωση των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* έχει ερευνηθεί σε αρκετές μελέτες. Εμβολιασμένος βόειος κιμάς συντηρήθηκε στους 10°C κάτω από υψηλό μίγμα O₂ και ο πληθυσμός του *E. coli* O157 αυξήθηκε από 3 log₁₀ CFU/g στους 4 log₁₀ CFU/g (Nissen, Alvseike, Bredholt, Holck, & Nesbakken, 2000).

Ο Uyttendaele et al. (2001) έδειξαν ότι η συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (40% CO₂/60% N₂) ή με κενό δεν είχε σημαντική επίδραση στην επιβίωση του *E. coli* O157 σε εμβολιασμένες φέτες βόειου κρέατος λιανικής πώλησης σε σύγκριση με

αυτές που ήταν συσκευασμένες σε αέρα. Ο Kudra et al. (2011) έδειξαν ότι η συσκευασία σε κενό ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (99.6% CO₂ + 0.4% CO) από μόνη της δεν μείωσε σημαντικά τον αριθμό των στελεχών *E. coli* O157 σε μπιφτέκια βόειου κιμά μετά από 48 h συντήρησης στους 4°C και δεν υπήρχε επίσης μία στατιστικώς σημαντική μείωση στα προϊόντα που είχαν συσκευασθεί σε κενό μετά από συντήρηση για έξι εβδομάδες. Παρόλα αυτά σημαντικώς στατιστική μείωση παρατηρήθηκε στο προϊόν με συσκευασία MAP μετά από τέσσερις εβδομάδες συντήρησης σε ψύξη, η μείωση που παρατηρήθηκε στις έξι εβδομάδες ήταν λίγο πάνω από 1 log₁₀ CFU/g. Παρομοίως οι Dykes, Moorhead & Roberts (2001) εξέτασαν εμβολιασμένα αρχικά τεμάχια βόειου κρέατος υπό κενό ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα (100% CO₂) και έδειξαν ότι δεν υπήρχαν σημαντικές αλλαγές στους αριθμούς των τοξικογόνων στελεχών *E. coli* O157 κατά τη διάρκεια συντήρησης είτε στους -1.5°C για έξι εβδομάδες ή στους 4°C για δύο εβδομάδες. Συνολικά, μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι συσκευασίες σε κενό και τροποποιημένη ατμόσφαιρα δεν είναι αποτελεσματικές παρεμβάσεις για τη μείωση ή εξάλειψη του *E. coli* O157 σε προϊόντα βόειου κρέατος (Geraldine Duffy et al., 2014).

1.2 Θερμική Επεξεργασία

Η μικροβιακή επιμόλυνση των τροφίμων είναι ένα θέμα κύριου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία τροφίμων, τους ρυθμιστικούς φορείς και τους καταναλωτές. Εκτιμάται ότι 76 εκ. άνθρωποι προσβλήθηκαν από τροφιμογενείς λοιμώξεις κάθε χρόνο στις ΗΠΑ. Το εκτιμώμενο κόστος σχετικά με τις τροφιμογενείς ασθένειες στις ΗΠΑ είναι μεταξύ \$10 δισεκατομμυρίων και \$83 δισεκατομμυρίων ετησίως (USFDA, 2001) (Wu, 2008). Μέθοδοι όπως θέρμανση, κατάψυξη, ξήρανση, λυοφιλίωση, ακτινοβολία, υψηλή υδροστατική πίεση, ζύμωση, ή προσθήκη αντιμικροβιακών και χημικών ουσιών χρησιμοποιούνται συνήθως για τον έλεγχο της βακτηριακής επιμόλυνσης και των παθογόνων. Μετά από αυτές τις μεταχειρίσεις, ένας πληθυσμός των μικροοργανισμών μπορεί να θανατωθεί, άλλος πληθυσμός μπορεί να επιβιώσει (μη τραυματισμένα κύτταρα), και ένα τρίτος πληθυσμός ίσως τραυματιστεί υποθανάτια.

Η θερμική επεξεργασία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος συντήρησης και τα θερμικά κατεργασμένα τρόφιμα έχουν καλό ιστορικό όσο αφορά στην ασφάλεια τους. Η θερμική καταστροφή των μικροοργανισμών λαμβάνει χώρα ακολουθώντας μιας πρώτης τάξης ημι-λογαριθμική τιμή (Awuah, Ramaswamy, & Economides, 2007). Βιομηχανικά, οι θερμικές επεξεργασίες σχεδιάζονται από τις κατάλληλες αρχές για να παρέχουν εμπορικά στείρα προϊόντα ή με σταθερό χρόνο ζωής. Η εμπορική αποστείρωση

(όπως ορίζεται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA)) ή η σταθερότητα της διάρκειας χρόνου ζωής (Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA)) αναφέρεται στις συνθήκες που επιτυγχάνονται σε ένα προϊόν με την εφαρμογή θερμότητας για να καταστήσουν το προϊόν απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς οι οποίοι είναι ικανοί να αναπαραχθούν στο τρόφιμο κάτω από κανονικές μη ψυχόμενες συνθήκες συντήρησης και διανομής. Σχεδιάζοντας μια ασφαλή θερμική επεξεργασία, απαιτείται εκτεταμένη κατανόηση των μεθόδων διεργασίας, της συμπεριφοράς θέρμανσης του προϊόντος και της επίδρασης της στον μικροοργανισμό-στόχο.

Έτσι, η σοβαρότητα οποιασδήποτε θερμικής επεξεργασίας πρέπει να είναι γνωστή και εξαρτάται από παράγοντες όπως: (i) τα φυσικά χαρακτηριστικά του τροφίμου συμπεριλαμβανομένων των θερμοφυσικών του ιδιοτήτων, του σχήματος, του μεγέθους του περιέκτη που συγκρατεί το προϊόν (ii) το είδος και τη θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών-στόχων οι οποίοι είναι πιθανότατα παρόντες στο τρόφιμο και (iii) το pH, την ενεργότητα νερού (a_w) και την περιεκτικότητα σε αλάτι του τροφίμου.

Το ανεπαρκώς μαγειρεμένο τρόφιμο ή η επιβίωση του παθογόνου κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος του τροφίμου είναι ένας παράγοντας που έχει συμβάλει στα περισσότερα κρούσματα. Ως εκ τούτου, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας του παθογόνου *E. coli* O157: H7 στην θερμότητα. Για να καταστραφούν όλα τα βακτήρια, το μαγείρεμα των προϊόντων κρέατος (ρολό κιμά, μπιφτέκια) πρέπει να γίνεται σε μια ασφαλή ελάχιστη εσωτερική θερμοκρασία 71.1°C (160°F) (USDA, 2013). Η μετρούμενη θερμική ανθεκτικότητα ενός είδους μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των συνθηκών ανάπτυξης, όπως η φάση ανάπτυξης των κυττάρων, το pH, και την ενεργότητα νερού του μέσου ανάπτυξης, τη θερμοκρασία ανάπτυξης, τη χρονική περίοδο πριν την θερμική επεξεργασία, το θερμικό σοκ (στρες), τη μέθοδο θέρμανσης, για παράδειγμα, η χρήση ανοικτού συστήματος θέρμανσης και ο ρυθμός θέρμανσης, το διαλυτό μέσο θέρμανσης, συμπεριλαμβανομένων της σύνθεσης του, του pH, της ενεργότητας νερού και της υγρής ουσίας, και τέλος των συνθηκών ανάκτησης (Stringer, George, & Peck, 2000).

Οι θερμικές διεργασίες που έχουν καθιερωθεί, βασίζονται σε δύο προϋποθέσεις: (i) τη θερμοανθεκτικότητα των μικροοργανισμών για κάθε συγκεκριμένη σύνθεση προϊόντος, και (ii) το ρυθμό θέρμανσης του συγκεκριμένου προϊόντος. Το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA) έχει σχεδιάσει “Το Πρόγραμμα Μοντελοποίησης των Παθογόνων” (“The Pathogen Modeling Program”) ως ερευνητικό και εκπαιδευτικό εργαλείο για την εκτίμηση των επιπτώσεων των πολλαπλών μεταβλητών στην ανάπτυξη, επιβίωση και αδρανοποίηση των

τροφιμογενών παθογόνων (<http://www.arserrc.gov/mfs/pathogen.htm>). Το πρόγραμμα, το οποίο βασίζεται στη μαθηματική μοντελοποίηση των πειραματικών δεδομένων, μπορεί να αποτελέσει χρήσιμη πηγή για την κατανόηση της επίδρασης του pH και της θερμοκρασίας μεταξύ άλλων, σχετικά με τους παθογόνους στη βιομηχανία τροφίμων. (Awuah et al., 2007)

1.2.1 Κινητική Θερμικής Απενεργοποίησης

Οι κινητικές θερμικής απενεργοποίησης των μικροοργανισμών λαμβάνονται καθιερώνοντας αρχικά μια καμπύλη επιβίωσης, η οποία είναι μια λογαριθμική γραφική παράσταση του αριθμού των μικροοργανισμών που επιβιώνουν μιας δεδομένης θερμικής μεταχείρισης σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία έναντι του χρόνου θέρμανσης. Αυτό προϋποθέτει ότι η μικροβιακή απενεργοποίηση ακολουθεί γενικά μια αντίδραση πρώτης τάξης. Δύο βασικές παράμετροι (D -, z - values) καθορίζονται από τις καμπύλες επιβίωσης και ανθεκτικότητας, αντίστοιχα (Awuah et al., 2007). Η D -value αντιπροσωπεύει τον χρόνο θέρμανσης που έχει ως αποτέλεσμα 90% μείωση του υπάρχοντος μικροβιακού πληθυσμού. Αυτό εκφράζεται μαθηματικά ακολούθως:

$$D = \frac{t_2 - t_1}{\log(A) - \log(B)} \quad (1.2.1)$$

όπου,

A και B αντιπροσωπεύουν τα επιζώντα στελέχη μετά τη θέρμανση για χρόνους t_1 και t_2 λεπτά.

Η σταθερά αντίδρασης πρώτης τάξης (k) λαμβάνεται από την έκφραση $k=2.303/D$. Η σταθερά θερμικής ανθεκτικότητας (z -value) η οποία αντιπροσωπεύει την μεταβολή θερμοκρασίας η οποία οδηγεί σε μια 10πλάσια μεταβολή στη D -value, αναπαρίσταται μαθηματικά με τον ακόλουθο τρόπο:

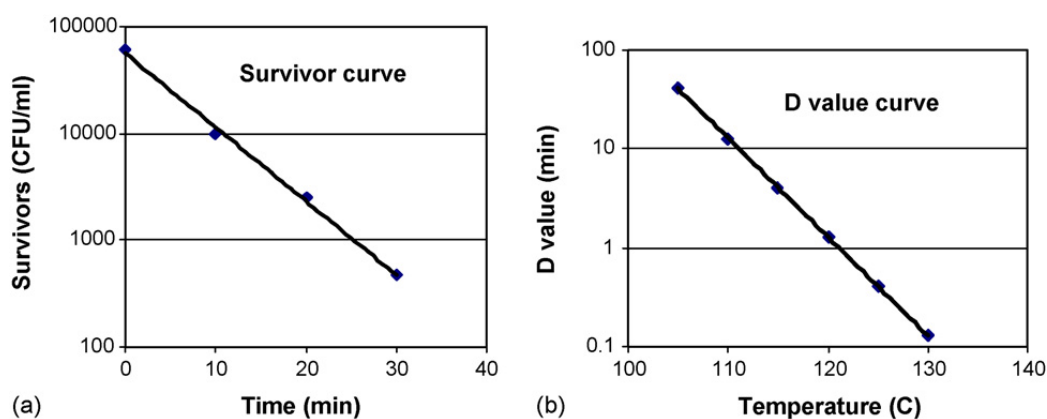
$$z = \frac{T_2 - T_1}{\log(D_1) - \log(D_2)} \quad (1.2.2)$$

όπου, D_1 και D_2 είναι οι D -values σε θερμοκρασίες T_1 και T_2 , αντίστοιχα.

Παρόλο που η κινητική αντίδρασης πρώτης τάξης και οι D -values έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε υπολογισμούς θερμικής απενεργοποίησης, η βιβλιογραφία είναι γεμάτη παραδείγματα όπου οι κινητικές αντιδράσεων πρώτης τάξης δεν ακολουθούνται. Πράγματι, οι Pflug και Holcomb (1991) εκτίμησαν ότι μόνο το 1/3 των δεδομένων θερμικής απενεργοποίησης ακολουθούν τέτοια κινητική.

Οι αποκλίσεις από την κινητική πρώτης τάξης (συνήθως αναφέρεται ως μηχανιστική προσέγγιση) παίρνουν τη μορφή "ώμων" ή "ουρών" (shoulders or tails), κάτι το οποίο έχει μελετηθεί. Υπάρχουν δύο βασικές εξηγήσεις γιατί δεν ακολουθείται η κινητική πρώτης τάξεως. Η πρώτη είναι ότι, οι "ώμοι" ή οι "ουρές" είναι αποτέλεσμα εσφαλμένης εκτίμησης και μπορούν να αποδοθούν σε περιορισμούς της πειραματικής διαδικασίας. Η δεύτερη εξήγηση είναι ότι οι "ώμοι" ή οι "ουρές" είναι ένα φυσικό χαρακτηριστικό που συνδέεται με το μηχανισμό της θερμικής απενεργοποίησης ή ανθεκτικότητας του πληθυσμού (Stringer et al., 2000).

Ο σχηματισμός "ουρών" θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα από (i) ένα μικρό αριθμό μεγάλων συσσωματωμάτων κυττάρων σε ένα πληθυσμό, (ii) διαφορές στην θερμική ανθεκτικότητα των κυττάρων και (iii) μεταβολές στον κύκλο ζωής ή στη δυνητική θερμική προσαρμογή. Η παρουσία "ώμων" έχει αποδοθεί στους μικροβιακούς πληθυσμούς οι οποίοι αποτελούνται από μερικούς υπο-πληθυσμούς (με κάθε πληθυσμό να έχει τη δική του κινητική απενεργοποίησης), στη συσσωμάτωση των κυττάρων και στη κακή μεταφορά θερμότητας ή τους πολλαπλούς στόχους μέσα σε ένα κύτταρο. Η βιταλιστική προσέγγιση βασίζεται στην παραδοχή ότι η εκθετική αποσύνθεση των μικροοργανισμών θα μπορούσε να εξηγηθεί από τις διαφορές στην ανθεκτικότητα ή στην κινητική απενεργοποίησης. Αυτή η προσέγγιση έχει αμφισβητηθεί να αγνοεί την αυστηρή στοχαστική βάση για το μετασχηματισμό απενεργοποίησης με την παραδοχή ότι η βιολογική μεταβλητότητα στην ανθεκτικότητα μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη συμπεριφορά ορθώς.



Γράφημα 1.2.1.1 (a,b) Τυπικές καμπύλες επιβίωσης και τιμές *D*-value.

Ορισμένοι ερευνητές είναι της άποψης ότι η μη-γραμμικότητα, που σχετίζεται με κάποιες ημι-λογαριθμικές καμπύλες, είναι απίθανο να προκύψει από ένα μεικτό πληθυσμό ή από πειραματικά λανθασμένες εκτιμήσεις ως παραδοσιακούς ισχυρισμούς αιτιολόγησης. Μία εναλλακτική εξήγηση στη μη-γραμμικότητα είναι ότι η καμπύλη επιβίωσης είναι μια συσσωρευτική μορφή χρονικής κατανομής θανατηφόρων γεγονότων. Επιπρόσθετα, οι ημι-λογαριθμικές καμπύλες επιβίωσης είναι αντανάκλασεις των κατανομών θερμικής ανθεκτικότητας, έχοντας ένα διαφορετικό τρόπο λειτουργίας, παραλλακτικότητα και ασυμμετρία, αλλά όχι θνησιμότητα διαφορετικής κινητικής διαφορετικών τάξεων.

Η έννοια της ύπαρξης καμπυλών επιβίωσης να ακολουθούν μια κατανομή γεγονότων αναφέρεται ως πιθανολογική προσέγγιση. Η πιθανολογική προσέγγιση έχει επίσης αμφισβητηθεί εξαιτίας περιπλοκών που προκύπτουν από την απενεργοποίηση των σπορίων. Τα σπόρια θα μπορούσαν να είναι σε λανθάνουσα κατάσταση, τα οποία δεν μπορούν να απενεργοποιηθούν άμεσα. Για να ξεκινήσει η ανάπτυξη, αυτά τα σπόρια πρέπει να ενεργοποιηθούν. Η απενεργοποίηση των ζώντων αδρανοποιημένων σπορίων διαφέρει από εκείνη των ενεργοποιημένων σπορίων. Ως εκ τούτου, οι παρατηρούμενες επιδράσεις αντιπροσωπεύουν ένα μίγμα κινητικής ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των σπορίων. Άλλοι ερευνητές, οι οποίοι επιχειρηματολογούν ενάντια της πιθανολογικής προσέγγισης, είναι της άποψης ότι η αυθαίρετη χρήση των εξισώσεων κατανομής συχνοτήτων όπως το μοντέλο Weibull, που αναπαριστά ένα εκτεταμένο άλμα στη λογική, το οποίο δεν μπορεί να δικαιολογηθεί αυστηρά (Awuah et al., 2007).

1.2.2 Μελέτες θερμικής απενεργοποίησης του *E. coli* O157:H7 στο κρέας

Αρκετοί συγγραφείς έχουν μελετήσει τη θερμική απενεργοποίηση του *E. coli* O157:H7 σε θρεπτικά μέσα καθώς επίσης και σε τρόφιμα, με κυρίαρχο το κρέας. Οι Jackson, Hardin, & Acuff (1995) μελέτησαν τη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου σε υγρό θρεπτικό υλικό και σε μπιφτέκια βόειου κιμά, όπως αυτή επηρεαζόταν από τις θερμοκρασίες συντήρησης και αναμονής του προϊόντος πριν από τη θερμική επεξεργασία. Βρήκαν ότι τα κύτταρα του παθογόνου στα κατεψυγμένα μπιφτέκια (-18°C) είχαν σημαντική μεγαλύτερη θερμική ανθεκτικότητα ($P < 0.05$) από εκείνα που συντηρήθηκαν σε συνθήκες ψύξης (3°C) ή στους 15°C πριν από το ψήσιμο στους 62.8°C και σημαντικά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από εκείνα που αποθηκεύτηκαν στους 15°C πριν από το ψήσιμο στους 68.3°C. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια ψήσιματος στους 68.3°C στα μπιφτέκια που είχαν συντηρηθεί στους 3°C σε σύγκριση με αυτά που συντηρήθηκαν στους -18°C, ωστόσο, αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική λόγω της μεγάλης παραλλακτικότητας στα

κατεψυγμένα μπιφτέκια. Η μεγαλύτερη επιβίωση του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια του ψησίματος των μπιφτεκιών θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα ενός βραδύτερου ρυθμού θέρμανσης κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος, ή των αλλαγών στη φυσιολογία εντός του βακτηριακού κυττάρου ως αποτέλεσμα της κατάψυξης.

Πίνακας 1.2.2.1: Ο μέσος όρος των μειώσεων του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 (log CFU/g) (\pm τυπική απόκλιση δείγματος) σε βόεια μπιφτέκια, ψημένα σε εσωτερική θερμοκρασία 54.4, 62.8, ή 68.3°C (Jackson et al., 1996).

Treatment ^a	Mean log CFU/g reduction (\pm SD)		
	Final internal temperature of patty		
	54.4°C	62.8°C	68.3°C
-18°C	0.3 (0.1) ^b	1.2 (0.6)BCD	3.0 (1.8)FG
-18°C/21°C	0.7 (0.1)BC	3.9 (0.9)GH	4.8 (0.3)HIJK
-18°C/30°C	1.6 (0.7)BCDE	5.5 (0.3)JKLM	5.2 (0.7)IJKL
3°C	0.5 (0.3)BC	2.6 (0.5)E	4.1 (0.5)FGHI
3°C/21°C	1.3 (0.4)BCDE	5.3 (0.2)JKLM	5.2 (0.3)JKLM
3°C/30°C	1.9 (0.3)CDE	6.0 (0.2)LM	5.8 (0.4)JKLM
15°C	1.0 (0.1)BC	4.3 (0.7)HIJ	5.1 (0.1)IJKLM
15°C/21°C	1.6 (0.8)BCDE	5.4 (0.5)JKLM	5.6 (0.4)KLM
15°C/30°C	2.4 (0.1)DEF	5.3 (1.7)JKLM	6.4 (0.2)M

^a Storage of patties at -18°C for 8 days, or 3 or 15°C for 9 h followed by no holding or holding at 21 or 30°C for 4 h.

^b Means followed by common letters do not differ significantly.

Οι Luchansky et al. (2013) μελέτησαν την επίδραση ψύξης, κατάψυξης, απόψυξης και ψησίματος σε φλόγα αερίου ή σε ηλεκτρικό grill στην επιβίωση του *E. coli* O157:H7 σε βόεια μπιφτέκια. Μετά από συντήρηση σε ψύξη ή κατάψυξη και ακόλουθο μαγείρεμα στους 60 με 76°C, ο μέσος όρος της ολικής μείωσης του *E. coli* O157:H7 κυμάνθηκε από 3.0 με ≥ 7.0 log CFU/g. Ανεξάρτητα από τον τύπο ψησίματος (grill) και την απόψυξη, το μαγείρεμα των μπιφτεκιών με υψηλότερο ποσοστό λίπος (άπαχο : λίπος, 70:30) στους 65.6, 71.1, or 76.7°C ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματικό ($P < 0.05$) στην απενεργοποίηση του παθογόνου από ότι το μαγείρεμα στους 60.0°C. Παρομοίως, στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$) στη θνησιμότητα του *E. coli* O157:H7 παρατηρήθηκαν για τα μπιφτέκια με χαμηλότερο ποσοστό λίπους (97:3) τα οποία ψύχθηκαν, καταψύχθηκαν και έπειτα αποψύχθηκαν στους 21°C, πριν να μαγειρευτούν στο ηλεκτρικό grill στους 60.0°C συγκριτικά με τους 65.6, 71.1, ή 76.7°C. Επίσης, υπήρχε σημαντικά λιγότερη

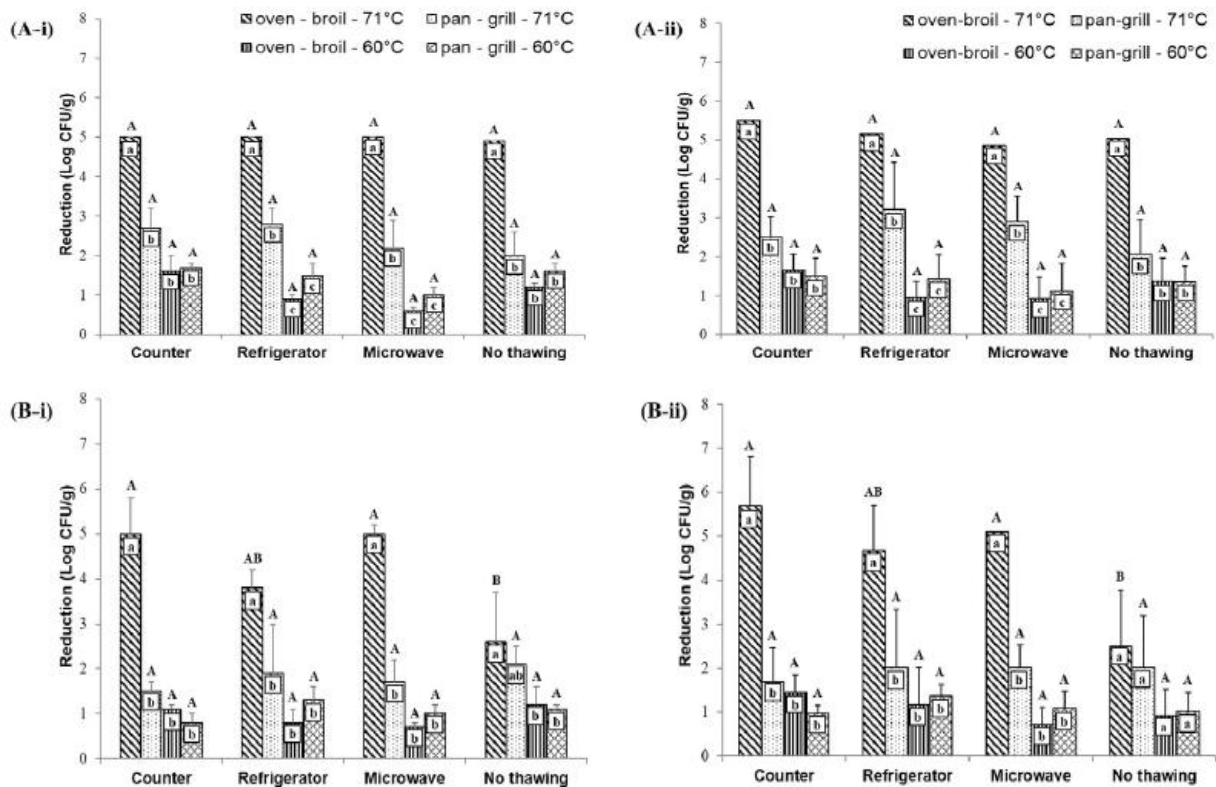
απενεργοποίηση ($P < 0.05$) του παθογόνου στα μπιφτέκια που ψήθηκαν στους 65.6°C συγκριτικά με αυτά στους 76.7°C , όχι όμως με όσα μαγειρεύτηκαν στους 71.1°C . Τέλος, το μαγείρεμα μπιφτεκιών με λιγότερο λίπος, τα οποία είχαν προηγουμένως καταψυχθεί και έπειτα αποψυχθεί στους 21°C , πριν να μαγειρευτούν σε φλόγα αερίου στους 65.6 , 71.1 , ή 76.7°C ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματικό στην απενεργοποίηση του παθογόνου από ότι το μαγείρεμα στους 60.0°C , ωστόσο σημαντικά μικρότερη θνησιμότητα ($P < 0.05$) έναντι του *E. coli* O157:H7 παρατηρήθηκε σε μπιφτέκια τα οποία μαγειρεύτηκαν στους 65.6°C συγκριτικά με τους 71.1 ή 76.7°C .

Πίνακας 1.2.2.2: Θερμική απενεργοποίηση του *E. coli* O157:H7 μετά από μαγείρεμα βόειων μπιφτεκιών σε εμπορικά grills^a (Luchansky et al., 2013).

Temp ($^{\circ}\text{C}$)	Population reduction, avg \pm SD (log CFU/g)			
	<i>E. coli</i> O157:H7			
	93:7%		70:30%	
	Gas	Electric	Gas	Electric
Fresh				
Uncooked	7.16 \pm 0.30 a A	7.16 \pm 0.30 a A	7.67 \pm 0.65 a A	7.67 \pm 0.65 a A
60.0	3.08 \pm 1.98 b AB	2.75 \pm 1.25 b A	3.29 \pm 1.65 b A	2.12 \pm 1.75 b A
65.6	2.54 \pm 1.59 b A	1.13 \pm 0.73 c A	1.22 \pm 0.70 c A	1.42 \pm 1.12 bc AB
71.1	0.93 \pm 0.70 c AB	0.70 \pm 0.0 c A	0.72 \pm 0.07 c A	0.99 \pm 0.82 c A
76.7	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.0 c A
Frozen (after 3 wk at -18°C)				
Uncooked	6.61 \pm 0.59 a A	6.61 \pm 0.59 a A	6.87 \pm 0.13 a AB	6.87 \pm 0.13 a AB
60.0	2.78 \pm 1.59 b B	1.97 \pm 1.36 b AB	3.34 \pm 1.85 b A	2.28 \pm 1.61 b A
65.6	2.30 \pm 1.81 b AB	0.77 \pm 0.22 c A	1.78 \pm 1.60 c A	1.77 \pm 1.45 b A
71.1	1.49 \pm 1.39 c AB	0.72 \pm 0.07 c A	1.18 \pm 1.08 c A	0.71 \pm 0.05 c A
76.7	1.32 \pm 1.25 c A	0.70 \pm 0.0 c A	1.31 \pm 1.24 c A	0.70 \pm 0.0 c A
Frozen then thawed (21°C, 10 ± 2 h)				
Uncooked	6.93 \pm 0.15 a A	6.93 \pm 0.15 a A	6.97 \pm 0.07 a AB	6.97 \pm 0.07 a AB
60.0	3.65 \pm 1.22 b A	1.55 \pm 1.24 b B	4.03 \pm 0.77 b A	2.27 \pm 1.00 b A
65.6	1.57 \pm 1.24 c B	0.85 \pm 0.47 b c A	1.32 \pm 0.90 c A	0.89 \pm 0.44 b B
71.1	0.81 \pm 0.33 cd B	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.02 c A	0.70 \pm 0.0 b A
76.7	0.70 \pm 0.0 d A	0.70 \pm 0.0 c A	0.90 \pm 0.60 c A	0.70 \pm 0.0 b A
Frozen then thawed (4°C, 18 ± 4 h)				
Uncooked	6.90 \pm 0.43 a A	6.90 \pm 0.43 a A	6.73 \pm 0.33 a B	6.73 \pm 0.33 a B
60.0	3.04 \pm 1.58 b AB	1.96 \pm 1.03 b AB	2.20 \pm 1.39 b B	1.83 \pm 0.97 b A
65.6	2.40 \pm 2.20 bc A	0.70 \pm 0.0 c A	1.13 \pm 0.52 c A	0.86 \pm 0.33 c B
71.1	1.71 \pm 1.59 cd A	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.0 c A
76.7	1.16 \pm 1.09 d A	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.0 c A	0.70 \pm 0.0 c A

^a Για το δεδομένο παθογόνο, τη μέθοδο απόψυξης, το ποσοστό λίπους και τον τύπο του ψησίματος, οι μέσοι όροι με κανένα κοινό μικρό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά με τη τεχνική Bonferroni λιγότερο σημαντικής διαφοράς ($P \leq 0.05$); για το δεδομένο παθογόνο, περιεκτικότητα λίπους, τύπο ψησίματος και θερμοκρασία μαγειρέματος οι μέσοι όροι με κανένα κοινό μεγάλο γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικοί με τη τεχνική λιγότερο σημαντικής διαφοράς Bonferroni ($P \leq 0.05$).

Οι Manios & Skandamis (2015) διερεύνησαν την επίδραση των κοινών πρακτικών χειρισμού (κατάψυξη, απόψυξη, μαγείρεμα) βόειων μπιφτεκιών στην επιβίωση του παθογόνου. Παρατήρησαν ότι η κατάψυξη των δειγμάτων (-22°C) για 5 ημέρες προκάλεσε μικρές αλλά στατιστικά σημαντικές μειώσεις ($P < 0.05$) των υγιών κυττάρων του παθογόνου. Κατά τη διάρκεια της κατάψυξης, τα κύτταρα εκτίθενται σε συνθήκες καταπόνησης, κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αναστρέψιμους ή μη, μηχανικούς τραυματισμούς, ωστόσο η μέθοδος της κατάψυξης δεν μπορεί να θεωρηθεί επαρκής χειρισμός για την καταστροφή παθογόνων. Τα θερμοκρασιακά προφίλ έδειξαν ότι τα δείγματα που αποψύχθηκαν στον πάγκο της κουζίνας (20°C για 12 h) παρέμειναν κάτω από τους 5 °C για περίπου 7 h, εξηγώντας τη λογαριθμική αύξηση (0.9 log CFU/g) του πληθυσμού του παθογόνου, κάτι το οποίο δεν ήταν εμφανές κατά τη διάρκεια απόψυξης στους 4 °C (για 16 h) ή σε φούρνο μικροκυμάτων, διότι ο κύκλος απόψυξης ολοκληρώθηκε μέσα σε 22-24 λεπτά. Το μαγείρεμα των βόειων μπιφτεκιών στον φούρνο (oven-broiler) είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερη μείωση του παθογόνου, συγκεκριμένα κάτω από το όριο ανίχνευσης (0.7 log CFU/g) με ψήσιμο σε εσωτερική θερμοκρασία 71 °C, συγκριτικά με το μαγείρεμα στο τηγάνι (pan-grill), ανεξάρτητα από τη διάρκεια συντήρησης σε κατάψυξη ή της μεθόδου απόψυξης. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τον υπολογισμό θνησιμότητας της θερμικής διεργασίας (*F value*). Οι *F-values* μετά το μαγείρεμα στο φούρνο στους 71 °C ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με το μαγείρεμα στο τηγάνι. Ενώ, το ανεπαρκές μαγείρεμα (τελική εσωτερική θερμοκρασία 60 °C) των μπιφτεκιών, οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερη μείωση (0.5–2.7 log CFU/g) του πληθυσμού, ανεξάρτητα της μεθόδου μαγειρέματος.



Γράφημα 1.2.2.1: Λογαριθμικές μειώσεις του *Escherichia coli* O157:H7 (i: στελέχη σε TSA+ 0.6% YE, ii: στελέχη σε CT-SMAC) σε βόεια μπιφτέκια μετά από συντήρηση στους -22°C για 5 (A) ή 75 ημέρες (B), απόψυξη με 4 διαφορετικές μεθόδους (πάγκος, ψυγείο, φούρνος μικροκυμάτων, καθόλου απόψυξη) και μαγείρεμα σε φούρνο (oven-broiler) ή σε τηγάνι (pan-grill) σε εσωτερική θερμοκρασία (γεωμετρικό κέντρο) 60 ή 71°C (Manios & Skandamis, 2015).

Η Lahou et al. (2015) αξιολόγησαν την επίδραση της προσομοίωσης οικιακού τηγανίσματος κρέατος, καθώς και παρασκευασμάτων του από διαφορετικά είδη ζώων, στην θερμική απενεργοποίηση των παθογόνων και στη θερμική ανθεκτικότητα (*D-value*) στελεχών *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

Πίνακας 1.2.2.3: Οι εκτιμώμενες *D-values* στους 60 °C σε κανονικό και προσαρμοσμένο θρεπτικό υλικό σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη και σύγκριση των *D-values* με προηγούμενες μελέτες (Lahou et al., 2015).

Bacterial strain		D-values from normal broth ^a (min)	Mean D-values from published data (min)	D-values from adjusted broth ^a (min)
<i>Salmonella</i>	872	0.59 ± 0.13		0.72 ± 0.39
	875	0.64 ± 0.02		0.95 ± 0.59
	877	0.62 ± 0.08		1.42 ± 0.44
	Mean ^b	0.61 ± 0.08 ABX ^c	0.75 ± 0.74 (n = 62 ^d) AX	1.03 ± 0.52 BX
<i>C. jejuni</i>	595	0.36 ± 0.00		0.43 ± 0.07
	866	0.30 ± 0.04		0.58 ± 0.15
	867	0.54 ± 0.18		0.46 ± 0.07
	Mean ^b	0.40 ± 0.14 AX	0.31 ± 0.26 (n = 12) AX	0.49 ± 0.11 AX
<i>E. coli</i> O157:H7	846	0.73 ± 0.10		1.66 ± 0.49
	847	0.88 ± 0.14		1.06 ± 0.33
	849	0.89 ± 0.11		2.17 ± 0.03
	Mean ^b	0.84 ± 0.13 BX	1.35 ± 0.72 (n = 37) BXY	1.63 ± 0.56 CY
<i>L. monocytogenes</i>	392	1.37 ± 0.46		1.26 ± 0.25
	421	1.05 ± 0.10		1.07 ± 0.31
	491	1.42 ± 0.40		1.90 ± 0.50
	Mean ^b	1.28 ± 0.36 CX	1.74 ± 1.12 (n = 33) BX	1.41 ± 0.50 BCX

^a Values are expressed in mean standard deviations from three replicates.

^b Mean D-values of three or two strains of each organism.

^c Means in the same column with a different letter (A through C) are significantly different ($P < 0.05$). Means in the same row with different letters (X through Y) are significantly different ($P < 0.05$).

^d n, Number of D-values reported from ComBase database and literature.

^e N.D. no data.

Πίνακας 1.2.2.4: Υπολειμματική ανάκαμψη παθογόνων βακτηρίων σε εμβολιασμένο κρέας και παρασκευάσματα του μετά από προσομοίωση οικιακών πρακτικών μαγειρέματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε log CFU/g (Lahou et al., 2015).

Inoculation level (log CFU/g)	After baking	Pork			Chicken			Beef			Lamb			Horse Steak ^c	Kangaroo Steak ^c	Crocodile Steak ^c	Turkey Steak ^c
		Hamburger	Filet	Marinated Strips	Hamburger	Filet	Marinated Strips	Hamburger	Steak ^c	Marinated Strips	Hamburger	Filet	Marinated Strips				
<i>L. monocytogenes</i> (4.2 ± 0.3)	Enumeration ^a	3/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	Mean	1.8 ± 0.8	<1.0	1.0	<1.0	<1.0	<1.0	1.3	<1.0	<1.0	2.6	<1.0	<1.0	1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Maximum	2.5	-	1.0	-	-	-	1.3	-	-	2.6	-	-	1.0	-	-	-
	Enrichment ^b	3/3	0/6	2/9	0/3	0/6	2/9	3/3	2/6	3/9	3/3	2/6	0/9	2/6	1/6	1/6	1/6
<i>Salmonella</i> spp. (4.0 ± 0.3)	Enumeration ^a	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Mean	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
	Maximum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-	-	-	-	-	-
	Enrichment ^b	2/3	1/6	0/9	1/3	0/6	0/9	2/3	0/5	5/9	1/3	1/6	1/9	2/6	0/6	0/6	1/6
<i>Campylobacter</i> spp. (3.7 ± 0.5)	Enumeration ^a	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	Mean	1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	1.7	<1.0	<1.0	<1.0
	Maximum	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	-	-	-
	Enrichment ^b	3/3	0/6	0/9	0/3	0/6	0/9	0/3	0/6	1/9	0/3	0/6	0/9	4/6	0/6	2/6	2/6
<i>E. coli</i> O157 (3.6 ± 0.4)	Enumeration ^a	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
	Mean	1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	1.3	<1.0	<1.0	<1.0
	Maximum	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.3	-	-	-
	Enrichment ^b	2/3	0/6	1/9	1/3	0/6	0/9	0/3	0/5	2/9	1/3	1/6	0/9	2/6	0/6	0/6	0/6

^a These results present the number of times enumeration was possible for the different repeats.

^b These results present the number of times the pathogen was detected after enrichment in 25 gram food product.

^c These results present the inactivation of "well-done" heat inactivation (6'30").

Σύμφωνα με τον πίνακα 1.2.2.4 μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι τα μπιφτέκια απέδωσαν την υψηλότερη μετρήσιμη ανάκαμψη του παθογόνου με τα μπιφτέκια χοιρινού κρέατος (40%) να αποδίδουν το περισσότερο, ακολουθούμενα από αρνίσιο κρέας (20%), βόειο κρέας (13%) και κοτόπουλο (0%). Τα επίπεδα *L. monocytogenes* σε μπιφτέκια μετά από θερμική επεξεργασία κυμαίνονταν από < 1 log CFU/g έως 2.6 log CFU/g. Τα επίπεδα *Salmonella* spp., *E. coli* O157 και *Campylobacter* σε αυτά τα μπιφτέκια κυμάνθηκαν από < 1 log CFU/g έως 1.0 log CFU/g. Όταν το κρέας υφίσταται θερμική επεξεργασία, για να επιτευχθεί το ασφαλές κριτήριο διεργασίας των 70 °C για 2 min (ή ισοδύναμος συνδυασμός χρόνου/ θερμοκρασίας), λαμβάνεται μία μείωση 6 log του *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. *L. monocytogenes* σε προϊόντα κρέατος και έτσι θεωρείται ότι το κρέας είναι απαλλαγμένο από παθογόνους και άρα ασφαλές για να καταναλωθεί. Ωστόσο, η προσομοίωση των οικιακών πρακτικών μαγειρικής έδειξε την περιστασιακή παρουσία χαμηλών αριθμών *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* και *E. coli* O157:H7 σε 25 g θερμικά επεξεργασμένου κρέατος, κάτι το οποίο υποδεικνύει ότι το κριτήριο επίδοσης μείωσης 6 log για τους παθογόνους στο κρέας δεν επιτυγχάνεται σταθερά και με συνέπεια.

1.2.3 Διαδικασία Επαλήθευσης/Επικύρωσης

Η διαδικασία της επαλήθευσης και επικύρωσης είναι το κλειδί για να διασφαλιστεί η ασφάλεια των θερμικά επεξεργασμένων τροφίμων. Είναι συχνά επιθυμητό να επιβεβαιώνονται οι υπολογισμένες διεργασίες χρησιμοποιώντας εμβολιασμένη συσκευασία ή διαδικασίες καταμέτρησης της μείωσης. Τυπικά, το προϊόν εμβολιάζεται με ένα κατάλληλο δοκιμασμένο μικροοργανισμό γνωστής ανθεκτικότητας και υπόκεινται σε διάφορους χρόνους θέρμανσης σε μία ή περισσότερες διαφορετικές θερμοκρασίες επεξεργασίας. Το προϊόν, στη συνέχεια, επωάζεται στην κατάλληλη θερμοκρασία ανάπτυξης. Μία ικανοποιητική διαδικασία θα ήταν μία χωρίς ενδείξεις αλλοίωσης. Παρόλο που η μικροβιολογική επικύρωση δίνει άμεση απόδειξη της στειρότητας του προϊόντος, η παρακολούθηση των χημικών αλλαγών στα τρόφιμα προσφέρει μια εξαιρετική εναλλακτική λύση για την αξιολόγηση της ολοκληρωμένης έκθεσης (χρόνος-θερμοκρασία) των τροφίμων σε θανατηφόρες θερμοκρασίες. Μερικοί χημικοί δείκτες συμπεριλαμβανομένων των: υδροχλωρική θειαμίνη, σουλφόνιο μεθυλομεθειονίνης (MMS), 2,3-διϋδρο-3,5-διϋδροξυ-6-μεθυλο-(4H)-πυραν-4-όνη, ασκορβικό οξύ, υδρολυτικό οξύ σακχαρόζης και υπεροξειδάσης έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της διείσδυσης της θερμότητας, της αποτελεσματικότητας της διεργασίας και την υποβάθμιση της ποιότητας. Παραδοσιακά, κάποιος θα ερευνούσε μια γνωστή ένωση με αποδεδειγμένη συνέπεια για την αξιολόγηση

αλλαγών σχετικών με τη μικροβιακή απενεργοποίηση. Τέτοιοι δείκτες και ο τρόπος χρήσης τους πρέπει να είναι απλοί, αναπαραγώγιμοι και ευαίσθητοι στις πειραματικές συνθήκες (Awuah et al., 2007).

1.3 Αιθέρια Έλαια

Τα αιθέρια έλαια (Essential oils - EOs) έχουν αποκτήσει έντονο ενδιαφέρον σε αρκετούς κλάδους. Ως φυσικά προϊόντα, έχουν ενδιαφέροντα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά υψηλής προστιθέμενης αξίας, σεβόμενα το περιβάλλον. Επίσης έχουν ποικίλες και σχετικές βιολογικές δράσεις, για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται στον τομέα της ιατρικής χάρη στις βιοκτόνες δράσεις (βακτηριοκτόνο, ιοκτόνο, μυκητοκτόνο) και τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Πολλές μελέτες έχουν επισημάνει τις αντιμικροβιακές δράσεις των αιθέριων ελαίων ακόμα και έναντι πολλαπλά ανθεκτικών βακτηρίων. Λόγω της σύνθετης χημικής τους σύστασης, συχνά αποτελούμενα από περισσότερες από 100 διαφορετικές τερπενικές ενώσεις, τα αιθέρια έλαια έχουν ένα ευρύ βιολογικό και αντιμικροβιακό φάσμα δράσης (αντιβακτηριακά, αντιμυκητιακά, αντιϊκά, καταπολεμούν τα παράσιτα και εντομοαπωθητικά).

Η βιομηχανία τροφίμων επίσης παρουσιάζει αυξανόμενη ζήτηση για τα αιθέρια έλαια λόγω των σημαντικών εφαρμογών τους ως συντηρητικά τροφίμων, καινοτομία στην συσκευασία τροφίμων και στην καταπολέμηση παθογόνων, που δημιουργούν επικίνδυνες τροφικές δηλητηριάσεις (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Pseu- domonas putida* and *Staphylococcus aureus*). Επιπλέον, τα αιθέρια έλαια λόγω της ευρέως γνωστής και καταγεγραμμένης αντιμικροβιακής τους δράσης, αποτελούν εναλλακτική λύση στη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία, καθώς από το 2006, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει απαγορέψει τη χρήση σύνθετων αντιβιοτικών, και πρόσθετων ουσιών που ενισχύουν την ανάπτυξη στις τροφές των ζώων. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχει αναγνωρίσει τα αιθέρια έλαια ως ασφαλείς ουσίες σύμφωνα με τον Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών (CFR) Federal Regulations και ορισμένα περιέχουν ενώσεις οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακά πρόσθετα.

Τα αιθέρια έλαια είναι αρωματικά λιπιδικά (ελαιώδη) υγρά που εκχυλίζονται από αρωματικές φυτικές ύλες. Μπορούν να βιοσυντεθούν σε διαφορετικά όργανα του φυτού ως δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως άνθη (γιασεμί, τριαντάφυλλο, βιολέτα και λεβάντα), βότανα, κάλυκες (γαρύφαλλο), φύλλα (θυμάρι, ευκάλυπτος, *Salvia*), φρούτα (γλυκάνισος, αστεροειδής γλυκάνισος), κλαδιά, φλοιός (κανέλα), ξίσμα (κίτρο), σπόροι (κάρδαμο), ξύλο (σανταλόξυλο), ρίζωμα και ρίζες (τζίντζερ). Μπορούν να εκχυλισθούν με διαφορετικές

μεθόδους. Λόγω της υδρόφοβης φύσης τους και της πυκνότητάς τους, συχνά χαμηλότερης από εκείνη του νερού, είναι γενικά λιπόφιλες ενώσεις, διαλυτές σε οργανικούς διαλύτες, μη αναμίξιμες με το νερό. Τα αιθέρια έλαια είναι σύνθετα μίγματα πτητικών ενώσεων που προέρχονται από ένα μεγάλο αριθμό φυτών. Γενικά, αντιπροσωπεύουν ένα μικρό κλάσμα της σύνθεσης των φυτών (λιγότερο από 5% της φυτικής ξηρής ύλης) και αποτελούνται κυρίως από τερπένια (ισοπρένια) και τερπενοειδή. Τα τερπένια ταξινομούνται ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν. Οι πρώτες ενώσεις είναι τα μονοτερπένια (με 10 άτομα άνθρακα, δύο μονάδες ισοπρενίου και αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 80% της σύνθεσης των αιθέριων ελαίων), ακολουθούν τα σεσκιτερπένια (με 15 άτομα άνθρακα και τρία μόρια ισοπρενίου). Ορισμένα τερπένια είναι μόρια ανοικτής αλυσίδας, άλλα περιλαμβάνουν δακτυλίους και άλλα περιέχουν άτομα οξυγόνου (οξυγονωμένα παράγωγα τερπενίων) όπως αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, οξέα, φαινόλες, αιθέρες και εστέρες (El Asbahani et al., 2015).

Τα αιθέρια έλαια αποτελούνται από περισσότερα από 60 μεμονωμένα συστατικά. Τα κύρια συστατικά μπορούν να αποτελούν μέχρι και το 85% των αιθέριων ελαίων, ενώ άλλα συστατικά είναι παρόντα μόνο ως ίχνη. Οι φαινολικές ενώσεις είναι κυρίως υπεύθυνες για τις αντιβακτηριακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων. Υπάρχουν κάποια στοιχεία που υποστηρίζουν ότι τα δευτερεύοντα συστατικά διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αντιβακτηριακή δράση, πιθανότατα με τη δημιουργία συνεργιστικής δράσης μεταξύ άλλων συστατικών. Αυτό έχει βρεθεί να είναι η περίπτωση για το φασκόμηλο, ορισμένα είδη θυμαριού και τη ρίγανη (Burt, 2004).

Οι αντιμικροβιακές δράσεις των ρίγανη, θρούμπι, και θυμάρι είχαν αρχικά καταγραφεί κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1950 και εδραιώθηκε ότι η ανασταλτική δράση των παραπάνω φυτών οφείλεται πιθανώς στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε θυμόλη και καρβακρόλη, τα οποία είναι μεταξύ των πιο αποτελεσματικών γνωστών φυτικών αντιβακτηριακών παραγόντων (Oussalah, Caillet, Saucier, & Lacroix, 2007). Οι Oussalah et al. μελέτησαν τη δράση 28 αιθέριων ελαίων έναντι των παθογόνων βακτηρίων *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium και *Staphylococcus aureus*. Τα πιο δραστικά αιθέρια έλαια έναντι των βακτηρίων που εξετάστηκαν ήταν τα *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *Cinnamomum verum*, *Satureja montana* και *Origanum heracleoticum* με τη μικρότερη MIC (η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα στην οποία παρατηρείται μη βακτηριακή αύξηση μετά από επώαση).

Η ευγενόλη, το κόλιανδρο, το γαρύφαλλο, η ρίγανη και τα έλαια από θυμάρι έχουν βρεθεί να είναι δραστικά σε επίπεδα 5–20 μl g⁻¹ στην αναστολή των *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* και της αυτόχθονης αλλοιωγόνου χλωρίδας σε προϊόντα με βάση το κρέας, προκαλώντας μερικές φορές σημαντική μείωση στον αριθμό των ανακτημένων κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι το εγκλεισμένο έλαιο δενδρολίβανου ήταν πολύ πιο δραστικό από ότι το αιθέριο έλαιο σε ελεύθερη μορφή έναντι του *L. monocytogenes* σε λουκάνικο χοιρινού συκωτιού, αν και δεν διευκρινίζεται περαιτέρω αν η δράση οφειλόταν στην ενθυλάκωση της αντιμικροβιακής ουσίας ή στο μεγαλύτερο ποσοστό που χρησιμοποιήθηκε (Burt, 2004). Το αιθέριο έλαιο πιπεριάς, σε συγκεντρώσεις 1.5 ml/100 g και 0.3 ml/100 g κιμά, ήταν ικανό να αναστείλει ολοκληρωτικά την ανάπτυξη *S. typhimurium* και *Pseudomonas aeruginosa*, αντίστοιχα, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις να ασκήσουν βακτηριοκτόνο δράση (Garriga & Aymerich, 2009).

Πίνακας 1.3.1: Κύρια συστατικά επιλεγμένων αιθέριων ελαίων που εμφανίζουν αντιβακτηριακές ιδιότητες (Burt, 2004).

Common name of EO	Latin name of plant source	Major components	Approximate % composition ^b
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> (immature leaves)	Linalool	26%
		E-2-decanal	20%
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i> (seeds)	Linalool	70%
		E-2-decanal	–
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinnamaldehyde	65%
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Trace-80%
		Thymol	Trace-64%
		γ-Terpinene	2–52%
		p-Cymene	Trace-52%
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α-pinene	2–25%
		Bomyl acetate	0–17%
		Camphor	2–14%
		1,8-cineole	3–89%
Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	Camphor	6–15%
		α-Pinene	4–5%
		β-pinene	2–10%
		1,8-cineole	6–14%
		α-tujone	20–42%
Clove (bud)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75–85%
		Eugenyl acetate	8–15%
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10–64%
		Carvacrol	2–11%
		γ-Terpinene	2–31%
		p-Cymene	10–56%

^a EOs which have been shown to exert antibacterial properties in vitro or in food models and for which the composition could be found in the literature.

^b Percentages of total volatiles rounded up to the nearest whole number.

1.3.1 Αιθέριο Έλαιο ρίγανης

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*) είναι ένα φυτό που χρησιμοποιείται ως καρύκευμα στα τρόφιμα από την αρχαιότητα. Η κοινή ονομασία της ρίγανης δίνεται σε πολλά είδη του γένους *Origanum* (οικογένεια Lamiaceae) και *Lippia* (οικογένεια Verbenaceae), μεταξύ άλλων. Οι καταναλωτές και οι βιομηχανίες τροφίμων κάνουν επιτακτική την ανάγκη για φυσικές εναλλακτικές λύσεις για τη διασφάλιση της ασφάλειας και ποιότητας των τροφίμων. Η χρήση φυσικών ενώσεων από βότανα και καρυκεύματα αποτελεί μια εναλλακτική λύση στα συνθετικά πρόσθετα που συνδέονται με τοξικά προβλήματα. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, αποτελεσματικές στην επιβράδυνση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων σε λιπαρά τρόφιμα, και στην "παγίδευση" των ελεύθερων ριζών. Επίσης, το αιθέριο έλαιο ρίγανης είναι ένας από τους πιο αποτελεσματικούς αντιμικροβιακούς και αντιοξειδωτικούς παράγοντες (Ortega-Ramirez, Rodriguez-Garcia, Silva-Espinoza, & Ayala-Zavala, 2016).

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών «Φυσικό Άρωμα (ή Εκχύλισμα) Ρίγανης» (*Origanum Extract*) χαρακτηρίζεται το προϊόν περιεκτικότητας τουλάχιστον 1% σε αιθέριο έλαιο που λαμβάνεται είτε με απ' ευθείας εκχύλιση είτε από το αντίστοιχο αιθέριο έλαιο.

Σε μελέτη των Skandamis & Nychas (2001), έχει βρεθεί ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης επηρεάζει τη μικροβιακή κατάσταση του κιμά που έχει συντηρηθεί σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified Active Packaging-MAP), αλλά δεν παρατηρήθηκε έντονη αναστολή στην αερόβια μικροχλωρίδα. Επίσης, η ανασταλτική δράση του αιθέριου ελαίου ήταν αναλογική της συγκέντρωσής του, με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (0.5 & 1% v/w) να έχουν πιο έντονη δράση. Οι στατιστικά σημαντικές αλλαγές ($P < 0.05$) στα μικροβιακά χαρακτηριστικά (συγκριτικά με τους μάρτυρες) λόγω του αιθέριου ελαίου ρίγανης μπορούν να συνοψισθούν στις τρεις κύριες δράσεις: (i) μείωση του αρχικού μικροβιακού φορτίου ($0.3-0.9 \log_{10} \text{ cfu g}^{-1}$ κιμά), αμέσως μετά την ανάμιξη με αιθέριο έλαιο (ii) μείωση των ρυθμών ανάπτυξης και του μέγιστου πληθυσμού των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του κιμά και (iii) σε ορισμένες περιπτώσεις αύξηση των φάσεων προσαρμογής (*Enterobacteriaceae* και οξυγαλακτικά βακτήρια σε MAP).

Επιπλέον έχει μελετηθεί η δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης έναντι των σπορίων *Clostridium botulinum* σε συσκευασμένο σε κενό και παστεριωμένο προϊόν χοιρινού κιμά. Συγκεντρώσεις έως και $0.4 \mu\text{l g}^{-1}$ αιθέριου ελαίου ρίγανης βρέθηκε ότι δεν επηρέασαν σημαντικά τον αριθμό των σπορίων ούτε καθυστέρησαν την ανάπτυξη. Ωστόσο, με την

παρουσία χαμηλών επιπέδων νιτρικού νατρίου, η ίδια συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης ενίσχυσε την καθυστέρηση της ανάπτυξης (Burt, 2004).

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα συμπεριλαμβανομένων παθογόνων και της αλλοιωγόνου χλωρίδας του κρέατος. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι όχι μόνο καθυστέρησε την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού σε κιμά στους 58°C, ειδικά της Gram-θετικής μικροχλωρίδας (π.χ. *Brochothrix thermosphacta* και οξυγαλακτικά βακτήρια), αλλά μείωσε επίσης τον ρυθμό κατανάλωσης της γλυκόζης, την απελευθέρωση α-αμινοξέων και την παραγωγή οργανικών οξέων συγκριτικά με τους μάρτυρες (Drosinos, Skandamis, & Mataragas). Σύμφωνα με τους Sağdıç et al. (2002) το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 1, 1.5 και 2% είχε βακτηριοκτόνο δράση κατά του *E. coli* O157:H7 που είχε ενοφθαλμιστεί σε πληθυσμούς 10^8 CFU/ml σε θρεπτικό υπόστρωμα που επωάστηκε στους 37°C.

Με βάση τα αποτελέσματα μελέτης για το ρόλο της καρβακρόλης και κινναμαλδεΐδης στη θερμική απενεργοποίηση του *E. coli* O157:H7 σε βόειο κιμά, βρέθηκε ότι οι χρόνοι θέρμανσης στους 60°C, ή σε οποιαδήποτε άλλη θερμοκρασία απαιτείται για να επιτευχθεί μια μείωση 4-D του παθογόνου, μπορούν να μειωθούν όταν το βόειο κρέας περιέχει 0.5 με 1.0 % καρβακρόλη ή κινναμαλδεΐδη (Juneja & Friedman, 2008).

1.3.2 Μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων

Παρόλο που οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους έχουν ανασκοπηθεί παλαιότερα, ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει μελετηθεί με μεγάλη λεπτομέρεια (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001). Λαμβάνοντας υπόψη τον μεγάλο αριθμό διαφορετικών ομάδων χημικών συστατικών που υπάρχουν στα αιθέρια έλαια, είναι πολύ πιθανό ότι η αντιβακτηριακή τους δράση δεν οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο μηχανισμό αλλά υπάρχουν μερικοί στόχοι στο κύτταρο. Οι θέσεις ή οι μηχανισμοί στο βακτηριακό κύτταρο, που θεωρούνται ότι είναι θέσεις δράσης για τα συστατικά των αιθέριων ελαίων παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 1.3.2.1). Δεν είναι όλοι οι μηχανισμοί ξεχωριστοί στόχοι, μερικοί επηρεάζονται σαν συνέπεια άλλου μηχανισμού που είναι στοχευόμενος.

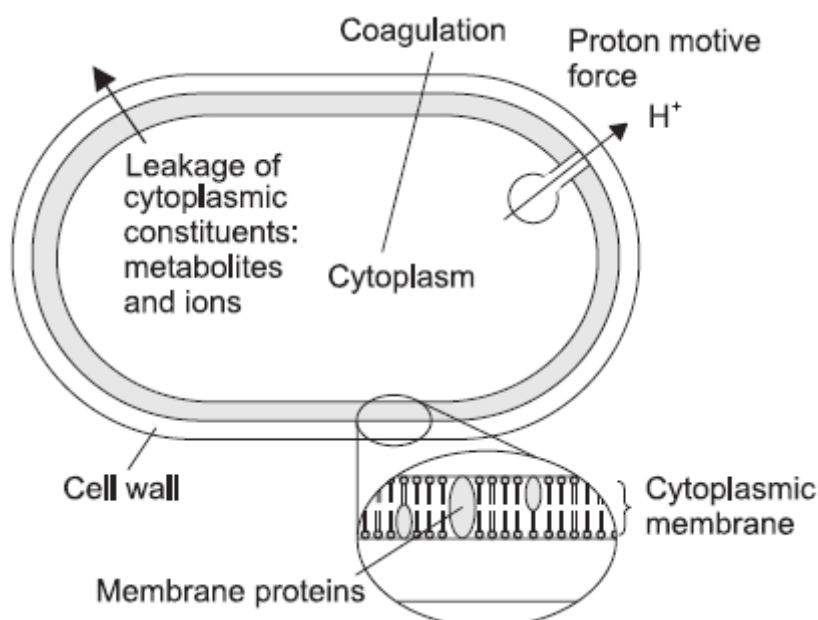
Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους είναι η υδροφοβικότητα τους, η οποία τους επιτρέπει να κατανέμονται στα λιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη και τα μιτοχόνδρια, διαταράσσοντας τις δομές τους και καθιστώντας περισσότερο διαπερατά. Παρόλο που μια συγκεκριμένη ποσότητα διαρροής από τα

βακτηριακά κύτταρα μπορεί να είναι ανεχτή χωρίς απώλεια της βιωσιμότητας, εκτεταμένη απώλεια των περιεχομένων του κυττάρου ή η έξοδος κρίσιμων μορίων και ιόντων θα οδηγήσει στο θάνατο. Υπάρχουν ορισμένα στοιχεία από μελέτες με έλαιο από δέντρο τσαγιού και *E. coli*, όπου ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να συμβεί πριν τη λύση. Γενικά, τα αιθέρια έλαια διαθέτουν τις ισχυρότερες αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι τροφιμογενών παθογόνων, περιέχουν υψηλό ποσοστό φαινολικών ενώσεων όπως καρβακρόλη, ευγενόλη (2-μεθοξυ-4-(2-προπενυλο)φαινόλη) και θυμόλη. Φαίνεται λογικό ότι ο μηχανισμός δράσης τους θα ήταν συνεπώς παρόμοιος με άλλες φαινόλες, αυτό γενικά θεωρείται να είναι η διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, διαταράσσοντας την κινητήρια δύναμη πρωτονίων, τη ροή ηλεκτρονίων, την ενεργή μεταφορά και συσσωμάτωση (κροκίδωση) του περιεχομένου του κυττάρου.

Η χημική δομή των μεμονωμένων συστατικών των αιθέριων ελαίων επηρεάζει τον ακριβή τρόπο λειτουργίας και αντιμικροβιακής δράσης τους (Dorman & Deans, 2000). Έχει επιβεβαιωθεί η σημασία της παρουσίας της υδροξυλομάδας στις φαινολικές ενώσεις όπως καρβακρόλη και θυμόλη. Η σχετική θέση της υδροξυλομάδας στον φαινολικό δακτύλιο δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το βαθμό της αντιμικροβιακής δράσης, η δράση της θυμόλης έναντι του *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* εμφανίζεται να είναι συγκρίσιμη με εκείνη της καρβακρόλης για παράδειγμα. Ωστόσο, σε μία μελέτη η καρβακρόλη και η θυμόλη βρέθηκαν να δρουν διαφορετικά έναντι gram-θετικών και gram-αρνητικών ειδών (Dorman & Deans, 2000). Όσον αφορά τα μη φαινολικά συστατικά των αιθέριων ελαίων, ο τύπος της αλκυλο-ομάδας έχει βρεθεί να επηρεάζει την δράση τους (αλκενυλο-ομάδα > αλκυλο-ομάδα). Για παράδειγμα, το λιμονένιο είναι πιο δραστικό από το p-κυμένιο.

Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων εμφανίζονται, επίσης, να δρουν στις κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι ενσωματωμένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Ένζυμα όπως οι ΑΤΡάσες είναι γνωστές να βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και να συνορεύουν με μόρια λιπιδίων. Δύο πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί, σύμφωνα με τους οποίους θα μπορούσαν να δράσουν οι κυκλικοί υδρογονάνθρακες. Λιπόφιλα μόρια υδρογονανθράκων θα μπορούσαν να συσσωρεύονται στην λιπιδική διπλοστοιβάδα και να διαστρεβλώνουν την αλληλεπίδραση λιπιδίων και πρωτεϊνών, εναλλακτικά είναι πιθανή η απευθείας αλληλεπίδραση των λιπόφιλων ενώσεων με τα υδρόφοβα μέρη της πρωτεΐνης. Μερικά αιθέρια έλαια έχουν βρεθεί να διεγείρουν την ανάπτυξη ψευδομικκυλίων (μία σειρά κυττάρων που προσκολλώνται από άκρο σε άκρο ως αποτέλεσμα ατελούς διαχωρισμού νεοσηματιζόμενων κυττάρων) σε ορισμένες ζύμες. Αυτό θα μπορούσε να

αποτελεί ένδειξη ότι τα αιθέρια έλαια δρουν στα ένζυμα που εμπλέκονται στην ρύθμιση ενέργειας ή στη σύνθεση δομικών στοιχείων. Το έλαιο κανέλας και τα συστατικά του έχουν δείξει να αναστέλλουν αποκαρβοξυλάσες αμινοξέων στο *Enterobacter aerogenes*. Ο μηχανισμός δράσης θεωρήθηκε ότι είναι η πρόσδεση των πρωτεϊνών (Burt, 2004).



Εικόνα 1.3.2.1: Περιοχές και μηχανισμοί στο βακτηριακό κύτταρο που θεωρούνται να είναι θέσεις δράσης για τα συστατικά των αιθέριων ελαίων (Burt, 2004): αποδόμηση κυτταρικού τοιχώματος, βλάβη στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, βλάβη στις μεμβρανικές πρωτεΐνες, διαρροή κυτταρικού περιεχομένου, πήξη του κυτταροπλάσματος και εξάντληση της κινητήριας δύναμης πρωτονίων.

1.3.3 Ευαισθησία των gram-αρνητικών και των gram-θετικών μικροοργανισμών

Οι περισσότερες μελέτες που ερευνούν τη δράση των αιθέριων ελαίων έναντι μικροοργανισμών αλλοίωσης των τροφίμων και τροφιμογενών παθογόνων συμφωνούν ότι, γενικά, τα αιθέρια έλαια είναι ελαφρώς πιο δραστικά έναντι gram-θετικών παρά gram-αρνητικών βακτηρίων. Το γεγονός ότι οι gram-αρνητικοί οργανισμοί είναι λιγότερο ευαίσθητοί στη δράση των αντιβακτηριακών, ίσως να είναι αναμενόμενο, αφού διαθέτουν μια εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα, η οποία περιορίζει τη διάχυση υδρόφοβων ενώσεων μέσω των λιποπολυσακχαριτών που περιέχει.

Ωστόσο, όλες οι μελέτες που αφορούν στα αιθέρια έλαια δεν καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα gram-θετικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα. *A. hydrophila* (gram-

αρνητικό) εμφανίζεται να είναι στην πραγματικότητα ένα από τα πιο ευαίσθητα είδη. Σε μια μελέτη, το αιθέριο έλαιο μέντας (*Mentha piperita*) πέτυχε μεγαλύτερη μείωση στο *S. enteritidis* απ' ό τι για το *L. monocytogenes* όταν προστέθηκε σε ελληνικά ορεκτικά ταραμοσαλάτα και τζατζίκι (Tassou, Drosinos, & Nychas, 1995). Σύμφωνα με μελέτη που εξέτασε 50 εμπορικά διαθέσιμα αιθέρια έλαια έναντι 25 γενών δεν βρήκε στοιχεία για διαφορά στην ευαισθησία μεταξύ gram-αρνητικών και gram-θετικών μικροοργανισμών. Ωστόσο, μια μεταγενέστερη μελέτη χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο δοκιμασίας και τα ίδια βακτηριακά απομονώσιμα στελέχη, αλλά πιθανόν χρησιμοποιώντας πρόσφατα αποσταγμένα αιθέρια έλαια, αποκάλυψε ότι τα gram-θετικά βακτήρια ήταν πράγματι πιο ευαίσθητα σε δύο από τα αιθέρια έλαια που δοκιμάστηκαν και εξίσου ευαίσθητα σε τέσσερα άλλα αιθέρια έλαια από ότι ήταν τα αρνητικά κατά gram είδη (Dorman & Deans, 2000).

Θεωρήθηκε ως δεδομένο ότι τα επιμέρους συστατικά των αιθέριων ελαίων παρουσιάζουν διαφορετικούς βαθμούς δράσης έναντι gram-θετικών και gram-αρνητικών μικροοργανισμών και είναι γνωστό, ότι η χημική σύνθεση των αιθέριων ελαίων από ένα συγκεκριμένο φυτικό είδος μπορεί να ποικίλει σύμφωνα με τη γεωγραφική του προέλευση και τη περίοδο συγκομιδής. Επομένως, είναι πιθανό ότι η απόκλιση στη σύνθεση μεταξύ παρτίδων των αιθέριων ελαίων είναι επαρκής να προκαλέσει μεταβλητότητα στο βαθμό της ευαισθησίας των gram-αρνητικών και gram-θετικών βακτηρίων. Από τα gram-αρνητικά βακτήρια, το *Pseudomonads*, και συγκεκριμένα το *P. aeruginosa*, φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητο στη δράση των αιθέριων ελαίων (Burt, 2004).

1.3.4 Νομοθετικά ζητήματα της χρήσης αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους στα τρόφιμα

Ένας αριθμός συστατικών των αιθέριων ελαίων έχουν καταγραφεί από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή για χρήση ως αρωματικές ύλες στα τρόφιμα. Οι αρωματικές ύλες που έχουν καταγραφεί θεωρούνται ότι δεν παρουσιάζουν κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την καρβακρόλη, καρβόνη, κινναμαλδεΐδη, κιτράλη, p-κυμένιο, ευγενόλη, λιμονένιο, μενθόλη και θυμόλη. Η εστραγκόλη και η μεθυλο-ευγενόλη διαγράφηκαν από τη λίστα το 2001 λόγω του ότι είναι γονιδιοτοξικά (European Commission, 2002). Νέες αρωματικές ύλες μπορούν να αξιολογηθούν για καταχώρηση μόνο μετά από τη διεξαγωγή τοξικολογικών και μεταβολικών μελετών (European Commission, 1999, 2000, 2002), οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντική οικονομική δαπάνη. Οι εγγεγραμμένες αρωματικές ύλες στην Ευρωπαϊκή Ένωση παρατίθενται στην λίστα 'Everything Added to Food in the US' (EAFUS) του Οργανισμού Τροφίμων και

Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA), ο οποίος έχει ταξινομήσει τις ουσίες γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς (generally recognised as safe - GRAS) (FDA, 2013) ή ως εγκεκριμένα πρόσθετα τροφίμων (Burt, 2004).

1.4 Λιποσώματα

1.4.1 Γενικά

Τα λιποσώματα είναι μικρά τεχνητά κυστίδια σφαιρικού σχήματος που μπορούν να δημιουργηθούν από τη χοληστερόλη και φυσικά μη τοξικά φωσφολιπίδια. Λόγω του μεγέθους τους και του υδρόφοβου και υδρόφιλου χαρακτήρα τους (εκτός της βιοσυμβατότητας), τα λιποσώματα είναι υποσχόμενα συστήματα για τη μεταφορά και απελευθέρωση ουσιών. Οι ιδιότητες των λιποσωμάτων διαφέρουν σημαντικά με τη σύνθεση λιπιδίων, επιφάνεια, το φορτίο, το μέγεθος και τη μέθοδο προετοιμασίας. Επιπρόσθετα, η επιλογή των συστατικών της διπλοστοιβάδας καθορίζει την "ακαμψία" ή τη "ρευστότητα" και το φορτίο της διπλοστοιβάδας. Για παράδειγμα, ακόρεστα είδη φωσφατιδυλοχολίνης από φυσικές πηγές δίνουν πολύ περισσότερο διαπερατές αλλά λιγότερο σταθερές διπλοστοιβάδες, ενώ τα κορεσμένα φωσφολιπίδια με μακριές ακυλο-αλυσίδες σχηματίζουν μια άκαμπτη, μάλλον αδιαπέραστη δομή διπλοστοιβάδας. Έχει εμφανιστεί ότι τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν κλειστές δομές αυθόρμητα όταν ενυδατώνονται σε υδατικά διαλύματα.

Τέτοια κυστίδια τα οποία έχουν μία ή περισσότερες μεμβράνες φωσφολιπιδίων μπορούν να μεταφέρουν υδατικές ή λιπιδιακές ουσίες, ανάλογα με τη φύση αυτών των ουσιών. Επειδή τα λιπίδια είναι αμφιπαθή μόρια (υδρόφοβα και υδρόφιλα) σε υδατικά μέσα, οι ιδιότητες της θερμοδυναμικής φάσης και τα χαρακτηριστικά αυτοσυγκρότησης τους επηρεάζουν την εντροπικά συγκεντρωμένη σύνδεση - προσάρτηση των υδρόφοβων τμημάτων τους σε σφαιρικές διπλοστοιβάδες. Γενικά, τα λιποσώματα είναι ορισμένα ως σφαιρικά κυστίδια με τα μεγέθη των σωματιδίων να κυμαίνονται από 30 nm έως μερικά μικρόμετρα (μm). Αποτελούνται από μία ή περισσότερες λιπιδικές διπλοστοιβάδες που περιβάλλουν υδατικές μονάδες, όπου οι πολικές κεφαλές είναι προσανατολισμένες στο μονοπάτι των εσωτερικών και εξωτερικών υδατικών φάσεων. Από την άλλη πλευρά, η αυτο-συνάθροιση πολικών λιπιδίων δεν περιορίζεται στις συμβατικές δομές διπλοστοιβάδων, οι οποίες βασίζονται στο μοριακό σχήμα, τη θερμοκρασία, τις συνθήκες προετοιμασίας και περιβάλλοντος αλλά μπορούν να αυτοσυγκροτούνται σε διάφορους τύπους κολλοειδών σωματιδίων.

Τα λιποσώματα χρησιμοποιούνται εκτεταμένα ως φορείς για πολυάριθμα μόρια στην βιομηχανία των φαρμάκων και των καλλυντικών. Επιπρόσθετα, οι γεωργικές βιομηχανίες και οι βιομηχανίες τροφίμων έχουν μελετήσει εκτεταμένα τη χρήση ενθυλάκωσης σε λιποσώματα για να αναπτύξουν συστήματα μεταφοράς, τα οποία μπορούν να εγκλωβίσουν ασταθείς ενώσεις (αντιμικροβιακά, αντιοξειδωτικά, αρώματα και βιοενεργά στοιχεία) και να προστατεύσουν τη λειτουργικότητα τους. Τα λιποσώματα μπορούν να εγκλωβίσουν υδρόφοβες και υδρόφιλες ενώσεις, να αποτρέψουν την αποσύνθεση των εγκλωβισμένων συνδυασμών και να τις απελευθερώσουν στους καθορισμένους στόχους. Λόγω της βιοσυμβατότητας, βιοαποδόμησης, χαμηλής τοξικότητας τους και της ικανότητάς τους να παγιδεύουν υδρόφιλα και λιπόφιλα φάρμακα (ουσίες) και να απλοποιούν τη μεταφορά φαρμάκων σε συγκεκριμένες θέσεις στους καρκινικούς ιστούς, τα λιποσώματα έχουν αυξημένο ποσοστό ως διερευνητικό σύστημα και εμπορικά ως σύστημα απελευθέρωσης φαρμάκων.

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σχετικά με τα λιποσώματα με στόχο την μείωση της τοξικότητας των φαρμάκων ή/και τη στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων. Η τεχνολογία της λιποσωμικής ενθυλάκωσης (liposomal encapsulation technology - LET) είναι η νεότερη τεχνική μεταφοράς που χρησιμοποιείται από ιατρικούς ερευνητές για να μεταβιβάσουν φάρμακα, τα οποία δρουν ως θεραπευτικοί υποκινητές σε συγκεκριμένα όργανα του σώματος. Αυτή μορφή συστήματος μεταφοράς που προτείνεται, στοχεύει στην μεταφορά (παράδοση) ζωτικών συνδυασμών στο σώμα. Η τεχνολογία LET είναι μια μέθοδος παραγωγής υπο-μικροσκοπικών αφρώδων υλικών που καλούνται λιποσώματα, τα οποία ενθυλακώνουν πολυάριθμα υλικά. Τα λιποσώματα σχηματίζουν ένα εμπόδιο-φράγμα γύρω από το περιεχόμενο τους, το οποίο είναι ανθεκτικό σε ένζυμα του στόματος και του στομάχου, αλκαλικά διαλύματα, πεπτικά υγρά, χολικά άλατα και στην εντερική χλωρίδα, που παράγονται στο ανθρώπινο σώμα, καθώς επίσης και στις ελεύθερες ρίζες. Τα περιεχόμενα των λιποσωμάτων είναι, επομένως, προστατευμένα από την οξείδωση και την αποδόμηση. Αυτή η προστατευτική φωσφολιπιδική ασπίδα ή φράγμα παραμένει άθικτη μέχρι το περιεχόμενο του λιποσώματος να παραδοθεί στον ακριβή αδένα-στόχο, όργανο ή σύστημα όπου εκεί θα χρησιμοποιηθεί. (Akbarzadeh et al., 2013).

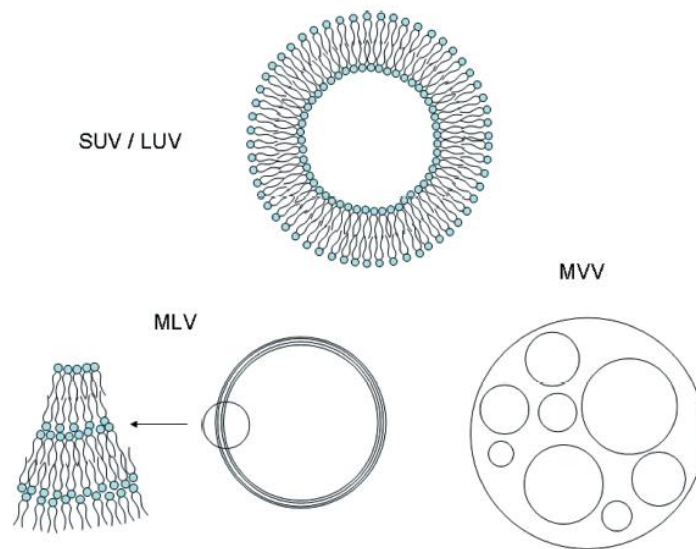
Έως τώρα, η χρήση των λιποσωμάτων στα συστήματα των τροφίμων είναι περιορισμένη. Αυτό βασίζεται κυρίως στο γεγονός ότι η αλληλεπίδραση των λιποσωμάτων με τα συστατικά των τροφίμων είναι ελάχιστα κατανοητή και ότι η παραγωγή των λιποσωμάτων ήταν ακριβή λόγω του κόστους των πρώτων υλών και των διαδικασιών παραγωγής. Παρ'όλα αυτά με την αυξανόμενη κατανόηση των λειτουργικών ιδιοτήτων των

λιποσωμάτων, όπως οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, η κινητική και θερμοδυναμική σταθερότητα, η αλληλεπίδραση με τα συστατικά των τροφίμων, βελτιωμένες τεχνολογίες κατασκευής, όπως η συνεχής υψηλή πίεση ή ομογενοποίηση μεμβράνης, και χαμηλότερες δαπάνες στις πρώτες ύλες, έχουν κάνει εφικτή τη χρήση λιποσωμάτων για την παράδοση λειτουργικών συστατικών όπως φαρμακευτικά προϊόντα διατροφής, αντιμικροβιακά, και αρωματικές ύλες στα τρόφιμα. Ένα συγκεκριμένο πλεονέκτημα των λιποσωμάτων είναι ότι αποτελούνται από αποκλειστικά από φυσικώς απαντώμενα συστατικά υλικά, πιθανώς μειώνοντας ή εξαλείφοντας θεσμικά εμπόδια που ίσως να εμποδίσουν την εφαρμογή τους στα τρόφιμα (Taylor, Weiss, Davidson, & Bruce, 2005).

1.4.2 Ιδιότητες λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα είναι συνήθως σφαιρικά και μπορεί να περιέχουν ένα ή πολλαπλά στρώματα αμφίφιλων πολυμοριακών μεμβρανών. Λόγω του σφαιρικού σχήματος τους, τα λιποσώματα καλούνταν αρχικά "σφαιρουλίτες". Τα λιποσώματα που περιέχουν μία μόνο μεμβράνη διπλοστοιβάδας καλούνται μικρά (<30 nm) ή μεγάλα (30 – 100 nm) μονομεμβρανικά κυστίδια, ή SUVs και LUVs, αντίστοιχα. Τα λιποσώματα που περιέχουν περισσότερες από μία διπλοστοιβάδες καλούνται πολυμεμβρανικά κυστίδια (MLV) εάν όλες οι στοιβάδες είναι ομόκεντρες, ή πολυκυστικά κυστίδια (MW), όπου στην περίπτωση αυτή ένας αριθμός κυστιδίων τυχαίου μεγέθους μπορεί να περικλείεται στο εσωτερικό ενός άλλου κυστιδίου (Εικόνα 1.4.2.1). Λιποσώματα μεγαλύτερα από ~300 nm σκεδάζουν το φως επαρκώς για να μπορούν να είναι ορατά με γυμνό μάτι και αυτά τα δείγματα έχουν μια θολή λευκή εμφάνιση. Ωστόσο, περαιτέρω επεξεργασία με τη χρήση μεθόδων παρασκευής, όπως κατεργασία με υπερήχους ή εξώθηση, μπορούν να παράγουν μικρότερα λιποσώματα. Αυτά τα λιποσώματα μπορεί να έχουν μεγέθη κάτω από 300 nm και ένα διάλυμα με τέτοια λιποσώματα θα εμφανίζεται διαυγές ή έχοντας μια ελαφρά μπλε απόχρωση. Ως εκ τούτου, ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων είναι η κατανομή μεγέθους των σωματιδίων μετά το σχηματισμό και κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ο Πίνακας 1.4.2.1 παρουσιάζει μια γενική εικόνα των διάφορων κατηγοριών των λιποσωμάτων, τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες και τις κύριες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό τους. Το εσωτερικό των λιποσωμάτων είναι υδατικής φύσεως, σε αντίθεση με το εσωτερικό των επιφανειοδραστικών μικκυλίων που παρέχουν ένα υδρόφοβο περιβάλλον. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα πολικά λιπίδια προσανατολίζονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε οι πολικές κεφαλές τόσο στην εσωτερική όσο και στην εξωτερική

επιφάνεια των μεμβρανών να εκτίθενται στο μέγιστο βαθμό στην εσωτερική και εξωτερική φάση του διαλύτη (Εικόνα 1.4.2.1). Ως εκ τούτου, το εσωτερικό των λιποσωμάτων αποτελείται από ένα υδατικό διάλυμα που έχει την ίδια χημική σύνθεση όπως το μέσο στο οποίο τα λιποσώματα διαμορφώθηκαν αρχικά. Ο εσωτερικός πυρήνας της μεμβράνης όπου οι υδρόφοβες ουρές των πολικών λιπιδίων αλληλεπιδρούν είναι μη πολικής φύσεως, εδώ μπορεί να συμβεί διαλυτοποίηση, ενσωμάτωση δηλαδή του λιπόφιλου υλικού στο εσωτερικό της διπλοστοιβάδας (Taylor et al., 2005).



Εικόνα 1.4.2.1: Σχηματική αναπαράσταση της δομής μεγάλων και μικρών μονομεμβρανικών κυστιδίων (SUV/LUV), πολυμεμβρανικών κυστιδίων (MLV) και πολυκυστιδικών κυστιδίων (MVV) (Taylor et al., 2005).

Πίνακας 1.4.2.1: Κατάταξη, σχηματισμός και χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων (Taylor et al., 2005).

Liposome	Formulation methods	Characteristics
MLV	Thin-film dehydration/rehydration.	Low energy input required for formation. Useful for larger batch formulations. Good entrapment efficiency. No significant technical training required to form and low cost of reagents and equipment. Maximum storage stability.
LUV	Membrane extrusion of MLVs; may budd-off from MLVs in suspension. Can also be formed from detergent depletion (dialysis) methods.	High energy input not required for formation. Good encapsulation efficiency. Longer storage stability vs. SUV liposomes due to reduced curve stress.
SUV	Membrane extrusion of MLVs or LUVs; Ultrasonication (probe or bath) of MLVs or LUVs; dialysis of MLVs; high pressure homogenization.	Increased homogeneity of liposomes. Increased circulation times/half-life.

Από χημικής άποψης, τα λιποσώματα αποτελούνται κυρίως από φωσφολιπίδια, αν και άλλα λιπίδια όπως γλυκολιπίδια μπορούν να ενσωματωθούν. Τα κύρια συστατικά των βιολογικών μεμβρανών, τα φωσφολιπίδια, υπάρχουν είτε ως σφιγγολιπίδια είτε ως φωσφοδιγλυκερίδια. Το πιο άφθονο φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) γνωστή και ως λεκιθίνη. Τα σφιγγολιπίδια, βασικά συστατικά στην μετάδοση σήματος μέσω των νεύρων, λαμβάνονται μέσω του συνδυασμού ενός φωσφολιπιδίου και ενός κεραμιδίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα σφιγγολιπιδίου είναι η σφιγγομυελίνη. Άλλα πολικά λιπίδια που χρησιμοποιούνται στα λιποσώματα είναι οι κεφαλίνες (φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνες) σε συνδυασμό με φωσφατιδυλο-σερίνη και φωσφατιδυλο-ινοσιτόλη και στερόλες, όπως χοληστερόλη και σιτοστερόλη. Τα συστήματα που περιέχουν φωσφολιπίδια έχουν πολύπλοκες συμπεριφορές φάσης, μπορούν να υπάρχουν σε μία ή περισσότερες υγρές κρυσταλλικές ή μεσομορφικές μορφές ανάλογα με τη θερμοκρασία σύνθεσης. Μία από τις βασικές παραμέτρους των λιποσωμικών συστημάτων είναι η αποκαλούμενη θερμοκρασία μετάπτωσης T_m της πηκτής (gel) σε υγρή κρυσταλλική μορφή, όπου η διπλοστοιβάδα χάνει μεγάλο μέρος της οργανωμένης δομής της εξαιτίας της "τήξης" των υδρογονανθρακικών αλυσίδων. Συνήθως, υδρογονανθρακικές αλυσίδες μεγαλύτερου μήκους μεταφράζονται σε υψηλότερες θερμοκρασίες μετάπτωσης φάσης. Θα πρέπει να

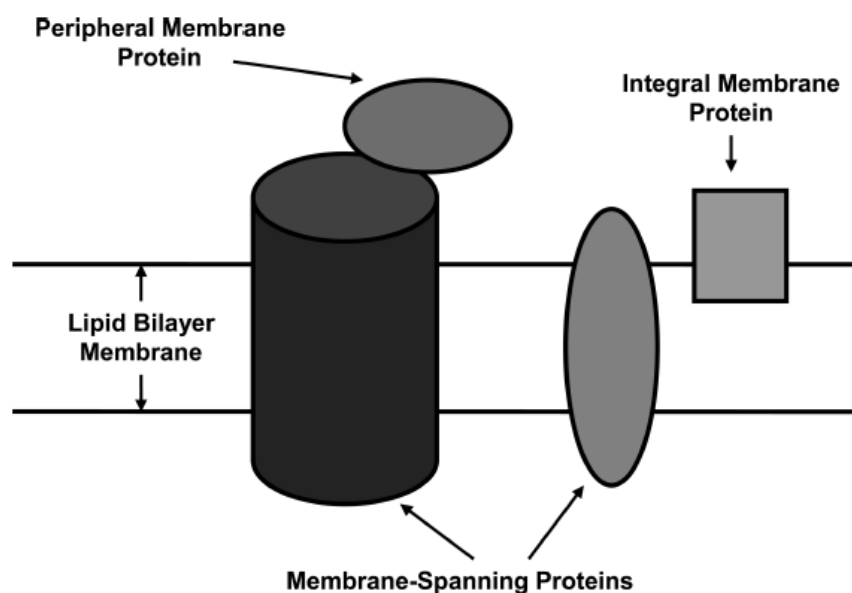
σημειωθεί ότι τα πιο φυσικά φωσφολιπίδια περιέχουν ασύμμετρες υδρογονανθρακικές αλυσίδες, δηλαδή οι αλυσίδες των λιπαρών οξέων μπορεί να διαφέρουν σε μήκος. Ως εκ τούτου, οι αλλαγές φάσης μπορούν να συμβούν σε ένα εύρος θερμοκρασιών. Ο βαθμός ακορεστότητας του λιπαρού οξέος στην υδρογονανθρακική αλυσίδα επηρεάζει επίσης την αλλαγή φάσης. Η T_m αυξάνει με αυξημένο βαθμό κορεσμού. Συνεπώς, η συμπεριφορά αλλαγής φάσης των λιποσωμάτων με διμερή ή πολλαπλά συστατικά μπορεί να είναι αρκετά σύνθετη. Για παράδειγμα, η χοληστερόλη συχνά προστίθεται στα λιποσώματα για να βελτιώσει την *in vivo* και *in vitro* σταθερότητα τους. Η χοληστερόλη παρέχει στη μεμβράνη ακαμψία, αλλάζοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολικών κεφαλών και της υδρογονανθρακικής αλυσίδας και παρατηρείται μια μείωση τόσο της T_m όσο και της ενθαλπίας μετάβασης.

Η λειτουργικότητα των λιποσωμάτων εξαρτάται από την αλληλεπίδραση τους με άλλες ενώσεις, η οποία καθορίζεται ευρέως από τις διεπιφανειακές τους ιδιότητες, π.χ. διεπιφανειακές ρεολογικές ιδιότητες, υδροφοβικότητα και φορτίο επιφάνειας. Οι διεπιφανειακές ιδιότητες των λιποσωμάτων εξαρτώνται από τη χημική σύνθεση της διπλοστοιβάδας και των περιβαλλοντικών συνθηκών όπως ο τύπος του διαλύτη, η ιοντική ισχύς και η θερμοκρασία. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, οι ρεολογικές ιδιότητες αλλάζουν δραματικά και τα λιποσώματα γίνονται αρκετά ευαίσθητα στις μηχανικές καταπονήσεις, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν αποσύνθεση και απελευθέρωση των εγκλωβισμένων ενώσεων. Το επιφανειακό φορτίο των λιποσωμάτων επηρεάζει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των λιπιδιακών σωματιδίων με άλλες φορτισμένες ενώσεις. Οι φορτισμένες λιποσωμικές μεμβράνες μπορούν, για παράδειγμα, να εμποδίσουν τη διέλευση εξίσου φορτισμένων ενώσεων στο εσωτερικό των λιποσωμάτων, και είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους οι ενθυλακωμένες, στο εσωτερικό των λιποσωμάτων, ουσίες μπορούν να είναι προστατευμένες από ουσίες στη φάση του διαλύτη.

Από βιοχημικής άποψης, οι αλληλεπιδράσεις των δομών διπλοστοιβάδας με τις πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μερικές από τις σημαντικότερες μεταβολικές αντιδράσεις όπως είναι η παραγωγή ATP. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες μπορούν να ενσωματωθούν πλήρως στη μεμβράνη και να γεφυρώσουν την εξωτερική και εσωτερική φάση του λιποσώματος ή μπορεί να είναι ένα αναπόσπαστο μέρος της μεμβράνης στην οποία περίπτωση βρίσκονται είτε στην εσωτερική ή εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης. (Εικόνα 2). Ο χωρικός προσανατολισμός των πρωτεϊνών μέσα σε αυτές τις μεμβράνες, ο οποίος διέπεται από τις μοριακές ιδιότητες της πρωτεΐνης και των πολικών λιπιδίων καθώς

επίσης και των περιβαλλοντικών συνθηκών, είναι ένα από τα προαπαιτούμενα για να διασφαλιστεί η ορθή λειτουργία των σύνθετων βιολογικών συστημάτων.

Ως εκ τούτου, οι λιποσωμικές ιδιότητες και λειτουργικές δυνατότητες εξαρτώνται από εξωτερικές παραμέτρους (π.χ. pH, ιοντική ισχύς, θερμοκρασία) και εσωτερικές παραμέτρους που περιλαμβάνουν συγκέντρωση, σύνθεση, φύση φωσφολιπιδίου και τη συγκέντρωση των ενθυλακωμένων ενώσεων. Αυτά τα χαρακτηριστικά επηρεάζουν τη φυσικοχημική σταθερότητα των λιποσωμάτων. Η χημική αστάθεια μπορεί να ανακύψει λόγω της οξείδωσης και της υδρόλυσης των λιπιδίων. Τα λιποσώματα μπορούν να αποσταθεροποιηθούν φυσικά, εάν υποστούν αλλαγές φάσεις ή εάν οι δομές διπλοστοιβάδας συγχωνευθούν, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των εγκλεισμένων ενώσεων και την αύξηση των κατανομών μεγέθους των σωματιδίων. Οι παρασκευαστές τροφίμων σχεδιάζουν να εγκλωβίσουν λειτουργικά συστατικά στοιχεία σε λιποσώματα, ως εκ τούτου πρέπει να επιλέξουν προσεκτικά τους συνδυασμούς φωσφολιπιδίου/λειτουργικού στοιχείου για την βελτιστοποίηση της σταθερότητας των καψουλών κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες διεργασίας και εφαρμογής (Taylor et al., 2005).



Εικόνα 1.4.2.2: Επισκόπηση των διαφορετικών κατηγοριών μεμβρανικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένων των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, περιφερειακών πρωτεϊνών και ενσωματωμένων πρωτεϊνών (Taylor et al., 2005).

1.4.3 Μέθοδοι προετοιμασίας λιποσωμάτων

Σε αντίθεση με άλλα επιφανειοδραστικά συσσωματώματα, τα λιποσώματα δεν σχηματίζονται αυθόρμητα σε υδατικά μέσα και για αυτό δεν είναι θερμοδυναμικά σταθερές δομές. Ο σχηματισμός λιποσωμάτων απαιτεί ενέργεια. Ανάλογα με τον τύπο του λιποσώματος που παράγεται, η απαιτούμενη εισροή ενέργειας μπορεί να ποικίλει σημαντικά. Τα πολυμεμβρανικά κυστίδια (MLVs) σχηματίζονται αμέσως όταν γίνει διασπορά των πολικών λιπιδίων σε υδατικά μέσα υπό ήπια ανάδευση. Για την παραγωγή των μονομεμβρανικών κυστιδίων (LUVs/SUVs), απαιτούνται σημαντικά ποσά ενέργειας τα οποία είναι επαρκή να διαταράξουν τις δομές των πολυμεμβρανικών κυστιδίων (MLV) και των πολυκυστιδιακών κυστιδίων (MVV) και να αναγκάσουν την παραγωγή μονοτροπικών κυστιδίων. Γενικά, τα λιποσώματα είναι σταθερά μόνο για μια ορισμένη χρονική περίοδο, θεωρούνται κινητικά σταθερά παρομοίως με τα γαλακτώματα, για αυτό πολλές από τις αρχές και τις τεχνικές σχηματισμού γαλακτωμάτων ισχύουν επίσης για την παρασκευή λιποσωμάτων. Οι συνηθέστερα εφαρμόσιμες τεχνικές βασίζονται στην είσοδο μηχανικής ενέργειας στο σύστημα, π.χ. κατεργασία με υψηλής έντασης υπερήχους, ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, εξώθηση, και ομογενοποίηση μεμβράνης. Οι μη μηχανικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την εξάτμιση αντίστροφης φάσης, απομάκρυνση απορρυπαντικών ουσιών από μεικτά απορρυπαντικά/μικκύλια λιπιδίων και λυοφιλίωση ακολουθούμενη από επανενυδάτωση. Ο Πίνακας 1.4.3.1 παρουσιάζει μια συνολική επισκόπηση των διαθέσιμων μεθόδων για το σχηματισμό λιποσωμάτων καθώς και τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που έχουν ανάλογα με τη μέθοδο παρασκευής (Taylor et al., 2005).

Πίνακας 1.4.3.1: Μέθοδοι για το σχηματισμό λιποσωμάτων και εγγενή πλεονεκτήματα/αδυναμίες των παραγόμενων λιποσωμάτων με τις συγκεκριμένες μεθοδολογίες (Taylor et al., 2005).

Methods	Strengths	Weaknesses
Thin-Film Rehydration	Rapidly formed; low energy input to form. Highest stability and transition cooperativity.	Highly heterogeneous dispersion; lower encapsulation efficiency vs. LUVs. Nearly impossible to determine mass encapsulated/vesicle and surface area.
Freeze-Dried Rehydration Vesicles	High entrapment efficiency. Improved homogeneity in mixing of lipid species/liposome. Useful for forming antigen-entrapping vesicles.	Dehydration best controlled by freeze-drying; long time to process.
Reverse-Phase Evaporation	Higher entrapment efficiency reported for variety of molecules than MLVs (proteins, nucleic acids, etc.).	Heterogeneous distribution of MLVs and unilamellar vesicles; additional homogenization required. Solvent exposure may inhibit protein activity. Possible incomplete removal of organic solvent. Entrapment above 50% very difficult.
Detergent-Depletion	No solvent used; protein activity retained. No mechanical energy input. Homogenous distribution of liposomes. Useful for multiple lipids and molecules for encapsulation. Best for entrapping membrane-associated proteins.	Limited number of useful detergents. Dialysis is very slow process and some detergent is likely to remain in the sample. Detergent may negatively interact with molecule of interest.
Membrane Extrusion	Homogenization of liposomes improved over other methods; rapid preparation of unilamellar vesicles from MLVs. Equipment for small-large batches is readily available.	Liposomes must be held above T_M to facilitate extrusion. Manual extruders handle only small volumes (1 ml). Solute leakage can occur during extrusion. High salt concentration (>150 mM) can preclude liposome formation.
High-Pressure Homogenization, Microfluidization	Can process high lipid concentration (~150 mg/ml). Lab data is easily inferred to processing plant. High reproducibility. Most useful for large-scale production of liposomes.	Solvent ionic strength must be carefully controlled to control liposome size. Complete homogenization is time consuming in microfluidizer.
Ultrasonication: Probe	Can be performed directly on hydrated MLVs. Preferred method to form SUVs. Excellent for reduction of large MLVs to more homogenous dispersion of SUVs.	Probe sonication can degrade sample/localized overheating. Requires constant cooling. Liposomes are metastable (low storage-stability). Low volume required for effective treatment.
Ultrasonication: Bath	Less destructive to liposomes vs. probe method. Greater reproducibility and more homogenous product vs. probe sonicator. Increased sample volume capability. Increased control over sample temperature.	Requires extensive sonication to obtain minimum size limit of SUV; not always possible. Non-homogenous product; requires removal of larger vesicles via chromatographic or centrifugal methods.

1.4.3.1 Μηχανικές Μέθοδοι

Υπέρηχοι Υψηλής Έντασης

Η εφαρμογή υπερήχων υψηλής πίεσης σε υδατικά αιωρήματα πολικών λιπιδίων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό μικρών λιπιδικών κυστιδίων. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη διάδοση ηχητικών κυμάτων με συχνότητες μεταξύ 16 και μερικών εκατοντάδων kHz μέσω μιας υδατικής διασποράς λιπιδίων. Η διάδοση του ηχητικού κύματος μέσω μέσων έχει ως αποτέλεσμα την αυθόρμητη παραγωγή και κατάρρευση μικρών κοιλοτήτων, μια διεργασία γνωστή ως σπηλαιώση. Ο κυκλικός σχηματισμός και η καταστροφή των κοιλοτήτων προκαλεί ακραία πίεση, άνοδο θερμοκρασίας στο εσωτερικό της κοιλότητας και συνθήκες υψηλής τυρβώδους ροής πολύ κοντά στην κατάρρευση των κοιλοτήτων. Οι συνθήκες τυρβώδους ροής ασκούν υψηλές διατμητικές δυνάμεις στα μεγάλα προλιποσώματα, σωματίδια τα οποία σχηματίζονται αυθόρμητα κατά την επαφή του ξηρού ελεύθερα ρέοντος λιπιδίου με το υδατικό μέσο. Τελικά, οι δυνάμεις αυτές είναι αρκετά υψηλές για να προκαλέσουν διάσπαση των προ-λιποσωματικών δομών ακολουθούμενη από ένα ανασχηματισμό μικρότερων, λιγότερο ευαίσθητων σε καταπονήσεις κυστιδίων. Δύο τύποι συστημάτων ομογενοποίησης υπερήχων είναι διαθέσιμοι: άμεσες συσκευές υπερήχων τύπου ακίδας και έμμεσες συσκευές υπερήχων λουτρού.

Οι υπέρηχοι υψηλής έντασης έχουν αποδειχθεί να είναι ένα πολύ αποτελεσματικό μέσο για την παραγωγή μικρών ποσοτήτων σταθερών SUVs. Οι αποδοτικότητες της ενθυλάκωσης είναι συνήθως αρκετά υψηλές με τη χρήση υπερήχων αλλά ενδέχεται να προκύψουν τα εξής τρία προβλήματα κατά την παραγωγή. Πρώτον, η επεξεργασία με υπερήχους ορισμένων αιωρημάτων πολικών λιπιδίων έχει καταγραφεί να προκαλεί εκτεταμένο αφρισμό, το οποίο καταλήγει σε απώλεια των λιπιδίων. Δεύτερον, οι υπέρηχοι μπορεί να οδηγήσουν σε τροποποίηση των λειτουργικών ιδιοτήτων του ίδιου του ενθυλακωμένου υλικού (Barnadas-Rodríguez & Sabés, 2001). Τρίτον, μικρά κυστίδια που έχουν κατεργαστεί με υπερήχους είναι κατά κύριο λόγο μετασταθή, τα κυστίδια μπορούν να μεγαλώνουν με το χρόνο για να μειώσουν την υψηλή ενέργεια καμπυλότητας που σχετίζεται με τη μεγάλη κάμψη της διπλοστοιβάδας λιπιδίων (Rodríguez & Xamaní, 2003). Γενικά, προτείνεται τα λιποσώματα που έχουν παραχθεί με υπερήχους να αφήνονται για >24 ώρες, έτσι ώστε τα κυστίδια να "ηρεμήσουν" σε ένα πιο σταθερό μέγεθος (Taylor et al., 2005).

Ομογενοποίηση Υψηλής Πίεσης και κολλοειδή Mills

Η μείωση του μεγέθους των λιποσωμάτων σε έναν ομογενοποιητή υψηλής πίεσης λαμβάνει χώρα εντός μιας βαλβίδας ομογενοποίησης, η οποία αποτελείται από ένα ρυθμιζόμενο στέλεχος βαλβίδας (πυρήνας) και ένα σταθερό εξωτερικό τοίχωμα. Τα προ-λιποσώματα, ξηροί κόκκοι που σχηματίζουν μία λιποσωμική διασπορά κατά την επαφή με το νερό ή άλλο υδατικό διάλυμα, διοχετεύονται μέσα στον δακτύλιο της βαλβίδας, που σχηματίζεται μεταξύ του στελέχους και του τοιχώματος με πιέσεις μεταξύ 10–100 MPa. Εντός του δακτυλίου, οι ταχύτητες μπορεί να ξεπερνούν τα 200 m/s. Ο μέσος χρόνος παραμονής του λιποσωμικού προμίγματος στην βαλβίδα είναι λιγότερος από μερικά ms. Λόγω της ταχείας επιτάχυνσης του υγρού στο τμήμα του δακτυλίου, η υδροστατική πίεση στο δακτύλιο μπορεί να πέσει κάτω από την τάση ατμών του υγρού. Συνεπώς, σχηματίζονται φυσαλίδες ατμού, οι οποίες είναι παροδικές αφού πέφτουν στο οπίσθιο μέρος του δακτυλίου που η πίεση και η θερμοκρασία αυξάνουν ξανά (Rodríguez & Xamaní, 2003). Η κατάρρευση των φυσαλίδων είναι η κύρια πηγή μηχανικής ενέργειας που προκαλεί τα προ-λιποσώματα να διασπαστούν.

Η αποτελεσματικότητα της λιποσωμικής διάσπασης σε μία βαλβίδα ομογενοποίησης υψηλής πίεσης μπορεί να συσχετισθεί άμεσα με την εφαρμόσιμη διαφορά πίεσης μεταξύ της εισόδου και εξόδου της βαλβίδας ομογενοποίησης. Ένας εξειδικευμένος ομογενοποιητής υψηλής πίεσης είναι ο μικρορευστοποιητής (Barnadas-Rodríguez & Sabés, 2001; Rodríguez & Xamaní, 2003). Οι μικρορευστοποιητές έχουν υψηλή αποδοτικότητα και συνήθως παράγουν μικρότερου μεγέθους σωματίδια συγκριτικά με αυτά που παράγουν οι ομογενοποιητές υψηλής πίεσης.

Τα κολλοειδή mills είναι συστήματα "ρότορα-στάτορα" που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν την κατανομή μεγέθους σωματιδίων και των δύο υγρών αιωρημάτων όπως προ-λιποσώματα και γαλακτώματα καθώς επίσης και στερεές διασπορές (εναιωρήματα). Το αιώρημα αντλείται μέσα από ένα στενό άνοιγμα που σχηματίζεται από ένα περιστρεφόμενο εσωτερικό κώνο και ένα σταθερό εξωτερικό κώνο. Η βασική μείωση του μεγέθους στα κολλοειδή mills οφείλεται στις υψηλές διατμητικές δυνάμεις που προκαλούνται από τη διαφορά ταχύτητας μεταξύ του περιστρεφόμενου κώνου και των επιφανειών του στατικού. Για την αύξηση της τριβής του τοιχώματος και τη μείωση της ολίσθησης, οι επιφάνειες είναι συνήθως τραχείς ή οδοντωτές, αυτό με τη σειρά του αλλάζει τις συνθήκες ροής από ομαλή σε τυρβώδη, αυξάνοντας έτσι τις διατμητικές δυνάμεις στον δακτύλιο (Taylor et al., 2005).

Εξώθηση και Ομογενοποίηση Μεμβράνης

Στην εξώθηση ή στην ομογενοποίηση μεμβράνης, η φάση διασποράς που περιέχει μεγάλα λιποσώματα αναγκάζεται να περάσει μέσα από μια μεμβράνη ή ένα φίλτρο με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους πόρων δημιουργώντας έναν ομοιογενή πληθυσμό μικρότερων κυστιδίων. Η αναγκαστική διέλευση μέσω των τριχοειδών της μεμβράνης ή του φίλτρου ασκεί δυνάμεις διάτμησης, οι οποίες προκαλούν ρήξη των μεμβρανών ακολουθούμενη από ταχεία επαναστεγανοποίηση. Εξαιτίας αυτού, οι ουσίες που περικλείονται σε μεγαλύτερα κυστίδια πριν από τη διέλευση μέσω των τριχοειδών θα διαρρεύσουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εξώθησης (εξαγωγής). Ως εκ τούτου η εξώθηση πρέπει να πραγματοποιείται με την παρουσία της ουσίας η οποία πρόκειται να ενθυλακωθεί.

Η εξώθηση και ομογενοποίηση μεμβράνης επηρεάζονται από τη θερμοκρασία και εξωτερικές ιδιότητες, όπως το μέγεθος των πόρων, την εφαρμόσιμη πίεση κατά μήκος της μεμβράνης του φίλτρου και το ρυθμό ροής. Η διεπιφανειακή ρεολογική συμπεριφορά των λιπιδικών μεμβρανών αλλάζει σημαντικά ανάλογα με το αν η θερμοκρασία είναι πάνω ή κάτω από την T_m (Barnadas-Rodríguez & Sabés, 2001). Αφού οι θερμοκρασίες αλλαγής φάσης εξαρτώνται από τις μοριακές ιδιότητες των πολικών λιπιδίων, η απαιτούμενη θερμοκρασία της διαδικασίας θα πρέπει να ρυθμίζεται εάν αλλάζει η σύνθεση των λιπιδίων (Taylor et al., 2005).

1.4.3.2 Μη Μηχανικές Μέθοδοι

Εξάτμιση αντίστροφης φάσης

Κατά την διαδικασία εξάτμισης αντίστροφης φάσης (REV), πολικά λιπίδια διασπείρονται σε έναν οργανικό διαλύτη με χαμηλό σημείο ζέσεως, π.χ. διαιθυλαιθέρας, ισοπροπυλαιθέρας, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη. Ένα υδατικό διάλυμα, που περιέχει την ουσία που θα ενθυλακωθεί, προστίθεται στην οργανική φάση και το σύστημα ομογενοποιείται σύντομα για να σχηματίσει ένα γαλάκτωμα. Η δομή του γαλακτώματος είναι παρόμοια με εκείνη ενός αντίστροφου μικκυλιακού συστήματος ή ενός συστήματος μικρογαλακτώματος νερό σε έλαιο όπου οι υδρόφιλες κεφαλές των λιπιδίων είναι σε επαφή με τα υδατικά σταγονίδια που περιέχουν τα ενεργά συστατικά, ενώ οι αλυσίδες λιπαρών οξέων αλληλεπιδρούν με τον οργανικό διαλύτη. Με την εξάτμιση του διαλύτη κάτω από μειωμένη πίεση, το σύστημα μετατρέπεται σε ένα υδατικό αιώρημα κυστιδίων.

Παρόλο που η αποδοτικότητα εγκλωβισμού των ουσιών είναι αρκετά υψηλή, η ολοκληρωτική απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη είναι συχνά αδύνατη και οι κατανομές μεγέθους των σωματιδίων των κυστιδίων είναι πολύτροπες και ευρείες. Συνεπώς, τα λιποσώματα που παράγονται μέσω της διαδικασίας REV υπόκεινται συχνά σε ένα δεύτερο στάδιο εξώθησης για να αποκτήσουν μικρότερες και περισσότερο ομοιογενείς διασπορές (Taylor et al., 2005).

Λυοφιλίωση- Επανενοδάτωση- Ψύξη-Απόψυξη

Οι τεχνικές αυτές χρησιμοποιούνται περισσότερο για την βελτιστοποίηση λιποσωμάτων που έχουν ήδη διαμορφωθεί και την βελτίωση των ιδιοτήτων τους, παρά ως μέθοδοι παραγωγής τους. Τα λυοφιλιωμένα, επανενοδατωμένα λιποσώματα σχηματίζονται από ήδη υπάρχοντα, διαμορφωμένα λιποσώματα τα οποία υπόκεινται σε κύκλους ξήρανσης-επανενοδάτωσης. Η επανενοδάτωση πάνω από τη θερμοκρασία αλλαγής φάσης πηκτής (gel) σε υγρή κρυσταλλική μορφή έχει ως αποτέλεσμα μια συγχώνευση μικρών, προσχηματισμένων κυστιδίων για την παραγωγή MLVs. Παρόλο που τα MLVs είναι σημαντικά μεγαλύτερα από τα αρχικά λιποσώματα (>1 μm), η συγκέντρωση της περικλειόμενης ύλης είναι αρκετά υψηλή, έχουν καταγραφεί για παράδειγμα αποδόσεις ενθυλάκωσης έως και 45%. Οι αποδόσεις του εγκλωβισμού δραστικών ουσιών μπορούν επίσης να βελτιωθούν με την επανειλημμένη κατάψυξη και απόψυξη σε θερμοκρασία πάνω από τη θερμοκρασία αλλαγής φάσης T_m (Gregoriadis et al., 2003). Θεωρείται ότι η προκύπτουσα διαδικασία σύντηξης οδηγεί σε έναν αριθμό πολύ μικρών λιποσωμάτων και στο σχηματισμό πολυκυστιδιακών κυστιδίων με υψηλές αποδόσεις εγκλωβισμού ουσιών (Taylor et al., 2005).

1.4.4 Μελέτες Ενθυλάκωσης Αντιμικροβιακών Ουσιών σε Λιποσώματα

Η χρήση των λιποσωμάτων για την ενθυλάκωση αιθέριων ελαίων είναι μια ελκυστική προσέγγιση για να ξεπεραστούν προβλήματα σχετικά με τη φυσικοχημική τους σταθερότητα (ευαισθησία στο οξυγόνο, φως, θερμοκρασία, πτητικότητα και αστάθεια sensibility) και τη μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα τους η οποία οφείλεται στη χαμηλή διαλυτότητα στο νερό (El Asbahani et al., 2015). Η μικροενθυλάκωση μειώνει την αντιδραστικότητα με το περιβάλλον (νερό, οξυγόνο, φως), την εξάτμιση ή το ρυθμό μεταφοράς προς το εξωτερικό περιβάλλον, προωθεί την ικανότητα χειρισμού, αποκρύπτει τη γεύση και ενισχύει την αραίωση για την επίτευξη μιας ομοιόμορφης διανομής στο τελικό

προϊόν όταν χρησιμοποιείται σε πολύ μικρές ποσότητες. Η χρήση των λιποσωμάτων, με σκοπό την μεταφορά αρωματικών υλών και θρεπτικών συστατικών, μπορεί επίσης να παρέχει την απαραίτητη προστασία έναντι της οξειδωσης, ενώ η ενσωμάτωση αντιμικροβιακών ουσιών στα τρόφιμα θα βοηθούσε στην προστασία των τροφίμων έναντι της ανάπτυξης αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Taylor et al., 2005).

Σύμφωνα με τους Liolios et al. (2009) οι οποίοι μελέτησαν τη λιποσωμική ενσωμάτωση καρβακρόλης και θυμόλης, που απομονώθηκαν από το αιθέριο έλαιο του *Origanum dictamnus*, και την *in vitro* αντιμικροβιακή τους δράση, βρήκαν ότι τα αιθέρια έλαια του συγκεκριμένου φυτού ανέστειλαν την υπεροξειδωση των φωσφολιπιδίων του λιποσώματος. Η αναστολή της οξειδωσης από τα αιθέρια έλαια ήταν υψηλά εξαρτώμενη από τις συγκέντρωσεις των καρβακρόλη και θυμόλη. Οι καθαρές ενώσεις (καρβακρόλη, θυμόλη), αποδείχθηκαν να είναι πιο δραστικές από το έλαιο, και οι αντιμικροβιακές δράσεις τους ήταν σημαντικά αυξημένες μετά τον εγκλεισμό τους σε λιποσώματα. Η θυμόλη παρουσίασε ισχυρότερη δράση από την καρβακρόλη, έναντι των περισσότερων μικροβιακών τύπων που εξετάστηκαν. Επίσης, μια μικρή ποσότητα καρβακρόλης (4.16%) ενθυλακώθηκε επιτυχώς σε λιποσώματα και φάνηκε να ήταν πιο δραστική από την καθαρή φυσική ένωση η οποία βρισκόταν σε υψηλότερη ποσότητα (Liolios, Gortzi, Lalas, Tsaknis, & Chinou, 2009). Οι Sebaaly et al. (2015) παρασκεύασαν και μελέτησαν λιποσώματα στα οποία είχε περικλειστεί αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου. Τα λιποσώματα ελέγχθηκαν για τη σταθερότητα τους μετά από συντήρηση 2 μηνών στους 4 °C, παρακολουθώντας αλλαγές στο μέγεθος τους, τον δείκτη πολυδιασποράς (pdi) και τις τιμές αποτελεσματικότητας ενθυλάκωσης (EE). Οι τιμές σχετικά με την αποδοτικότητα της ενθυλάκωσης (EE) μετά από την περίοδο συντήρησης ήταν ακριβώς ίδιες με αυτές στην αρχή (t=0) , κάτι που υποδηλώνει ότι τα λιποσώματα διατήρησαν το αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου καθ'όλη τη διάρκεια των 2 μηνών και την ευγενόλη από την υποβάθμιση (αποδόμηση) που προκαλεί η έκθεση σε UV ακτινοβολία. (Sebaaly, Jraij, Fessi, Charcosset, & Greige-Gerges, 2015).

Οι Imran et al (2015) μελέτησαν νανο-λιποσωμικά συστήματα χρησιμοποιώντας λεκιθίνη σόγιας και θαλάσσια λεκιθίνη για την ενθυλάκωση της φυσικής αντιμικροβιακής ουσίας, νισίνης. Η φυσική σταθερότητα των λιποσωμάτων στα οποία είχε εγκλειστεί νισίνη αποδείχθηκε για 6 εβδομάδες με συντήρηση στους 4°C, αν και μελέτες μικροσκοπίας εκπομπής ηλεκτρονίων αποκάλυψαν το σχηματισμό πόρων από τη νισίνη και φαινόμενο σύντηξης μετά από συντήρηση 20 εβδομάδων στους 4°C. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι το μίγμα ελεύθερης και ενθυλακωμένης νισίνης (1:1) παρουσίασε καλύτερο έλεγχο του *Listeria monocytogenes* συγκριτικά με την ελεύθερη ή 100% ενθυλακωμένη

νισίνη. Αυτό το φαινόμενο πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι η ελεύθερη νισίνη έλεγξε την αρχική έκρηξη βακτηριακής ανάπτυξης και τελικά η απελευθέρωση νισίνης από το λιπόσωμα και οι αλληλεπιδράσεις λιποσώματος με το *L. monocytogenes* θα μπορούσαν να βελτιώσουν την αντιμικροβιακή δράση. Γενικά, η παρουσία της νισίνης αύξησε το μέγεθος του λιποσώματος (151 ± 4 και 181 ± 5 nm χωρίς νισίνη και με νισίνη αντίστοιχα). Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στη δημιουργία μιας περισσότερο διογκωμένης μεμβράνης (Imfran et al., 2015).

Σύμφωνα με μελέτη των Peng et al. (2015) για την αντιμικροβιακή δράση λιποσωμάτων στα οποία έχει εγκλειστεί ευγενόλη, παρατηρήθηκε ικανοποιητική σταθερότητα κατά τη διάρκεια συντήρησης, η οποία επιβεβαιώθηκε με τη χαμηλή διακύμανση της μέσης διαμέτρου των σωματιδίων, και αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης μετά από 8 εβδομάδες χρόνο συντήρησης. Επίσης, δεν βρέθηκαν σταγόνες ελαίου στα νανο-λιποσώματα ευγενόλης μετά το τέλος της περιόδου συντήρησης στους 4°C και σε θερμοκρασία δωματίου, κάτι το οποίο προτείνει ότι η χαμηλή διαλυτότητα της ευγενόλης στο νερό ξεπεράστηκε με την ενθυλάκωση της στα λιποσώματα. Ωστόσο, η παρεμποδιστική δράση της διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίων του λιποσώματος και τα προφίλ βραδείας απελευθέρωσης της ευγενόλης πιθανότατα να οδήγησαν σε χαμηλότερα επίπεδα αλληλεπίδρασης της ευγενόλης με τα βακτήρια (Peng et al., 2015).

1.5 Συσκευασία

Είναι ευρέως γνωστό ότι η συσκευασία δίνει στα τρόφιμα μεγαλύτερη διασφάλιση της ασφάλειας από μικροοργανισμούς, βιολογικές και χημικές αλλαγές έτσι ώστε τα συσκευασμένα τρόφιμα να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής. Ως αποτέλεσμα, η συσκευασία έχει γίνει αναπόσπαστο στοιχείο στη διαδικασία παρασκευής τροφίμων. Προκειμένου να εκπληρωθεί η μεγάλη ζήτηση της βιομηχανίας τροφίμων, έχει υπάρξει αξιοσημείωτη αύξηση στην ανάπτυξη της συσκευασίας τροφίμων τις τελευταίες δεκαετίες. Ανάμεσα στις τεχνολογίες συσκευασίας που αναπτύχθηκαν από και για την βιομηχανία, η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας έχει οδηγήσει στην εξέλιξη της συντήρησης των φρέσκων και ελάχιστα μεταποιημένων τροφίμων, κυρίως του κρέατος και των προϊόντων του τις δύο τελευταίες δεκαετίες.

Σε τέτοιες συσκευασίες, δημιουργείται μια αρχική ατμόσφαιρα είτε επιτρέποντας στον αέρα να εσωκλείεται είτε με την έγχυση ενός επιθυμητού μίγματος αερίων. Αυτό το μίγμα στη συνέχεια αλλάζει, ως αποτέλεσμα των πολλαπλών μεταβλητών συμπεριλαμβανομένων των: (i) διαπερατότητα του O_2 , CO_2 , και υδρατμών διαμέσου του

υλικού συσκευασίας, (ii) μετάδοση του O₂, CO₂ και υδρατμών μέσω της σφράγισης και ελαττωματικών περιοχών, (iii) θερμοκρασία του υλικού συσκευασίας η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μικρές αλλαγές στη διαπερατότητα, (iv) επιφάνεια του υλικού συσκευασίας και (v) το πάχος του υλικού συσκευασίας. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να επηρεάσουν τη συνεισφορά των διαφορετικών μελών του μικροβιακού πληθυσμού και συνεπώς μπορεί να επιτευχθεί παράταση του χρόνου ζωής του προϊόντος. Η πλειονότητα των προϊόντων κρέατος συσκευάζονται σε περιβάλλον με υψηλό ποσοστό O₂ περίπου 80% για την μείωση της οξείδωσης της μυογλοβίνης και την παροχή ενός σταθερού, ελκυστικού, κόκκινου χρώματος, σε αναλογία τουλάχιστον 20% CO₂ (Karetanakou, Agathaggelou, & Skandamis, 2014).

Παρά τον παρατεταμένο χρόνο ζωής των προϊόντων ψύξης που συντηρούνται σε συνθήκες συσκευασίας κενού ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας, υπάρχει αυξανόμενη ανησυχία για την ανάπτυξη/επιβίωση αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (π.χ οξυγαλακτικά βακτήρια) και μικροαερόφιλων ψυχρότροφων παθογόνων (π.χ. *Brochotrix thermosphacta*). Συνεπώς, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν επιπρόσθετα εμπόδια για τη διασφάλιση της ασφάλειας τέτοιων προϊόντων. Έξυπνες, διαδραστικές και ενεργές συσκευασίες είναι όροι που έχουν χρησιμοποιηθεί για να περιγράψουν την καινοτόμο ιδέα των δομών συσκευασίας. Μπορεί να οριστεί ως ένα είδος συσκευασίας, το οποίο αλλάζει τις συνθήκες συσκευασίας για να επεκτείνει τον χρόνο ζωής ή να βελτιώσει την ασφάλεια ή τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, ενώ παράλληλα διατηρείται η ποιότητα του τροφίμου.

Δεδομένου ότι, τα περισσότερα συστήματα συσκευασίας τροφίμων αποτελούνται από το υλικό συσκευασίας, το τρόφιμο και τον υπερκείμενο χώρο στην συσκευασία, αντιμικροβιακοί παράγοντες θα μπορούσαν είτε να ενσωματωθούν στα υλικά συσκευασίας αρχικά και να μεταναστεύσουν στο τρόφιμο μέσω διάχυσης και διαχωρισμού είτε να απελευθερωθούν μέσω εξάτμισης στον ανώτερο χώρο της συσκευασίας. Ο τελευταίος τρόπος μπορεί να επιτευχθεί με αιθέρια έλαια, τα οποία είναι ασταθή και θεωρούνται "φυσικές" εναλλακτικές λύσεις στα χημικά συντηρητικά. Επιπλέον, η χρήση τους στα τρόφιμα ανταποκρίνεται στις τρέχουσες απαιτήσεις των καταναλωτών για ήπια μεταποιημένα ή φυσικά προϊόντα.

Ωστόσο, δεδομένου ότι η πρακτική εφαρμογή τους είναι περιορισμένη λόγω ζητημάτων που αφορούν στο άρωμα, καθώς και επειδή η αποτελεσματικότητά τους είναι περιορισμένη εξαιτίας της αλληλεπίδρασης τους με τα συστατικά των τροφίμων, η εφαρμογή της ενεργού συσκευασίας μπορεί να είναι μεγάλης σημασίας (Panagiotis N. Skandamis & Nychas, 2002).

1.6 Υπερ-υψηλή Πίεση (High Pressure Processing)

1.6.1 Γενικά

Την τελευταία δεκαετία, μη θερμικές καινοτόμες τεχνολογίες επεξεργασίας έχουν κάνει την εμφάνισή τους, ως πολλά υποσχόμενες μέθοδοι συντήρησης, παρουσιάζοντας ως σημαντικά σημεία την διασφάλιση της ασφάλειας και την επιμήκυνση του χρόνου ζωής χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα των επεξεργασμένων τροφίμων. Η επεξεργασία τροφίμων με υψηλή πίεση (HPP) είναι μια μέθοδος μη θερμικής παστερίωσης των τροφίμων, η οποία συνίσταται στην υποβολή των τροφίμων σε υψηλά επίπεδα πίεσης, τα οποία εφαρμόζονται για την απενεργοποίηση αλλοιωγόνων ενζυματικών συμπλόκων, βακτηρίων και να εξαλείψουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Η υψηλή πίεση, αυτή τη στιγμή, χρησιμοποιείται για την μείωση του αλλοιωγόνου μικροβιακού φορτίου, την επέκταση του χρόνου ζωής και τη βελτίωση της ασφάλειας ενός ευρέος φάσματος ωμών και επεξεργασμένων κατηγοριών τροφίμων. Σε αντίθεση με συμβατικές μεθόδους θερμικής επεξεργασίας, η κατάλληλη εφαρμογή υψηλής πίεσης μπορεί να προάγει την διατήρηση της φρεσκάδας, την αισθητική και θρεπτική αξία των τροφίμων. Συνήθως, η εφαρμογή μεταχειρίσεων υψηλής πίεσης συνίσταται στην υποβολή τροφίμων σε φορτία πίεσης υψηλότερα από 50-100 MPa και μέχρι 1000 MPa για μερικά λεπτά και κύκλους, με ή χωρίς αύξηση της θερμοκρασίας.

Αυτή η έντονη διεργασία υιοθετήθηκε εξαιτίας της ανθεκτικότητας στην πίεση και του υποθανάτιου τραυματισμού μερικών βακτηριακών στελεχών, τα οποία μπορεί να ανακτήσουν την ανάπτυξη τους σύμφωνα με τα εγγενή χαρακτηριστικά του συστήματος του τροφίμου και εξωγενών παραγόντων συντήρησης. Παρόλα αυτά, η καθιέρωση αυτού του έντονου συμβατικού συστήματος, που περιλαμβάνει το χρόνο, θερμοκρασία και το φορτίο πίεσης έχει συσχετισθεί με υποτίμηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αρνητικές επιδράσεις στο χρώμα και την υφή και με αντιδράσεις υποβάθμισης, όπως η πυροδότηση της οξειδωσης των λιπιδίων σε μερικές κατηγορίες τροφίμων. Στην πραγματικότητα, ενώ οι υψηλές πιέσεις δεν επηρεάζουν τους ομοιοπολικούς δεσμούς μικρών μορίων, επηρεάζουν σημαντικά δομικά, διαμορφωτικά ή/και λειτουργικά μακρομόρια και τις σχετικές ιδιότητες ποιότητας των τροφίμων. Αυτές οι αρνητικές επιδράσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά, περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα κατηγοριών τροφίμων, όπως μερικά προϊόντα κρέατος και ωμών τεμαχίων κρέατος, ψάρι, φρούτα, χυμούς, λαχανικά και γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η διαδικασία υψηλής πίεσης μπορεί να εφαρμοστεί μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων: ως επεξεργασία υψηλής υδροστατικής πίεσης (High Hydrostatic Pressure

processing - HHP) σε μία ισοστακτική μονάδα υψηλής πίεσης και ως επεξεργασία υπερ-υψηλής πίεσης (Ultra-high-pressure processing - UHP), ή δυναμική ομογενοποίηση υψηλής πίεσης (Dynamic High Pressure Homogenization - HPH), σε υπερ-ομογενοποιητές. Η τεχνολογία της υψηλής πίεσης είτε με τη μορφή της HHP ή HPH (η UHP χρησιμοποιείται κυρίως για υγρά ή ημι-στερεά δείγματα) μπορεί να εφαρμοσθεί σε μια μεγάλη ποικιλία τροφίμων συμπεριλαμβανομένων προϊόντων με βάση το κρέας, ψάρι, προμαγειρεμένα πιάτα, μαρμελάδες, φρούτα, γαλακτοκομικά, αναψυκτικά, έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα (RTE), λαχανικά και χυμούς (Oliveira, Ramos, Ramos, Piccoli, & Cristianini, 2015).

1.6.2 Επιδράσεις στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων

Η μεταχείριση με υψηλή πίεση σε ήπια επίπεδα πίεσης γενικά δεν αλλάζει την οσμή, τη γεύση ή άλλα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων. Για αυτό, η επεξεργασία υψηλής πίεσης προσφέρει στη βιομηχανία μια τεχνολογία η οποία μπορεί να επιτύχει τα χαρακτηριστικά ασφάλειας των τροφίμων ενώ παράλληλα να ικανοποιήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών για φρέσκα γευστικά τρόφιμα. Οι μεταχειρίσεις με αυξημένη πίεση θα αυξήσουν την μικροβιακή απενεργοποίηση σε μικρότερους χρόνους, αλλά οι υψηλότερες πιέσεις μπορούν επίσης να προκαλέσουν υψηλότερα επίπεδα τροποποίησης των μακρομορίων και άλλες δυνητικά επιζήμιες αλλαγές στην ποιότητα των τροφίμων, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση και υφή του τροφίμου συγκριτικά με το ανεπεξέργαστο προϊόν. Ο συντελεστής της μεταβλητής του φορτίου της πίεσης, μεταξύ άλλων μεταβλητών της μεταχείρισης με υψηλή πίεση, είναι υψηλότερος, όντας οι επιδράσεις του στα ποιοτικά χαρακτηριστικά μεγάλου ενδιαφέροντος. Επειδή οι ομοιοπολικοί δεσμοί δεν επηρεάζονται από την πίεση, πολλά από τα μικρά μόρια που συνεισφέρουν στο χρώμα, το άρωμα ή τη θρεπτική ποιότητα ενός τροφίμου είναι αμετάβλητα από την πίεση. Ωστόσο, εάν η οργανοληπτική ποιότητα ενός τροφίμου εξαρτάται από δομικά ή λειτουργικά μακρομόρια και ειδικά πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες, η πίεση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του τροφίμου. Ένα από τα κύρια προνόμια της εφαρμογής υψηλής πίεσης είναι η καλύτερη ποιότητα με ισοδύναμη ασφάλεια συγκριτικά με τα συμβατικά θερμικά επεξεργασμένα τρόφιμα (Oliveira, Ramos, et al., 2015).

1.6.3 Προσέγγιση πολλαπλών εμποδίων: συνδυασμός υψηλής πίεσης και φυσικών αντιμικροβιακών

Παρά την αδιαμφισβήτητη χρησιμότητα και οφέλη της μεταχείρισης τροφίμων με υψηλή πίεση, πρέπει να διερευνηθούν και να καθιερωθούν και άλλα συμπληρωματικά εργαλεία. Επιδιώκοντας ταυτόχρονη ποιότητα και ασφάλεια, η τεχνολογία πολλαπλών εμποδίων φαίνεται να είναι μια εύλογη εναλλακτική λύση. Αν και είναι προφανής η επιτυχία της τεχνολογίας της υψηλής πίεσης ως μέθοδος μη θερμικής επεξεργασίας για τη συντήρηση των τροφίμων, η πρόσφατη βιβλιογραφία έχει τονίσει την πολλά υποσχόμενη τάση της συνδυασμένης χρήσης της υψηλής πίεσης και των φυσικών αντιμικροβιακών.

Φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες μπορούν να δράσουν ως επιπρόσθετο εμπόδιο ή συνεργιστικά με ενέργειες διαπερατοποίησης και ευαισθητοποίησης έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροβιακών κυττάρων, ενδυναμώνοντας την βακτηριοκτόνο δράση. Επομένως, οι ήπιες μεταχειρίσεις με υψηλή πίεση μπορούν να είναι ασφαλείς και οι μικρές δόσεις πρόσθετων αντιμικροβιακών που απαιτούνται για αποτελεσματικότητα. Βελτιστοποιημένες δράσεις εμποδίων με επίδοση υψηλής πίεσης μπορούν να μειώσουν τις αρχικές δαπάνες εγκατάστασης και συντήρησης του εξοπλισμού, τον χρόνο και τα φορτία πίεσης που εφαρμόζονται. Μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα, ότι τα φυσικά αντιμικροβιακά και οι νέες ιδέες συντήρησης τροφίμων μπορούν να είναι σημαντικά εμπόδια στα ελάχιστα επεξεργασμένα, ασφαλή και υψηλής ποιότητας τρόφιμα επεξεργασμένα με υψηλή πίεση (Oliveira, Ramos, et al., 2015).

1.6.4 Μελέτες Εφαρμογής Υψηλής Πίεσης

Σύμφωνα με μελέτη των Sheen et al. (2015) για την απενεργοποίηση του *Salmonella* spp. σε αλεσμένο κοτόπουλο με χρήση υψηλής πίεσης, βρήκαν ότι οι μεταχειρίσεις του τροφίμου με 250 και 300 MPa για 15 λεπτά επέφεραν μειώσεις 0.5 log και 1.8 log CFU/g αντίστοιχα, ενώ παρατηρήθηκε υψηλότερη απενεργοποίηση (1.0 log CFU/g) με εφαρμογή 3 κύκλων για 5 λεπτά στις ίδιες πιέσεις. Ωστόσο, σε συνθήκες 450 MPa για 10 και 15 λεπτά (ένας κύκλος) σημειώθηκαν μειώσεις 5.56 log και 7.78 log αντίστοιχα, ενώ με περαιτέρω αύξηση της πίεσης στα 550 MPa, τα βακτηριακά κύτταρα μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Γενικά, η θνησιμότητα που επιφέρει η εφαρμογή υψηλής πίεσης πολλαπλών κύκλων είναι περίπου 1.0 log CFU/g υψηλότερη από ότι η μεταχείριση ενός κύκλου για ίδιο περίπου χρόνο επεξεργασίας. Όσον αφορά στην εμφάνιση, διαφορές υπήρξαν στην περίπτωση των 450 και 500 MPa, όπου παρατηρήθηκε ένα ελαφρώς ροζ και καφέ χρώμα του αλεσμένου κοτόπουλου αντίστοιχα (Sheen, Cassidy, Scullen, Uknalis, & Sommers, 2015).

Οι Oliveira et al. (2015) εξέτασαν τη συνεργιστική δράση καρβακρόλης και υψηλής πίεσης (600 MPa/180 sec) σε ζαμπόν γαλοπούλας χαμηλής περιεκτικότητας σε νάτριο και συσκευασμένο σε κενό κατά τη συντήρηση στους 4°C. Στα δείγματα που υπέστησαν υψηλή πίεση, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν απόντα για τις 20 ημέρες συντήρησης, συγκριτικά με αυτά που δεν μεταχειρίστηκαν με πίεση όπου ο πληθυσμός κυμάνθηκε μεταξύ 1.29 και 1.62 log₁₀ CFU/g, 24 ώρες μετά τη συντήρηση στους 4°C. Επίσης, σε συνθήκες καθόλου πίεσης, ο μικροοργανισμός *L. innocua* παρουσίασε αρχικό πληθυσμό 6 log₁₀ CFU/g, φτάνοντας τους 8 log₁₀ CFU/g στο τέλος των 60 ημερών συντήρησης, ενώ στα δείγματα που μεταχειρίστηκαν με HP η βακτηριακή ανάπτυξη καθυστέρησε, ξεκινώντας μετά τις 20 ημέρες. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 180s δεν επηρέασε αρνητικά το χρώμα του προϊόντος, καθώς οι δείκτες χρώματος που εξετάστηκαν ήταν σχετικά σταθεροί καθ'όλη τη διάρκεια συντήρησης (Oliveira, Junior, et al., 2015). Με βάση μελέτη των Kamenik et al. (2015), η ολική μεσόφιλη χλωρίδα σε δείγματα μαγειρεμένων λουκάνικων, τα οποία μεταχειρίστηκαν με πίεση 600 MPa/5 min, μειώθηκε 0.7 log₁₀ CFU/g κατά τη διάρκεια 35 ημερών συντήρησης. Επίσης, ο αριθμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν αρχικά χαμηλότερος από 1 log CFU/g στα δείγματα που υπέστησαν πίεση καθώς και στα δείγματα των μαρτύρων, με τη διαφορά ότι στα δείγματα που μεταχειρίστηκαν με πίεση ο πληθυσμός παρέμεινε σταθερός, ενώ στα ανεπεξέργαστα δείγματα ο πληθυσμός αυξήθηκε στους 4 log CFU/g μετά από 35 ημέρες συντήρησης. Τέλος, δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των λουκάνικων που δέχθηκαν HP (Kamenik, Saláková, Hulánková, & Borilova, 2015).

Οι Jiang et al. (2015) εξέτασαν την αποτελεσματικότητα σύντομων και επαναλαμβανόμενων μεταχειρίσεων με υψηλή πίεση (4 κύκλοι των 60s, 400MPa, 17 °C) στην μείωση του πληθυσμού διαφόρων οροτύπων *E. coli* σε βόεια μπιφτέκια. Οι μεταχειρίσεις αυτές επέφεραν διάφορες μειώσεις κυμαινόμενες από 2.35–3.88 και 2.26–4.31 log₁₀ CFU/g σε 80:20 και 90:10 (άπαχο κρέας : λίπος) δείγματα, αντίστοιχα, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι η εφαρμογή πίεσης στο βόειο κρέμα προκάλεσε ποικίλα αποτελέσματα. Υψηλότερο ποσοστό τραυματισμού παρατηρήθηκε στους ορότυπους *E. coli* που εμβολιάστηκαν σε 80:20 βόεια μπιφτέκια, συγκριτικά με τα 90:10 δείγματα, δείχνοντας ότι η σύσταση 80:20 ίσως να παρέχει ένα περιβάλλον που επιτρέπει στα τοξικογόνα στελέχη *E. coli* να επιβιώνουν της υψηλής πίεσης σε τραυματισμένη κατάσταση και να ανακάμπτουν όταν υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης (Jiang, Scheinberg, Senevirathne, & Cutter, 2015).

1.7 Υπόθεση και Στόχοι Μελέτης

Το νωπό κρέας αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο προϊόν, λόγω των ενδογενών παραμέτρων και της άμεσης έκθεσης του σφαγίου στο περιβάλλον, αφού ο φυσικός ανατομικά φραγμός του δέρματος απομακρύνεται. Συγκεκριμένα, η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό ($a_w > 0.99$), το pH, το οποίο αντιστοιχεί στο βέλτιστο εύρος περιοχής για μικροβιακή ανάπτυξη (5.5–6.5), η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών απόδοσης ενέργειας (π.χ. γλυκόζη, ριβόζη, αμινοξέα και νουκλεοτίδια) καθώς επίσης οι βιταμίνες και τα ανόργανα στοιχεία καθιστούν το κρέας ένα τρόφιμο με σύντομη διάρκεια ζωής (Pothakos et al., 2015). Την τελευταία δεκαετία, ο βόειος κιμάς έχει συνδεθεί με αρκετά κρούσματα τροφιμογενών ασθενειών που προκαλούνται από διάφορα στελέχη *Escherichia coli*, τα οποία παράγουν Shiga τοξίνη.

Για την βελτίωση των ποσοστών απενεργοποίησης παθογόνων βακτηρίων στα τρόφιμα, χωρίς όμως την υποβάθμιση του προϊόντος και τη μεταβολή των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών έχει δημιουργηθεί η ανάγκη για εφαρμογή εναλλακτικών μεθόδων συντήρησης, οι οποίες είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται συνδυαστικά σύμφωνα με την τεχνολογία των πολλαπλών εμποδίων. Μία πολλά υποσχόμενη τάση είναι η συνδυαστική χρήση φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών (αιθέρια έλαια) και η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης (HPP) (Oliveira, Ramos, et al., 2015).

Δεδομένου ότι τα δραστικά επίπεδα των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα έχουν συνήθως αρνητικό αντίκτυπο στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων, η εμπορική εφαρμογή τους είναι προς το παρόν περιορισμένη. Ένας τρόπος για να μετριασθεί αυτή η επίδραση, είναι η ενθυλάκωση των αιθέριων ελαίων σε εδώδιμες μεμβράνες, επιφανειοδραστικά μικκύλια ή άλλα σωματίδια (Drosinos et al., 2009).

Η παρούσα έρευνα μελετά την επίδραση αιθέριου ελαίου ρίγανης, ελεύθερου ή ενθυλακωμένου σε λιποσώματα και την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης στην επιβίωση κατά την συντήρηση και την έψηση του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 σε βόειο κιμά, καθώς και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός Σχεδιασμός

Στο παρόν κεφάλαιο, έγινε ο σχεδιασμός του πειράματος με στόχο τη μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης (Α.Ε.Ρ.), ως φυσικό αντιμικροβιακό παράγοντα στην επιβίωση και θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου *E. coli* O157:H7 σε βόειο κιμά., είτε με την απευθείας προσθήκη του στον κιμά είτε έπειτα από ενθυλάκωση του σε λιποσώματα. Στη συνέχεια, ως επιπρόσθετο εμπόδιο έναντι του παθογόνου, εφαρμόστηκε υπερυψηλή πίεση (High Pressure Processing, HPP). Αρχικά, επιλέχθηκε να μελετηθεί μια υψηλή συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 0.5%, που έχει αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση σύμφωνα με τη βιβλιογραφία και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις, αυτές των 0.1% και 0.25%, για να μελετηθεί η μεμονωμένη δράση τους είτε σε συνδυασμό με την υπερυψηλή πίεση. Επίσης, με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου, παράλληλος στόχος ήταν η επίτευξη των καλύτερων δυνατών αποτελεσμάτων στην οργανοληπτική αξιολόγηση των βόειων μπιφτεκιών. Η υπερυψηλή πίεση επιλέχθηκε να εφαρμοστεί σε δύο επίπεδα, ένα χαμηλό στα 250 MPa (ήπια μεταχείριση) και ένα υψηλότερο στα 400 MPa. Έτσι προέκυψαν περιπτώσεις στις οποίες προστέθηκε μόνο η αντιμικροβιακή ουσία και άλλες στις οποίες έγινε συνδυασμός αντιμικροβιακής ουσίας και υπερυψηλής πίεσης (Πίνακας 2.1.1.).

Πίνακας 2.1.1: Οι περιπτώσεις που μελετήθηκαν με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό.

% Α.Ε.Ρ. MPa	0 % Α.Ε.Ρ. (ΜΑΡΤΥΡΑΣ)	0.1% Α.Ε.Ρ.	0.25% Α.Ε.Ρ.	0.5% Α.Ε.Ρ.	0.1% ΛΙΠΟΣΩΜΑ + Α.Ε.Ρ.	0.25% ΛΙΠΟΣΩΜΑ +Α.Ε.Ρ.	0.5% ΛΙΠΟΣΩΜΑ +Α.Ε.Ρ.
0 MPa	X	X	X	X	X	X	X
250 MPa	X			X			X
400 MPa	X	X	X	X	X	X	X

Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 5 °C για 28 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν κατά την 0^η, 8^η, 14^η και 28^η μέρα συντήρησης, με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης των αντιμικροβιακών ουσιών και της υψηλής πίεσης στην επιβίωση του παθογόνου. Η θερμική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε κατά τη 14^η και 28^η μέρα σε τελική θερμοκρασία 65°C στο γεωμετρικό κέντρο του μπιφτεκιού. Η θερμοκρασία αυτή επιλέχτηκε μετά από δοκιμή θερμικής επεξεργασίας στους 70-71 °C, την ενδεδειγμένη σύμφωνα με τη νομοθεσία, η οποία όμως εξάλειψε τον παθογόνο και δεν ήταν δυνατή η μελέτη της επίδρασης των αντιμικροβιακών χειρισμών και εμποδίων που εφαρμόστηκαν.

2.2 Προπειράματα

Για να μελετηθούν οι περιπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω έγιναν οι ακόλουθοι πειραματικοί σχεδιασμοί. Τα πειράματα που έλαβαν χώρα με βάση τους εκάστοτε πειραματικούς σχεδιασμούς διήρκεσαν από 15 - 30 ημέρες με 4 ή 6 δειγματοληψίες για τα ωμά δείγματα την 0^η, 7^η, 15^η και 30^η μέρα συντήρησης, ενώ για τα θερμικά επεξεργασμένα πραγματοποιήθηκαν 3 δειγματοληψίες την 0^η, 15^η και 30^η μέρα συντήρησης. Η θερμοκρασία συντήρησης των δειγμάτων ήταν οι 5 °C, ενώ η θερμοκρασία θερμικής επεξεργασίας ήταν οι 68.3 °C (1^{ος} πειραματικός σχεδιασμός) και 65 °C (2^{ος} και 3^{ος} πειραματικός σχεδιασμός).

2.2.1 1^{ος} Πειραματικός Σχεδιασμός

Στον 1^ο πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις:

1. Μάρτυρας (control)
2. 0.5% A.E.P
3. 0.5% A.E.P. σε λιπόσωμα

Παρελήφθη βόειος κιμάς από το εμπόριο, ο οποίος ενοφθαλμίστηκε με 10⁷ cfu/g βόειου κιμά και προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αντιμικροβιακών ουσιών. Ο συνολικός χρόνος συντήρησης ήταν 16 ημέρες. Οι χρόνοι δειγματοληψίας για τη μελέτη της επιβίωσης κατά την συντήρηση έγιναν κατά την 0^η, 3^η, 6^η, 9^η, 11^η και 16^η ημέρα, ενώ για την επιβίωση κατά την έψηση έγιναν κατά την 0^η, 7^η και 16^η ημέρα συντήρησης. Η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε η θερμική επεξεργασία ήταν οι 68.3 °C.

2.2.2 2ος Πειραματικός Σχεδιασμός

Στον 2^ο πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις:

1. Μάρτυρας (control)
2. 0.5% A.E.P
3. 0.5% A.E.P. σε λιπόσωμα

Παρελήφθη βόειο κρέας και προετοιμάστηκε φρέσκος κιμάς στον εργαστηριακό χώρο με χρήση κιμαδομηχανής, ο οποίος ενοφθαλμίστηκε με 10^5 cfu/g βόειου κιμά και προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αντιμικροβιακών ουσιών. Ο συνολικός χρόνος συντήρησης ήταν 30 ημέρες. Οι χρόνοι δειγματοληψίας για τη μελέτη της επιβίωσης κατά την συντήρηση έγιναν κατά την 0^η, 7^η, 15^η και 30^η ημέρα, ενώ για την επιβίωση κατά την έψηση έγιναν κατά την 0^η, 7^η και 30^η ημέρα συντήρησης. Η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε η θερμική επεξεργασία ήταν οι 65 °C.

2.2.2 3ος Πειραματικός Σχεδιασμός

Στον 3^ο πειραματικό σχεδιασμό μελετήθηκαν οι παρακάτω περιπτώσεις:

1. Μάρτυρας (control) χωρίς αντιμικροβιακές ουσίες
2. 0.5% A.E.P
3. 0.5% A.E.P. + HPP (250 MPa, 400 MPa)
3. 0.5% A.E.P. σε λιπόσωμα
4. 0.5% A.E.P. σε λιπόσωμα + HPP (250 MPa, 400 MPa)

Παρελήφθη βόειο κρέας και προετοιμάστηκε φρέσκος κιμάς στον εργαστηριακό χώρο με χρήση κιμαδομηχανής, ο οποίος ενοφθαλμίστηκε με 10^5 cfu/g βόειου κιμά και προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες των αντιμικροβιακών ουσιών. Τα δείγματα μετά τη συσκευασία υποβλήθηκαν σε υψηλή πίεση στα 250 και 400 MPa και συντηρήθηκαν στους 5 °C για 30 ημέρες. Οι χρόνοι δειγματοληψίας για τη μελέτη της επιβίωσης κατά την συντήρηση έγιναν κατά την 0^η, 15^η και 30^η ημέρα, ενώ για την επιβίωση κατά την έψηση έγινε κατά την 30^η ημέρα συντήρησης. Η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε η θερμική επεξεργασία ήταν οι 65 °C.

2.3 Μικροοργανισμός *Escherichia coli* O157:H7

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα κατά τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν ο παθογόνος μικροοργανισμός *Escherichia coli* O157:H7, στέλεχος NCTC 12079, το οποίο έχει απομονωθεί από ανθρώπινα περιπτώματα. Το στέλεχος διατηρούνταν στους -22 °C, σε Nutrient broth παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 20% επί του συνολικού όγκου, στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2.4 Φυσική Αντιμικροβιακή Ουσία

Στην παρούσα μελέτη η αντιμικροβιακή ουσία που χρησιμοποιήθηκε ήταν το αιθέριο έλαιο ρίγανης (A.E.P) (*Origanum Essential Oil – Origanum vulgare*). Το αιθέριο έλαιο ρίγανης προστέθηκε είτε απευθείας στον κιμά είτε εγκλεισμένο σε λιποσώματα σε συγκέντρωση 5% v/w.

2.5 Παρασκευή Λιποσωμάτων

Τα λιποσώματα παρασκευάστηκαν με τη χρήση γαλακτωματοποιητών και την εφαρμογή υψηλής διατμητικής τάσης (high shear force). Οι γαλακτωματοποιητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολυσορβιτόλη 80 (Tween 80), μονο- και δι-γλυκερίδια. Η οργανική φάση αποτελούνταν από φυτοστερόλη και ελαιόλαδο, ενώ η υδατική φάση από νερό και ζελατίνη. Στη λιπαρή φάση προστέθηκαν οι γαλακτωματοποιητές και οι δύο φάσεις θερμάνθηκαν χωριστά μέχρι διαυγάσεως. Μετά τη θέρμανση, προστέθηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης για να μην εξατμιστεί και οι δύο φάσεις ψύχθηκαν σε θερμοκρασία, που να αποφευχθεί η δημιουργία θολώματος. Έπειτα προστέθηκε η υδατική φάση στην λιπαρή υπό συνεχή ανάδευση και όταν σχηματίστηκε η κατάλληλη υφή, το νέο μίγμα ψύχθηκε σε υδατόλουτρο υπό συνεχή λειτουργία του ομογενοποιητή. Το μίγμα στη συνέχεια παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου. Το λιπόσωμα που προέκυψε ήταν πολυστοιβαδικό (MLV), καθώς αποτελούνταν από 2-4 διπλοστοιβάδες, μεγέθους 600 - 800 nm.

Πληροφορίες σχετικά με τη ποσοτική σύσταση του λιποσώματος δεν είναι διαθέσιμες, καθώς η συγκεκριμένη συνταγή έχει κατοχυρωθεί με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας από τον OBI με αρ. 1008481.

2.6 Υπερυψηλή Πίεση

Η υπερυψηλή πίεσης εφαρμόστηκε στα σχηματοποιημένα βόεια μπιφτέκια, την 0η ημέρα συντήρησης, σε πιέσεις 250 και 400 MPa και θερμοκρασία 14°C για χρονικό διάστημα 5 λεπτών. Η μονάδα υψηλής πίεσης (Food Pressure Unit FPU 1.01, Resato International BV, Roden, Holland), αποτελείται από έναν ενισχυτή πίεσης και ένα πολυδοχειακό σύστημα, το οποίο απαρτίζεται από ένα δοχείο χωρητικότητας 250 ml, με μέγιστη πίεση λειτουργίας 1000 MPa και θερμοκρασία 90°C. Το υγρό μετάδοσης της πίεσης ήταν πολυγλυκερόλη ISO τάξης ιώδους VG 15 (Resato International BV, Roden, Holland). Η θερμοκρασία στο δοχείο κατά τη διάρκεια της διεργασίας επετεύχθη μέσω της κυκλοφορίας του υγρού στο εξωτερικό τοίχωμα-περίβλημα, η οποία ελεγχόταν μέσω ενός συστήματος θέρμανσης και ψύξης. Η επιθυμητή τιμή της πίεσης ρυθμίστηκε και μετά τη συσσώρευση της πίεσης (20 MPa/s), ενώ τα δοχεία της πίεσης ήταν απομονωμένα. Η πίεση του δοχείου απελευθερώθηκε μετά από ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα ανοίγοντας την αντίστοιχη βαλβίδα πίεσης. Η αύξηση της αρχικής αδιαβατικής θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια συσσώρευσης της πίεσης λήφθηκε υπόψη με στόχο την επίτευξη της επιθυμητής θερμοκρασίας λειτουργίας κατά τη διάρκεια της συμπίεσης. Η πίεση και η θερμοκρασία παρακολουθούνταν και καταγράφονταν συνεχώς (σε διαστήματα 1 δευτερολέπτου) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μέσω του συστήματος PLC (Pressure Level Control). Ο ρυθμός ανόδου πίεσης ήταν περίπου 100 MPa ανά 7 δευτερόλεπτα και ο χρόνος απελευθέρωσης της πίεσης ήταν 3 sec.

2.7 Πειραματική Διαδικασία

Συσκευασία ολόκληρου τεμαχίου βόειου κρέατος (στρογγυλό) παρελήφθη και μεταφέρθηκε στον εργαστηριακό χώρο όπου στη συνέχεια τεμαχίστηκε και παρασκευάστηκε φρέσκος κιμάς με τη χρήση κιμαδομηχανής. Μετά από τον εμβολιασμό του κιμά με *Escherichia coli* O157:H7 σε επίπεδα 5.0 log CFU/g, παρασκευάστηκαν μπιφτέκια 70 γραμμαρίων και πάχους 1.5 εκατοστών περίπου. Στη συνέχεια, προστέθηκε η αντιμικροβιακή ουσία - αιθέριο έλαιο ρίγανης είτε απευθείας στον κιμά είτε εγκλεισμένο σε λιποσώματα. Ορισμένα από τα δείγματα μεταχειρίστηκαν με δύο επίπεδα υψηλής πίεσης 250 και 400 MPa ως επιπρόσθετο εμπόδιο στην επιβίωση του παθογόνου και τέλος πραγματοποιήθηκε θερμική επεξεργασία στο μέσο και στο τέλος της συντήρησης.

2.7.1 Ανανέωση του μικροοργανισμού – Προετοιμασία εμβολίου

Πριν τον ενοφθαλμισμό του μικροοργανισμού σε κάποιο υπόστρωμα, προηγήθηκε το στάδιο της ανανέωσης του μικροβιακού στελέχους υπό ασηπτικές συνθήκες, προκειμένου τα κύτταρα να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους. Το στέλεχος αναπτύχθηκε σε 10 mL μη-επιλεκτικού υγρού, θρεπτικού υποστρώματος TSB (Tryptone Soy Broth) στους 37°C για 24 ώρες (1η ανανέωση). Μετά το πέρας των 24 h μεταφέρονται 100 μL από την ανανεωμένη καλλιέργεια σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 10 mL TSB και ακολουθεί ξανά επώαση σε θερμοκρασία 37 °C (2η ανανέωση). Μετά από 18 h πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του εμβολίου. Αρχικά, έγινε ανάμιξη-vortex (SiTM Scientific Industries) του γυάλινου περιέκτη που περιείχε TSB και το εμβόλιο, αμέσως μετά απόρριψη του περιεχομένου σε αποστειρωμένους πλαστικούς περιέκτες φυγοκέντρησης (falcon) και ακολούθησε φυγοκέντρηση (φυγόκεντρος – Heraeus Instruments) για 10 min σε θερμοκρασία 4 °C στις 3600 rpm. Έπειτα, το υπερκείμενο κάθε στελέχους απορρίφτηκε και η παραλαμβανόμενη βιομάζα (ίζημα) επαναιώρηθηκε σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα ¼ Ringer 10 mL. Το στάδιο του καθαρισμού (έκπλυσης) επαναλήφθηκε εις διπλούν. Τέλος, έγινε παραλαβή της ποσότητας εμβολίου του συγκεκριμένου στελέχους το οποίο αποτέλεσε το τελικό εμβόλιο με συγκέντρωση περίπου 10^8 - 10^9 cfu/mL. Σε κάθε πείραμα, η εκτίμηση της συγκέντρωσης του αρχικού εμβολίου γινόταν με την καταμέτρηση των αποικιών σε τρυβλία επιλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων μετά από δεκαδικές αραιώσεις σύμφωνα με το ISO 16654:2001.

2.7.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Συσκευασίες κατεψυγμένων τεμαχίων βόειου κρέατος παρελήφθησαν μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C μέχρι την χρήση τους. Συγκεκριμένα το βόειο κρέας τεμαχίστηκε και παρασκευάστηκε φρέσκος κιμάς με τη χρήση ειδικής μηχανής επεξεργασίας κρέατος (Kenwood MG510, China). Στόχος αυτής της διαδικασίας ήταν η επίτευξη του χαμηλότερου δυνατού αρχικού μικροβιακού φορτίου στον υπό εξέταση κιμά. Οι ποσότητες κιμά που παράχθηκαν, διαχωρίστηκαν σε σακούλες, συσκευάστηκαν υπό κενό και συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C για μία μέρα. Την επόμενη μέρα, προστέθηκαν οι κατάλληλες ποσότητες του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε τελικές συγκεντρώσεις 0.1, 0.25 και 0.5% και του *E. coli* O157:H7, ώστε να επιτευχθεί τελικό εμβόλιο 10^5 cfu/g βόειου κιμά. Ακολούθησε μάλαξη με τα χέρια με σκοπό την ομοιόμορφη κατανομή του εμβολίου και της αντιμικροβιακής ουσίας σε όλη τη μάζα του κιμά και στη

συνέχεια ο κιμάς τοποθετούνταν στους 5 °C για περίπου 15 λεπτά, ώστε να γίνει προσκόλληση των κυττάρων του παθογόνου. Έπειτα, ζυγίζοταν ποσότητα κιμά με στόχο την παρασκευή βόειων μπιφτεκιών βάρους 70 g. Αμέσως μετά πραγματοποιούταν μορφοποίηση του κιμά με τη βοήθεια μεταλλικής στεφάνης (τσέρκι-*cerchi*) ώστε να προκύψει μπιφτέκι διαμέτρου 1.5 cm. Μπιφτέκια χωρίς την προσθήκη αιθέριου ελαίου αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Τέλος, τα δείγματα συσκευάστηκαν σε πλαστικές σακούλες υπό κενό και συντηρήθηκαν στους 5 °C για 28 ημέρες συνολικά, με σκοπό τον προσδιορισμό της επίδρασης του αιθέριου ελαίου στην επιβίωση του παθογόνου. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν την 0^η, 8^η, 14^η και 28^η μέρα συντήρησης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές χωρίς την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης και δύο ανεξάρτητες φορές με την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης, με δύο εσωτερικές επαναλήψεις κάθε φορά.

2.7.3 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων

Για τη μελέτη της επίδρασης των αντιμικροβιακών χειρισμών στην επιβίωση του παθογόνου *E. coli* O157:H7 κατά τη θερμική επεξεργασία πραγματοποιήθηκαν θερμικές μεταχειρίσεις κατά την 0^η, 15^η και 28^η μέρα συντήρησης όπου δείγματα μαρτύρων (χωρίς αντιμικροβιακές ουσίες και χωρίς υψηλή πίεση), δείγματα με αντιμικροβιακές ουσίες και δείγματα με αντιμικροβιακές ουσίες και υπερυψηλή πίεση μεταχειρίστηκαν θερμικά με τη χρήση οικιακού φούρνου διπλής αντίστασης (Davoline) προθερμασμένο στους 200 °C, έως ότου η θερμοκρασία στο γεωμετρικό κέντρο των δειγμάτων να είναι 65 °C. Η θερμοκρασία αυτή επιλέχτηκε μετά από δοκιμή θερμικής επεξεργασίας στους 70-71 °C, την ενδεδειγμένη σύμφωνα με τη νομοθεσία, η οποία όμως εξάλειφε τον παθογόνο και επομένως καθιστούσε αδύνατη τη μελέτη της επίδρασης των αντιμικροβιακών χειρισμών και εμποδίων που εφαρμόστηκαν. Για τη μέτρηση των μεταβολών της θερμοκρασίας κατά τη θερμική επεξεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν θερμοζεύγη τύπου K, τα οποία προσαρμόστηκαν στα μπιφτέκια από την πλαϊνή πλευρά στο γεωμετρικό τους κέντρο και καταγραφικό θερμοκρασίας (Pico-PP222), το οποίο ήταν συνδεδεμένο με υπολογιστή. Μετά το ψήσιμο, τα δείγματα εμβαπτίζονταν σε σακούλες stomacher με ισοτονικό διάλυμα Ringer, το οποίο είχε ψυχθεί στους 0 °C, ώστε να επιτευχθεί άμεση πτώση της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, η σακούλα stomacher με το θερμικά επεξεργασμένο μπιφτέκι μεταφερόταν στον πάγκο δειγματοληψίας για να αρχίσει η διαδικασία της δειγματοληψίας.

2.7.4 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Οι συσκευασίες με τα δείγματα βόειου κιμά, στα οποία είχε προστεθεί ή όχι αντιμικροβιακή ουσία και είχαν μεταχειριστεί ή όχι με υπερυψηλή πίεση, ανοίχτηκαν ασηπτικά στον πάγκο δειγματοληψίας. 10 g από το κάθε δείγμα τοποθετήθηκαν σε σακούλα stomacher με φίλτρο, προστέθηκαν 90 mL αποστειρωμένου ισοτονικού διαλύματος Ringer ώστε να προκύψει 1:10 αραιώση. Στην περίπτωση των θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων, επειδή τα μπιφτέκια τοποθετήθηκαν ολόκληρα στη σακούλα stomacher με το παγωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer, γινόταν προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας διαλύματος Ringer ώστε να επιτευχθεί τελική αραιώση 1:3. Στη συνέχεια, η σακούλα με το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε ομογενοποιητή (Stomacher® 400 CIRCULATOR), ώστε η ποσότητα του δείγματος να ομογενοποιηθεί, για συνολικό χρόνο 1 min στις 230 rpm. Ακολούθησαν δεκαδικές αραιώσεις σε διάλυμα Ringer και εν συνεχεία 0.1 mL ή/και 1 mL επιστρώθηκαν σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά θρεπτικά μέσα. Για την καταμέτρηση του παθογόνου στα δείγματα πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία εφαρμόστηκε η τεχνική της διπλής επίστρωσης (thin agar layer method). Χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με το μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Agar με 0.6% w/v Yeast Extract (TSA-YE), τα οποία μετά τον ενοφθαλμισμό τους με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης, αφέθηκαν στον εργαστηριακό πάγκο για 120 min σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την ανάκτηση των τραυματισμένων (καταπονημένων) κυττάρων λόγω παρουσίας αντιμικροβιακών ουσιών, υψηλής πίεσης ή/και θέρμανσης. Μετά το πέρας των 120 min, στα τρυβλία προστέθηκε δεύτερη στρώση 10 ml με επιλεκτικό υλικό Sorbitol - MacConkey Agar (SMAC) και αφού στερεοποιήθηκε τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Memert & Sanyo Incubator) σε θερμοκρασίας 37 °C για 24 h (Juneja & Friedman, 2008). Με σκοπό την μείωση του ορίου ανίχνευσης (όπου χρειαζόταν), 1mL δείγματος από την αρχική αραιώση (σακούλα Stomacher) εξαπλωνόταν ισόποσα σε τρία (3) τρυβλία στερεού θρεπτικού υποστρώματος με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Η τελευταία μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε δείγματα που έχουν μεταχειριστεί με συνδυασμό αντιμικροβιακών παραγόντων και κυρίως μετά τη θερμική επεξεργασία. Σε αυτήν την περίπτωση, η απαρίθμηση των αποικιών του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 προέκυψε αθροιστικά από τα τρία (3) τρυβλία. Τέλος, για την απαρίθμηση αποικιών *Pseudomonas* spp. χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία με το στερεό θρεπτικό υλικό *Pseudomonas* Agar Base, στο οποίο είχε προστεθεί συμπλήρωμα *Pseudomonas* CFC, έτσι ώστε το μέσο να γίνει εκλεκτικό. Η τεχνική της ενσωμάτωσης χρησιμοποιήθηκε για τα θρεπτικά υλικά Plate Count Agar (PCA) και MRS Agar (ISO), με τα οποία έγινε καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και των

οξυγαλακτικών βακτηρίων. Παρατίθενται συνοπτικά (πίνακας 2.7.4.1) τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για τους αντίστοιχους μικροοργανισμούς, καθώς και οι συνθήκες επώασης τους.

Πίνακας 2.7.4.1: Βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης για τους παρακάτω μικροοργανισμούς.

Θρεπτικό μέσο ανάπτυξης	Μικροοργανισμοί	Τεχνική ενοφθαλμισμού	Θερμοκρασία επώασης (°C)	Χρόνος επώασης (h)
TSA / SMAC	<i>E. coli</i>	επίστρωση	37	24
CFC	<i>Pseudomonas</i>	επίστρωση	25	48
PCA	Ολική Μεσόφιλη χλωρίδα	ενσωμάτωση	30	72
MRS	<i>Lactobacilli</i>	ενσωμάτωση	30	72

2.7.5 Μέτρηση pH

Η μέτρηση των τιμών του pH πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ηλεκτρονικού ρHμέτρου (WTW Mulitcal®). Έπειτα από κάθε μικροβιολογική ανάλυση, ακολουθούσε λήψη τιμής του pH για κάθε δείγμα τροφίμου με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου του ηλεκτρονικού ρHμέτρου στη σακούλα stomacher με το ομογενοποιημένο διάλυμα δείγματος – αραιωτικού διαλύματος Ringer 1/10 (w/w).

2.7.6 Καταμέτρηση αποικιών

Οι πληθυσμοί του παθογόνου μικροοργανισμού καθώς και της ενδογενούς χλωρίδας που επιβίωσαν κατά τη συντήρηση και τη θερμική επεξεργασία των δειγμάτων, καταμετρήθηκαν με μεθόδους απαρίθμησης των αποικιών με βάση τα ISO 16654:2001, 4833-1:2013, 4833-2:2013.

2.8 Οργανοληπτική Αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μιας ομάδας 10 ατόμων από το εργαστήριο. Δείγματα βόειου κιμά λαμβάνονταν από τη συντήρηση (5 °C) και ακολουθούσε η αξιολόγηση τους σε χώρο με τεχνητό φως και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με βάση το ISO 6658. Τα

άτομα που συμμετείχαν στον οργανοληπτικό έλεγχο και κλήθηκαν να βαθμολογήσουν τα δείγματα, δεν γνώριζαν την ταυτότητα τους. Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του αρώματος, του χρώματος, της υφής και της συνολικής εκτίμησης σε βόεια μπιφτέκια, ενώ η παράμετρος της γεύσης αξιολογήθηκε μετά από ψήσιμο για 20 - 25 min σε προθερμασμένο φούρνο στους 200 °C.

Η οργανοληπτική αξιολόγηση έλαβε χώρα αρχικά την 15η και 30η ημέρα συντήρησης, ενώ η επόμενη αξιολόγηση (δείγματα με 0.1% A.E.P.) την 0η και 15η μέρα. Η κάθε παράμετρος αξιολογήθηκε με βάση μια ηδονική κλίμακα από το 1 (μη αποδεκτό) μέχρι το 3 (πολύ ικανοποιητικό). Η βαθμολογία 2 ορίστηκε ως το όριο της αποδοχής του προϊόντος.

2.9 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS Version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Η ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης και της υπερυψηλής πίεσης στην επιβίωση του πληθυσμού του παθογόνου και της ολικής μσόφιλης χλωρίδας κατά τη συντήρηση και έψηση. Επιλέχτηκε η δοκιμασία (test) Duncan για τη σύγκριση των μέσων όρων με επίπεδο σημαντικότητας 95%.

2.10 Ανάπτυξη Μοντέλων πρόρρησης

2.10.1 Πρωτογενές Μοντέλο

Οι επιβιώσαντες πληθυσμοί του παθογόνου κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 5 °C, υπό την επίδραση των αντιμικροβιακών χειρισμών χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία καμπυλών απενεργοποίησης μέσω του λογισμικού GinaFit (Geeraerd et al., 2005). Τα δεδομένα επιβίωσης του μικροοργανισμού προσαρμόστηκαν στο μοντέλο Mafart et al., 2002: Weibull. Η καλή προσαρμογή των μοντέλων (goodness of fit) αξιολογήθηκε με τη χρήση του συντελεστή παλινδρόμησης (R^2). Τα *D-values* (ο χρόνος που απαιτείται για την πρώτη λογαριθμική μείωση), καθώς και τα *p-values* (κλίση της καμπύλης) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του χρόνου που απαιτείται για μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 4 log CFU/g (t_{4D}).

2.10.2 Δευτερογενές Μοντέλο

Οι τιμές των χρόνων για τη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά $4 \log$ CFU/g (t4D) χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για την ανάπτυξη δευτερογενούς πολυωνυμικού μοντέλου. Οι τιμές t4D περιγράφηκαν ως πολυωνυμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης (%) και της υπερυψηλής πίεσης. Αναπτύχθηκαν δύο ξεχωριστά μοντέλα, ένα για την περίπτωση του λιποσώματος με το ενθυλακωμένο αιθέριο έλαιο, και ένα για την περίπτωση του ελεύθερου αιθέριου ελαίου ρίγανης. Στην περίπτωση του λιποσώματος επιλέχθηκε η μετατροπή των δεδομένων t4D με τη χρήση λογαρίθμου (logarithmic), ενώ για το ελεύθερο αιθέριο έλαιο επιλέχθηκε η μετατροπή των δεδομένων t4D με τη χρήση τετραγωνικής ρίζας (square root transformation), με στόχο τη μείωση της διακύμανσης των εξαρτημένων μεταβλητών παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο καλύτερη προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων.

Η έκφραση του πολυωνυμικού μοντέλου είναι:

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_1 X_2 + \alpha_4 X_1^2 + \alpha_5 X_2^2$$

όπου $\alpha_0, \alpha_1, \dots, \alpha_5$ είναι οι σταθερές που πρόκειται να προσδιοριστούν από το μοντέλο, X_1, X_2 , οι ανεξάρτητες μεταβλητές (independent or input variables) (% A.E.P., υπερυψηλή πίεση) και Y οι εξαρτημένες μεταβλητές, $\ln(t4D)$, $\text{sq}(t4D)$. Η συσχέτιση μεταξύ των αναπτυχθέντων μοντέλων και των πειραματικών δεδομένων εκτιμήθηκε γραφικά από τους συντελεστές R^2 και RMSE (Root Mean Square Error).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης απεικονίζονται στα ακόλουθα γραφήματα και θα αναλυθούν ξεχωριστά για τις διαφορετικές μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν και πώς επέδρασαν στην επιβίωση του παθογόνου κατά τη συντήρηση και τη θερμική επεξεργασία.

Αρχικά (ενότητα 3.1), παρατίθενται τα γραφήματα που περιγράφουν την μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 (TSAYE-SMAC) και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (PCA) κατά την συντήρηση δειγμάτων βόειου κιμά (γραφήματα 3.1.1 και 3.1.2). Κάθε γράφημα περιλαμβάνει όλες τις μεταχειρίσεις που εφαρμόστηκαν (αντιμικροβιακή ουσία - υπερευψηλή πίεση). Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε προσαρμογή των μετρήσεων στο πρωτογενές μοντέλο απενεργοποίησης Weibull (Mafart et al., 2002), από το οποίο προέκυψε ο χρόνος λογαριθμικής μείωσης (D-value), και υπολογίστηκε ο χρόνος που απαιτείται για μείωση του πληθυσμού του παθογόνου κατά 4 log CFU/g (t_{4D}). Εν συνεχεία, οι τιμές t_{4D} χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη δευτερογενούς μοντέλου και περιγράφηκαν ως πολυωνυμική συνάρτηση της συγκέντρωσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης (%) και της υπερευψηλής πίεσης.

Στη συνέχεια (ενότητα 3.2), παρατίθενται τα γραφήματα της επιβίωσης του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας μετά τη θερμική επεξεργασία. Σε όλα τα γραφήματα γίνεται σύγκριση των μεταχειρίσεων με τον μάρτυρα (control), δηλαδή με την περίπτωση κατά την οποία ο βόειος κιμάς είχε εμβολιαστεί με *Escherichia coli* O157:H7, αλλά δεν είχε γίνει προσθήκη αντιμικροβιακής ουσίας ή δεν είχε μεταχειριστεί με υπερευψηλή πίεση.

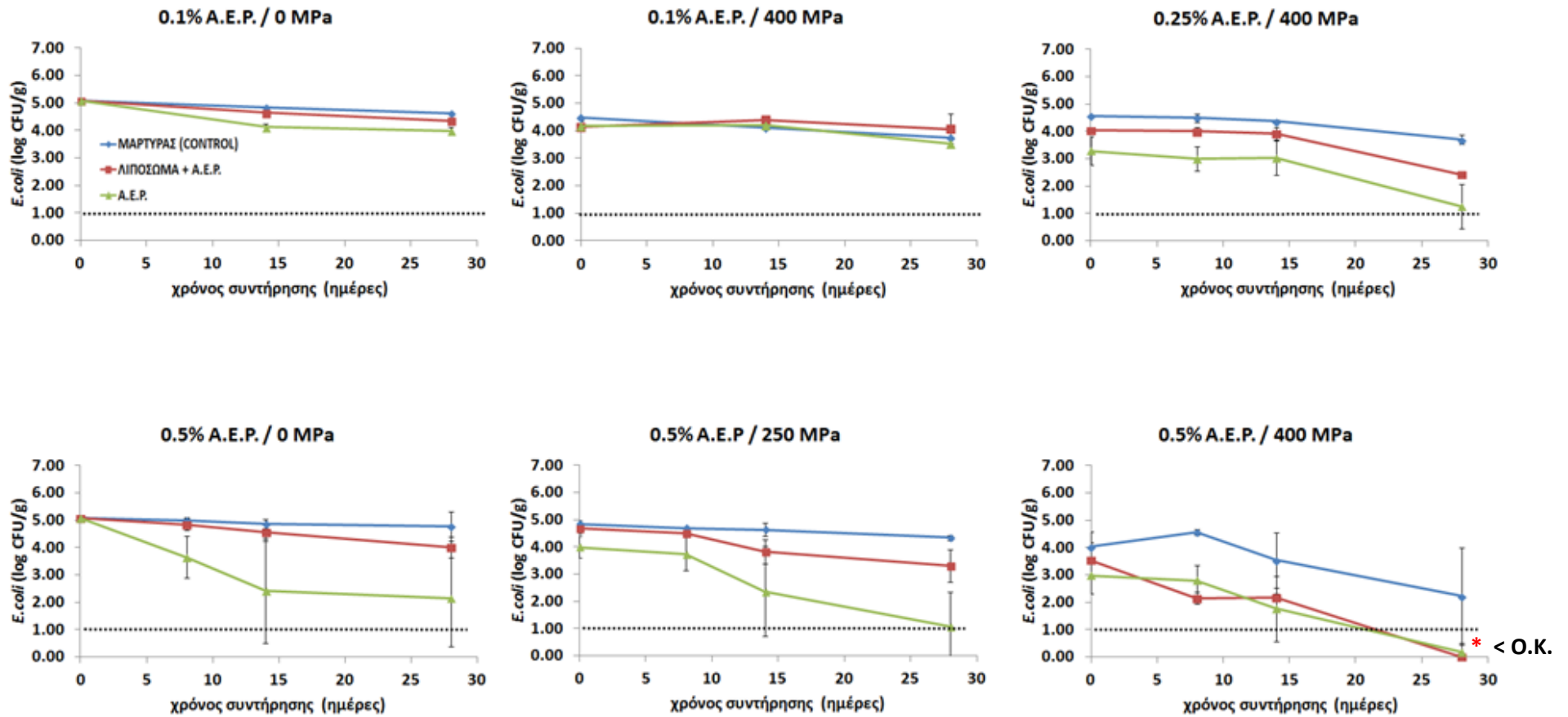
Από τα γραφήματα προκύπτει ο τρόπος επίδρασης της θερμοκρασίας συντήρησης καθώς και της θερμοκρασίας της θερμικής επεξεργασίας σε συνδυασμό με την προσθήκη του φυσικού αντιμικροβιακού - αιθέριο έλαιο ρίγανης, ελεύθερου ή εγκλεισμένου σε λιποσώματα, και της υπερευψηλής πίεσης στην επιβίωση κατά τη συντήρηση και την έψηση του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα των μετρήσεων pH (ενότητα 3.3), και πως αυτό μεταβάλλεται στους διαφορετικούς τύπους δειγμάτων ανάλογα με τις μεταχειρίσεις (αντιμικροβιακή ουσία, υπερευψηλή πίεση, θερμική επεξεργασία).

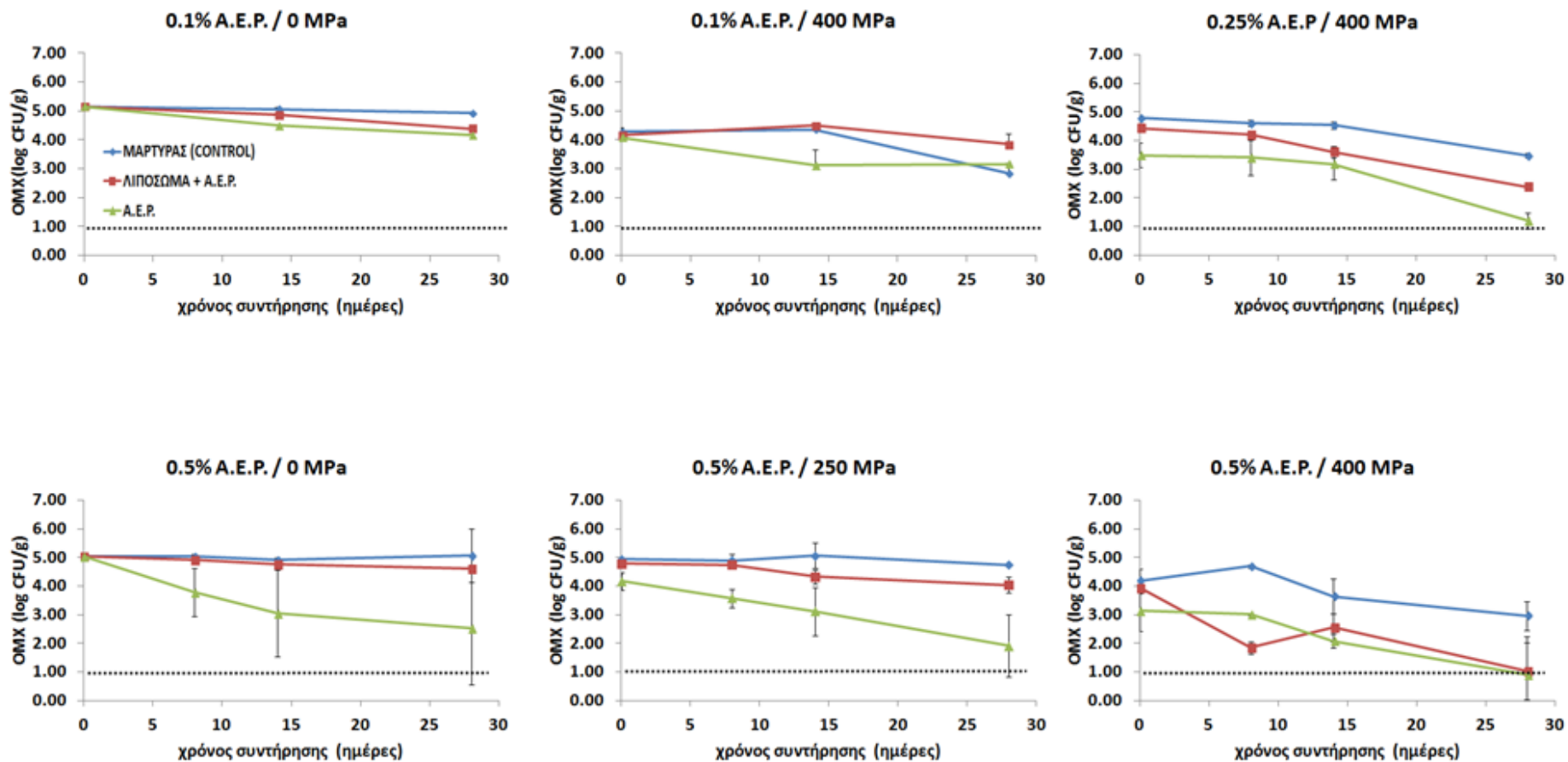
Τέλος, παρατίθενται τα γραφήματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης των δειγμάτων βόειου κιμά (ενότητα 3.4). Ακολουθεί σχολιασμός της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης όταν αυτό προστέθηκε απευθείας στον κιμά ή εγκλεισμένο σε λιποσώματα καθώς και της υπερυψηλής πίεσης στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των βόειων μπιφτεκιών κατά την συντήρηση και τη θερμική επεξεργασία τους.

3.1 Επίδραση της Αντιμικροβιακής Ουσίας και της Υπερυψηλής Πίεσης κατά τη Συντήρηση

Σκοπός ήταν να διερευνηθεί η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης είτε ελεύθερου είτε ενθυλακωμένου σε λιποσώματα καθώς και της υπερυψηλής πίεσης στην επιβίωση του παθογόνου *Escherichia coli* O157:H7 κατά τη συντήρηση του βόειου κιμά στους 5 °C για 28 ημέρες.



Γράφημα 3.1.1: Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 κατά τη συντήρηση δειγμάτων βόειου κιμά στους 5°C για 28 ημέρες με την προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.1, 0.25, 0.5% v/w) ελεύθερου ή εγκλεισμένου σε λιποσώματα και μεταχείρισης ή όχι με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa). Ως μάρτυρες ορίστηκαν τα δείγματα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία στην κάθε περίπτωση. Το όριο καταμέτρησης (O.K.) ήταν 1.0 log CFU/g (δεν πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός). Τα σημεία που αντιστοιχούν στο σημείο γ=0, υποδηλώνουν ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου καταμέτρησης.



Γράφημα 3.1.2: Μεταβολή του πληθυσμού της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας κατά τη συντήρηση δειγμάτων βόειου κινά στους 5°C για 28 ημέρες με την προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.1, 0.25, 0.5% v/w) ελεύθερου ή εγκλεισμένου σε λιποσώματα και μεταχείρισης ή όχι με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa). Ως μάρτυρες ορίστηκαν τα δείγματα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία στην κάθε περίπτωση. Το όριο καταμέτρησης (Ο.Κ.) ήταν 1.0 log CFU/g (δεν πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός).

Από τα παραπάνω γραφήματα είναι εμφανές ότι η επικρατούσα χλωρίδα είναι ο μικροοργανισμός *E. coli* O157:H7, καθώς οι μεταβολές που παρατηρούνται στις εκάστοτε περιπτώσεις αντικατοπτρίζονται και στα γραφήματα της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Ο πληθυσμός του παθογόνου με τον οποίο εμβολιάστηκε ο κιμάς την 0η μέρα ήταν 5.0 log CFU/g. Στα δείγματα μάρτυρες κατά τη διάρκεια της συντήρησης τους για 28 ημέρες, ο πληθυσμός του παθογόνου *E. coli* O157:H7 καθώς και της ενδογενούς μικροχλωρίδας δεν παρουσίασαν μειώσεις, με εξαίρεση την περίπτωση της εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης 400 MPa, όπου παρατηρήθηκε μείωση από 0.5 - 1.0 log CFU/g την 0η μέρα (αμέσως μετά την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης) έως 1.5 - 2.0 log CFU/g στο τέλος της συντήρησης (γραφήματα 3.1.1 και 3.1.2 αντίστοιχα). Το γεγονός ότι δεν παρουσιάστηκε αύξηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ή του παθογόνου έως το τέλος της συντήρησης δικαιολογείται από την χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης (5°C).

Στην περίπτωση προσθήκης 0.1% A.E.P. χωρίς εφαρμογή πίεσης, παρατηρήθηκε μείωση 1.0 log στα δείγματα με ελεύθερο αιθέριο έλαιο στο τέλος της συντήρησης. Όταν αυτή η συγκέντρωση 0.1% A.E.P. συνδυάστηκε με υπερυψηλή πίεση 400 MPa, είχε ως αποτέλεσμα μια αρχική μείωση 1.0 log CFU/g σε όλα τα δείγματα στην περίπτωση του πληθυσμού του παθογόνου (γράφημα 3.1.1) και της μεσόφιλης χλωρίδας (γράφημα 3.1.2), ενώ στο τέλος της συντήρησης παρατηρήθηκε επιπλέον μείωση 1.0 log στον πληθυσμό της ενδογενούς μικροχλωρίδας στα δείγματα των μαρτύρων και του αιθέριου ελαίου ρίγανης (γράφημα 3.1.2). Επειδή η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού (0.1%) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη δεν είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου, η περίπτωση της συγκέντρωσης 0.25% A.E.P. επιλέχτηκε να εφαρμοστεί σε συνδυασμό με ένα σχετικά μεγάλο επίπεδο υπερυψηλής πίεσης 400 MPa, ώστε να μελετηθεί η όποια συνεργιστική τους δράση. Την 0η μέρα παρατηρήθηκε μείωση 0.5 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων ενώ στα δείγματα με το λιπόσωμα και το ελεύθερο αιθέριο έλαιο σημειώθηκαν αρχικές μειώσεις της τάξης του 1.0 και 1.5 log CFU/g, αντίστοιχα, τόσο στον πληθυσμό του παθογόνου όσο και στις μεσόφιλης χλωρίδας. Στο τέλος της συντήρησης, η μεγαλύτερη μείωση παρατηρήθηκε στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο, όπου ο τελικός πληθυσμός του *E. coli* O157:H7 ήταν 1.27 log CFU/g, ακολουθούμενη από την περίπτωση των δειγμάτων με το λιπόσωμα, τα οποία σε συνδυασμό με την υπερυψηλή πίεση μείωσαν τον μικροβιακό πληθυσμό στους 2.43 log CFU/g. Η υψηλότερη συγκέντρωση 0.5% A.E.P. μελετήθηκε για τις περιπτώσεις χωρίς και με υπερυψηλή πίεση σε επίπεδα 250 και 400 MPa. Στην περίπτωση που δεν εφαρμόστηκε πίεση, τα δείγματα των μαρτύρων και αυτών με το λιπόσωμα στο οποίο έχει ενθυλακωθεί

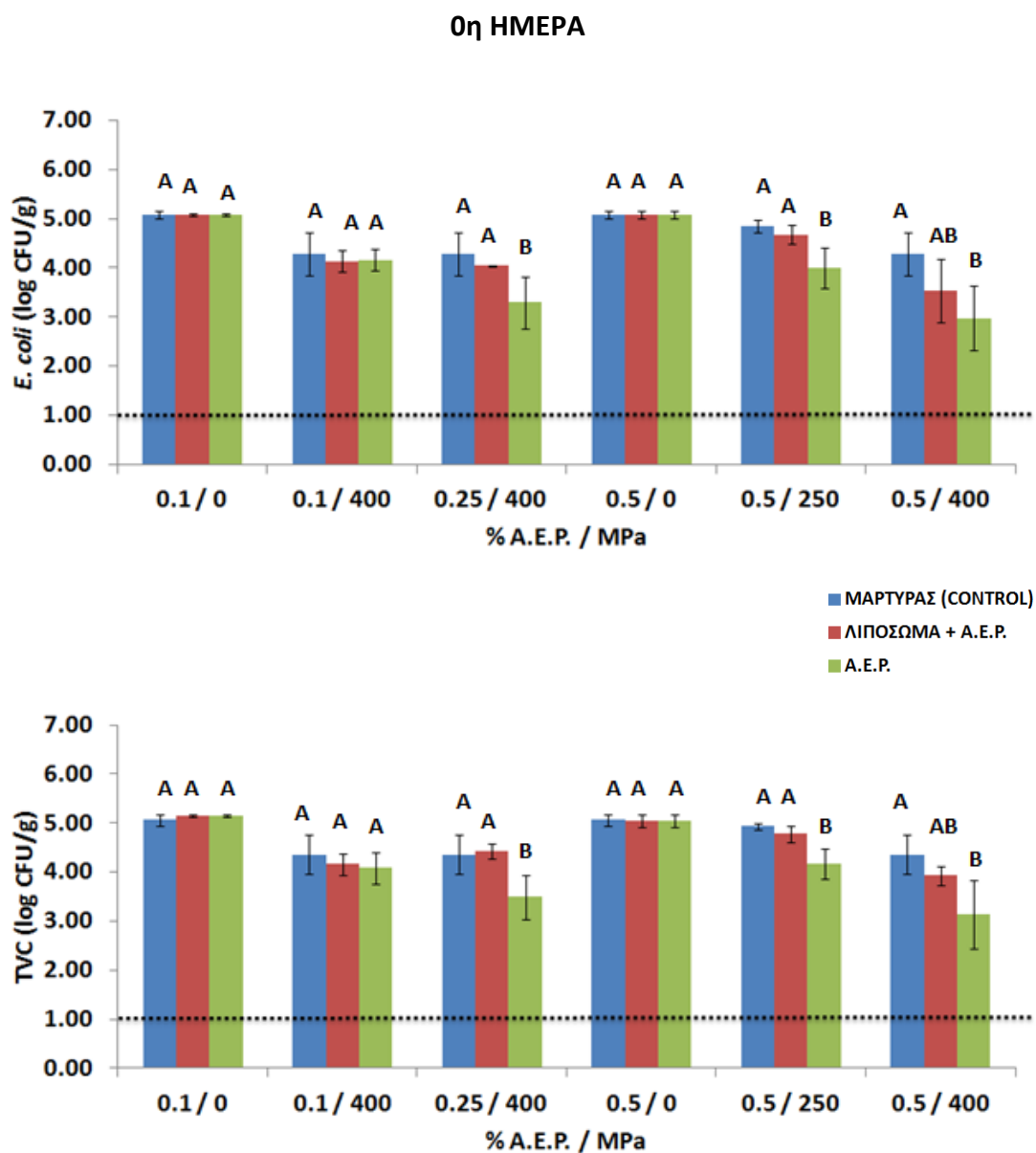
το αιθέριο έλαιο ρίγανης, δεν επέφεραν μειώσεις καθώς ο πληθυσμός του παθογόνου και της ενδογενούς χλωρίδας έμεινε σταθερός στα 5.0 log CFU/g καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης (γραφήματα 3.1.1 και 3.1.2). Οι Peng et al. (2015) σε παρόμοια μελέτη σχετικά με την σύγκριση της αντιμικροβιακής δράσης της ευγενόλης σε μορφή διαλύματος ή ενθυλακωμένης σε νανολιποσώματα έναντι του παθογόνου *E. coli* O157:H7 σε γάλα, βρήκαν ότι οι ελάχιστες συγκεντρώσεις αναστολής της ευγενόλης (Minimum Inhibitory Concentrations, MIC's) όταν βρισκόταν σε μορφή διαλύματος ήταν 4 mg/ml, ενώ όταν είχε εγκλειστεί σε νανολιποσώματα ήταν 7 mg/ml. Αυτό υποδηλώνει ότι η αντιμικροβιακή δράση της ουσίας ήταν μικρότερη όταν ήταν ενθυλακωμένη στα λιποσώματα, κάτι το οποίο μπορεί να δικαιολογηθεί από την παρεμπόδιση της δομής της φωσφολιπιδιακής διπλοστοιβάδας και το χαρακτηριστικό της σταδιακής απελευθέρωσης των ουσιών από τα λιποσώματα. Σε άλλη μελέτη για την αντιμικροβιακή δράση της θυμόλης έναντι του ίδιου παθογόνου σε μηλίτη, βρέθηκε ότι η ελεύθερη θυμόλη ήταν πιο αποτελεσματική από εκείνη που είχε διασπαρθεί σε νανοσωματίδια. Διαπιστώθηκε, ότι η προσθήκη ελεύθερης θυμόλης 0.5 g/l μηλίτη, επέφερε μείωση 5 log CFU/ml, συγκριτικά με εκείνη που είχε γίνει νανοδιασπορά της σε σωματίδια και μείωσε τον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 κατά 3 log CFU/ml (Shah, Davidson, & Zhong, 2012). Αντιθέτως, τα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί απευθείας εκχύλισμα αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.5%) και χωρίς εφαρμογή πίεσης, ο μικροβιακός πληθυσμός μειώθηκε 2.5 - 3.0 log CFU/g έως το τέλος της συντήρησης (γραφήματα 3.1.1 και 3.1.2).

Με τη χρήση υπερυψηλής πίεσης 250 MPa και 0.5% A.E.P., παρατηρήθηκε μείωση 1.0 log CFU/g την 0η μέρα μόνο στα δείγματα με το αιθέριο έλαιο ρίγανης, στα οποία μέχρι το τέλος της συντήρησης σημειώθηκε συνολική μείωση 4.0 log CFU/g στον πληθυσμό του *E. coli* και 3.0 log CFU/g στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα (γραφήματα 3.1.1 και 3.1.2 αντίστοιχα). Ωστόσο, τα δείγματα με το λιπόσωμα έδωσαν τελικές μειώσεις της τάξης των 1.5 log CFU/g στην περίπτωση του παθογόνου και 1.0 log CFU/g στον πληθυσμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, γεγονός που υποδεικνύει ότι η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου το οποίο έχει ενθυλακωθεί σε λιποσώματα είναι μακροπρόθεσμη, με αργή αποδέσμευση της αντιμικροβιακής ουσίας. Σε παρόμοια μελέτη (Hsu et al., 2015), παρατηρήθηκαν μειώσεις της τάξης του 1.0 log σε εμβολιασμένο βόειο κιμά με *E. coli* O157:H7, όταν μεταχειρίστηκε με πίεση 250 MPa για 30 min και 3.2 log όταν εφαρμόστηκε πίεση 350 για τον ίδιο χρόνο. Ωστόσο, η μεταχείριση με 450 MPa πίεση για 15 min προκάλεσε μείωση 5 log CFU/g

Οι μεγαλύτερες μειώσεις, στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκαν με τον συνδυασμό υπερυψηλής πίεσης 400 MPa και 0.5% A.E.P., όπου την 0η μέρα στα δείγματα των μαρτύρων, ο πληθυσμός του παθογόνου και της ενδογενούς χλωρίδας ήταν 3.78 και 3.92 log CFU/g αντίστοιχα, ενώ μειώσεις 1.5 και 1.0 log CFU/g παρατηρήθηκαν στα δείγματα με το λιπόσωμα για τους αντίστοιχους πληθυσμούς. Το αιθέριο έλαιο την 0η μέρα επέφερε μείωση 2.0 log CFU/g τόσο στον παθογόνο όσο και στην μεσόφιλη χλωρίδα. Στο τέλος της συντήρησης, η υπερυψηλή πίεση είχε ως αποτέλεσμα στα δείγματα των μαρτύρων (control) τελικό μικροβιακό πληθυσμό περίπου 2.5 log CFU/g, ενώ στα δείγματα με το αιθέριο έλαιο, ανεξαρτήτως μεθόδου εφαρμογής (ελεύθερο ή ενθυλάκωσης σε λιποσώματα), σημειώθηκαν συνολικές μειώσεις των 4.0 - 4.5 log CFU/g (κάτω του ορίου καταμέτρησης). Σύμφωνα με μελέτη των de Alba, Bravo, & Medina (2013) για απενεργοποίηση του *E.coli* O157:H7 σε φέτες ζαμπόν με συνδυασμό υψηλής πίεσης και συντηρητικών ουσιών βρήκαν ότι οι μεταχειρίσεις με 400 MPa και 500 MPa πίεση για 10 min ήταν αποτελεσματικές στην απενεργοποίηση του παθογόνου και παρατηρήθηκε μικρή συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση με το συνδυασμό υπερυψηλής πίεσης 500 MPa και νισίνης (μείωση 4 log CFU/g στις 60 ημέρες συντήρησης). Μεταχείριση με υπερυψηλή πίεση 450 MPa για 10 min ήταν ικανή να προκαλέσει μείωση του πληθυσμού *Salmonella* spp. έως και 5 log CFU/g. Οι μεταχειρίσεις με 250 MPa ή 350MPa επέφεραν μικρότερες μικροβιακές μειώσεις (0.5 log και 1.7 log CFU/ g αντίστοιχα), ενώ εφαρμογή πίεσης 550 MPa για 10 min μπόρεσε να μειώσει τον μικροβιακό πληθυσμό από 8.5 log CFU/g αρχικά, κάτω από το όριο καταμέτρησης (1.0 log CFU/g) (Sheen et al., 2015).

Ο συνδυασμός υπερυψηλής πίεσης και φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών φαίνεται να έχει συνεργιστική αντιμικροβιακή δράση στην απενεργοποίηση Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, ουσίες που έχουν δείξει σταθερή συνεργιστική δράση είναι ηλεκτρονιόφιλες, δραστικές στη θειόλη, ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων α,β-ακόρεστων αλδευδών και ισοθειοκυανικών. Το εύρημα αυτό πιθανότατα να σχετίζεται με τη φύση της υποθανάτιας βλάβης που προκαλείται από την μεταχείριση με υπερυψηλή πίεση, αφού έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια είναι ευαισθητοποιημένα στις οξειδωτικές καταπονήσεις από τη μεταχείριση με υψηλή πίεση (Feyaerts, Rogiers, Corthouts, & Michiels, 2014). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης ο πληθυσμός της ολικής χλωρίδας δεν έφτασε σε επίπεδα που θα καταστούσαν το προϊόν μικροβιολογικά απορριπτό, καθώς δεν ξεπέρασε τους 5.0 log CFU/g. Επίσης, οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων και ψευδομονάδων δε μεταβλήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης, κάτι το οποίο μπορεί να αιτιολογηθεί από το γεγονός ότι ο κιμάς

παρασκευάστηκε στον χώρο του εργαστηρίου και ο αρχικός πληθυσμός του ήταν χαμηλός 2.0 log CFU/g. Τέλος, τα δείγματα συσκευάστηκαν σε κενό και συντηρήθηκαν στους 5°C, συνθήκες οι οποίες απέτρεψαν την αύξηση των παραπάνω μικροοργανισμών.



Γράφημα 3.1.3: Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε δείγματα βόειου κιμά με την προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.1, 0.25, 0.5% v/w) ελεύθερου ή εγκλεισμένου σε λιποσώματα μετά από μεταχείριση με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) την 0η μέρα. Ως μάρτυρες ορίστηκαν τα δείγματα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία στην κάθε περίπτωση. Το όριο καταμέτρησης ήταν 1.0 log CFU/g. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν τη στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των διαφορετικών τύπων δειγμάτων (μάρτυρας, λιπόσωμα με αιθέριο έλαιο ρίγανης, αιθέριο έλαιο ρίγανης).

Στο γράφημα 3.1.3 φαίνονται οι πληθυσμοί του παθογόνου μικροοργανισμού και της μεσόφιλης χλωρίδας μετά από μεταχειρίσεις με την αντιμικροβιακή ουσία και την υπερυψηλή πίεση την 0η ημέρα. Στην περίπτωση χωρίς υπερυψηλή πίεση και 0.1% A.E.P, ο μικροβιακός πληθυσμός δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή ($p > 0.05$) αφού κυμάνθηκε στους 5.0 log CFU/g για όλα τα δείγματα. Όταν η ίδια συγκέντρωση συνδυάστηκε με επίπεδο πίεσης 400 MPa, παρατηρήθηκε μείωση 0.8 log CFU/g στον πληθυσμό του παθογόνου και της ολικής χλωρίδας, ανεξαρτήτως του τρόπου εφαρμογής του αιθέριου ελαίου ($p > 0.05$). Η αμέσως επόμενη συγκέντρωση του 0.25% A.E.P. και 400 MPa πίεσης επέφεραν μειώσεις 1.0 και 1.5 log CFU/g στα δείγματα με το λιπόσωμα και το ελεύθερο αιθέριο έλαιο αντίστοιχα. Η μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ήταν στατιστικά σημαντική ($p < 0.05$) συγκριτικά με τις μειώσεις στα δείγματα των μαρτύρων και αυτών με το λιπόσωμα. Η προσθήκη 0.5% αιθέριου ελαίου ρίγανης τη 0η μέρα δεν επέφερε άμεση μεταβολή του μικροβιακού πληθυσμού χωρίς την εφαρμογή πίεσης, ωστόσο ο συνδυασμός υπερυψηλής πίεσης 250 MPa και 0.5% A.E.P., φάνηκε να μπορεί να επιφέρει μείωση του μικροβιακού πληθυσμού κατά 1.0 log CFU/g στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης, στατιστικώς σημαντική μεταβολή ($p < 0.05$) σε σύγκριση με τους μάρτυρες και με το ενθυλακωμένο σε λιποσώματα έλαιο. Τέλος, οι μεγαλύτερες μειώσεις παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός εμποδίων με τη μέγιστη καταπονητική ισχύ, δηλαδή 0.5% A.E.P. και 400 MPa πίεσης. Πιο συγκεκριμένα όπου ο πληθυσμός του *E. coli* O157:H7 μειώθηκε κατά 1.5 log CFU/g στην περίπτωση του εγκλεισμένου αντιμικροβιακού παράγοντα στο λιπόσωμα και 2.0 log CFU/g στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης.

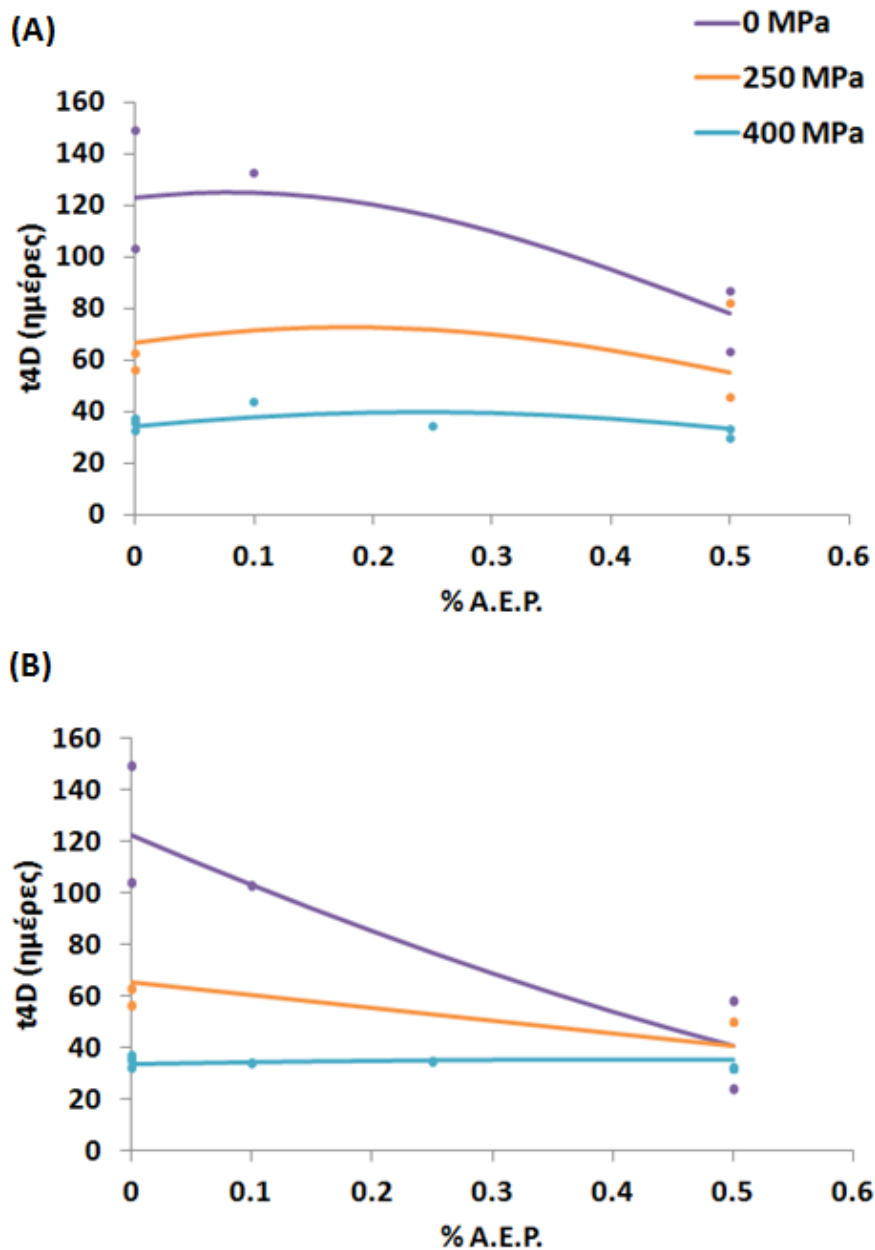
3.1.1 Πειράματα κινητικής και ανάπτυξη μοντέλων πρόρρησης

Πίνακας 3.1.1.1 Εκτίμηση παραμέτρων μέσω της μοντελοποίησης της απενεργοποίησης του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 (κατά τη συντήρηση) με τη χρήση του πρωτογενούς μοντέλου GinaFit (Geeraerd et al.: 2000).

ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	%Α.Ε.Ρ.	MPa	delta value	p	t4D
ΜΑΡΤΥΡΑΣ (CTRL)	0	0	40.65 ± 7.23	1.23 ± 0.09	126.67 ± 32.36
	0	250	36.87 ± 0.25	2.91 ± 0.53	59.92 ± 4.87
	0	400	25.37 ± 1.29	4.22 ± 0.69	35.51 ± 2.43
ΛΙΠΟΣΩΜΑ + Α.Ε.Ρ.	0.1	0	42.00 ± 0.10	1.20 ± 0.10	133.34 ± 0.10
	0.5	0	23.15 ± 7.78	1.30 ± 0.61	75.59 ± 16.52
	0.5	250	17.93 ± 0.42	1.18 ± 0.37	64.44 ± 25.68
	0.1	400	30.48 ± 0.10	3.73 ± 0.10	44.20 ± 0.10
	0.25	400	25.20 ± 0.10	4.26 ± 0.10	34.88 ± 0.10
	0.5	400	15.16 ± 4.92	1.90 ± 0.63	31.96 ± 2.39
Α.Ε.Ρ.	0.1	0	25.63 ± 0.10	1.00 ± 0.10	102.52 ± 0.10
	0.5	0	2.76 ± 0.15	0.55 ± 0.12	41.00 ± 24.35
	0.5	250	13.92 ± 0.10	1.08 ± 0.10	50.33 ± 0.10
	0.1	400	29.34 ± 0.10	8.99 ± 0.10	34.23 ± 0.10
	0.25	400	21.65 ± 0.10	2.83 ± 0.10	35.32 ± 0.10
	0.5	400	16.39 ± 4.63	2.12 ± 0.81	32.56 ± 0.52

Οι τιμές delta εκφράζουν τον χρόνο που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η πρώτη λογαριθμική μείωση στον πληθυσμό του παθογόνου, ενώ τιμές p αφορούν στην κλίση της καμπύλης (καμπυλότητα). Σύμφωνα με την εξίσωση του μοντέλου Weibull, που περιγράφει την απενεργοποίηση του παθογόνου, από τις τιμές delta και p, υπολογίστηκε ο χρόνος t4D, δηλαδή ο χρόνος στον οποίο ο πληθυσμός του παθογόνου μειώνεται κατά 4 log CFU/g. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, είναι εμφανής η μείωση των τιμών delta στις περιπτώσεις των αντιμικροβιακών χειρισμών, είτε μεμονωμένα (μόνο αιθέριο έλαιο ρίγανης) είτε με τον συνδυασμό τους (αιθέριο έλαιο ρίγανης, υπερυψηλή πίεση), συγκριτικά με τα αντίστοιχα δείγματα των μαρτύρων. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν και οι χρόνοι t4D, οι οποίοι στην περίπτωση των μαρτύρων είναι μεγαλύτεροι, ενώ με τη προσθήκη της αντιμικροβιακής ουσίας ή/και υπερυψηλής πίεσης μειώνονται αισθητά. Οι μικρότεροι χρόνοι παρατηρούνται στην περίπτωση εφαρμογής

υπερυψηλής πίεσης 400 MPa σε συνδυασμό με 0.5% αιθέριο έλαιο ρίγανης (ελεύθερο ή ενθυλακωμένο σε λιποσώματα).



Γράφημα 3.1.1.1 Γραφική απεικόνιση των προβλεπόμενων από το πολυωνυμικό μοντέλο τιμών του χρόνου t4D (ο χρόνος για να επιτευχθεί μείωση 4 log CFU/g του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7) σε σύγκριση τις παρατηρούμενες τιμές (πειραματικά δεδομένα) που χρησιμοποιήθηκαν για την προσαρμογή. (A) Καμπύλες πολυωνυμικού μοντέλου για το ενθυλακωμένο στα λιποσώματα αιθέριο έλαιο. (B) Καμπύλες πολυωνυμικού μοντέλου για το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης.

Στο γράφημα Α παρατηρείται, ότι χωρίς την εφαρμογή πίεσης, οι τιμές t_{4D} ήταν υψηλότερες, καθώς κυμάνθηκαν κοντά στις 120 ημέρες, ενώ με την αύξηση της συγκέντρωσης της αντιμικροβιακής ουσίας μειώθηκαν, φτάνοντας περίπου τις 80 ημέρες (προσθήκη 0.5% αιθέριου ελαίου ρίγανης). Με την εφαρμογή πίεσης 250 MPa, οι ημέρες που χρειάστηκαν για να μειωθεί ο πληθυσμός του παθογόνου κατά 4 log, ελαττώθηκε σημαντικά, στις 70 ημέρες περίπου, και με την αύξηση της πίεσης στα 400 MPa, ο χρόνος αυτός έφτασε τις 35 - 40 ημέρες. Η αύξηση της συγκέντρωσης της αντιμικροβιακής ουσίας φάνηκε να μην έχει σημαντική επίδραση στο χρόνο t_{4D}, όταν χρησιμοποιήθηκε συνδυαστικά με υπερυψηλή πίεση, υποδηλώνοντας την κύρια επίδραση της πίεσης στη μείωση του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7. Στην περίπτωση που το αιθέριο έλαιο προστέθηκε απευθείας (γράφημα Β), παρατηρείται μια πιο απότομη κλίση των καμπύλων, δείχνοντας την άμεση επίδραση της αντιμικροβιακής ουσίας στη μείωση του παθογόνου. Κατά παρόμοιο τρόπο, με την αύξηση της συγκέντρωσης του αιθέριου ελαίου, οι τιμές t_{4D} μειώθηκαν χωρίς την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης, καθώς από τις 120 ημέρες (χωρίς προσθήκη αιθέριου ελαίου), ο χρόνος (t_{4D}) μειώθηκε σχεδόν στις 50 ημέρες (0.5% αιθέριο έλαιο ρίγανης). Η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης, ανεξάρτητα συγκέντρωσης της αντιμικροβιακής ουσίας, είχε ως αποτέλεσμα να ελαττώσει επιπρόσθετα τις τιμές t_{4D}, καθώς αυτές κυμάνθηκαν σχεδόν στα ίδια επίπεδα για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης.

Πίνακας 3.1.1.2 Οι παράμετροι που χαρακτηρίζουν τα δευτερογενή πολυωνυμικά μοντέλα του χρόνου μείωσης του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 κατά 4 log (t_{4D}).

	ΛΙΠΟΣΩΜΑ + Α.Ε.Ρ.	Α.Ε.Ρ.
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ± ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	ΕΚΤΙΜΗΣΕΙΣ ± ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ
b	4.8107 ± 0.12657	11.066±0.55464
% Α.Ε.Ρ.	0.41831 ± 1.4973	-9.0227±6.5341
Υ.Π. (MPa)	-0.0012086 ± 0.0013609	-0.0099114±0.0065106
% Α.Ε.Ρ.* Υ.Π.(MPa)	0.0021114 ± 0.0013346	0.024006±0.0058199
% Α.Ε.Ρ.* % Α.Ε.Ρ.	-2.6354 ± 2.8089	-0.69543±12.239
Υ.Π. (MPa) * Υ.Π. (MPa)	-4.92E-06 ± 3.27E-06	-8.05E-06±1.58E-05
R²	0.8485	0.8228
RMSE	0.2027	0.88301

R²: δείκτης προσδιορισμού (coefficient of determination)

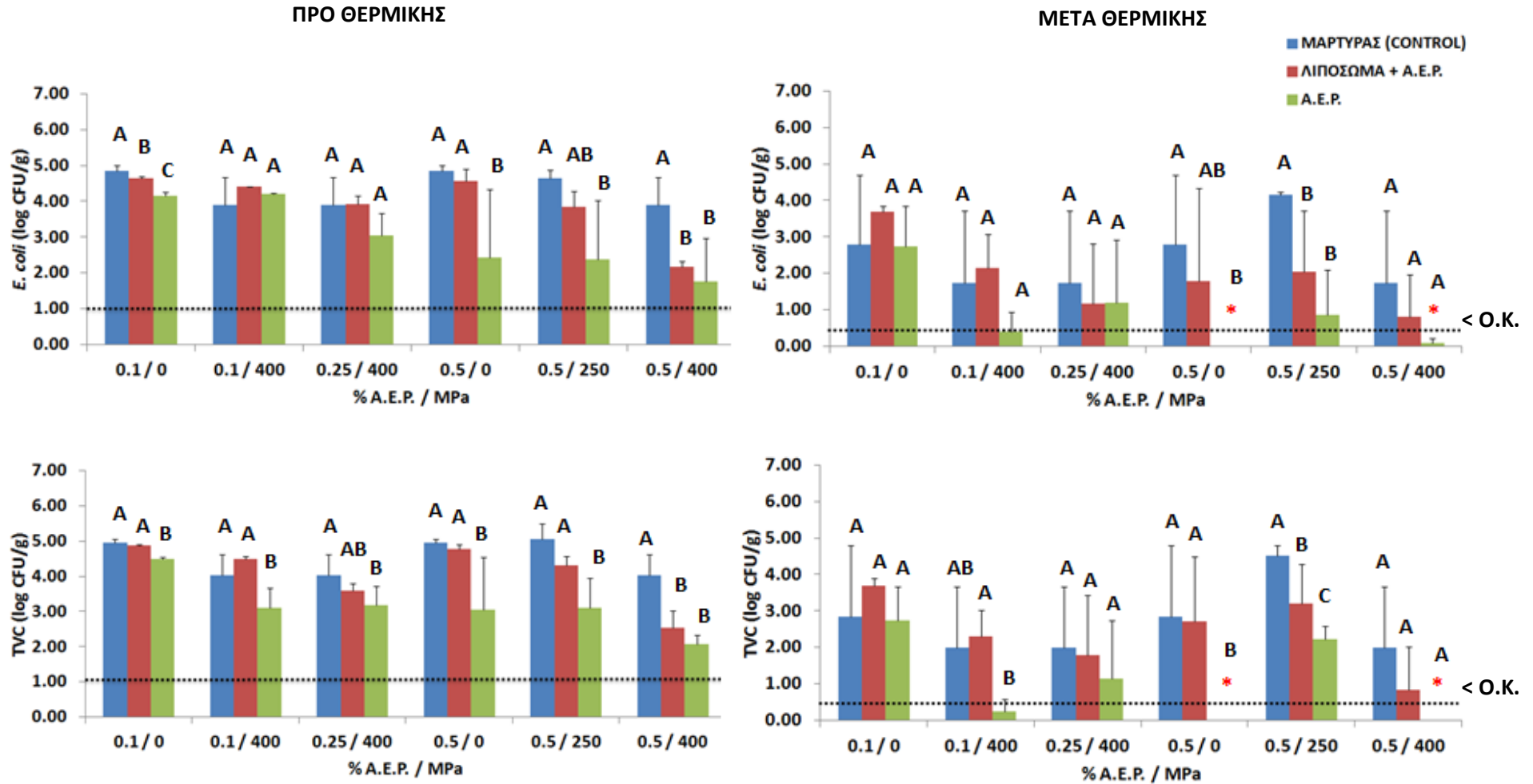
RMSE: Root Mean Square Error

3.2 Επιβίωση του Παθογόνου Μικροοργανισμού Μετά τη Θερμική Επεξεργασία

Σκοπός της συγκεκριμένης μεταχείρισης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης είτε αυτό είχε προστεθεί απευθείας στον κιμά είτε ενθυλακωμένο στα λιποσώματα καθώς και της υπερυψηλής πίεσης στην θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου κατά τη θερμική επεξεργασία στους 65 °C (γεωμετρικό κέντρο των μπιφτεκιών).

Στα γραφήματα που ακολουθούν γίνεται σύγκριση του επιβιώσαντα πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία για τις μέρες κατά τις οποίες αυτή πραγματοποιήθηκε (μέση και τέλος συντήρησης).

14η ΗΜΕΡΑ



Γράφημα 3.2.1: Πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία δειγμάτων βόειου κινά με την προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.1, 0.25, 0.5% v/w) ελεύθερου ή εγκλεισμένου σε λιποσώματα και μεταχείρισης ή όχι με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) στους 65°C κατά την 14η μέρα συντήρησης. Ως μάρτυρες ορίστηκαν τα δείγματα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία στην κάθε περίπτωση. Το όριο καταμέτρησης (O.K.) ήταν 1.0 και 0.48 log CFU/g για τα μη θερμικά και θερμικά επεξεργασμένα δείγματα αντίστοιχα (δεν πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός). Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο καταμέτρησης και τα διαφορετικά γράμματα τη στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των διαφορετικών τύπων δειγμάτων (μάρτυρας, λιπόσωμα με αιθέριο έλαιο ρίγανης, αιθέριο έλαιο ρίγανης).

Παρατηρείται ότι οι πληθυσμιακές μεταβολές που σημειώθηκαν στην περίπτωση του παθογόνου, αντικατοπτρίζονται στις περισσότερες περιπτώσεις και στα διαγράμματα της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Κατά τη 14η ημέρα συντήρησης στους 5°C, ο πληθυσμός του παθογόνου στα δείγματα με την προσθήκη 0.1% αιθέριου ελαίου ρίγανης και χωρίς μεταχείριση με υπερυψηλή πίεση είχε μεταβολές στατιστικά σημαντικές ($p < 0.05$) μεταξύ των διαφορετικών τύπων δειγμάτων. Στα δείγματα των μαρτύρων ο πληθυσμός του *E. coli* O157:H7 ήταν 4.86 log CFU/g, ενώ σημείωσε μεγαλύτερη μείωση στα δείγματα με το λιπόσωμα και το αιθέριο έλαιο φτάνοντας τους 4.65 και 4.14 log CFU/g αντίστοιχα. Ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας παρουσίασε σημαντική μείωση κατά τη θερμική επεξεργασία ($p < 0.05$) μόνο στην περίπτωση των δειγμάτων με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης. Μετά τη θερμική επεξεργασία, ο μικροβιακός πληθυσμός στα δείγματα των μαρτύρων μειώθηκε κατά 2.0 log CFU/g και 1.5 log CFU/g στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης ενώ στα δείγματα με το ενθυλακωμένο στο λιπόσωμα αιθέριο έλαιο περίπου 1.0 log CFU/g. Η μικρότερη μείωση του πληθυσμού στα δείγματα με την αντιμικροβιακή ουσία πιθανότατα να οφείλεται στην χαμηλή συγκέντρωση (0.1%) του αιθέριου ελαίου και στην μη πλήρη απελευθέρωση κατά τη διάρκεια της θέρμανσης.

Στην περίπτωση συνδυασμού 0.1% της αντιμικροβιακής ουσίας και 400 MPa υπερυψηλής πίεσης, σημειώθηκαν μειώσεις 0.5 - 1.0 log CFU/g στον μικροβιακό πληθυσμό σε όλα τα δείγματα ήδη κατά τη διάρκεια της συντήρησης (5°C). Οι μειώσεις αυτές ενισχύθηκαν μετά τη θερμική επεξεργασία, αφού παρατηρήθηκαν επιπλέον μειώσεις στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 κατά 2.25 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων και σε αυτών με το λιπόσωμα, ενώ η μεγαλύτερη μείωση ($p < 0.05$) των 3.8 log CFU/g σημειώθηκε στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης. Ο συνδυασμός 0.25% αιθέριου ελαίου και 400 MPa πίεσης επέφερε, ως το μέσο της συντήρησης (5°C), μειώσεις στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 της τάξης του 1.0 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων και αυτών με το λιπόσωμα, και περίπου 2.0 log CFU/g στα δείγματα με το ελεύθερο έλαιο ρίγανης, μεταβολές οι οποίες όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές μεταξύ τους ($p > 0.05$). Μετά τη θερμική επεξεργασία, επετεύχθησαν επιπρόσθετες μειώσεις 1.8 log CFU/g σε όλους τους τύπους δειγμάτων.

Ο πληθυσμός του παθογόνου με την προσθήκη 0.5% αιθέριου ελαίου ρίγανης χωρίς την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης σημείωσε μείωση 0.5 log CFU/g στα δείγματα με το λιπόσωμα και 2.5 log CFU/g σε εκείνα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης έως το μέσο του χρόνου συντήρησης (στατιστικά σημαντική μεταβολή $p < 0.05$) (5°C). Η επίδραση της

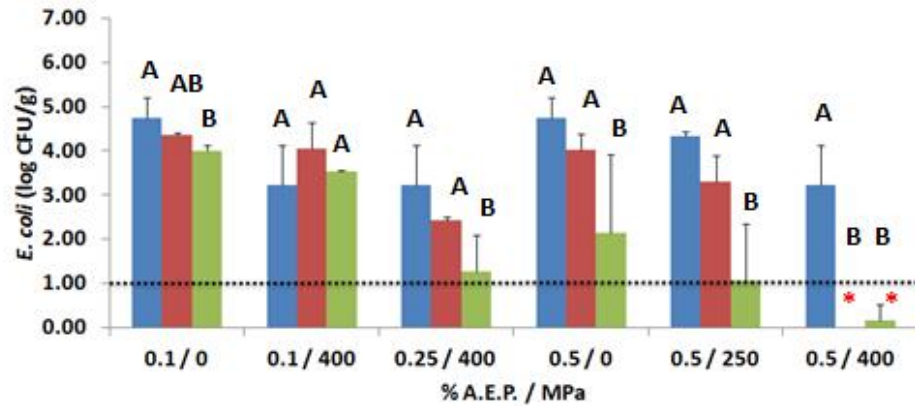
θερμικής επεξεργασίας έγινε αισθητή από τις επιπρόσθετες μειώσεις των 2.0 log CFU/g στους μάρτυρες και περίπου 2.5 log CFU/g στα δείγματα με την αντιμικροβιακή ουσία είτε αυτή ήταν ενθυλακωμένη σε λιπόσωμα είτε όχι. Συγκεκριμένα, ο μικροβιακός πληθυσμός στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης από 2.5 log CFU/g πριν την θέρμανση μειώθηκε κάτω του ορίου καταμέτρησης μετά από αυτήν. Σε μελέτη θερμικής απενεργοποίησης του *E. coli* O157:H7 σε βόειο κρέας, βρέθηκε ότι η προσθήκη 0.5% καρβακρόλης ή κινναμαλδεΐδης και εν συνεχεία θέρμανση στους 55°C για 120 min επέφεραν μειώσεις 4.66 log CFU/g στον πληθυσμό του παθογόνου (από 7.13 σε 2.47 log CFU/g για τα δείγματα με την καρβακρόλη και 7.30 σε 2.64 log CFU/g για αυτά με την κινναμαλδεΐδη) (Juneja & Friedman, 2008). Όσον αφορά στην επίδραση της θέρμανσης αυτής κάθε αυτής, έχει βρεθεί ότι η θερμική επεξεργασία βόειων μπιφτεκιών στους 71.1 ή 76.6°C ανεξάρτητα από τον τρόπο ψήσιματος και τη λιποπεριεκτικότητα του κρέατος, είχε ως αποτέλεσμα μειώσεις του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 από 7.0 log CFU/g, αρχικά, σε τελικό επίπεδο ≤ 1.0 log CFU/g, ενώ όταν η θέρμανση πραγματοποιήθηκε στους 60.0 ή 65.5°C, σημειώθηκαν μειώσεις από 1.1 έως 3.1 log CFU/g (Luchansky et al., 2013).

Η συγκέντρωση 0.5% αιθέριου ελαίου και υπερυψηλή πίεση 250 MPa επέφεραν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στον μικροβιακό πληθυσμό μεταξύ των δειγμάτων ($p < 0.05$), αφού μείωσαν τον πληθυσμό του παθογόνου κατά 0.5 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων, ενώ ακολούθησαν μεγαλύτερες μειώσεις 1.2 log CFU/g και 2.6 log CFU/g στα δείγματα με το λιπόσωμα και με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο αντίστοιχα κατά τη διάρκεια των 14 ημερών συντήρησης στους 5°C. Έπειτα από τη θερμική επεξεργασία, οι τελικοί πληθυσμοί του *E. coli* O157:H7 παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές ($p < 0.05$) μεταξύ των δειγμάτων των μαρτύρων, όπου ο πληθυσμός έφτασε τους 4.16 log CFU/g, και αυτών με την αντιμικροβιακή ουσία, όπου ο πληθυσμός στα δείγματα με το ενθυλακωμένο στο λιπόσωμα αιθέριο έλαιο ήταν 2.05 log CFU/g, ενώ σε αυτά με τον ελεύθερο αντιμικροβιακό παράγοντα έφτασε τους 0.8 log CFU/g. Όσον αφορά στον πληθυσμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας πριν την θερμική επεξεργασία στατιστικά σημαντική μεταβολή σημειώθηκε στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης ($p < 0.05$), όπου ο πληθυσμός έφτασε τους 3.11 log CFU/g, ενώ μετά τη θέρμανση ο πληθυσμός της ενδογενούς χλωρίδας διέφερε σημαντικά μεταξύ και των τριών τύπων δειγμάτων με τους τελικούς πληθυσμούς να φτάνουν τους 4.52, 3.21 και 2.22 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων, αυτών με το λιπόσωμα και το ελεύθερο αιθέριο έλαιο αντίστοιχα.

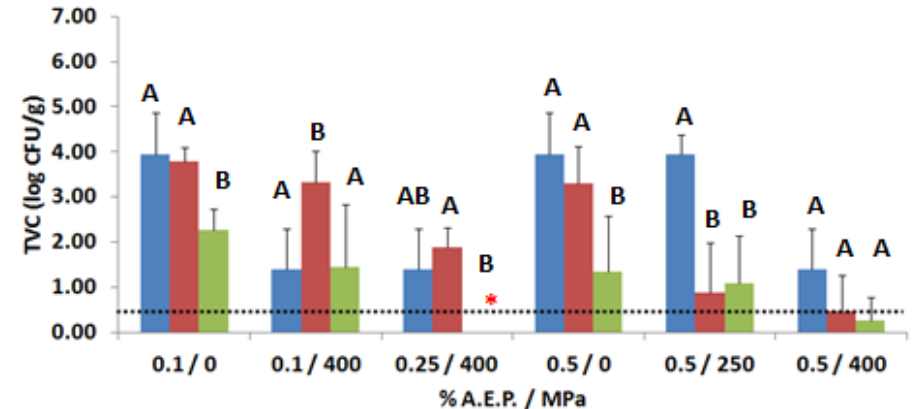
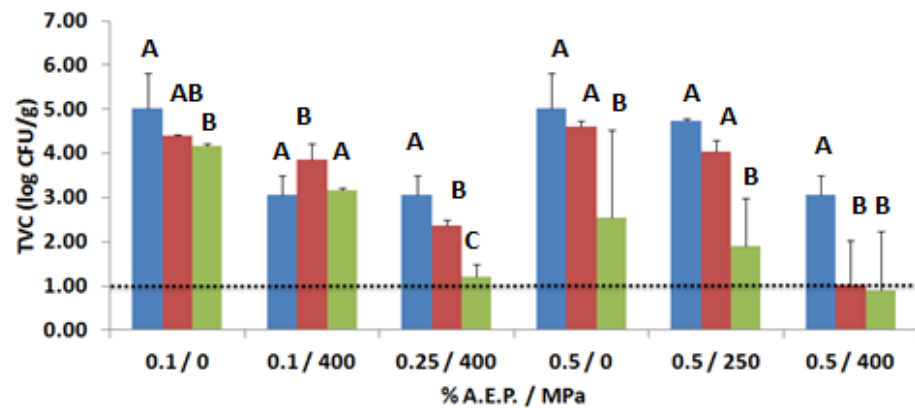
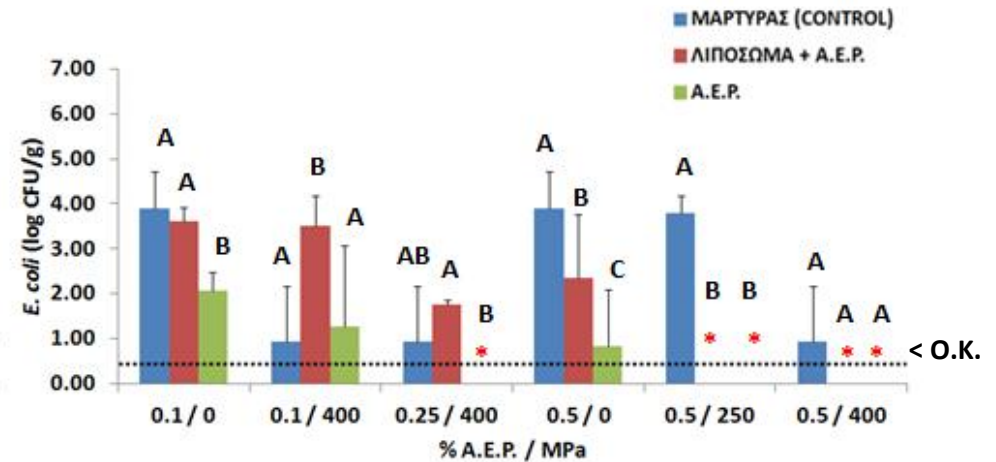
Τέλος, οι μεγαλύτερες μειώσεις σημειώθηκαν στην περίπτωση 0.5% αιθέριου ελαίου και 400 MPa πίεσης, τόσο στα μη θερμικά και θερμικά επεξεργασμένα δείγματα. Οι μειώσεις ($p < 0.05$) που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των 14 ημερών συντήρησης ήταν 1.0 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων, 2.8 log CFU/g στα δείγματα με το ενθυλακωμένο στα λιποσώματα αιθέριο έλαιο και 3.2 log CFU/g σε εκείνα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης. Μετά τη θερμική επεξεργασία, σημειώθηκαν επιπρόσθετες μειώσεις σε όλους τους τύπους δειγμάτων με τον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 στα δείγματα των μαρτύρων να είναι 3.9 log CFU/g πριν την θέρμανση και να φτάνει τους 1.75 log CFU/g μετά από αυτήν, στα δείγματα με το λιπόσωμα από 2.18 log CFU/g έφτασε τους 0.8 log CFU/g , ενώ στα δείγματα με το ελεύθερο έλαιο από 1.8 log CFU/g, ο πληθυσμός έφτασε κάτω του ορίου καταμέτρησης. Παρόμοιες πληθυσμιακές μεταβολές μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων σημειώθηκαν και στην ολική χλωρίδα, οι οποίες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

28η ΗΜΕΡΑ

ΠΡΟ ΘΕΡΜΙΚΗΣ



ΜΕΤΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ



Γράφημα 3.2.2: Μεταβολή του πληθυσμού του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας πριν και μετά την θερμική επεξεργασία δειγμάτων βόειου κιμά με την προσθήκη ή μη αιθέριου ελαίου ρίγανης (0.1, 0.25, 0.5% v/w) ελεύθερου ή εγκλεισμένου σε λιποσώματα και μεταχείρισης ή όχι με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) στους 65°C κατά την 28η μέρα συντήρησης. Ως μάρτυρες ορίστηκαν τα δείγματα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία στην κάθε περίπτωση. Το όριο καταμέτρησης (Ο.Κ.) ήταν 1.0 και 0.48 log CFU/g για τα μη θερμικά και θερμικά επεξεργασμένα δείγματα αντίστοιχα (δεν πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός). Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι ο πληθυσμός ήταν κάτω από το όριο καταμέτρησης και τα διαφορετικά γράμματα τη στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των διαφορετικών τύπων δειγμάτων (μάρτυρας, λιπόσωμα + αιθέριο έλαιο ρίγανης, αιθέριο έλαιο ρίγανης).

Στο γράφημα 3.2.2 παρουσιάζονται οι μεταβολές του μικροοργανισμού *E. coli* O157:H7 και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας στο τέλος της συντήρησης πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία. Κατά την 28η ημέρα συντήρησης, στην περίπτωση προσθήκης 0.1% αιθέριου ελαίου ρίγανης, ο πληθυσμός του παθογόνου στα δείγματα με το λιπόσωμα και το ελεύθερο αιθέριο έλαιο παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μεταβολή ($p < 0.05$), αφού ο πληθυσμός ήταν 4.36 και 4.00 log CFU/g αντίστοιχα, ενώ στα δείγματα των μαρτύρων 4.74 log CFU/g. Μετά τη θερμική επεξεργασία, ο πληθυσμός τόσο του παθογόνου όσο και της ενδογενούς χλωρίδας διαφοροποιήθηκε σημαντικά στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης φτάνοντας τους 2.0 log CFU/g, συγκριτικά με τα δείγματα των μαρτύρων και του λιποσώματος, στα οποία σημειώθηκε επιπλέον μείωση του παθογόνου κατά 1.0 log CFU/g. Η εφαρμογή 400 MPa πίεσης σε συνδυασμό με 0.1% αντιμικροβιακό, επέφερε στο τέλος της συντήρησης μειώσεις 1.0 log CFU/g στα δείγματα με το εγκλεισμένο στο λιπόσωμα αιθέριο έλαιο και μείωση 1.5 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων και του ελεύθερου αιθέριου ελαίου. Η θερμική επεξεργασία επέφερε επιπρόσθετες μειώσεις 2.0 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων και αυτών με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης, ενώ τα δείγματα που περιείχαν την αντιμικροβιακή ουσία εγκλεισμένη στο λιπόσωμα παρουσίασαν μείωση 0.5 log CFU/g. Παρόμοιες μεταβολές σημειώθηκαν και στον πληθυσμό της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Η μικρότερη μείωση που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα με το λιπόσωμα μπορεί να οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση του αντιμικροβιακού, το οποίο είτε δεν κατανεμήθηκε ομοιόμορφα στα ωμά δείγματα είτε δεν απελευθερώθηκε επαρκώς κατά τη θέρμανση.

Η προσθήκη 0.25% αιθέριου ελαίου και υπερυψηλής πίεσης 400 MPa ήταν ικανά να προκαλέσουν μειώσεις του πληθυσμού του παθογόνου κατά 1.7, 2.5 και 3.7 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων, του λιποσώματος και του ελεύθερου αιθέριου ελαίου αντίστοιχα έως το τέλος της συντήρησης. Η θερμική επεξεργασία μείωσε τον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 σε τελικά επίπεδα 0.94 log CFU/g στα δείγματα των μαρτύρων, 1.76 log CFU/g στα δείγματα με το εγκλεισμένο σε λιπόσωμα αιθέριο έλαιο, ενώ στα δείγματα στα οποία προστέθηκε απευθείας το αιθέριο έλαιο, ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου καταμέτρησης ($p < 0.05$).

Η προσθήκη 0.5% αιθέριου ελαίου επέφερε στατιστικά σημαντική μεταβολή στον πληθυσμό του παθογόνου και της ολικής χλωρίδας στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο, ο οποίος ήταν 2.16 και 2.54 log CFU/g αντίστοιχα στο τέλος της συντήρησης. Έπειτα από θέρμανση των δειγμάτων στους 65°C στο γεωμετρικό τους κέντρο, ο πληθυσμός του παθογόνου διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων, καθώς έφτασε τους 3.9

log CFU/g στους μάρτυρες, 2.36 log CFU/g στα δείγματα με το λιπόσωμα και 0.80 log CFU/g σε αυτά με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο. Ο πληθυσμός της ενδογενούς μικροχλωρίδας μετά τη θερμική επεξεργασία δεν διέφερε σημαντικά στα δείγματα των μαρτύρων και εκείνων με το λιπόσωμα, 3.9 log CFU/g και 3.3 log CFU/g αντίστοιχα, αλλά διέφερε στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης όπου ο τελικός πληθυσμός ήταν 1.3 log CFU/g.

Ο συνδυασμός 0.5% αιθέριου ελαίου ρίγανης και 250 MPa πίεσης επέφερε μειώσεις στον πληθυσμό του παθογόνου κατά 0.6 log CFU/g στους μάρτυρες, 1.7 log CFU/g στα δείγματα με το λιπόσωμα και 4.0 log CFU/g στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο στο τέλος της συντήρησης. Μετά τη θερμική επεξεργασία, στα δείγματα των μαρτύρων δεν σημειώθηκε σημαντική μείωση του παθογόνου (0.5 log CFU/g), ενώ στα δείγματα με την αντιμικροβιακή ουσία είτε αυτή είχε προστεθεί ελεύθερη είτε ενθυλακωμένη στα λιποσώματα, ο πληθυσμός του *E. coli* O157:H7 ήταν κάτω του ορίου καταμέτρησης. Παρόμοιου μεγέθους μειώσεις σημειώθηκαν και στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα πριν και μετά τη θέρμανση.

Ο συνδυασμός των μεταχειρίσεων που ήταν ικανός να μειώσει ή να εξαλείψει τον παθογόνο, είτε κατά την συντήρηση, είτε κατά την έψηση, ήταν αυτός του 0.5% αιθέριου ελαίου και υπερυψηλής πίεσης 400 MPa. Στα δείγματα των μαρτύρων ο πληθυσμός του παθογόνου μικροοργανισμού έφτασε τους 3.2 log CFU/g στο τέλος της συντήρησης (5°C), και μετά τη θέρμανση ήταν περίπου 1.0 log CFU/g, ενώ στα δείγματα με την αντιμικροβιακή ουσία ο πληθυσμός ήταν κάτω του ορίου καταμέτρησης κατά την συντήρηση πριν από τη θέρμανση. Η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού *E. coli* στην θέρμανση και την πίεση εξαρτάται από την έκφραση πρωτεϊνών θερμικής καταπόνησης (heat shock proteins) και την επαγωγή, της εξαρτώμενης από το γονίδιο *ropS*, απόκρισης σε καταπόνηση. Συνδέεται, επίσης, με την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στην οξειδωτική καταπόνηση. Μία ομάδα γονιδίων που αντιστοιχούν στην απόκριση της οξειδωτικής καταπόνησης αλληλεπικαλύπτεται με γονίδια υπεύθυνα για τη θερμική ανθεκτικότητα του *E. coli*. Η ανθεκτικότητα στο οξειδωτικό στρες έχει χαρακτηριστεί κρίσιμος παράγοντας στην ανθεκτικότητα του μικροβίου στην πίεση. Έχει βρεθεί σύμφωνα με μελέτη ότι υψηλή αναλογία τοξικογόνων στελεχών *E. coli* ήταν ανθεκτικά στην πίεση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πίεση από μόνη της δεν είναι επαρκής για την εξάλειψη των στελεχών αυτών σε προϊόντα κρέατος και θα πρέπει να συνδυαστεί με επιπρόσθετα εμπόδια (Liu, Gill, McMullen, & Gänzle, 2015).

Συνοπτικά, φαίνεται ότι στις περιπτώσεις που δεν εφαρμόστηκε υπερυψηλή πίεση, ο πληθυσμός του παθογόνου μειώθηκε σημαντικά μόνο στα δείγματα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης έως το τέλος της συντήρησης και η μείωση αυτή ενισχύθηκε με τη θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, ο συνδυασμός των δύο επίπεδων πίεσης (250, 400 MPa) με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου (0.25, 0.5%) επέφεραν μεγαλύτερες μειώσεις του μικροβιακού πληθυσμού σε όλα τα δείγματα και ειδικότερα σε εκείνα με την αντιμικροβιακή ουσία στο τέλος της συντήρησης. Η θέρμανση ήταν ικανή να μειώσει έως και να εξαλείψει τον παθογόνο στην περίπτωση των δειγμάτων που είχαν μεταχειριστεί με πίεση 250 και 400 MPa και 0.5% αιθέριο έλαιο ρίγανης. Στο τέλος της συντήρησης παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες μειώσεις καθώς η αντιμικροβιακή ουσία είτε είχε προστεθεί απευθείας στον κιμά είτε είχε ενθυλακωθεί στα λιποσώματα είχε το χρονικό διάστημα να δράσει και να προκαλέσει τις μειώσεις που σημειώθηκαν. Η δράση του αιθέριου ελαίου όταν αυτό προστέθηκε απευθείας στον κιμά ήταν πιο άμεση και έντονη, ενώ όταν ήταν εγκλεισμένο σε λιποσώματα, παρατηρήθηκε μια πιο βραδεία απελευθέρωση και δράση του. Το πόσο εύκολα ή/και γρήγορα θα αποδεσμευθεί η αντιμικροβιακή ουσία και πως θα επηρεαστεί από τις εκάστοτε μεταχειρίσεις (υπερυψηλή πίεση, έψηση) εξαρτάται από τις ιδιότητες και τη δομή του λιποσώματος. Με βάση τα παραπάνω, γίνεται κατανοητή η συνεργιστική δράση του αντιμικροβιακού παράγοντα, της υπερυψηλής πίεσης και της θέρμανσης στην μείωση ή/και την εξάλειψη του παθογόνου.

3.3 pH

Πίνακας 3.3.1: Τιμές pH των διαφορετικών τύπων δειγμάτων ανάλογα με τη μεταχείριση (% A.E.P, MPa) πριν και μετά τη θερμική επεξεργασία τη 14η και 28η μέρα συντήρησης.

ΤΥΠΟΣ	% A.E.P./ MPa	ΠΡΟ ΘΕΡΜΙΚΗΣ				ΜΕΤΑ ΘΕΡΜΙΚΗΣ			
		14η		28η		14η		28η	
		M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.	M.O.	T.A.
ΜΑΡΤΥΡΑΣ (CTRL)	0/0	5.72 ^{a,A}	0.09	5.69 ^{a,A}	0.07	5.83 ^{a,A}	0.04	5.79 ^{a,A}	0.05
	0/250	5.67 ^{a,A}	0.03	5.58 ^{b,B}	0.08	5.76 ^{b,A}	0.10	5.74 ^{a,B}	0.03
	0/400	5.84 ^{b,B}	0.02	5.76 ^{a,A}	0.07	5.84 ^{a,B}	0.06	5.81 ^{a,A}	0.06
ΛΙΠΟΣΩΜΑ + A.E.P.	0.1/0	5.70 ^{a,A}	0.01	5.69 ^{ab,BC}	0.01	5.82 ^{a,A}	0.01	5.84 ^{b,BC}	0.01
	0.1/400	5.80 ^{b,B}	0.01	5.79 ^{c,C}	0.01	5.81 ^{a,B}	0.02	5.84 ^{ab,C}	0.02
	0.25/400	5.84 ^{b,C}	0.00	5.69 ^{ab,AB}	0.01	5.85 ^{b,C}	0.01	5.81 ^{ab,AB}	0.04
	0.5/0	5.71 ^{a,A}	0.05	5.66 ^{ab,A}	0.09	5.81 ^{a,A}	0.04	5.74 ^{a,A}	0.08
	0.5/250	5.69 ^{a,A}	0.07	5.61 ^{a,A}	0.09	5.80 ^{a,A}	0.04	5.73 ^{a,A}	0.10
	0.5/400	5.85 ^{b,C}	0.03	5.73 ^{bc,AB}	0.03	5.87 ^{b,C}	0.01	5.73 ^{a,AB}	0.10
A.E.P.	0.1/0	5.76 ^{b,B}	0.01	5.73 ^{c,C}	0.01	5.87 ^{c,B}	0.01	5.88 ^{b,C}	0.01
	0.1/400	5.85 ^{c,B}	0.01	5.85 ^{d,D}	0.01	5.86 ^{c,B}	0.01	5.90 ^{b,D}	0.01
	0.25/400	5.82 ^{bc,B}	0.00	5.69 ^{bc,B}	0.00	5.82 ^{b,B}	0.06	5.78 ^{a,B}	0.09
	0.5/0	5.68 ^{a,A}	0.09	5.63 ^{ab,AB}	0.12	5.67 ^{a,A}	0.01	5.77 ^{a,AB}	0.10
	0.5/250	5.75 ^{ab,A}	0.07	5.60 ^{a,A}	0.02	5.68 ^{a,A}	0.00	5.74 ^{a,A}	0.02
	0.5/400	5.78 ^{bc,B}	0.02	5.70 ^{bc,B}	0.01	5.85 ^{c,B}	0.01	5.79 ^{a,B}	0.10

M.O.: Μέσος όρος

T.A.: Τυπική απόκλιση

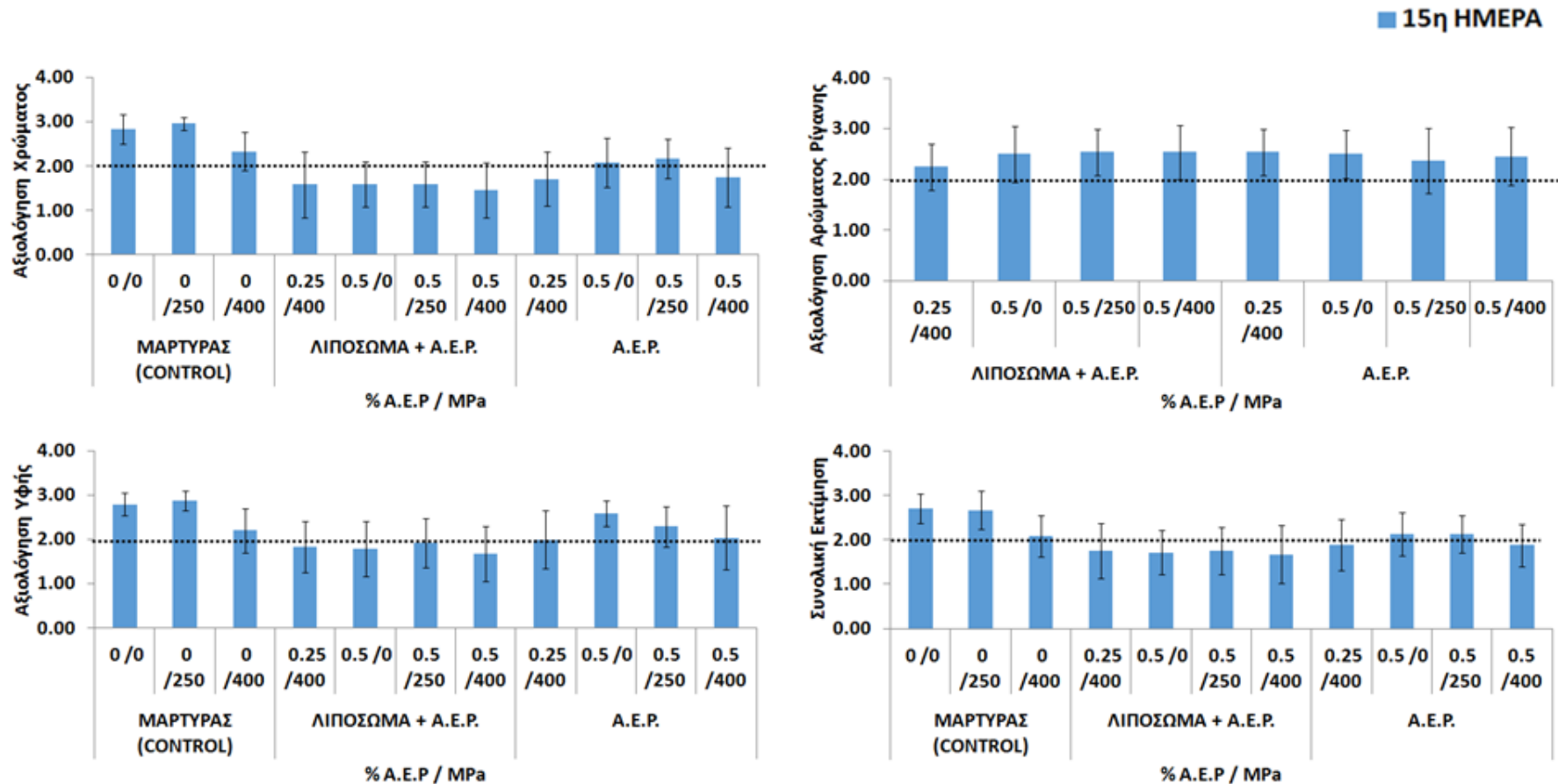
Τα διαφορετικά γράμματα μέσα στην ίδια στήλη (a-d) και στην ίδια σειρά (A-D) δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) μεταξύ των τιμών. Η σύγκριση στην ίδια στήλη έγινε για τις διαφορετικές μεταχειρίσεις του κάθε τύπου δείγματος τη 14η και 28η μέρα αντίστοιχα, ενώ η σύγκριση στην ίδια σειρά έγινε μεταξύ των μη θερμικά και θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων για τις αντίστοιχες μέρες.

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται, ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, το pH μεταβλήθηκε σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων (% A.E.P., MPa) ανά τύπο δείγματος κατά τη διάρκεια της συντήρησης, καθώς και μετά από τη θερμική επεξεργασία. Γενικά, οι τιμές του pH κυμάνθηκαν από 5.65 - 5.85. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p < 0.05$) στις τιμές pH των δειγμάτων κατά την συντήρηση, πιθανότατα να οφείλονται στην πίεση, αφού η εφαρμογή της υπερυψηλής πίεσης έτεινε να αυξήσει ελαφρώς τις τιμές του pH. Η μεταχείριση με πίεση των προϊόντων κρέατος είναι γνωστό ότι προκαλεί μια μικρή αύξηση στο pH, η οποία μπορεί να προκύπτει από τη μείωση των όξινων ενώσεων λόγω διαμορφωτικών αλλαγών στις πρωτεΐνες, σχετιζόμενες με τη μετουσίωση (Oliveira, Junior, et al., 2015). Κατά παρόμοιο τρόπο, η θερμική επεξεργασία είχε επίδραση στο pH των δειγμάτων (μπιφτέκια βόειου κιμά), αφού οδήγησε σε αύξηση της τελικής τιμής του. Η αύξηση του pH κατά την θερμική επεξεργασία πιθανόν να συνδέεται με την απώλεια όξινων ενώσεων (Vasanthi et al., 2007) και (Shen et al., 2016). Όσο αυξάνει ο χρόνος έκθεσης του κρέατος στη θερμότητα ή η θερμοκρασία ψήσιματος, προκαλείται μεγαλύτερο ποσοστό απελευθέρωσης όξινων ενώσεων, με αποτέλεσμα την αύξηση του pH του προϊόντος.

3.4 Οργανοληπτική Αξιολόγηση

Σκοπός ήταν να αξιολογηθούν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων βόειου κιμά κατά τη διάρκεια της συντήρησης τους στους 5°C για 28 ημέρες ανάλογα με τις μεταχειρίσεις που είχαν δεχτεί (% αιθέριου ελαίου ρίγανης, υπερυψηλή πίεση). Πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του αρώματος ρίγανης στα δείγματα που περιείχαν το αιθέριο έλαιο (είτε ελεύθερο είτε σε λιποσώματα), του χρώματος και της υφής στα μη θερμικά επεξεργασμένα δείγματα ενώ σε αυτά που ψήθηκαν αξιολογήθηκε και η παράμετρος της γεύσης. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τη 15η ημέρα, καθώς τη 30η ημέρα ορισμένα δείγματα ήταν οργανοληπτικά απορριπτέα και δεν αξιολογήθηκαν.

3.4.1 Οργανοληπτική Αξιολόγηση μη Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων



Γράφημα 3.3.1 Οργανοληπτική αξιολόγηση του αρώματος ρίγανης, του χρώματος, της υφής και της συνολικής εκτίμησης βόειων μιπτεκιών στα οποία είχε προστεθεί ή όχι αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.25, 0.5%) ελεύθερο ή ενθυλακωμένο σε λιποσώματα και είχαν μεταχειριστεί ή όχι με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) σε υπό κενό συσκευασία και συντήρηση στους 5 °C. Ως μάρτυρες σε κάθε περίπτωση ορίστηκαν τα δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί αντιμικροβιακή ουσία. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε τη 15η ημέρα συντήρησης. Κάθε παράμετρος βαθμολογήθηκε με βάση μια ηδονική κλίμακα από 1 (μη αποδεκτό) έως 3 (πολύ ικανοποιητικό), όπου το όριο αποδοχής ήταν το 2 (διακεκομμένη γραμμή).

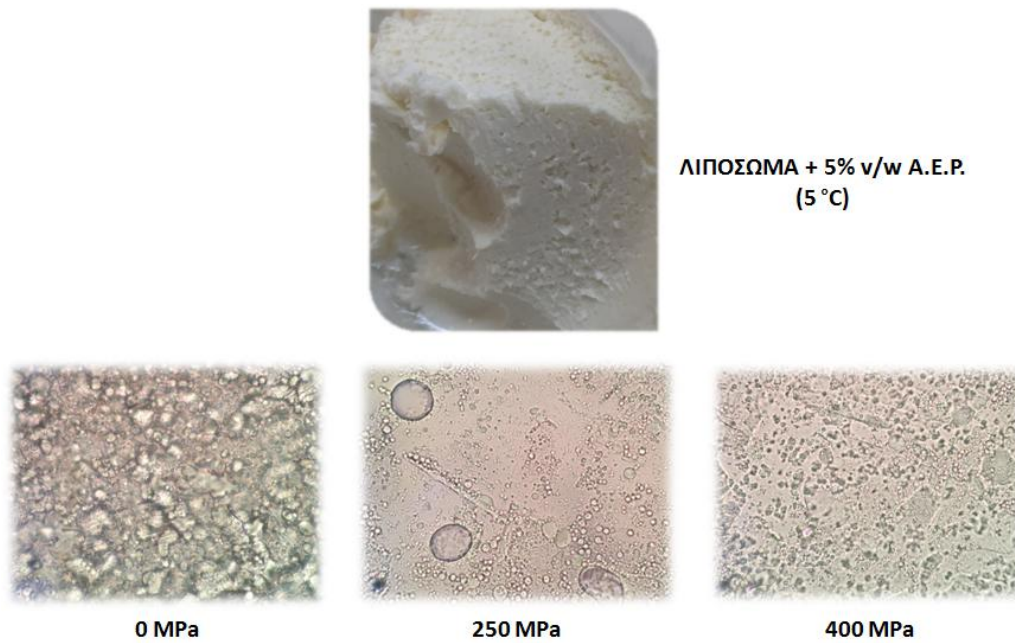
Στην παρούσα οργανοληπτική ανάλυση κρίθηκε αρχικά σκόπιμο να αξιολογηθεί το άρωμα ρίγανης, αφού μια από τις βασικές παραμέτρους της μελέτης ήταν η χρήση του αιθέριου ελαίου ρίγανης. Σε όλες τις περιπτώσεις των μεταχειρίσεων ανεξάρτητα του ποσοστού συγκέντρωσης και της εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης, η βαθμολογία ήταν μεγαλύτερη ή σχεδόν ίση του 2, γεγονός που δείχνει ότι ήταν ευχάριστο και ικανοποιητικό το άρωμα που προσέδιδε το έλαιο ρίγανης στον βόειο κιμά. Επίσης, το άρωμα ρίγανης διατηρήθηκε μέχρι το μέσο συντήρησης είτε είχε προστεθεί απευθείας ως εκχύλισμα στον κιμά είτε ενθυλακωμένο σε λιποσώματα. Σε αυτό πιθανόν να συντέλεσαν και οι συνθήκες συσκευασίας σε κενό και συντήρησης στους 5°C. Οργανοληπτική ανάλυση σε φιλέτα μπακαλιάρου με έλαιο ρίγανης 0.05% v/w, παρήγαγε ένα χαρακτηριστικό αλλά ευχάριστο άρωμα, το οποίο μειώθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια συντήρησης στους 2 °C. Μεμονωμένα συστατικά αιθέριων ελαίων, πολλά από αυτά έχουν εγκριθεί ως αρωματικές ύλες τροφίμων, προσδίδουν επίσης κάποιο άρωμα στα τρόφιμα (Burt, 2004).

Η παράμετρος του χρώματος ήταν αποδεκτή στα δείγματα των μαρτύρων τα οποία δεν είχαν μεταχειριστεί με πίεση ή είχαν υποστεί υπερυψηλή πίεση 250 MPa, καθώς και στα αντίστοιχα με το ελεύθερο αιθέριο έλαιο ρίγανης. Το χρώμα των δειγμάτων στα οποία προστέθηκε το αιθέριο έλαιο ενθυλακωμένο σε λιπόσωμα καθώς και εκείνων που μεταχειρίστηκαν με υψηλό επίπεδο πίεσης (400 MPa) βαθμολογήθηκαν κάτω του 2 και δεν ήταν ικανοποιητικά, καθώς είχαν απόκλιση από το αποδεκτό έντονο κόκκινο χρώμα του βόειου κιμά. Το λιπόσωμα, ως προϊόν, έχει μια άσπρη κρεμώδη υφή, η οποία άλλαξε το κόκκινο χρώμα του κιμά, δίνοντας μια ελαφριά ροζ απόχρωση. Όσο μειώνεται η τελική συγκέντρωση του λιποσώματος με το αιθέριο έλαιο στον κιμά, τόσο μικρότερη είναι η αλλαγή που παρατηρείται στο χρώμα. Επιπλέον, το υψηλό επίπεδο πίεσης άλλαξε το χρώμα του βόειου κιμά δίνοντας μια ελαφριά καφέ απόχρωση εξωτερικά του προϊόντος, καθώς το εσωτερικό του διατηρούσε μια ροζ - κόκκινη απόχρωση. Σε παρόμοια μελέτη με εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης 450 MPa σε κιμά κοτόπουλου παρατηρήθηκε ελαφριά ροζ απόχρωση, ενώ η μεταχείριση με 550 MPa άλλαξε το χρώμα του κιμά κοτόπουλου σε ελαφρώς καφέ, παρόλο που επέφερε υψηλές μικροβιακές μειώσεις (Sheen et al., 2015). Οι Hayes et al. (2014) μελέτησαν την επίδραση της υπερυψηλής πίεσης (400 MPa, 1 min x 4 κύκλους στους 4 °C) στην ποιότητα του κρέατος και βρήκαν ότι τα βόεια μπιφτέκια ήταν ακόμα αποδεκτά, αλλά είχαν σημαντικά μικρότερες βαθμολογίες στην συνολική εκτίμηση, την υφή, το άρωμα και στο πόσο ζουμερά ήταν συγκριτικά με τα δείγματα των μαρτύρων. Σε άλλη μελέτη, η εμφάνιση του βόειου κιμά είχε μια ελαφριά καφέ απόχρωση όταν μεταχειρίστηκε με 450

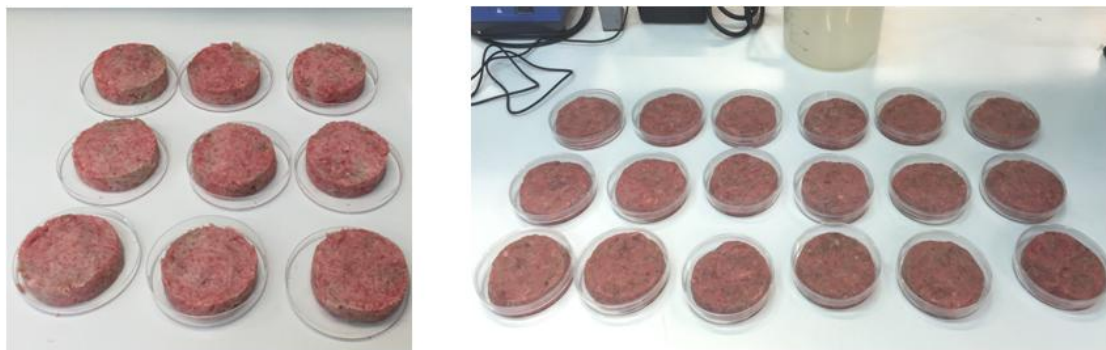
MPa, και το φαινόμενο εντάθηκε όταν η πίεση που εφαρμόστηκε ήταν 500 MPa (Hsu et al., 2015).

Τα δείγματα, όσον αφορά στην παράμετρο της υφής, που έλαβαν την υψηλότερη βαθμολογία ήταν τα δείγματα των μαρτύρων καθώς και εκείνα που είχαν μεταχειριστεί με πίεση 250 MPa. Οι μεταχειρίσεις με υψηλά επίπεδα πίεσης αυξάνουν γενικά την μικροβιακή απενεργοποίηση σε συντομότερο χρονικό διάστημα, ωστόσο μπορεί να προκαλέσουν υψηλότερα επίπεδα τροποποίησης των μακρομορίων και άλλων δυνητικά επιζήμιων αλλαγών στην ποιότητα των τροφίμων, οι οποίες επηρεάζουν την εμφάνιση και την υφή συγκριτικά με τα μη επεξεργασμένα προϊόντα.

Όταν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου εξαρτώνται από δομικά ή λειτουργικά μακρομόρια και ειδικότερα πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες, η υψηλή πίεση μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα του τροφίμου (Oliveira, Junior, et al., 2015). Η προσθήκη του λιποσώματος ως σύστημα ενθυλάκωσης και μεταφοράς της αντιμικροβιακής ουσίας προσδίδει μια πιο μαλακή υφή στα μπιφτέκια, η οποία μπορεί να παρουσιάζει απόκλιση από την συνηθισμένη υφή του βόειου κιμά, ωστόσο δεν την επηρεάζει αρνητικά ώστε να είναι απορριπτέα. Συνολικά, τα δείγματα των μαρτύρων και εκείνων με το αιθέριο έλαιο ρίγανης που δεν είχαν δεχτεί πίεση ή μεταχειρίστηκαν με υπερυψηλή πίεση 250 MPa ήταν πρώτα στις προτιμήσεις της ομάδας που διεξήγαγε τον οργανοληπτικό έλεγχο.

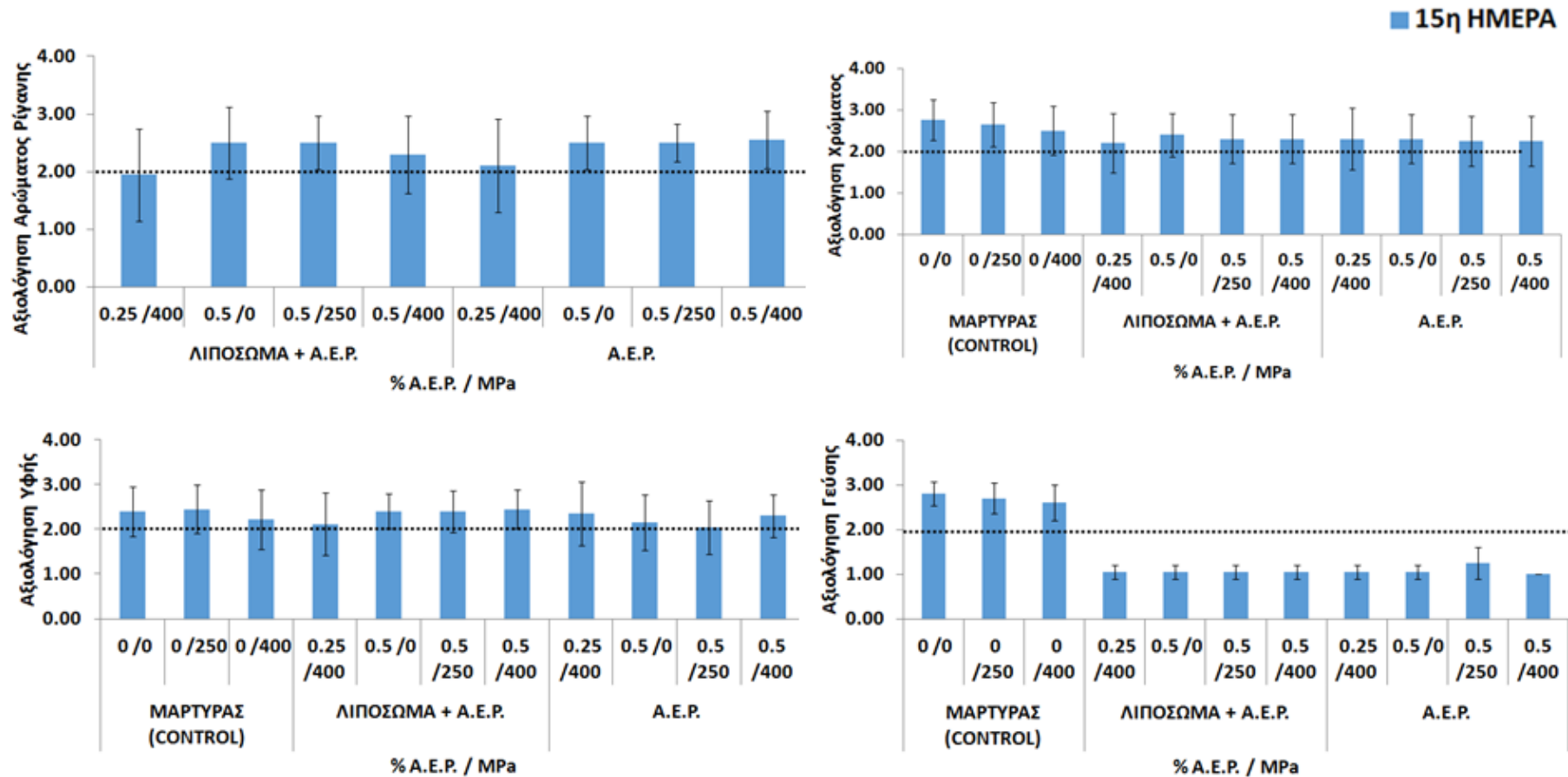


Εικόνα 3.4.1.1: Εικόνες του λιποσώματος από μικροσκόπιο κατά την μεταχείριση ή όχι με υπερυψηλή πίεση (0, 250, 400 MPa).



Εικόνα 3.4.1.2: Παρασκευή δειγμάτων βόειου κιμά βάρους 70 g, πάχους 1.5 cm στα οποία έχει προστεθεί λιπόσωμα με ενθυλακωμένο το αιθέριο έλαιο ρίγανης και η τελική του συγκέντρωση στον βόειο κιμά ήταν 0.5 v/w.

3.4.2 Οργανοληπτική Αξιολόγηση Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων



Γράφημα 3.4.2 Οργανοληπτική αξιολόγηση του αρώματος ρίγανης, του χρώματος, της υφής και της γεύσης βόειων μπιφτεκιών στα οποία είχε προστεθεί ή όχι αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.25, 0.5%) ελεύθερο ή ενθυλακωμένο σε λιποσώματα και είχαν μεταχειριστεί ή όχι με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) μετά από θερμική επεξεργασία για 20-25 min. Ως μάρτυρες σε κάθε περίπτωση ορίστηκαν τα δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί αντιμικροβιακή ουσία. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε τη 15η ημέρα συντήρησης. Κάθε παράμετρος βαθμολογήθηκε με βάση μια ηδονική κλίμακα από 1 (μη αποδεκτό) έως 3 (πολύ ικανοποιητικό), όπου το όριο αποδοχής ήταν το 2 (διακεκομμένη γραμμή).

Το άρωμα ρίγανης στα δείγματα που περιείχαν αιθέριο έλαιο φάνηκε να έχει παρόμοια αποτελέσματα και στα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα, λαμβάνοντας βαθμολογία ανώτερη ή ίση του 2 στις 15 ημέρες συντήρησης. Το άρωμα ρίγανης διατηρήθηκε μετά το ψήσιμο, τόσο στα δείγματα που είχε προστεθεί απευθείας όσο και σε εκείνα με το λιπόσωμα. Η χρήση των λιποσωμάτων στον τομέα των τροφίμων ξεκίνησε βασιζόμενη στην ιδιότητα των συγκεκριμένων σωματιδίων να μεταφέρουν και να αποδεσμεύουν ελεγχόμενα λειτουργικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, βιταμίνες και ενισχυτικά γεύσης (Taylor et al., 2005).

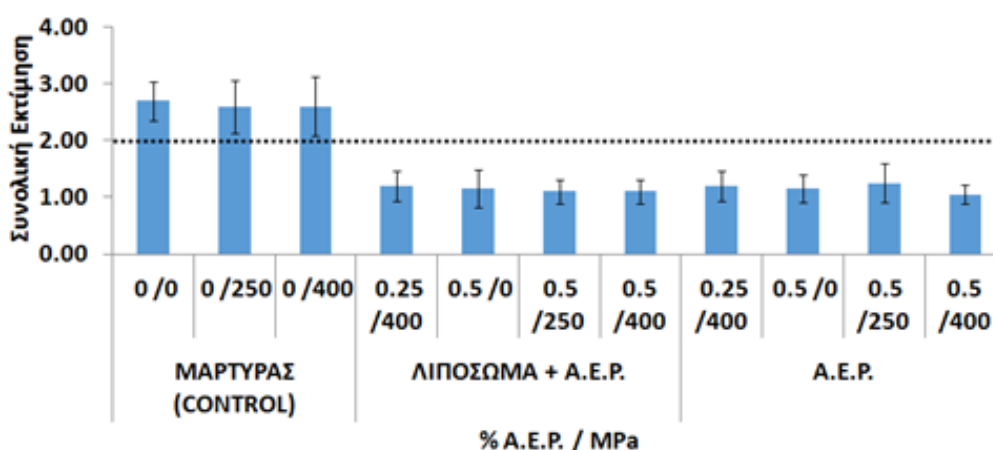
Με τη θερμική επεξεργασία, οι διαφορές στο χρώμα μεταξύ των δειγμάτων φάνηκε να εξισορροπήθηκαν, καθώς κύρια επίδραση είχε ο χρόνος και η θερμοκρασία ψησίματος. Η επίδραση της πίεσης στην αλλαγή του χρώματος δεν ήταν εμφανής στα θερμικά επεξεργασμένα δείγματα, συγκριτικά με τα ωμά δείγματα, ενώ η προσθήκη λιποσώματος προσέδιδε στα ψημένα δείγματα μια πιο ανοιχτή απόχρωση συγκριτικά με αυτά των μαρτύρων (δείγματα χωρίς αντιμικροβιακή ουσία).

Η υφή δε φάνηκε να μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της συντήρησης, ωστόσο παρατηρήθηκε υψηλότερη βαθμολογία και αποδοχή στα μπιφτέκια στα οποία είχε προστεθεί το αιθέριο έλαιο εγκλεισμένο σε λιποσώματα καθώς και σε αυτά των μαρτύρων. Τα λιποσώματα, όπως προαναφέρθηκε, λόγω της φύσης τους έχουν την ικανότητα να βελτιώνουν την υφή του προϊόντος και να το κάνουν πιο μαλακό και ζουμερό με παράλληλη διατήρηση του αρώματος και της γεύσης της ρίγανης.

Όσον αφορά στη γεύση, τα δείγματα που ήταν αποδεκτά (βαθμολογία > 2) ήταν αυτά των μαρτύρων. Τα υπόλοιπα δείγματα στα οποία είχε προστεθεί το αιθέριο έλαιο ρίγανης ανεξάρτητα συγκέντρωσης (0.25 ή 0.5%) ή χειρισμού (ελεύθερο ή ενθυλακωμένο σε λιποσώματα) ήταν απορριπτέα καθώς η βαθμολογία κυμάνθηκε κοντά στο 1. Τα αιθέρια έλαια είναι αρκετά υποσχόμενες φυσικές αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ουσίες, όμως η χρήση τους στα τρόφιμα είναι περιορισμένη καθώς για να επιτευχθεί ικανοποιητική αντιμικροβιακή δράση πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητες αλλαγές στην οσμή ή την γεύση του προϊόντος. Σε μελέτη σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση συνδυασμού αιθέριων ελαίων έναντι παθογόνων βακτηρίων σε κιμά, βρέθηκε ότι η αποδεκτή συγκέντρωση μίγματος αιθέριων ελαίων κανέλας με βάση την οσμή και τη γεύση ήταν αυτή του 0.05% v/v (Ghabraie, Vu, Tata, Salmieri, & Lacroix, 2016). Τα αποτελέσματα των περισσότερο *in vitro* δοκιμασιών υποδεικνύουν ότι τα αιθέρια έλαια έχουν ουσιαστική αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα, όταν χρησιμοποιούνται σε συστήματα τροφίμων, οι ποσότητες που απαιτούνται είναι

σημαντικά υψηλότερες (10 έως 100 πλάσιες) ή η συγκέντρωση των μικροοργανισμών - στόχων αρκετά χαμηλότερη. Τα αποτελεσματικά επίπεδα των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα, ως προς την αντιμικροβιακή δράση, έχουν συχνά αρνητική οργανοληπτική επίδραση και για αυτό η εμπορική εφαρμογή των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα είναι προς το παρόν περιορισμένη. Για παράδειγμα, όταν προστέθηκαν αιθέρια έλαια ρίγανης ή μοσχοκάρυδου στο μέγιστο οργανοληπτικά αποδεκτό επίπεδο σε μαγειρεμένο στήθος κοτόπουλου, παρουσίασαν περιορισμένη δράση, ακόμη και σε θερμοκρασίες ψύξης (Drosinos et al., 2009).

Ακολουθεί το γράφημα της συνολικής εκτίμησης των θερμικά επεξεργασμένων δειγμάτων, στο οποίο αντικατοπτρίζεται κυρίως η παράμετρος της γεύσης.

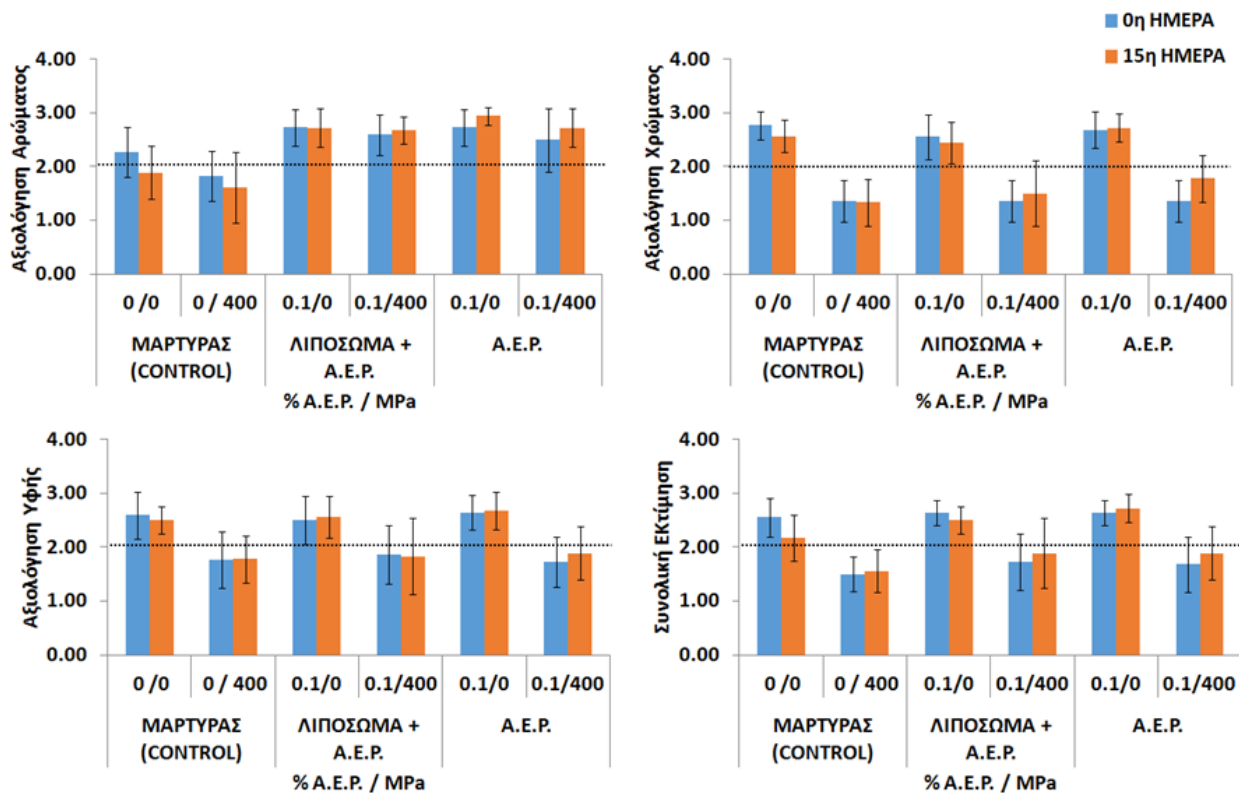


Γράφημα 3.4.2α Οργανοληπτική αξιολόγηση της συνολικής εκτίμησης βόειων μπιφτεκιών στα οποία είχε προστεθεί ή όχι αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.25, 0.5%) ελεύθερο ή ενθυλακωμένο σε λιποσώματα και είχαν μεταχειριστεί ή όχι με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) μετά από θερμική επεξεργασία για 20-25 min. Ως μάρτυρες σε κάθε περίπτωση ορίστηκαν τα δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί αντιμικροβιακή ουσία. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε τη 15η ημέρα συντήρησης. Κάθε παράμετρος βαθμολογήθηκε με βάση μια ηδονική κλίμακα από 1 (μη αποδεκτό) έως 3 (πολύ ικανοποιητικό), όπου το όριο αποδοχής ήταν το 2 (διακεκομμένη γραμμή)

Εφόσον οι συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου ρίγανης που χρησιμοποιήθηκαν (0.25%, 0.5%) ήταν οργανοληπτικά απορριπτές, κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθεί οργανοληπτικός έλεγχος με χαμηλότερη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου, που να είχε ωστόσο κάποια αντιμικροβιακή δράση, μόνο του ή σε συνδυασμό με ένα υψηλό επίπεδο υπερυψηλής πίεσης. Με βάση μελέτη των Özcan et al. (2008) σχετικά με την επίδραση αιθέριου ελαίου ρίγανης στη ζύμωση πράσινων ελιών, βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις που ήταν αποδεκτές οργανοληπτικά ήταν αυτές των 0.1 και 0.05%. Ακολούθησε λοιπόν οργανοληπτική αξιολόγηση με προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης 0.1% και εφαρμογή είτε καθόλου υπερυψηλής πίεσης είτε της τάξης των 400 MPa.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος αποφασίστηκε να λάβει χώρα στην αρχή και στο μέσο της συντήρησης (0η και 15η ημέρα), αφού την 30η ημέρα αρκετά δείγματα ήταν μικροβιολογικά ή/και οργανοληπτικά απορριπτέα.

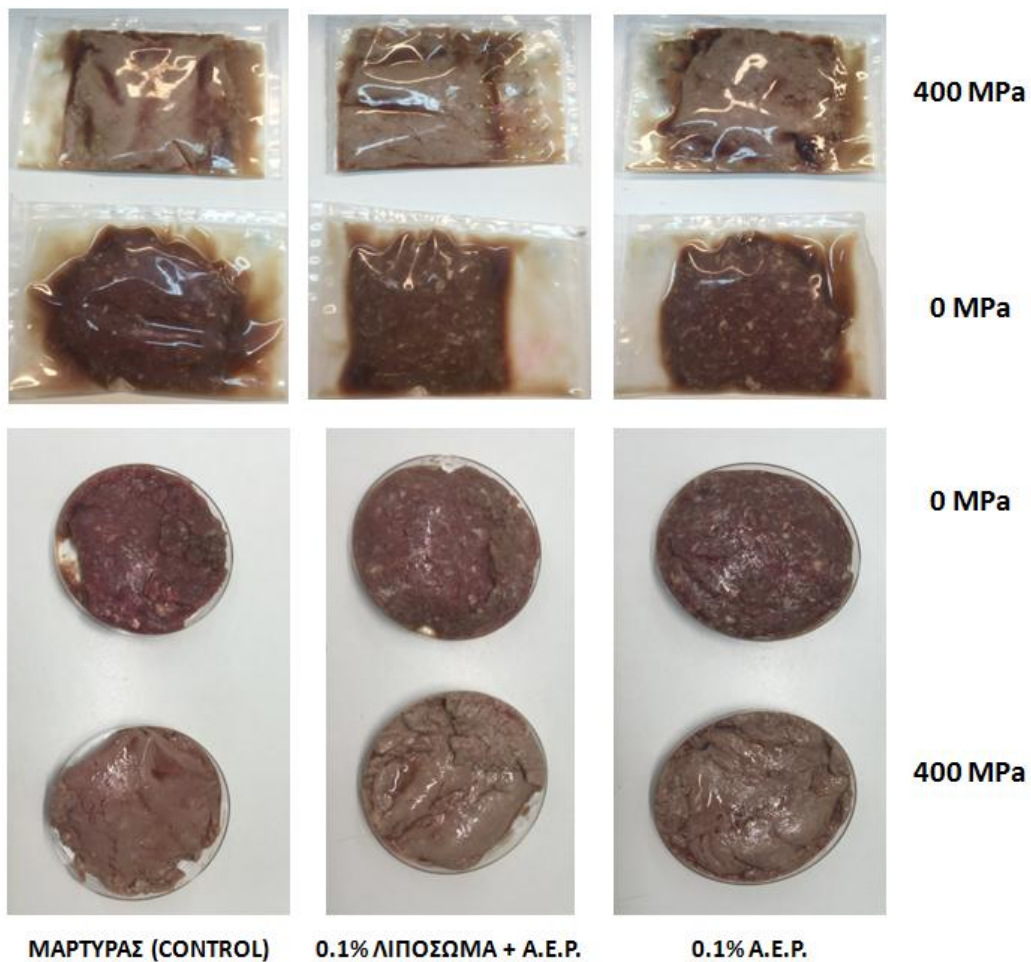
3.4.3 Οργανοληπτική Αξιολόγηση μη Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων (0.1% Α.Ε.Ρ.)



Γράφημα 3.4.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση του αρώματος, του χρώματος, της υφής και της συνολικής εκτίμησης βόειων μπιφτεκιών στα οποία είχε προστεθεί ή όχι αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.1%) ελεύθερο ή ενθυλακωμένο σε λιποσώματα και είχαν μεταχειριστεί ή όχι με υπερυψηλή πίεση (400 MPa) σε συσκευασία υπό κενό και συντήρηση στους 5 °C. Ως μάρτυρες σε κάθε περίπτωση ορίστηκαν τα δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί αντιμικροβιακή ουσία. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε τη 0η και 15η ημέρα συντήρησης. Κάθε παράμετρος βαθμολογήθηκε με βάση μια ηδονική κλίμακα από 1 (μη αποδεκτό) έως 3 (πολύ ικανοποιητικό), όπου το όριο αποδοχής ήταν το 2 (διακεκομμένη γραμμή).

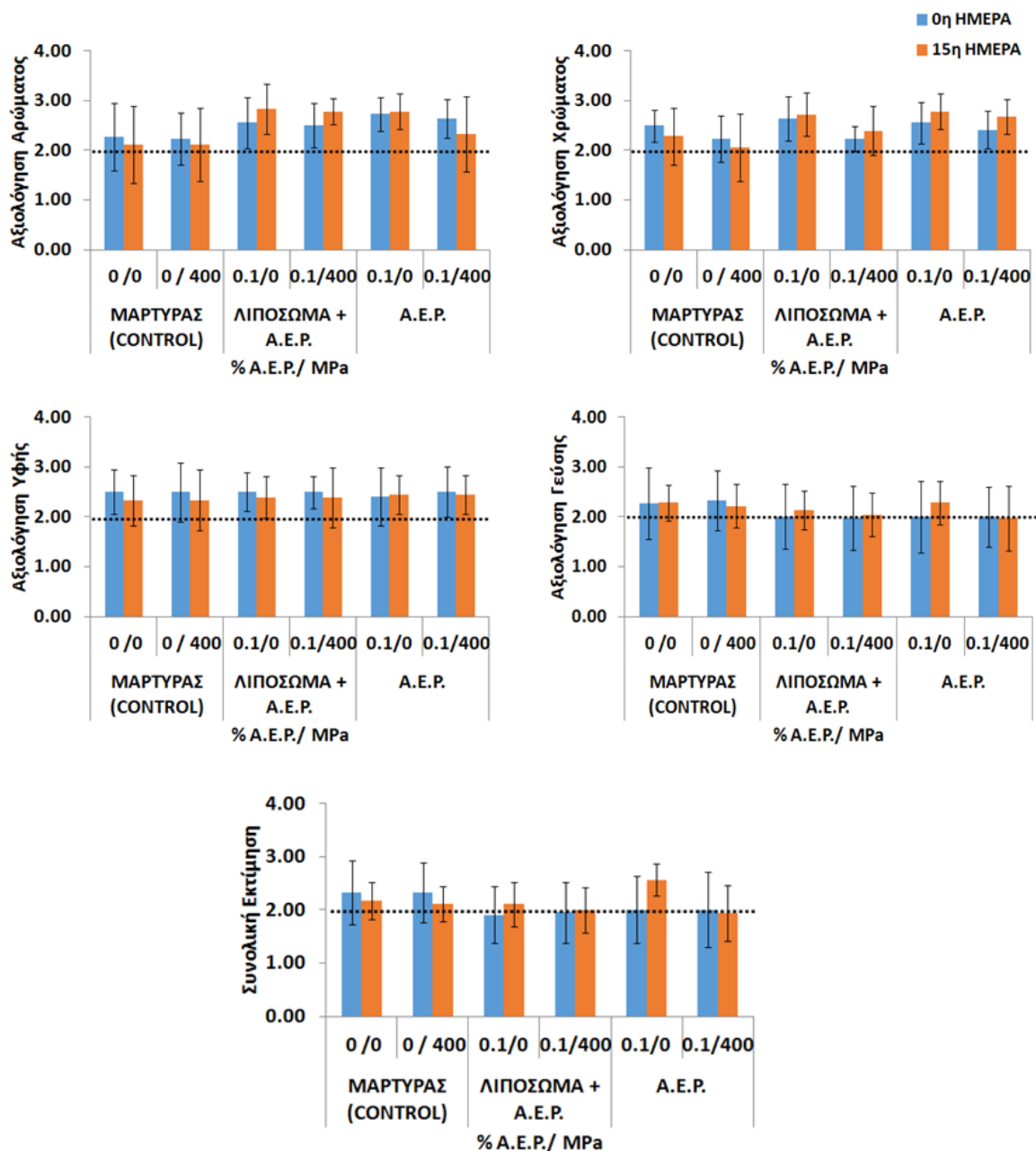
Σε αυτήν την περίπτωση αξιολογήθηκε συνολικά το άρωμα των βόειων μπιφτεκιών και όχι συγκεκριμένα της ρίγανης στα δείγματα που είχε προστεθεί. Καλύτερη βαθμολογία έλαβαν τα δείγματα με το αιθέριο έλαιο ρίγανης είτε είχε προστεθεί ελεύθερο είτε εγκλεισμένο σε λιποσώματα. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης βελτίωσε συνολικά το άρωμα του βόειου κιμά και ήταν αρκετά ικανοποιητικό. Οι βαθμολογικές διαφορές μεταξύ 0ης και 15ης ημέρας ήταν μικρές στα δείγματα με το αιθέριο έλαιο, ωστόσο τα δείγματα των μαρτύρων τόσο στην αρχή όσο και στη μέσο της συντήρησης κρίθηκαν μη αποδεκτά έως οριακά αποδεκτά, κάτι το οποίο δεν συνδέεται με μικροβιολογική αλλοίωση, αλλά με την οσμή του κιμά χωρίς την προσθήκη ρίγανης.

Το χρώμα, κατά ανάλογο τρόπο με τις προηγούμενες περιπτώσεις που αναλύθηκαν παραπάνω, επηρεάστηκε δυσμενώς από την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης 400 MPa, καθώς οι διάφοροι τύποι των δειγμάτων που μεταχειρίστηκαν με πίεση ήταν μη αποδεκτοί και στις δύο χρονικές στιγμές που έλαβε χώρα ο οργανοληπτικός έλεγχος. Τα δείγματα χωρίς πίεση ήταν αρκετά ικανοποιητικά με βάση το χρώμα έως την 15η μέρα συντήρησης. Παρομοίως, η υφή ήταν μια παράμετρος που επηρεάστηκε από την πίεση, καθώς τα αντίστοιχα δείγματα έλαβαν χαμηλότερη βαθμολογία συγκριτικά με αυτά που δεν μεταχειρίστηκαν με υπερυψηλή πίεση. Τα μπιφτεκία μετά την επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση αποκτούν μια πιο συμπιεσμένη μορφή, ο κιμάς έχει χάσει την μαλακότητα του και μοιάζει με μορφή κρεατόπαστας. Η συνολική εκτίμηση των δειγμάτων χωρίς πίεση και με ή χωρίς αιθέριο έλαιο αξιολογήθηκε αρκετά υψηλά (2.5 - 3), ενώ στα δείγματα που είχαν δεχτεί πίεση 400 MPa, η βαθμολογία ήταν μικρότερη του 2, ως αποτέλεσμα των αρνητικών αλλαγών στο χρώμα και την υφή τους.



Εικόνα 3.4.3: Συγκριτικές εικόνες δειγμάτων στα οποία έχει προστεθεί 0.1% αιθέριο έλαιο ρίγανης, είτε ενθυλακωμένο σε λιποσώματα, είτε ελεύθερο, έχουν μεταχειριστεί ή όχι με υπερυψηλή πίεση (400 MPa), σε υπό κενό συσκευασία και συντήρηση στους 5°C για 15 ημέρες (2η ημέρα οργανοληπτικού ελέγχου).

3.4.4 Οργανοληπτική Αξιολόγηση Θερμικά Επεξεργασμένων Δειγμάτων (0.1% Α.Ε.Ρ.)



Γράφημα 3.4.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση του αρώματος, του χρώματος, της υφής, της γεύσης και της συνολικής εκτίμησης βόειων μπιφτεκιών στα οποία είχε προστεθεί ή όχι αιθέριο έλαιο ρίγανης (0.1%) ελεύθερο ή ενθυλακωμένο σε λιποσώματα και είχαν μεταχειριστεί ή όχι με υπερυψηλή πίεση (400 MPa) μετά από θερμική επεξεργασία για 25 λεπτά. Ως μάρτυρες σε κάθε περίπτωση ορίστηκαν τα δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί αντιμικροβιακή ουσία. Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε τη 0η και 15η ημέρα συντήρησης. Κάθε παράμετρος βαθμολογήθηκε με βάση μια ηδονική κλίμακα από 1 (μη αποδεκτό) έως 3 (πολύ ικανοποιητικό), όπου το όριο αποδοχής ήταν το 2 (διακεκομμένη γραμμή).

Η παράμετρος του αρώματος εξακολούθησε να έχει υψηλότερη βαθμολογία στα δείγματα με το αιθέριο έλαιο ρίγανης και κατά τη θερμική επεξεργασία, συγκριτικά με τους μάρτυρες τόσο στην αρχή όσο και στο μέσο της συντήρησης. Ειδικότερα, στα δείγματα με το λιπόσωμα φάνηκε το άρωμα να είναι πιο έντονο στο μέσο της συντήρησης, καθώς αποδεσμεύεται με πιο αργό ρυθμό και το αιθέριο έλαιο είναι προστατευμένο και φυσικοχημικά σταθερό, όντας εγκλεισμένο στα λιποσώματα. Το χρώμα των μπιφτεκίων σε όλες τις περιπτώσεις ήταν αποδεκτό ανεξάρτητα των διαφορετικών μεταχειρίσεων, καθώς με τη θερμική επεξεργασία δεν γίνονται διακριτές οι αλλαγές στο χρώμα λόγω υπερυψηλής πίεσης ή λιποσώματος. Τα δείγματα, ως προς την υφή, ήταν όλα ικανοποιητικά ανεξάρτητα του χρόνου συντήρησης και των μεταχειρίσεων. Η προσθήκη 0.1% αιθέριου ελαίου ρίγανης φάνηκε να είναι οριακά αποδεκτή γευστικά, με τις περιπτώσεις των δειγμάτων χωρίς πίεση να ξεπερνούν το όριο αποδοχής. Τέλος, η συνολική εκτίμηση όλων των δειγμάτων ήταν από οριακά αποδεκτή έως ικανοποιητική, ιδιαίτερα στα δείγματα των μαρτύρων και αυτών με την αντιμικροβιακή ουσία, τα οποία δεν είχαν μεταχειριστεί με πίεση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι συνδυαστικές μεταχειρίσεις των προϊόντων όπως είναι οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες, η υπερυψηλή πίεση ή η θέρμανση είναι αποτελεσματικές στην μείωση ή/και την εξάλειψη παθογόνων μικροοργανισμών.

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκέντρωση 0.5% είχε σημαντική δράση στην επιβίωση του παθογόνου *E. coli* O157:H7 κατά τη διάρκεια της συντήρησης και σε συνδυασμό με τη θερμική επεξεργασία τα κύτταρα του παθογόνου ευαισθητοποιήθηκαν ακόμη περισσότερο, με αποτέλεσμα τη μικρότερη θερμοανθεκτικότητα τους. Ο συνδυασμός 0.5% αιθέριου ελαίου και υπερυψηλής πίεσης 400 MPa είχε την καλύτερη συνεργιστική δράση στην επιβίωση του παθογόνου, ωστόσο, υψηλές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ή μεταχειρίσεις με υψηλά επίπεδα πίεσης καθιστούν τα τελικά προϊόντα οργανοληπτικά απορριπτέα, για αυτό είναι προτιμότερος ο συνδυασμός χαμηλότερων δόσεων αντιμικροβιακών ουσιών με ήπιες μεταχειρίσεις υπερυψηλής πίεσης.

Οι συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου 0.1, 0.25%, φάνηκε να μην είχαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση, παρά μόνο όταν ο βόειος κιμάς μεταχειρίστηκε με υπερυψηλή πίεση (250, 400 MPa) και ακολούθησε επιπρόσθετη μείωση με τη θέρμανση. Ο συνδυασμός των αιθέριων ελαίων με μεταχειρίσεις υπερυψηλής πίεσης μπορεί να είναι υποσχόμενες μέθοδοι στην ασφάλεια του βόειου κρέατος, καθώς μπορούν να συμβάλλουν στην προστασία του προϊόντος έναντι αλλοιωγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών.

Τα λιποσώματα, ως συστήματα ενθυλάκωσης, προστατεύουν ευαίσθητες και με περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα ενώσεις, όπως είναι τα αιθέρια έλαια, ενώ παράλληλα προσφέρουν ελεγχόμενη απελευθέρωση των ουσιών, με συνέπεια μακροπρόθεσμη αντιμικροβιακή δράση, ενώ παράλληλα βελτιώνουν σημαντικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του βόειου κιμά.

Ως μελλοντική προοπτική, θα μπορούσε να μελετηθεί ο συσχετισμός των διαφορετικών τρόπων παρασκευής και συστατικών των λιποσωμάτων με τη δομή και τη λειτουργικότητά τους. Στόχος θα ήταν η ανάπτυξη συγκεκριμένων τύπων λιποσωμάτων για τις διάφορες κατηγορίες τροφίμων, η επίτευξη της επιθυμητής μεταφοράς και απελευθέρωσης των ενθυλακωμένων ουσιών, καθώς και η διατήρηση ή η βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των εκάστοτε προϊόντων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Nejadi-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8, 1. <http://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
2. Awuah, G. B., Ramaswamy, H. S., & Economides, a. (2007). Thermal processing and quality: Principles and overview. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(6), 584–602. <http://doi.org/10.1016/j.cep.2006.08.004>
3. Barnadas-Rodríguez, R., & Sabés, M. (2001). Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer. *International Journal of Pharmaceutics*, 213(January 2016), 175–186. [http://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00661-X](http://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00661-X)
4. Bettelheim, K. A. (2008). The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) Escherichia coli; Under-Rated Pathogens. *Critical Reviews in Microbiology*. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408410601172172?journalCode=imby20>
5. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–53. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
6. Commission, E. (1999). COMMISSION DECISION of 23 February 1999 adopting a register of flavouring substances used in or on foodstuffs drawn up in application of Regulation (EC) No 2232/96 of the European Parliament and of the Council of 28 October 1996. *Official Journal of the European Communities*, (L 84), 1–137.
7. Commission, E. (2000). COMMISSION REGULATION (EC) No 1565/2000. *Official Journal of the European Communities*, (L 180), 8–16.
8. Commission, E. (2002). COMMISSION DECISION of 23 January 2002 amending Commission Decision 1999/217/EC as regards the register of flavouring substances used in or on foodstuffs. *Official Journal of the European Communities*, (L 49), 1–160.
9. de Alba, M., Bravo, D., & Medina, M. (2013). Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in dry-cured ham by high-pressure treatments combined with biopreservatives. *Food Control*, 31(2), 508–513. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.043>
10. Dorman, H. J., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial

- activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.
<http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
11. Drosinos, E. H., Skandamis, P. N., & Mataragas, M. (2009). Antimicrobials Treatment. http://doi.org/10.1007/978-0-387-89026-5_10
 12. Duffy, G. (2003). Verocytotoxic Escherichia coli in animal faeces, manures and slurries. *Journal of Applied Microbiology*, 94(s1), 94–103.
<http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.11.x>
 13. Duffy, G., Burgess, C. M., & Bolton, D. J. (2014). A review of factors that affect transmission and survival of verocytotoxigenic Escherichia coli in the European farm to fork beef chain. *Meat Science*, 97(3), 375–383.
<http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.01.009>
 14. El Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Aït Addi, E. H., Casabianca, H., ... Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1-2), 220–243.
<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
 15. FDA, U. S. (2013). Everything Added to Food in the United States (EAFUS). Retrieved from <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=eafusListing>
 16. Feyaerts, J., Rogiers, G., Corthouts, J., & Michiels, C. W. (2014). Thiol-reactive natural antimicrobials and high pressure treatment synergistically enhance bacterial inactivation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 26–34.
<http://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.12.005>
 17. Garriga, M., & Aymerich, T. (2009). *Safety of Meat and Processed Meat*. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-89026-5>
 18. Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2016). Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 332–339.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.055>
 19. Gould, L. H., Demma, L., Jones, T. F., Hurd, S., Vugia, D. J., Smith, K., ... Griffin, P. M. (2009). Hemolytic uremic syndrome and death in persons with Escherichia coli O157:H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000-2006. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49(10), 1480–5. <http://doi.org/10.1086/644621>
 20. Guerini, M. N., Arthur, T. M., Shackelford, S. D., & Koohmaraie, M. (2006). Evaluation of Escherichia coli O157:H7 growth media for use in test-and-hold procedures for

- ground beef processing. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1007–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715796>
21. Hayes, J. E., Raines, C. R., DePasquale, D. A., & Cutter, C. N. (2014). Consumer acceptability of high hydrostatic pressure (HHP)-treated ground beef patties. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 207–210. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.014>
 22. Hsu, H., Sheen, S., Sites, J., Cassidy, J., Scullen, B., & Sommers, C. (2015). Effect of High Pressure Processing on the survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (Big Six vs. O157:H7) in ground beef. *Food Microbiology*, 48, 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.002>
 23. Imran, M., Revol-Junelles, A.-M., Paris, C., Guedon, E., Linder, M., & Desobry, S. E. (2015). Liposomal nanodelivery systems using soy and marine lecithin to encapsulate food biopreservative nisin. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 341–349. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.046>
 24. Jackson, T. C., Hardin, M. D., & Acuff, G. R. (1996). Heat Resistance of *Escherichia coli* O157 : H7 in a Nutrient Medium and in Ground Beef Patties as Influenced by Storage and Holding Temperatures. *Journal of Food Protection*, 59(3), 230–237.
 25. Jiang, Y., Scheinberg, J. A., Senevirathne, R., & Cutter, C. N. (2015). The efficacy of short and repeated high-pressure processing treatments on the reduction of non-O157:H7 Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in ground beef patties. *Meat Science*, 102, 22–6. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.12.001>
 26. Juneja, V. K., & Friedman, M. (2008). Carvacrol and Cinnamaldehyde Facilitate Thermal Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Ground Beef. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1604–1611.
 27. Kameník, J., Saláková, A., Hulánková, R., & Borilova, G. (2015). The effect of high pressure on the microbiological quality and other characteristics of cooked sausages packed in a modified atmosphere or vacuum. *Food Control*, 57, 232–237. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.010>
 28. Kaper, J. B., & Karmali, M. A. (2008). The continuing evolution of a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(12), 4535–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.0801435105>
 29. Kapetanakou, a. E., Agathaggelou, E. I., & Skandamis, P. N. (2014). Storage of pork meat under modified atmospheres containing vapors from commercial alcoholic beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 65–75.

<http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.021>

30. Lahou, E., Wang, X., De Boeck, E., Verguldt, E., Geeraerd, A., Devlieghere, F., & Uyttendaele, M. (2015). Effectiveness of inactivation of foodborne pathogens during simulated home pan frying of steak, hamburger or meat strips. *International Journal of Food Microbiology*, *206*, 118–129. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.014>
31. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, *91*(3), 453–462. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
32. Lindqvist, R., & Lindblad, M. (2009). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *International Journal of Food Microbiology*, *129*(1), 59–67. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.011>
33. Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, *112*(1), 77–83. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>
34. Liu, Y., Gill, A., McMullen, L., & Gänzle, M. G. (2015). Variation in Heat and Pressure Resistance of Verotoxigenic and Nontoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, *78*(1), 111–120. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-267>
35. Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. C. S., Shoyer, B. A., Call, J. E., Schlosser, W., Shaw, W., ... Latimer, H. (2011). Inactivation of Shiga toxin-producing O157:H7 and non-O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in brine-injected, gas-grilled steaks. *Journal of Food Protection*, *74*(7), 1054–64. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-579>
36. Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. C. S., Shoyer, B. A., Phillips, J., Chen, V., Eblen, D. R., ... Bauer, N. (2013). Fate of Shiga Toxin–Producing O157:H7 and Non-O157:H7 *Escherichia coli* Cells within Refrigerated, Frozen, or Frozen Then Thawed Ground Beef Patties Cooked on a Commercial Open-Flame Gas or a Clamshell Electric Grill. *Journal of Food Protection*, *76*(9), 1500–1512. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-432>
37. Manios, S. G., & Skandamis, P. N. (2015). Effect of frozen storage, different thawing methods and cooking processes on the survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia*

- coli O157:H7 in commercially shaped beef patties. *Meat Science*, 101, 25–32. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.031>
38. Nissen, H., Alvseike, O., Bredholt, S., Holck, A., & Nesbakken, T. (2000). Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 211–220. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00373-1](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00373-1)
39. Oliveira, T. L. C. de, Junior, B. R. de C. L., Ramos, A. L. S., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Cristianini, M. (2015). Phenolic carvacrol as a natural additive to improve the preservative effects of high pressure processing of low-sodium sliced vacuum-packed turkey breast ham. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1297–1308. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.011>
40. Oliveira, T. L. C. de, Ramos, A. L. S., Ramos, E. M., Piccoli, R. H., & Cristianini, M. (2015). Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 60–85. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.007>
41. Ortega-Ramirez, L. A., Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00071-7>
42. Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18(5), 414–420. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.009>
43. Özcan, M. M., Arslan, D., & Aydar, A. O. (2008). The use of the oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and hydrosol in green olive fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(3), 601–605. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132008000300022>
44. Peng, S., Zou, L., Liu, W., Lu, G., Liu, W., Liang, R., ... Chen, X. (2015). Storage Stability and Antibacterial Activity of Eugenol Nanoliposomes Prepared by an Ethanol Injection–Dynamic High-Pressure Microfluidization Method. *Journal of Food Protection*, 78(1), 22–30. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-246>
45. Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., & Ercolini, D. (2015). Lactic acid

- bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*, 109, 66–74. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.04.014>
46. Rodríguez, R. B. i, & Xamaní, M. S. i. (2003). *Liposomes Prepared by High-Pressure Homogenizers. Methods in Enzymology* (Vol. 367). Elsevier. [http://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)67004-7](http://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67004-7)
 47. Sağdıç, O., Kuşçu, A., Özcan, M., & Özçelik, S. (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 19(5), 473–480. <http://doi.org/10.1006/fmic.2002.0494>
 48. Sebaaly, C., Jraij, A., Fessi, H., Charcosset, C., & Greige-Gerges, H. (2015). Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. *FOOD CHEMISTRY*, 178, 52–62. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.067>
 49. Shah, B., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2012). Nanocapsular Dispersion of Thymol for Enhanced Dispersibility and Increased Antimicrobial Effectiveness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in Model Food Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8448–8453. <http://doi.org/10.1128/AEM.02225-12>
 50. Sheen, S., Cassidy, J., Scullen, B., Uknalis, J., & Sommers, C. (2015). Inactivation of *Salmonella* spp. in ground chicken using high pressure processing. *Food Control*, 57, 41–47. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.005>
 51. Shen, C., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2011). Thermal inactivation of acid, cold, heat, starvation, and desiccation stress-adapted *Escherichia coli* O157:H7 in moisture-enhanced nonintact beef. *Journal of Food Protection*, 74(4), 531–8. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-430>
 52. Shen, C., McKeith, A., Broyles, C., & McKeith, R. (2016). Quality attributes and thermal inactivation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in moisture enhanced, non-intact beef products are affected by pump rate, internal temperature, and resting time after cooking. *Food Control*, 68, 112–117. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.040>
 53. Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011–1022. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01467.x>
 54. Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food*

- Microbiology*, 79(1-2), 35–45. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00177-0](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00177-0)
55. Stringer, S. C., George, S. M., & Peck, M. W. (2000). Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157 : H7. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 88(Coia 1998), 79S–89S.
56. Tarr, P. I., Gordon, C. A., & Chandler, W. L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet (London, England)*, 365(9464), 1073–86. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71144-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71144-2)
57. Tassou, C. C., Drosinos, E. H., & Nychas, G. J. E. (1995). EFFECTS OF ESSENTIAL OIL FROM MINT (MENTHA-PIPERITA) ON SALMONELLA-ENTERITIDIS AND LISTERIA-MONOCYTOGENES IN MODEL FOOD SYSTEMS AT 4-DEGREES AND 10-DEGREES-C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), 593–600. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03104.x>
58. Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M., & Bruce, B. D. (2005). Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 587–605. <http://doi.org/10.1080/10408390591001135>
59. USDA. (2013). Ground Beef and Food Safety. Retrieved January 17, 2016, from http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/meat-preparation/ground-beef-and-food-safety/CT_Index
60. Vasanthi, C., Venkataramanujam, V., & Dushyanthan, K. (2007). Effect of cooking temperature and time on the physico-chemical, histological and sensory properties of female carabeef (buffalo) meat. *Meat Science*, 76(2), 274–80. <http://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.11.018>
61. Viazis, S., & Diez-Gonzalez, F. (2011). *Enterohemorrhagic Escherichia coli*. *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 111). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-387689-8.00006-0>
62. Wu, V. C. H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25, 735–744. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.011>
63. Κώδικας Τροφίμων και Ποτών. (n.d.). Άρθρο 46, Φυσικά Εκχυλίσματα, 1–9.

Διαδίκτυο

1. FDA, U. S. (2013). Everything Added to Food in the United States (EAFUS). Retrieved from <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=eafusListing>
2. USDA (2013). Ground Beef and Food Safety. Retrieved January 17, 2016, from http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/meat-preparation/ground-beef-and-food-safety/CT_Index
3. CDC (2014). "Escherichia coli O157:H7 Infections Linked to Ground Beef". Retrieved from <http://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/>
4. CDC (2015). "Escherichia coli O157:H7 Infections Linked to Costco Rotisserie Chicken Salad". Retrieved from <http://www.cdc.gov/ecoli/2015/o157h7-11-15/>