



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

---

**Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων**

**Παράγοντες που επηρεάζουν την εκβλάστηση και μετέπειτα ανάπτυξη σπορίων *Clostridium* spp. σε αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας κατά τη διάρκεια συντήρησής τους.**

**Άρτεμις Ι. Ζαβιτσάνου**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**Επιβλέπων Καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης**

**ΑΘΗΝΑ 2017**

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ)

«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του  
Ανθρώπου»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ

«Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας  
Τροφίμων»

**Παράγοντες που επηρεάζουν την εκβλάση και  
μετέπειτα ανάπτυξη σπορίων *Clostridium* spp. σε  
αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας κατά τη διάρκεια  
συντήρησής τους.**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ζαβιτσάνου Ι. Άρτεμις

Επιβλέπων καθηγητής:

Σκανδάμης Παναγιώτης, (Αναπληρωτής Καθηγητής)

ΑΘΗΝΑ 2017

**Παράγοντες που επηρεάζουν την εκβλάστηση και  
μετέπειτα ανάπτυξη σπορίων *Clostridium* spp. σε  
αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας κατά τη διάρκεια  
συντήρησής τους.**

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Ζαβιτσάνου Ι. Άρτεμις

**Επιβλέπων καθηγητής:**

Σκανδάμης Παναγιώτης, (Αναπληρωτής Καθηγητής)

**Εξεταστική επιτροπή:**

Σκανδάμης Παναγιώτης, (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Πανάγου Ευστάθιος, (Επίκουρος Καθηγητής)

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, (Καθηγητής)

## Περίληψη

Τα νιτρώδη άλατα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία κρέατος, διότι προσδίδουν χαρακτηριστικό χρώμα και άρωμα στα προϊόντα, καθώς επίσης αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, όπως *Listeria monocytogenes* και *Clostridium botulinum*. Ωστόσο, η τάση προς την εφαρμογή φυσικών τρόπων συντήρησης των τροφίμων οδήγησε στην αναζήτηση και χρήση φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, ως αντικαταστατών των νιτρωδών, και επακόλουθα στην επισήμανση της λεγόμενης «καθαρής ετικέτας» (clean-labeling).

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας ενός εμπορικού φυσικού αντιμικροβιακού σκευάσματος (εκχύλισμα από φρούτα και μπαχαρικά) έναντι αλλοιογόνων μικροοργανισμών, του παθογόνου *C.perfringens*, καθώς και του *C.sporogenes*, ως ισοδύναμο (surrogate) των πρωτεολυτικών στελεχών του *C.botulinum*, σε παστεριωμένα αλλαντικά. Έλαβαν χώρα 4 (τέσσερις) μεταχειρίσεις: δείγματα στα οποία έγινε προσθήκη νιτρωδών (150 ppm), δείγματα με εμπορικό σκεύασμα φυσικού αντιμικροβιακού σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5 και 1% w/w, σύμφωνα με τον κατασκευαστή), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας). Το επίπεδο του τελικού εμβολίου στην κρεατόπαστα ήταν 1-5 σπόρια/g για το *C.perfringens*, καθώς και 100 και 10000 σπόρια/g, για το *C.sporogenes*. Στη συνέχεια, τα τελικά προϊόντα προετοιμάστηκαν σύμφωνα με τις διεργασίες που ακολουθούνται στη βιομηχανία (θέρμανση, κάπνιση και υπερυψηλή πίεση). Φέτες βάρους περί τα 200g συσκευάστηκαν υπό κενό, σε αυτόματη συσκευαστική μηχανή, εφαρμόστηκε υπερυψηλή πίεση και συντηρήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες με σκοπό τη μελέτη της αλλοίωσης (5, 10, 15°C), καθώς και της ασφάλειας (6, 12, 15, 20, 25°C) των τελικών προϊόντων.

Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των κλωστριδίων, καθώς και της αλλοιογόνου χλωρίδας καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης, για έως και 6 μήνες, ενώ οι κινητικές παράμετροι (μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης- $\mu_{max}$  και λανθάνουσα φάση- $\lambda$ ) υπολογίστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα DMfit. Η συντήρηση υπό μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση του κινητικού μοντέλου πρόβλεψης της απόκρισης της αλλοιογόνου χλωρίδας στα παστεριωμένα αλλαντικά. Όσον αφορά στην ασφάλεια, παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *Clostridium sporogenes* (υψηλό εμβόλιο) σε όλες τις θερμοκρασίες > 6 °C απουσία αντιμικροβιακού μέσου, ενώ οι *Clostridium perfringens* και *Clostridium sporogenes* (χαμηλό εμβόλιο) αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία > 12 °C. Επιπρόσθετα, η επίδραση

του φυσικού αντιμικροβιακού έναντι των κλωστριδίων φάνηκε να εξαρτάται από τη συγκέντρωση αυτού. Σε συγκέντρωση 1% w/w ανεστάλη η ανάπτυξή τους, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία συντήρησης, ενώ η παρουσία νιτρώδων καθυστέρησε την ανάπτυξη του *C.sporogenes* ( $\lambda=13.93$  days;  $\mu_{\max}=0.37$  d<sup>-1</sup>, 25°C), συγκριτικά με το μάρτυρα ( $\lambda=1.5$  days;  $\mu_{\max}=0.79$  d<sup>-1</sup>, 25°C). Ενώ, τόσο τα νιτρώδη όσο και το φυσικό αντιμικροβιακό δεν εμφάνισαν σημαντική ανασταλτική δράση έναντι της αλλοιογόνου χλωρίδας, , πιθανόν οδηγούν σε διαφορετικό μικροβιακό προφίλ.

Συμπερασματικά, τα νιτρώδη θα μπορούσαν να αντικατασταθούν από φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες. Ωστόσο, για να γίνει εφαρμογή των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης σε άλλα προϊόντα κρέατος, θα πρέπει να συνυπολογιστούν τα ενδογενή χαρακτηριστικά του εκάστοτε προϊόντος.

**Επιστημονικό πεδίο:** Μικροβιολογία Τροφίμων

**Λέξεις ευρετηρίασης:** *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, οξυγαλακτικά βακτήρια, κινητικό μοντέλο ανάπτυξης, νιτρώδη άλατα, αντιμικροβιακές ουσίες φυσικής προέλευσης, παστεριωμένα αλλαντικά, μικροβιολογία πρόρρησης

## Abstract

### Factors that affect the germination and subsequent development of *Clostridium* spp. in cooked meat products during storage conditions

Nitrites have been used in meat industry to achieve distinctive color and flavor as well as to effectively control the growth of pathogens, such as *Listeria monocytogenes* and *Clostridium botulinum*. However, there is an emerging trend towards clean label products, using natural substitutes of nitrites.

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of a commercial fruit- and spices- based natural antimicrobial (NA) against spoilage organisms, *C. perfringens* and *C. sporogenes*, as surrogate for proteolytic *C. botulinum* in cooked meat products. Four formulations (no nitrites, nitrites 150 ppm and two concentrations of NA) of deli-style turkey paste were inoculated in the industrial setting with *C. perfringens* (1-5 spores/g) and *C. sporogenes* (100 and 10000 spores/g), while non-inoculated samples served as control. Final products were prepared according the commercial manufacturing process (heat treatment, smoking and High Pressure Processing-HPP). NA (extract of fruits and spices) was added in 0.5x or 1x of the concentration recommended by the manufacturer. 200g-pieces of product were vacuum packed, HPP treated and stored at different temperatures in order to monitor spoilage (5, 10, 15°C) as well as safety (6, 12, 15, 20, 25°C) of the final product.

Enumeration of *Clostridium* spp. and spoilage microflora was performed throughout storage for up to 6 months, while growth parameters ( $\mu_{\max}$ , lag phase- $\lambda$ ) were determined using DMfit. Storage under dynamic temperature conditions was used to further validate the developed growth model regarding spoilage of cooked meat products. Formulations lacking antimicrobials allowed the growth of *Clostridium sporogenes* (high inoculum) at all temperatures (except 6°C and dynamic temperature conditions), while *Clostridium perfringens* and *Clostridium sporogenes* (low inoculum) grew at all temperatures except 6 and 12 °C. NA performance against clostridia was concentration dependent. High NA concentration (1x) effectively inhibited growth of clostridia, regardless storage temperature, while nitrites only delayed the outgrowth of the surrogate ( $\lambda=13.93$  days;  $\mu_{\max}=0.37$  d<sup>-1</sup>, 25°C) compared to control ( $\lambda=1.5$  days;  $\mu_{\max}=0.79$  d<sup>-1</sup>, 25°C). While both antimicrobial agents may not have no significant effect on spoilage microflora, regardless of

storage temperature, they may potentially result in distinct microbial profile. Nitrites could successfully be substituted by natural antimicrobial agents, resulting in nitrite free products. However, extrapolation of the results in other deli meat products should co-evaluate the intrinsic characteristics of the product.

**Scientific discipline:** Food microbiology

**Key words:** *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*, lactic acid bacteria, growth model, nitrites, natural antimicrobial agents, cooked meat products, predictive microbiology

*Στους γονείς μου Γιάννα και Γιάννη,*

*στον αδελφό μου Τάσο*



## Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση της ερευνητικής αυτής μελέτης, καθώς και για την καθοδήγηση και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκειά της.

Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Υποψήφιους Διδάκτορες Μακαρίτη Ιφιγένεια και Γριβοκωστόπουλο Νικόλαο, του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανεκτίμητη συνεισφορά τους στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα, επίσης, να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλο το προσωπικό και τους φοιτητές του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων για τη συνεργασία και την προθυμία που έδειξαν να προσφέρουν τις γνώσεις και την εμπειρία τους στην εν λόγω μελέτη.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της μεταπτυχιακής διατριβής μου.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	<b>Σελ.</b>
Περίληψη.....	4
Abstract.....	6
<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>12</b>
1.1 Γενικά.....	12
1.2 Προϊόντα με βάση το κρέας.....	13
1.2.1 Αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας.....	14
1.3 Κρεατογαλάκτωμα.....	15
1.4 Σταθερότητα της κρεατόπαστας.....	16
1.5 Επιλογή πρώτων υλών.....	17
1.5.1 Κρέας.....	17
1.5.1.1 Φυσική κατάσταση του κρέατος.....	17
1.5.1.1.1 Διατήρηση των ιδιοτήτων του θερμού κρέατος.....	18
1.5.1.1.2 Επεξεργασία ψυχρού κρέατος.....	19
1.5.1.2 Επιλογή του κρέατος με βάση το pH.....	19
1.5.2 Λιπώδης ιστός.....	20
1.5.3 Προστιθέμενες ουσίες.....	21
1.5.3.1 Χλωριούχο Νάτριο (NaCl).....	21
1.5.3.2 Φωσφορικά άλατα και άλατα εδωδιμων οξέων.....	21
1.5.3.3 Νιτρικά άλατα.....	21
1.5.3.4 Νιτρώδη άλατα.....	22
1.5.3.5 Αντιμικροβιακές ουσίες φυσικής προέλευσης (clean labelling).....	24
1.5.3.5.1 Φυτικά εκχυλίσματα.....	25
1.5.3.5.2 Αντιμικροβιακές πρωτεΐνες.....	26
1.5.3.5.3 Οργανικά οξέα.....	27
1.6 Η μικροβιολογία των παστεριωμένων αλλαντικών.....	30
1.6.1 <i>Clostridium</i> spp.....	30
1.6.1.1 <i>Clostridium botulinum</i> .....	32
1.6.1.2 <i>Clostridium perfringens</i> .....	34
1.6.1.3 <i>Clostridium sporogenes</i> .....	37
1.7 Μικροβιολογία πρόρρησης.....	38
1.7.1 Πρωτογενή μοντέλα.....	38
1.7.2 Δευτερογενή μοντέλα.....	39
1.7.3 Τριτογενή μοντέλα.....	40
1.8 Υπόθεση εργασίας.....	41
<b>2 ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>42</b>
2.1 Μικροοργανισμοί.....	42
2.2 Προετοιμασία εμβολίου.....	42
2.3 Πειραματικός σχεδιασμός.....	43
2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	44
2.5 Μέτρηση pH.....	46
2.6 Πρωτογενές μοντέλο Baranyi.....	46
2.7 Μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας.....	46
2.8 Ταυτοποίηση αλλοιογόνων μικροοργανισμών.....	47
<b>3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ &amp; ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>48</b>
3.1 Ασφάλεια των παστεριωμένων αλλαντικών.....	48
3.1.1 Ικανότητα ανάπτυξη των <i>Clostridium sporogenes</i> και <i>Clostridium perfringens</i> σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης.....	48

3.1.2	Επίδραση του επιπέδου του εμβολίου.....	55
3.1.3	Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης.....	56
3.2	Αλλοίωση των παστεριωμένων αλλαντικών.....	59
3.2.1	Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στην ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και των οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	59
3.2.2	Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης.....	63
3.2.3	Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της μικροβιακής αλλοίωσης προϊόντων θερμικής επεξεργασίας.....	65
3.3	Απομόνωση και ταυτοποίηση αλλοιογόνου μικροβιακής χλωρίδας	71
3.4	Συμπεράσματα.....	73
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>74</b>

# ΕΝΟΤΗΤΑ 1

## Εισαγωγή

### 1.1 Γενικά

Η παραγωγή προϊόντων κρέατος ήταν γνωστή από τους αρχαίους ακόμη χρόνους. Ήδη, από τους Ομηρικούς χρόνους (900 π.Χ.) γνώριζαν για τη συντήρηση του κρέατος με αλάτι και καπνισμό, ενώ στην Οδύσσεια του Ομήρου αναφέρονται λεπτομέρειες για την παραγωγή και κατανάλωση αλλαντικών. Την παραγωγή αλλαντικών στον Ελλαδικό χώρο μαρτυρεί η ίδια η λέξη «αλλαντικό» (sausage). Η λέξη αυτή προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη «άλλᾱς, γεν. ἀλλᾶντος» που σημαίνει κομμένο κρέας εντός εντέρου (Μέγα Λεξικόν της Ελληνικής Γλώσσας).

Τα προϊόντα κρέατος αναπτύχθηκαν μέσω παραδοσιακών συνταγών, οι οποίες διαφυλάχθηκαν με το πέρασμα των χρόνων, ώστε να διατηρηθεί η μοναδικότητά τους. Με τις τεχνολογίες που αναπτύχθηκαν ήταν δυνατή η συντήρηση του κρέατος, το οποίο δεν καταναλωνόταν άμεσα, καθώς επίσης η χρήση ορισμένων βρώσιμων και θρεπτικών μερών του σφάγιου, όπως είναι τα όργανα, το λίπος, το αίμα, αλλά και τεμαχίων κρέατος που δεν είναι ελκυστικά για τον καταναλωτή. Με αυτές τις πρώτες ύλες παράγονταν ποικίλα είδη αλλαντικών, τα οποία ανήκουν στα παλαιότερα είδη τροφίμων (Ambrosiadis, 2005).

Αρχικά, οι μέθοδοι που εφαρμόζονταν ώστε να παρεμποδιστεί η αλλοίωση των προϊόντων αυτών βασίζονταν, κυρίως, στην καθυστέρηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, παρά στη θανάτωσή τους. Οι περισσότερο κοινές μέθοδοι συντήρησης περιελάμβαναν τις ακόλουθες: ξήρανση, αλάτιση και πάστωμα, ζύμωση, οξύνιση, κάπνιση, προσθήκη φυσικών συντηρητικών, μείωση της διαθεσιμότητας του οξυγόνου, ανταγωνιστική χλωρίδα και εξυγίανση. Η ψύξη και η κατάψυξη χρησιμοποιούνταν για τον ίδιο σκοπό τις ψυχρές εποχές του έτους. Αργότερα, άρχισε να παράγεται πλήθος προϊόντων κρέατος μέσω μεθόδων βασιζόμενες στη διεργασία της θέρμανσης, η οποία θανατώνει σχεδόν όλα τα βλαστικά κύτταρα των μικροοργανισμών. Οι ανωτέρω μέθοδοι, μόνες ή σε συνδυασμό, εξασφαλίζουν την ασφάλεια και σταθερότητα, καθώς και την υψηλή ποιότητα των προϊόντων κρέατος (Ambrosiadis, 2005).

Το κρέας και τα προϊόντα του αποτελούν σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής λόγω της θρεπτικής τους αξίας. Αυτή απορρέει από την υψηλή βιολογική

αξία των πρωτεϊνών του, οι οποίες περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, καθώς και από την υψηλή βιοδιαθεσιμότητα μετάλλων, βιταμινών και μικροσυστατικών, όπως ο σίδηρος, το σελήνιο, ο ψευδάργυρος και η βιταμίνη B12 (WHO/FAO, 2003).

## 1.2 Προϊόντα με βάση το κρέας

Σύμφωνα με τον Πίνακα 1, τα προϊόντα κρέατος διακρίνονται αρχικά σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) σε επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος, β) σε αναδομημένα ωπά προϊόντα και γ) σε εδώδιμα υποπροϊόντα κρέατος.

Πίνακας 1: Ταξινόμηση προϊόντων κρέατος (Μπλούκας, 2007).

<b>Προϊόντα Κρέατος</b>
<b>I. Επεξεργασμένα προϊόντα</b>
<b>A) Προϊόντα από σύγκοπτο κρέας</b>
1. Ωμά λουκάνικα – Παραδοσιακά χωριάτικα λουκάνικα
2. Αθλητικά ζύμωσης-ωρίμασης – Σαλάμια αέρος – Σουτζούκια
3. Αθλητικά θερμικής επεξεργασίας – Παστεριωμένα: Λουκάνικα, Σαλάμια, Παρίζες, Μορταδέλλες – Πατέ και ηηκτές – Ημίξηρα ή μερικής ωρίμασης: Σαλάμι μπίρας
<b>B) Προϊόντα από τεμάχια κρέατος</b>
1. Ωρίμασης – Χοιρομέρι ωρίμασης, Ωμοπλάτη ωρίμασης, Νουά ωρίμασης – Παστουρμάς
2. Θερμικής επεξεργασίας – Παστεριωμένα: Χοιρομέρι (ζαμπόν), Ωμοπλάτη (σπάλλα), Νουά, Φιλέτο χοιρινό & βοδινό, Μπριζόλλες χοιρινές & βοδινές, Μπέικον, Γλώσσα, Πτινά θερμικής επεξεργασίας – Ζαμπονέλλο, Φιλέτο Κρακοβίας, Φιλέτο, Φιλετάκι, Πικ-νικ – Παραδοσιακά προϊόντα: Κρέας παστό (σύγλινο), Καβουρμάς
<b>Γ) Κονσέρβες κρέατος</b>
– Ημικονσέρβες, 3/4 κονσέρβες, Γρήγεις κονσέρβες, Τροπικές κονσέρβες
<b>II. Αναδομημένα ωπά προϊόντα</b>
– Γύρος, Χάμπουργκερ, μπιφτέκια – Αναδομημένο κρέας
<b>III. Εδώδιμα υποπροϊόντα κρέατος</b>
– Εκχυλίσματα κρέατος, Ζωμοί, σούπες και κονσομέ, Ζελατίνη, Πλάσμα και ορός αίματος, Μηχανικά ανακτώμενο κρέας, Φυσικές θήκες

Τα επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος των προϊόντων κρέατος και διακρίνονται σε: α) προϊόντα από σύγκοπτο κρέας, β)

προϊόντα από τεμάχια κρέατος και σε γ) κονσέρβες κρέατος. Τα προϊόντα από σύγκοπτο κρέας (comminuted meat products) παράγονται από λεπτοτεμαχισμένο κρέας και λαρδί σε βαθμό που εξαρτάται από τη φύση του προϊόντος, ενώ τα προϊόντα από τεμάχια κρέατος (non-comminuted meat products) παράγονται από αυτοτελή ή μικρότερα τεμάχια κρέατος. Με βάση το είδος της επεξεργασίας που υφίστανται, τα προϊόντα από σύγκοπτο κρέας και λαρδί διακρίνονται σε: α) ωμά λουκάνικα, β) αλλαντικά ζύμωσης-ωρίμασης και γ) αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας, ενώ τα προϊόντα από τεμάχια κρέατος σε: α) προϊόντα ωρίμασης και β) προϊόντα θερμικής επεξεργασίας. Στα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας ανήκουν: α) τα παστεριωμένα αλλαντικά, β) τα παστεριωμένα προϊόντα από τεμάχια κρέατος, γ) τα πατέ, δ) οι πηκτές, ε) τα ημίξηρα αλλαντικά, στ) ο καβουρμάς και ζ) το παστό ή σύγκλινο κρέας.

### 1.2.1 Αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας

Ως αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας (παστεριωμένα αλλαντικά) χαρακτηρίζονται τα προϊόντα εκείνα, τα οποία υφίστανται ήπια θερμική επεξεργασία σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 100°C. Με τη θερμική αυτή επεξεργασία αποφεύγεται η σημαντική υποβάθμιση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών, καθώς και της θρεπτικής τους αξίας, ενώ η μικροβιολογική τους σταθερότητα και ασφάλεια έναντι παθογόνων μικροοργανισμών, και κυρίως έναντι του *Clostridium botulinum* εξασφαλίζεται με τη συνεργιστική δράση πολλών άλλων παραγόντων.

Τα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας παρασκευάζονται από σύγκοπτο κρέας και χοιρινό λιπώδη ιστό (λαρδί) με προσθήκη νερού και των απαραίτητων ουσιών. Οι πρώτες ύλες τεμαχίζονται αρχικά αδρομερώς στον επιθυμητό βαθμό και, αφού αναμειχθούν με τις προστιθέμενες ουσίες και το νερό, υφίστανται έντονο λεπτοτεμαχισμό με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μια ομοιογενής κρεατόπαστα στην οποία, ανάλογα με το προϊόν είναι δυνατόν να ενσωματωθούν μικρά τεμάχια κρέατος ή/και λαρδιού. Το χρησιμοποιούμενο κρέας πρέπει να είναι κατά το δυνατόν άπαχο, διότι ο λιπώδης ιστός παρεμποδίζει το σωστό λεπτοτεμαχισμό και κατά συνέπεια την παραπάνω διάνοιξη των μυϊκών ινών, με αποτέλεσμα την κακή συνδετική ικανότητα της κρεατόπαστας. Η κρεατόπαστα ενθηκεύεται, συνήθως, σε φυσικές ή τεχνητές θήκες διαφόρων διαμέτρων, και δέχεται ήπια θερμική επεξεργασία, δηλαδή παστερίωση, και ενδεχομένως θερμό καπνισμό. Η παστερίωση προκαλεί τη μετουσίωση των μυϊκών πρωτεϊνών σε όλη τη μάζα του προϊόντος, γεγονός που καθιστά αυτό συνεκτικό και διατμητό. Ο καπνισμός, με τις φαινολικές και άλλες ουσίες που περιέχει, προσδίδει στα προϊόντα κρέατος χαρακτηριστική οσμή και

γεύση, ενώ σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες συμβάλλει και στη μικροβιολογική τους σταθερότητα (Μπλούκας, 2007). Περισσότερες από 1100 χημικές ουσίες έχουν ταυτοποιηθεί στον καπνό, η σύσταση του οποίου καθορίζεται από το είδος του ξύλου, τις συνθήκες κάπνισης, καθώς και τη μετέπειτα επεξεργασία του (Wilms, 2000).

### 1.3 Κρεατογαλάκτωμα

Πολλοί επιστήμονες χαρακτηρίζουν την έντονα λεπτοτεμαχισμένη ομοιογενή κρεατόπαστα ως κρεατογαλάκτωμα λίπους σε νερό (meat emulsion). Στο γαλάκτωμα αυτό, την ασυνεχή φάση αποτελούν τα τεμαχίδια και οι σταγόνες λίπους, η διάμετρος των οποίων μπορεί να ξεπερνά τα 60 μm. Η συνεχής φάση είναι το νερό μέσα στο οποίο είναι διαλυμένα διάφορα άλατα και πρωτεΐνες, ενώ απαντούν διασκορπισμένες σε αυτό αδιάλυτες πρωτεΐνες, καθώς και τμήματα θρυμματισμένων μυϊκών ινών και συνδετικού ιστού, έτσι ώστε να σχηματίζεται ένα κολλοειδές σύστημα. Οι διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες του κρέατος ενεργούν ως γαλακτωματοποιητές και καλύπτουν όλες τις επιφάνειες των τεμαχιδίων και σταγόνων λίπους. Πιο συγκεκριμένα, όταν το μόριο μιας πρωτεΐνης βρεθεί στη διαχωριστική επιφάνεια των δύο φάσεων, οι πλευρικές της ομάδες προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι πολικές της ομάδες να στραφούν προς το νερό και οι μη πολικές προς το λίπος. Ως αποτέλεσμα του προσανατολισμού αυτού επέρχεται διατάραξη της δομής της πρωτεΐνης και προκαλείται, σε κάποια έκταση, ξεδίπλωμα του μορίου της. Έτσι, τα τεμαχίδια ή οι σταγόνες λίπους περιβάλλονται από μια λεπτή μεμβράνη πρωτεΐνης, ελαφρά μετουσιωμένης, η οποία προσδίδει μηχανική προστασία έναντι της τάσης που έχουν να συνενωθούν μεταξύ τους. Από τις πρωτεΐνες του κρέατος μεγάλη γαλακτωματοποιητική ικανότητα έχουν οι αλατοδιαλυτές πρωτεΐνες των μυϊκών ινιδίων, και ειδικότερα η μυοσίνη και η ακτίνη, όταν δεν είναι ενωμένες με τη μορφή της ακτινομυοσίνης. Αντίθετα, οι υδατοδιαλυτές σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες έχουν μειωμένη γαλακτωματοποιητική ικανότητα και οι αδιάλυτες πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού πολύ περιορισμένη (Μπλούκας, 2007).

Πολλοί, επίσης, επιστήμονες χαρακτηρίζουν την έντονα λεπτοτεμαχισμένη κρεατόπαστα ως ένα γαλάκτωμα τύπου γέλης (gel-type emulsion). Σε αυτό τα τεμαχίδια και οι σταγόνες λίπους είναι ομοιόμορφα διανεμημένα σ' ένα συνεχές τρισδιάστατο πρωτεϊνικό πλέγμα υπό μορφή κολλοειδούς πηκτώματος (protein gel matrix), χωρίς ωστόσο να περιβάλλονται απαραίτητα από πρωτεϊνική μεμβράνη. Στο τρισδιάστατο αυτό πρωτεϊνικό πλέγμα συγκρατείται, επίσης, το νερό που προστίθεται κατά την παραγωγική διαδικασία (Μπλούκας, 2007).

#### 1.4 Σταθερότητα της κρεατόπαστας

Ανεξάρτητα από τη μορφή την οποία έχει η έντονα λεπτοτεμαχισμένη ομοιογενής κρεατόπαστα, δηλαδή κρεατογαλάκτωμα λίπους σε νερό ή γαλάκτωμα τύπου γέλης, αυτή χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι: α) το λίπος έχει διαιρεθεί σε μικρά τεμαχίδια, τα οποία είναι ομοιόμορφα διανεμημένα σε όλη τη μάζα της, και β) οι αλατοδιαλυτές μυϊκές πρωτεΐνες συγκρατούν αφενός το λίπος ομοιόμορφα κατανεμημένο εντός της κρεατόπαστας και αφετέρου το προστιθέμενο, κατά την παραγωγή της, νερό.

Κατά τη θερμική επεξεργασία του προϊόντος, και μάλιστα σε θερμοκρασίες γύρω στους 40°C, αρχίζει η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Έτσι, σταθεροποιείται η πρωτεϊνική μεμβράνη γύρω από τα τεμαχίδια λίπους, καθώς και το τρισδιάστατο πρωτεϊνικό πλέγμα στην κρεατόπαστα.

Παράλληλα με τη θέρμανση τα τεμαχίδια λίπους αρχίζουν να ρευστοποιούνται μετατρέπόμενα σε σταγόνες λίπους. Όμως, ενώ οι πρωτεΐνες με τη μετουσίωση που υφίστανται συστέλλονται, τα τεμαχίδια και οι σταγόνες λίπους διαστέλλονται. Αν οι πρωτεϊνικές μεμβράνες και το πρωτεϊνικό πλέγμα είναι αρκετά ισχυρά, ώστε να αντέξουν τις δυνάμεις που ασκούνται από τα τεμαχίδια και τις σταγόνες λίπους, τότε το ρευστοποιημένο λίπος δεν μπορεί να εξέλθει και να συνενωθεί σε μεγαλύτερες σταγόνες, παραμένοντας έτσι εγκλωβισμένο στο πρωτεϊνικό πλέγμα. Παράλληλα, και το νερό που προστίθεται κατά την παρασκευή της κρεατόπαστας συγκρατείται από τις πρωτεΐνες του κρέατος. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η σταθερότητα της κρεατόπαστας και η μετατροπή της κατά τη θέρμανση σε μια συνεκτική, τρυφερή και χυμώδη κρεατόμαζα, η οποία μπορεί έπειτα να κοπεί σε λεπτές φέτες.

Ωστόσο, αν η σχηματιζόμενη κρεατόπαστα δεν είναι σταθερή, τότε κατά τη θέρμανση είναι πιθανό να συμβούν τα φαινόμενα: α) της αποβολής λίπους και β) ζελατίνης. Κατά την αποβολή ζελατίνης, το νερό μαζί με τη ζελατίνη, η οποία προκύπτει (κατά τη θερμική επεξεργασία) από τη ρευστοποίηση του κολλαγόνου, εξέρχονται από το πρωτεϊνικό πλέγμα και συγκεντρώνονται σε θύλακες στο εσωτερικό ή την περιφέρεια του προϊόντος. Κατά την αποβολή λίπους, οι σταγόνες του ρευστοποιημένου λίπους εξερχόμενες από το πρωτεϊνικό πλέγμα ενώνονται σε μεγαλύτερες σταγόνες και συγκεντρώνονται υπό μορφή θυλάκων στο εσωτερικό ή στην περιφέρεια του προϊόντος κάτω από τη θήκη. Τα δύο ανωτέρω φαινόμενα αποτελούν σοβαρά τεχνολογικά ελαττώματα των παστεριωμένων αλλαντικών.



## **1.5 Επιλογή πρώτων υλών**

### **1.5.1 Κρέας**

Η επιλογή του κατάλληλου κρέατος αποτελεί προϋπόθεση για την παραγωγή καλής ποιότητας παστεριωμένων αλλαντικών. Για την παραγωγή των προϊόντων αυτών απαιτείται κρέας: α) με υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού, β) με μεγάλη περιεκτικότητα σε αλατοδιαλυτές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν υψηλή γαλακτωματοποιητική ικανότητα, και γ) με υψηλή ικανότητα εκχύλισης των πρωτεϊνών αυτών. Βασικά κριτήρια επιλογής του κρέατος αποτελούν η φυσική κατάσταση και το pH του.

#### **1.5.1.1 Φυσική κατάσταση του κρέατος**

Το κρέας διακρίνεται με βάση τη φυσική του κατάσταση σε θερμό και ψυχρό. Ως θερμό κρέας χαρακτηρίζεται το κρέας που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και δεν έχει εισέλθει στη φάση της νεκρικής ακαμψίας. Στο κρέας αυτό η παρουσία της ATP παρεμποδίζει το σχηματισμό ακτινομυοσίνης και τα νημάτια της ακτίνης και μυοσίνης στο κάθε σαρκομερίδιο δεν ενώνονται μεταξύ τους με εγκάρσιους δεσμούς. Στην κατάσταση αυτή το κρέας έχει την ικανότητα να συγκρατεί στα μυϊκά ινίδια μεγάλες ποσότητες νερού στους κενούς χώρους μεταξύ των χονδρών και λεπτών νηματίων. Το κρέας μετά την είσοδό του στη νεκρική ακαμψία χαρακτηρίζεται ως ψυχρό κρέας. Το εν λόγω κρέας έχει περιορισμένη ικανότητα συγκράτησης νερού και μειωμένη ικανότητα εκχύλισης των αλατοδιαλυτών πρωτεϊνών.

Το πλέον κατάλληλο για την παραγωγή παστεριωμένων αλλαντικών θεωρείται το θερμό κρέας. Με τον λεπτοτεμαχισμό του καταστρέφεται η δομή της μυϊκής ίνας και ελευθερώνονται τα μυϊκά ινίδια. Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου και νερού δημιουργεί το αλατούχο διάλυμα, το οποίο διεισδύει στους κενούς χώρους και προκαλεί τη διόγκωση των χώρων αυτών και κατ' επέκταση των μυϊκών ινιδίων, βοηθώντας στη σταδιακή απελευθέρωση και διάλυση των αλατοδιαλυτών πρωτεϊνών. Από το θερμό κρέας εκχυλίζεται η μεγαλύτερη ποσότητα αλατοδιαλυτών πρωτεϊνών, η οποία συμβάλλει στο σχηματισμό σταθερής κρεατόπαστας. Το πλεονέκτημα του θερμού κρέατος διατηρείται στο μεν κρέας των βοοειδών 4 έως 5 ώρες, στο δε χοιρινών 1 ώρα μετά τη σφαγή. Διάφορα προβλήματα που σχετίζονται με το μέγεθος, καθώς και την οργάνωση της μονάδας παραγωγής καθιστούν αδύνατη τη χρήση θερμού κρέατος για την παραγωγή παστεριωμένων αλλαντικών.

Το θερμό κρέας δεν παρουσιάζει πάντοτε υψηλή ικανότητα σύνδεσης. Έτσι παρουσιάζονται σποραδικά ζώα των οποίων το κρέας έχει περιορισμένη ικανότητα σύνδεσης λόγω αλλαγής τροφής και άλλων παραγόντων. Για το λόγο αυτό, ενδείκνυται η ανάμειξη κρέατος πολλών ζώων πριν από την επεξεργασία τους, ώστε να αποφευχθούν τέτοιοι κίνδυνοι.

#### **1.5.1.1.1 Διατήρηση των ιδιοτήτων του θερμού κρέατος**

Οι ιδιότητες του θερμού κρέατος μπορούν να διατηρηθούν με το προαλάτισμα και την υπερταχεία κατάψυξη του κρέατος.

Με την έγκαιρη προσθήκη χλωριούχου νατρίου στο θερμό κρέας, σε ποσοστό 3%, ή την προσθήκη μίγματος χλωριούχου νατρίου και νιτρωδών αλάτων, διατηρείται η ικανότητα διαχωρισμού της ακτινομυοσίνης σε ακτίνη και μυοσίνη. Θεωρείται πως με την πρόσληψη των ιόντων των αλάτων αυτών τα ηλεκτρικά φορτία των πρωτεϊνών επηρεάζονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε παρά την αποικοδόμηση της ATP, να παρεμποδίζεται η συνένωση ακτίνης και μυοσίνης. Για να διατηρηθούν όμως οι ιδιότητες του θερμού κρέατος με το προαλάτισμα, πρέπει τα άλατα να εισχωρήσουν με διάχυση σε όλα τα σημεία του κρέατος, πριν ακόμα εισέλθει η αποικοδόμηση της ATP. Η διεργασία αυτή διευκολύνεται με το λεπτοτεμαχισμό του κρέατος. Θερμό κρέας το οποίο δέχτηκε την παραπάνω επεξεργασία διατηρεί υψηλή ΙΣΝ έως και 3 ημέρες συντηρούμενο υπό ψύξη σε θερμοκρασία 0-2°C.

Οι ιδιότητες του θερμού κρέατος μπορούν να διατηρηθούν με την υπερταχεία κατάψυξή του, υπό την προϋπόθεση ότι η θερμοκρασία στο εσωτερικό του πρέπει να μειωθεί στους -18°C εντός 4 ωρών από τη σφαγή του ζώου για το βοδινό κρέας και εντός 1 ώρας για το χοιρινό. Το κρέας πρέπει να διατηρηθεί σε σταθερή θερμοκρασία, χαμηλότερη από -18°C και να τεθεί σε επεξεργασία στο κούτερ χωρίς προηγούμενη απόψυξη. Αν αποψυχθεί, τότε κατά την απόψυξη δραστηριοποιούνται τα ένζυμα που διασπούν το ATP και επιφέρουν γρήγορα την απώλεια της ιδιότητας του θερμού κρέατος. Ακόμα καλύτερα αποτελέσματα για τη διατήρηση της ιδιότητας του θερμού κρέατος επιτυγχάνονται, όταν η υπερταχεία κατάψυξη συνδυαστεί με το προαλάτισμα ή τη χρήση κρυοπροστατευτικών ουσιών. Οι ουσίες αυτές αναμειγνύονται με το κρέας πριν την κατάψυξη και με διάχυση διεισδύουν στο εσωτερικό της μυϊκής μάζας αυξάνοντας την επιφανειακή τάση του νερού και εμποδίζοντας την απομάκρυνση των μορίων του από τις πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίησή τους. Την πλέον αποτελεσματική κρυοπροστατευτική ουσία

θεωρείται η πολυδεξτρόζη. Η δράση της αυξάνεται σημαντικά όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με πολυφωσφορικά άλατα.

#### **1.5.1.1.2 Επεξεργασία του ψυχρού κρέατος**

Στο ψυχρό κρέας, όπως ήδη αναφέρθηκε, λόγω της αποικοδόμησης της ATP και του σχηματισμού της ακτινομοουσίνης, η ικανότητα συγκράτησης νερού και η εκχύλιση των πρωτεϊνών παρουσία αλατούχου διαλύματος υψηλής ιονικής ισχύος είναι σημαντικά περιορισμένες. Η κατάσταση αυτή μπορεί να αντιστραφεί με την προσθήκη φωσφορικών αλάτων. Αυτά διασπούν τους δεσμούς της ακτινομοουσίνης ελευθερώνοντας τη μυσίνη από την ακίνη. Έτσι, το αλατούχο διάλυμα μπορεί και πάλι να δράσει και να προκαλέσει την εκχύλιση των αλατοδιαλυτών πρωτεϊνών.

#### **1.5.1.2 Επιλογή του κρέατος με βάση το pH**

Το pH του κρέατος επηρεάζει: α) την ικανότητα συγκράτησης νερού και κατ' επέκταση την απόδοση σε τελικό προϊόν, το χυμώδες και τη συνεκτικότητα του προϊόντος, β) την ποσότητα των μυϊκών πρωτεϊνών που εκχυλίζονται από το κρέας, γ) την ικανότητα πρόσληψης των προστιθέμενων ουσιών, και επομένως το χρώμα και τη γεύση του προϊόντος, και δ) την ικανότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών, και συνεπώς τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Παρ' όλα τα πλεονεκτήματα του θερμού κρέατος στην παρασκευή των παστεριωμένων αλλαντικών, η αποκλειστική χρησιμοποίησή του ή η χρησιμοποίηση κρέατος με υψηλή τιμή pH παρουσιάζει μειονεκτήματα στο σχηματισμό και στη διατήρηση του χρώματος, καθώς και στη συντηρησιμότητα του προϊόντος, ιδίως προϊόντων συσκευασμένων υπό κενό. Έτσι, η χρησιμοποίηση μιας καλής βοηθητικής ουσίας του χρώματος που περιέχει ασκορβικό οξύ κρίνεται απαραίτητη για τον καλό σχηματισμό και διατήρηση του χρώματος. Προϊόντα παρασκευαζόμενα με κρέας υψηλού pH δεν πρέπει να προορίζονται για συσκευασία κενού, διότι ευνοείται η ανάπτυξη μικροοργανισμών σήψης, με αποτέλεσμα την περιορισμένη διάρκεια ζωής του προϊόντος.

Για την παραγωγή παστεριωμένων αλλαντικών κατάλληλο θεωρείται το κρέας το οποίο δεν παρουσιάζει αποκλίσεις P.S.E (Pale, Soft & Exudative) και D.F.D (Dark, Firm & Dry) κρέατος και γενικά έχει υψηλή τιμή pH. Ως το πλέον κατάλληλο θεωρείται το χοιρινό κρέας με pH 6.0 και το βοδινό με pH 5.8.

Σε κρέας με κανονικές ιδιότητες παρατηρείται μια βραδεία πτώση της τιμής του pH, έτσι ώστε παρουσιάζεται στα χοιρινά μια τελική τιμή pH περίπου 5.8 ή μικρότερη

σε 24 ώρες μετά τη σφαγή. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η τιμή του pH φθάνει σε 45 μόλις λεπτά μετά τη σφαγή κάτω από 5.8, οπότε παρουσιάζεται η περίπτωση του P.S.E-κρέατος. Το P.S.E-κρέας μπορεί να χαρακτηριστεί ως ωχρό/αποχρωματισμένο, μαλακό και εξιδρωματικό, το οποίο εμφανίζει μικρή ικανότητα συγκράτησης νερού. Αντίθετα, υπάρχουν περιπτώσεις όπου, λόγω της ύπαρξης χαμηλών ποσοτήτων γλυκογόνου πριν τη σφαγή, παρατηρείται μικρή πτώση της τιμής του pH. Έτσι, όταν το pH 24 ώρες μετά τη σφαγή παρουσιάζει τιμή μεγαλύτερη του 6.2 έχουμε το D.F.D-κρέας. Το κρέας αυτό παρουσιάζει σκοτεινό χρωματισμό, συμπαγή σύσταση και ξηρή/στεγνή επιφάνεια, καθώς και υψηλή ικανότητα συγκράτησης νερού και μειωμένη συντηρησιμότητα. Ο ρυθμός της πτώσης του pH και ο σχηματισμός P.S.E- ή D.F.D- κρέατος εξαρτώνται τόσο από γενετικούς, όσο και από στρεσογόνους παράγοντες που επιδρούν στα ζώα πριν ή κατά τη διάρκεια της σφαγής.

### **1.5.2 Λιπώδης ιστός**

Ο λιπώδης ιστός που χρησιμοποιείται στην παρασκευή των παστεριωμένων αλλαντικών πρέπει να είναι κατά το δυνατό φρέσκος, κοκκώδης και συνεκτικός, όπως θεωρείται το λαρδί των παρειών και του τραχήλου και εν μέρει της ωμοπλάτης, της ράχης και των κοιλιακών τοιχωμάτων. Ως κοκκώδες θεωρείται το λαρδί, το οποίο παρουσιάζει υψηλό σημείο τήξεως, ενώ η συνεκτικότητά του εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε συνδετικό ιστό (κολλαγόνο). Όσο μεγαλύτερη η ποσότητα κολλαγόνου, τόσο στερεότερο το λαρδί.

Το σημείο τήξεως του λιπώδη ιστού επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά από την τροφή, καθώς και από την ηλικία του ζώου. Έτσι, οι χοίροι που εκτρέφονται με τροφές που περιέχουν μεγάλη ποσότητα ακόρεστων λιπαρών οξέων εμφανίζουν χαμηλό σημείο τήξεως του λιπώδη ιστού τους (μαλακός λιπώδης ιστός), ο οποίος δεν είναι κατάλληλος για την παρασκευή παστεριωμένων αλλαντικών, διότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, κατά τη συγκοπή στο κούτερ, αρχίζει να ρευστοποιείται. Λαρδί, το οποίο φθάνει σε θερμοκρασία ρευστοποίησης στο κούτερ, αποβάλλεται από την κρεατόπαστα, κατά τη θερμική επεξεργασία με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα στρώμα λίπους κάτω από τη θήκη. Επιπλέον, το λαρδί με την αύξηση της ηλικίας και του βάρους των χοίρων γίνεται σταδιακά στερεότερο και περισσότερο κοκκώδες.

### 1.5.3 Προστιθέμενες ουσίες

Για την παραγωγή των προϊόντων κρέατος θεωρείται τεχνολογικά απαραίτητη η προσθήκη του χλωριούχου νατρίου, των νιτρωδών αλάτων, του ασκορβικού οξέως ή του στερεοϊσομερούς του ερυθροβικού, των καρυκευμάτων και των ουσιών ενίσχυσης της γεύσης και του αρώματος, και σε ορισμένες περιπτώσεις των φωσφορικών αλάτων.

#### 1.5.3.1 Χλωριούχο Νάτριο (NaCl)

Η τεχνολογική σημασία του χλωριούχου νατρίου έγκειται στο γεγονός πως σχηματίζει με το προστιθέμενο νερό το αλατούχο διάλυμα, το οποίο διαλυτοποιεί και εκχυλίζει τις πρωτεΐνες των μυϊκών ινιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές δρουν ως γαλακτωματοποιητές. Επιπλέον, οι εκχυλιζόμενες πρωτεΐνες διογκώνονται και συγκρατούν το προστιθέμενο νερό. Η περιεχόμενη ποσότητα NaCl κυμαίνεται από 1,6 έως 2,2% (Ραμαντάνης, 2006). Επιπρόσθετα, η δράση των φωσφορικών και κιτρικών αλάτων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του NaCl. Εάν, δεν προστεθεί ή προστεθεί μικρή ποσότητα αυτού δεν αναπτύσσεται η πλήρης δράση τους. Επομένως, είναι βασικό στοιχείο της ποιότητας του προϊόντος.

#### 1.5.3.2 Φωσφορικά άλατα και άλατα των εδώδιμων οξέων

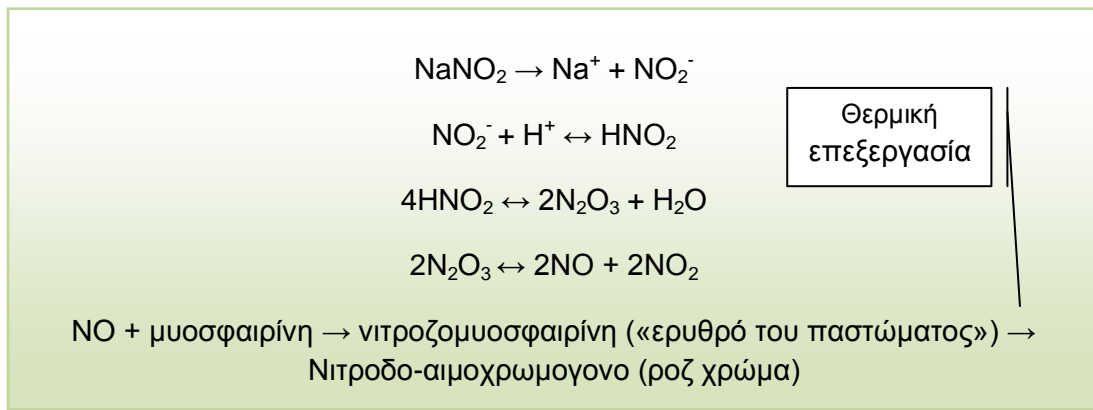
Τα φωσφορικά άλατα είναι τεχνολογικά απαραίτητα στην παραγωγή των παστεριωμένων αλλαντικών μόνο στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ψυχρό κρέας. Ως πλέον κατάλληλα θεωρούνται το μονόξινο και δισόξινο πυροφωσφορικό νάτριο, το πυροφωσφορικό νάτριο και κάλιο και το τρι- πολυφωσφορικό νάτριο. Τα άλατα των εδώδιμων οξέων (κιτρικού, γαλακτικού, οξικού και τρυγικού) προκαλούν αύξηση της ιονικής ισχύος της κρεατόπαστας, δρουν δηλ. όπως το NaCl.

#### 1.5.3.3 Νιτρικά άλατα

Πολυάριθμες μελέτες σχετικές με το πάστωμα του κρέατος υποδεικνύουν πως αυτό προκαλείται από τη χρήση άλατος σε συνδυασμό με νιτρικό κάλιο ή νάτριο (Peg & Shahidi, 2000). Στα τέλη του 1800, ανακαλύφθηκε πως τα νιτρικά μετατρέπονται σε νιτρώδη μέσω των νιτροαναγωγικών βακτηρίων, και πως τα νιτρώδη είναι ο πραγματικός παράγοντας παστώματος (Sebranek & Bacus, 2007). Στο πρώτο μισό του 20ου αιώνα παρατηρήθηκε μια σταδιακή μετάβαση από τη χρήση νιτρικών στη χρήση νιτρωδών, λόγω του ταχύτερου χρόνου και της αυξημένης παραγωγής, καθώς και της καλύτερης κατανόησης της δομής τους (Sebranek & Bacus, 2007).

### 1.5.3.4 Νιτρώδη άλατα

Τα νιτρώδη άλατα σταθεροποιούν το κόκκινο χρώμα του κρέατος, αναστέλλουν την ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, συμβάλλουν στην ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης των αλλαντικών (Merino et al., 2016), καθώς επίσης παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση παρεμποδίζοντας την οξείδωση των λιπών (Ραμαντάνης, 2006).



Εικόνα 1: Αντιδράσεις σχηματισμού του χρώματος στα παστεριωμένα αλλαντικά (Tarté, 2009).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, κατά τη δημιουργία του ερυθρού του παστώματος αντιδρά η χρωστική ουσία του μυός, η μυοσφαιρίνη, με το μονοξειδίο του αζώτου ( $\text{NO}$ ), το οποίο σε όξινο περιβάλλον, δημιουργείται από τα νιτρώδη ( $\text{NO}_2$ ). Η ένωση του  $\text{NO}$  με τη μυοσφαιρίνη καλείται νιτροζομυοσφαιρίνη και είναι σχετικά ανθεκτική στο οξυγόνο και στο φως. Κατά τη θέρμανση μετατρέπεται στο νιτροδο-αιμοχρωμογόνο, το οποίο παραμένει σταθερό ακόμη και μετά από τυχόν επαναθέρμανσή τους. Η δημιουργία του  $\text{NO}$ , και στη συνέχεια η αντίδρασή του με τη μυοσφαιρίνη επηρεάζεται σημαντικά από παράγοντες όπως  $T$ ,  $\text{pH}$ ,  $\text{O}_2$  και αναγωγικές ουσίες. Η ελάχιστη αναγκαία ποσότητα νιτρωδών για το σχηματισμό ενός ικανοποιητικού χρώματος στα παστεριωμένα αλλαντικά, θεωρείται από 30 έως 40 ppm (mg/Kg) (Ραμαντάνης, 2006).

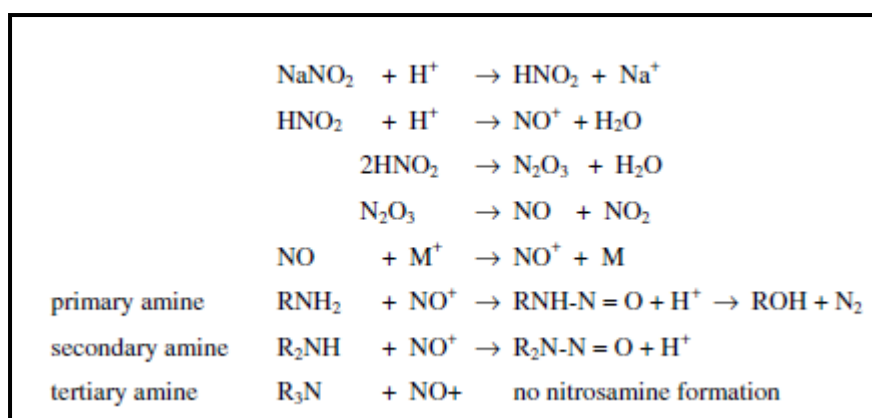
Η αντιμικροβιακή δράση δεν προκύπτει από τα νιτρώδη αυτά καθαυτά, αλλά από ενώσεις σχηματιζόμενες κατά την επεξεργασία των τροφίμων, όπως είναι τα νιτροζοθειολικά σύμπλοκα με σίδηρο, τα οποία σχηματίζονται κατά τη θέρμανση. Οι μηχανισμοί δράσης των παραγόμενων ενώσεων αφορούν την παρεμπόδιση ενζύμων, την αντίδραση με πρωτεΐνες απαραίτητες στο βακτηριακό μεταβολισμό και

τη γονιδιακή ρύθμιση, τη μεταβολή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς και την αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη πρόσληψη θρεπτικών συστατικών (Cammack et al., 1999).

Το νιτρώδες νάτριο που χρησιμοποιείται κατά το πάστωμα του κρέατος, την επεξεργασία δηλαδή με χλωριούχο νάτριο (NaCl) και νιτρώδη, αντιδρά με διάφορα συστατικά του κρέατος, με αποτέλεσμα στο τέλος της επεξεργασίας μόνο το 10-20% αυτού μπορεί να ανιχνευθεί (Jiménez-Colmenero et al., 2001).

Παρά τα τεχνολογικά, μικροβιολογικά και οργανοληπτικά πλεονεκτήματα των νιτρωδών, η χρήση τους τέθηκε υπό αμφισβήτηση τη δεκαετία του 1970, λόγω της αντίδρασης της υπολειπόμενης ποσότητας νιτρωδών με ενώσεις που περιέχουν άζωτο, όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια, αμινοξέα και αμίνες, σε όξινο περιβάλλον, προς σχηματισμό N-νιτροζοενώσεων (νιτροζαμίνες, νιτροζαμίδια κτλ.).

Οι χημικές αυτές ενώσεις έχουν τοξικές, μεταλλαξιογόνες, νευρο- και νεφροτοξικές, καθώς και καρκινογόνες ιδιότητες. Οι περισσότερες τοξικές από αυτές είναι η διμεθυλο-νιτροζαμίνη (DMNA) και η διαιθυλο-νιτροζαμίνη (DNA) (Rywoycki, 2002). Οι ενώσεις αυτές σχηματίζονται τόσο στο ίδιο το προϊόν, ανάλογα με τις συνθήκες θέρμανσης, τη συγκέντρωση άλατος και νιτρωδών, το pH, καθώς και την περιεκτικότητα ασκορβικού, όσο και στο στομάχι μετά την κατανάλωση (Pegg & Shahidi, 1997). Ο ρυθμός σχηματισμού των νιτροζαμινών είναι ανάλογος με το τετράγωνο της συγκέντρωσης των νιτρωδών (Peg & Shahidi, 2000).



Εικόνα 2: Σχηματισμός νιτροζαμινών (Honikel, 2008).

Σύμφωνα με την Εικόνα 2 παρατηρούμε πως μόνο με την αντίδραση NO με δευτεροταγείς αμίνες σχηματίζονται σταθερές νιτροζαμίνες. Οι τροτοταγείς αμίνες δεν αντιδρούν, ενώ τα προϊόντα της αντίδρασης του NO με πρωτοταγείς αμίνες είναι αλκοόλη και άζωτο.

Πολλές δημοσιεύσεις επιβεβαιώνουν την αποτελεσματικότητα του νιτρώδους νατρίου στην αναστολή της ανάπτυξης, καθώς και στην παραγωγή τοξίνης από το *Clostridium botulinum* στα αλλαντικά. Ωστόσο, η ασφάλεια αυτών των προϊόντων δεν αποδίδεται μόνο στη χρήση νιτρωδών, αλλά σε έναν αριθμό παραγόντων που δρουν συνεργιστικά, όπως η θερμική επεξεργασία, το pH, το αλάτι, το δυναμικό οξειδοαναγωγής, καθώς και ο αρχικός πληθυσμός των σπορίων, ο οποίος θα πρέπει να είναι χαμηλός (EFSA Journal, 2003). Άλλοι παράγοντες, όπως το ασκορβικό ή το ισοασκορβικό, έχει αναφερθεί πως πιθανόν βελτιώνουν την αποτελεσματικότητα των νιτρωδών. Ένας από τους λόγους χρήσης του ασκορβικού είναι πως, σε ποσότητα ίση με αυτή των νιτρωδών, επιφέρει μείωση του σχηματισμού νιτροζαμινών (Motttram et al., 1975). Οι αντιδράσεις μέσω των οποίων επιφέρεται η μείωση αυτή δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Ενδεχομένως να οφείλεται στη μείωση της υπολειπόμενης ποσότητας νιτρωδών ή στη δέσμευση του μονοξειδίου του αζώτου από το ασκορβικό και στην επιβραδυνόμενη αποδέσμευσή του (Honikel, 2008). Επιπρόσθετα, οι King et al. (2015) έδειξαν πως η συνδυαστική χρήση 75 ppm νιτρωδών και 250 ppm ασκορβικού περιόρισαν αποτελεσματικά την εκβλάστηση του *Clostridium perfringens* κατά τη ψύξη παστεριωμένου αλλαντικού διάρκειας 15 h. Εκτός από τα ανωτέρω πλεονεκτήματα της χρήσης των ενώσεων του ασκορβικού ή ερυθροβικού οξέως, αυτές αυξάνουν το σχηματισμό του ερυθρού του παστώματος και το διατηρούν κατά την αποθήκευση του προϊόντος (Peg & Shahidi, 2000).

Εκτός από το σχηματισμό N-νιτροζοενώσεων, τα νιτρώδη προκαλούν τη μη αναστρέψιμη μετατροπή της αιμοσφαιρίνης σε μεθαιμοσφαιρίνη, η οποία παρουσιάζει αδυναμία στη σύνδεση και μεταφορά του οξυγόνου (Chan, 1996). Ο κίνδυνος αυτός είναι ιδιαίτερα σοβαρός για τις έγκυες και τα βρέφη (Knobeloch et al., 2000).

### **1.5.3.5 Αντιμικροβιακές ουσίες φυσικής προέλευσης (clean labeling)**

Όπως προαναφέρθηκε, ποικίλες αντιμικροβιακές ουσίες χρησιμοποιούνται, εδώ και χρόνια, ως πρόσθετα των τροφίμων (food additives) ή ως βοηθητικές ουσίες (processing aids) με πρωταρχικό σκοπό την επέκταση της διάρκειας ζωής, καθώς και της διατήρησης της ποιότητας των κρεατοσκευασμάτων. Η χρήση των μέσων αυτών οδηγεί συχνά στην παρουσία υπολειμμάτων ή παραγώγων ουσιών στο τελικό προϊόν. Στις μέρες μας, η εφαρμογή χημικών συντηρητικών έχει αμφισβητηθεί λόγω των πιθανών τοξικών και καρκινογόνων επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. Τόσο η σπουδαιότητα των θεμάτων που αφορούν τη δημόσια υγεία, όσο και η τάση



προς την εφαρμογή φυσικών τρόπων συντήρησης των τροφίμων, οδήγησε στην αναζήτηση και χρήση φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, έναντι των χημικών, και επακόλουθα στην επισήμανση της λεγόμενης «καθαρής ετικέτας» (clean-labeling). Η προσθήκη φυσικών αντιμικροβιακών, όπως είναι τα φυτικά εκχυλίσματα, καθώς και προβιοτικών βακτηρίων, τα οποία είναι ικανά να παράγουν βακτηριοσίνες, θεωρούνται πιθανοί δείκτες ποιότητας για τους ενημερωμένους καταναλωτές (Laukoná, 2011).

#### 1.5.3.5.1 Φυτικά εκχυλίσματα

Στα προϊόντα με βάση το κρέας τα φυτικά εκχυλίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνα τους ή σε συνδυασμό για ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα. Οι αντιμικροβιακές ουσίες που περιέχονται σε αυτά διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: φαινόλες, τερπενοειδή (αιθέρια έλαια), αλκαλοειδή, λεκτίνες και πολυακετυλένια (Cowan, 1999). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να τραυματίσουν την κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας στην διαρροή των κυτταρικών συστατικών, προκαλώντας έτσι την αδρανοποίηση ή τη θανάτωση των μικροοργανισμών (Oussalah et al., 2006). Η πλειοψηφία των εκχυλισμάτων αυτών παρουσιάζει αντιβιοτουλινικές ιδιότητες, οι οποίες αποδίδονται στα συστατικά τους, όπως τα ευγενόλη, ισοευγενόλη, D-βορνεόλη, κιτρονελλόλη, μενθόλη και κιναμική αλδεΐδη (Ueda et al., 1982). Η χρήση, επίσης, βοτάνων και καρυκευμάτων, όπως το δεντρολίβανο, το θυμάρι, το φασκόμηλο και το σκόρδο μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα των ετεροκυκλικών αρωματικών αμινών, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό το σχηματισμό των καρκινογόνων ουσιών στο κρεατοσκεύασμα (Murkovic et al., 1998).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν τα ανασταλτικά αποτελέσματα των αιθέριων ελαίων της κανέλας και του γαρύφαλλου έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε κιμά από κοτόπουλο (Hoque et al., 2008), των θυμαριού και βάλσαμου σε νωπό στήθος κοτόπουλου (Fратиanni et al., 2010), καθώς και του εκχυλίσματος λυκίσκου σε μαριναρισμένο χοιρινό (Kramer et al., 2015) έναντι μεγάλου εύρους αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Οι Cui et al. (2010) έδειξαν πως η συνδυαστική χρήση νιτρώδους νατρίου και εκχυλισμάτων από φασκόμηλο, γαρύφαλλο και μοσχοκάρυδο αναστέλλει την ανάπτυξη του *Clostridium botulinum*. Παρόμοια και τα ευρήματα των Nevas et al. (2004), σύμφωνα με τους οποίους τα αιθέρια έλαια της ρίγανης και του θυμαριού παρεμπόδισαν την ανάπτυξη των *C. botulinum* και *C. perfringens*.

Λαχανικά, όπως το σέλινο, το σπανάκι, το ραπανάκι και το μαρούλι περιέχουν σημαντική ποσότητα νιτρικών αλάτων, περισσότερο από 2500 mg/kg (Santamaria, 2006). Εκχύλισμα σέλινου, καθώς και σκόνη αυτού συχνά χρησιμοποιούνται ως φυσικές πηγές νιτρικών, κυρίως λόγω του ότι δεν προσδίδουν δυσάρεστες οσμές στα μεταποιημένα προϊόντα κρέατος, σε περιεκτικότητα έως 0,2-0,4% (Sebranek & Bacus, 2007; Sindelar et al., 2007). Επίσης, δεδομένου ότι περιέχει σημαντική ποσότητα νιτρικών, δεν αποτελεί την καλύτερη εναλλακτική πηγή, αν δεν γίνει παράλληλη χρήση νιτροαναγωγικών βακτηρίων (Alahakoon et al., 2015). Το ίδιο ισχύει και για τη σκόνη από σέσκουλο, η περιεκτικότητά της οποίας θα πρέπει να κυμαίνεται από 0,15-0,3% (Sebranek et al., 2012).

Επιπρόσθετα, τόσο το εκχύλισμα κράνμπερι, όσο και αυτό της τομάτας επιφέρουν μείωση του pH, αυξάνοντας έτσι την ποσότητα των νιτρικών που καταναλώνεται μέσω των αντιδράσεων παστώματος, μειώνοντας έτσι την υπολειπόμενη συγκέντρωσή του (Pegg & Shahidi, 2000). Οι Deda et al. (2007) έδειξαν πως μπορεί να μειωθεί η συγκέντρωση των νιτρικών από 150 σε 100 mg/kg σε λουκάνικα φρανκφούρτης, με την προσθήκη 12% πάστας τομάτας με 12% διαλυτά στερεά χωρίς αρνητικές επιπτώσεις στην επεξεργασία και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Τα καροτενοειδή στην τομάτα (όπως τα λυκοπένιο, β-καροτένιο, φυτοένιο, φυτοφλουένιο και λουτεΐνη (Choksi & Joshi, 2007)), είναι μεταξύ των βασικότερων ουσιών που χρησιμοποιούνται ως χρωστικές στα τρόφιμα (Francis et al., 2000). Η κατανάλωση προϊόντων τομάτας σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πεπτικού σωλήνα και του προστάτη (Tariero et al., 2004). Η προστατευτική αυτή δράση πιθανόν να οφείλεται στην ικανότητα του λυκοπένιου και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών να παρεμποδίζουν τις κυτταρικές βλάβες μέσω συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων (Friedman, 2002).

Νέα τάση αποτελεί η προσθήκη παραπροϊόντων εσπεριδοειδών σε προϊόντα κρέατος με σκοπό τη μείωση των καταλοίπων των νιτρικών. Τα εκχυλίσματα αυτών είναι πλούσια σε φυτικές ίνες, αντιοξειδωτικά, και βιοδραστικές ενώσεις, όπως το οργανικό οξύ και οι πολυφαινόλες, τα οποία μπορεί να χρησιμοποιούνται ως λειτουργικά συστατικά στα προϊόντα αυτά (Perez-Alvarez, 2008).

#### **1.5.3.5.2 Αντιμικροβιακές πρωτεΐνες**

Πέρα από τα φυτικά εκχυλίσματα, οι εξελίξεις στην έρευνα οδήγησαν στην ανακάλυψη πρωτεϊνών και πεπτιδίων με αντιμικροβιακές ιδιότητες, τα οποία

χρησιμοποιούνται στα προϊόντα με βάση το κρέας. Αυτά είναι η λακτοφερίνη, η λυσοζύμη και η νισίνη (Davidson & Branen, 2005).

Η λυσοζύμη, ένα λυτικό ένζυμο που βρίσκεται στο ασπράδι του αυγού, υδρολύει τους γλυκοσιδικούς δεσμούς που συνδέουν τα μόρια της πεπτιδογλυκάνης προκαλώντας διάρρηξη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Losso et al., 2000). Η λακτοφερίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία ανταγωνίζεται για την απόκτηση του σιδήρου, αναστέλλοντας την ανάπτυξη των βακτηρίων. Παρεμποδίζει την μικροβιακή προσκόλληση στις επιφάνειες του κρέατος διασπώντας τις πρωτεΐνες της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών παθογόνων βακτηρίων (Atef Yekta et al., 2010). Ενώ η λυσοζύμη αναστέλλει αποτελεσματικά τα Gram θετικά βακτήρια, η λακτοφερίνη παρουσιάζει μεγάλο εύρος αντιβακτηριακών και αντιϊικών ιδιοτήτων (Naidu, 2002).

Σε αντίθεση με τα φυτικά εκχυλίσματα και τις ανωτέρω αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, οι βακτηριοσίνες εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, είναι δραστικές σε ευρεία περιοχή pH και απαιτείται μικρή συγκέντρωση ώστε να είναι αποτελεσματικές (Cleveland et al., 2001). Ως βακτηριοσίνες χαρακτηρίζονται τα ριβοσωμικά συντιθέμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια, τα οποία συνήθως εμφανίζουν υψηλό βαθμό ειδικότητας έναντι στελεχών του ίδιου είδους ή/και ευρέος φάσματος αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Μεταξύ πολυάριθμων βακτηριοσινών, η νισίνη είναι η μόνη, της οποίας έχει εγκριθεί η εφαρμογή σε κρέας, πουλερικά, έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα με βάση το κρέας, καθώς και θήκες για λουκάνικα (USFDA, 2000b). Σε προϊόντα κρέατος, η νισίνη και η πεδιοσίνη, η οποία δεν έχει εγκριθεί άλλα έχει μελετηθεί ιδιαίτερα στα προϊόντα αυτά, χρησιμοποιούνται είτε για εξυγίανση είτε για τον έλεγχο της ανάπτυξης του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, ειδικότερα στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Ready To Eat) (Woraprayote et al., 2016). Σύμφωνα με τους Garde et al. (2014), η νισίνη και η ρετερίνη (Reuterin) μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων, καθώς και την εκβλάστηση των спорίων του *Clostridium perfringens*. Ωστόσο, η λυσοζύμη δεν ήταν ικανή να αναστείλει την ανάπτυξη σε κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη. Οι προαναφερθέντες βακτηριοσίνες νισίνη, ρετερίνη και πεδιοσίνη παράγονται από τους *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus reuteri* και *Pediococcus acidilactici*, αντίστοιχα.

#### **1.5.3.5.3 Οργανικά οξέα**

Η χρήση ιόντων των οργανικών οξέων, όπως τα γαλακτικό, οξικό, σορβικό, κιτρικό και βενζοϊκό βρίσκει ποικίλες εφαρμογές σε μεγάλο εύρος τροφίμων. Η

αντιμικροβιακή τους δράση οφείλεται στη μεταβολή της ενεργότητας νερού, τη μείωση του ενδοκυτταρικού pH, καθώς και τις αλλαγές στον κυτταρικό μεταβολισμό μέσω διακοπής της παραγωγής ATP (Maas, Glass, & Doyle, 1989). Το γαλακτικό οξύ είναι το περισσότερο χρησιμοποιούμενο οργανικό οξύ στα προϊόντα κρέατος, διότι λόγω της αλμυρής του γεύσης ενισχύει τα προϊόντα αυτά (Doorges, 2005). Συμβάλλει, επίσης, στη σταθεροποίηση του χρώματος στο νωπό κρέας, ενώ λειτουργεί και ως αντιοξειδωτικό (Brewer et al., 1995). Αξίζει να σημειωθεί πως το γαλακτικό οξύ επιτρέπεται ως πρόσθετο στην παραγωγή οργανικών προϊόντων, είτε φυτικής είτε ζωικής προέλευσης, χωρίς να υφίσταται ανώτατο επιτρεπόμενο όριο για τη χρήση του (Alahakoon et al., 2015). Οι Meng και Genigeorgis (1994) μελέτησαν την επίδραση του γαλακτικού νατρίου στην παραγωγή τοξίνης από πρωτεολυτικά και μη σπόρια του *C. botulinum*, τα οποία εμβολιάστηκαν σε μοσχάρι και στήθος κοτόπουλο τύπου «sous-vide». Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παραγωγή τοξίνης καθυστέρησε στο βόειο κρέας 2,4% και στο κοτόπουλο 1,8%. Οι Jones και Betts (2009) έδειξαν πως η προσθήκη 2% γαλακτικού καλίου είχε ανασταλτική δράση σε μη πρωτεολυτικά στελέχη του *C. botulinum* σε υγρή καλλιέργεια με 2% NaCl, pH= 5,5 σε θερμοκρασία 30°C. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, 2000 ppm βενζοϊκού νατρίου αναστέλλουν τον ίδιο μικροοργανισμό σε υγρή καλλιέργεια χωρίς την παρουσία άλατος.

Πίνακας 2: Μελέτες σχετικά με την πιθανή αντικατάσταση των νιτρικών από ουσίες φυτικής προέλευσης στα προϊόντα κρέατος (Alahakoon et al., 2015).

Potential alternatives	Concentrations used	Type of meat product/media	Effects	References
Green tea extract	1–2%	Ground beef meat	Reduced lipid oxidation and stabilized the meat color	Mustafa (2013)
Tea catechin with modified atmospheric packaging	200 mg/kg	Beef patties	Improved lipid stability and color stability	Tang <i>et al.</i> (2006)
Rosemary and oregano extract	0.02% of each	Raw pork batters	Higher antioxidant activity and prevention of color deterioration	Hernandez-Hernandez, Ponce-Alquicira, Jaramillo-Flores, and Legarreta (2009)
Grape seed extracts	0.00015–0.125%	Aqueous media	Impact on growth of <i>L. monocytogenes</i>	Bisha, Weinsattel, Brehm-Stecher, & Mendonca (2010)
Oregano and cranberry, with sodium lactate	Oregano and cranberry (50:50) at 750 ppm with 2% sodium lactate	Cooked ground beef	Impact growth of <i>L. monocytogenes</i> ,	Apostolidis, Kwon, and Shetty (2008)
Aqueous extract of <i>Coptis</i> rhizome with sodium nitrite	Sodium nitrite 6–8 ppm with 0.05% <i>Coptis</i> extract	Broth media	Synergistic antibotulinal activity, reducing sodium nitrite from 6–8 ppm–2 ppm with 0.05% <i>Coptis</i> extract	Cui <i>et al.</i> (2010)
Anka rice with nitrite	Anka rice 0.5% 25 ppm nitrite	Low-nitrite Chinese sausages	No difference with 100 ppm nitrite added, color stability	Liu, Wu, and Tan (2010)
Annatto ( <i>Bixa orellana</i> L.) powder	60% in sausage and 0.08, 0.31, and 0.16% (v/v) in broth	Sausage	Higher redness value, no growth of <i>C. perfringens</i> , control of <i>C. botulinum</i> growth	Zarringhalami, Sahari, and Hamidi-Esfehani (2009)
Grape seed extract, pine bark extract and oleoresin rosemary	1% each ingredient	Cooked beef	Impact growth of <i>L. monocytogenes</i>	Ahn, Grun, and Mustapha (2007)

## 1.6 Η μικροβιολογία των παστεριωμένων αλλαντικών

Η σύνθεση του προϊόντος, τα στάδια επεξεργασίας, η συσκευασία, καθώς και η θερμοκρασία συντήρησης καθορίζουν το είδος των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν και κατ' επέκταση το είδος της αλλοίωσης. Τα εν λόγω προϊόντα υφίστανται ήπια θερμική επεξεργασία σε θερμοκρασίες κυμαινόμενες από 65-75°C, με αποτέλεσμα τη θανάτωση της πλειονότητας των βλαστικών κυττάρων, όχι όμως των θερμοανθεκτικών εντεροκόκκων και των σποριογόνων βακτηρίων. Οι τελευταίοι μικροοργανισμοί, ωστόσο, δεν αλλοιώνουν τα προϊόντα αυτά.

Η συσκευασία υπό κενό αποτελεί κοινή μέθοδο για την επέκταση της διάρκειας ζωής των παστεριωμένων αλλαντικών. Το υπολειμματικό οξυγόνο συνήθως μειώνεται κάτω του 1% (Dainty, 1992). Οι χρησιμοποιούμενες μεμβράνες έχουν σ' ένα βαθμό διαπερατότητα στο οξυγόνο, με αποτέλεσμα να μην δημιουργούνται αυστηρά αναερόβιες συνθήκες. Κατά τη συντήρηση, οι αερόβιοι μικροοργανισμοί, όπως είναι οι ψευδομονάδες και οι μύκητες, αντικαθίστανται από προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Στα βακτήρια αυτά περιλαμβάνονται τα γένη *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Weissella* (Seman et al., 2002). Μικροοργανισμοί του γένους *Brochothrix* είναι, επίσης, υπεύθυνοι για την αλλοίωση των προϊόντων αυτών.

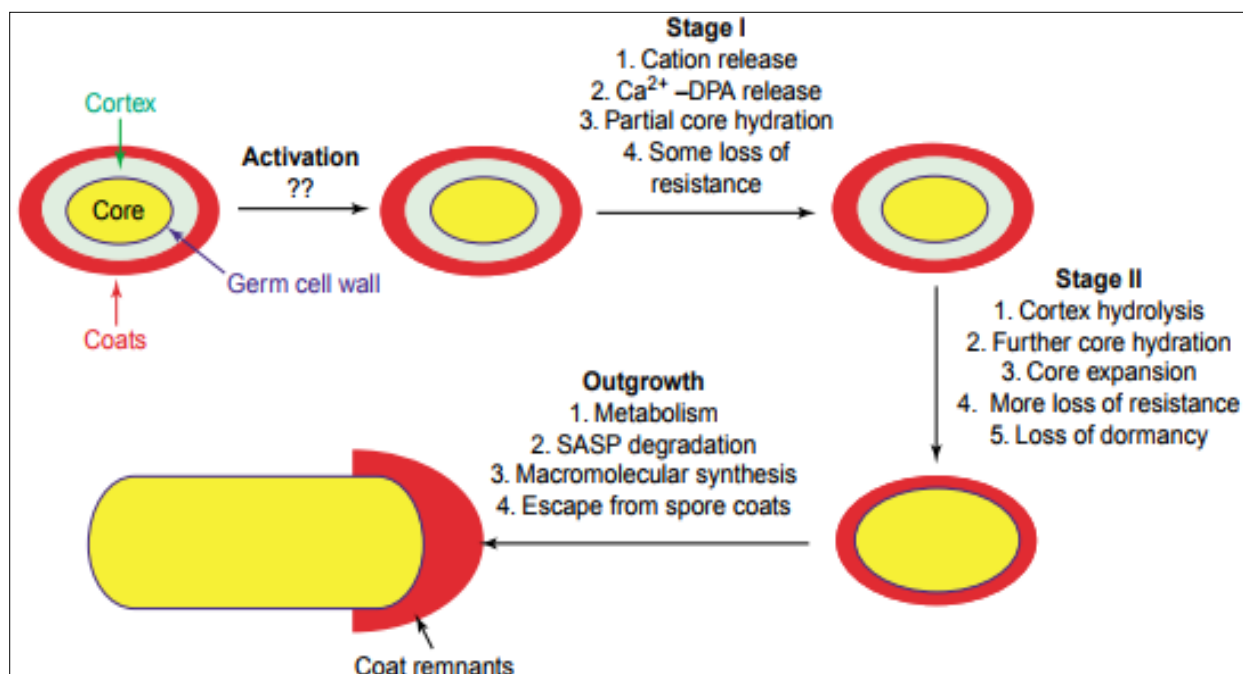
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατηγοριοποιούνται σε δύο ομάδες ανάλογα με τα τελικά προϊόντα από τη ζύμωση της γλυκόζης (Jay et al., 2005). Τα γένη *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, καθώς και μερικά στελέχη του γένους *Lactobacillus* θεωρούνται ομοζυμωτικά (homofermenters), μετατρέποντας την γλυκόζη σχεδόν στοιχειομετρικά προς γαλακτικό οξύ. Από την άλλη πλευρά, τα ετεροζυμωτικά (heterofermenters), στα οποία περιλαμβάνονται τα γένη *Leuconostoc* και *Carnobacterium*, καθώς και ορισμένοι λακτοβάκιλλοι, μετατρέπουν τη γλυκόζη προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και CO<sub>2</sub>. Πρωτεόλυση και λιπόλυση σπάνια λαμβάνουν χώρα στα προϊόντα αυτά λόγω της περιορισμένης ικανότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων να παράγουν τα απαιτούμενα ένζυμα.

### 1.6.1 *Clostridium* spp.

Τα είδη του γένους *Clostridium* είναι είτε αναερόβια είτε μικροαερόφιλα. Είναι αρνητικά ως προς την καταλάση, με εξαίρεση ορισμένα είδη τα οποία εκκρίνουν μικροποσότητες του ενζύμου. Σχηματίζουν ωοειδή έως σφαιρικά ενδοσπόρια, τα οποία κατά κανόνα διογκώνουν το σποριόγγειο. Ο μεταβολισμός τους είναι

ζυμωτικός και διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα σακχαρολυτικά και τα πρωτεολυτικά κλωστρίδια. Τα πρώτα σχηματίζουν κυρίως οξέα, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, καθώς και ενδιάμεσα προϊόντα, τα οποία δεν είναι δύσοσμα. Απ' την άλλη πλευρά, κατά την πρωτεόλυση σχηματίζονται δύσοσμα τελικά προϊόντα, όπως H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, ινδόλιο, σκατόλιο κλπ.

Χαρακτηριστικό του γένους *Clostridium* είναι ο σχηματισμός ενδοσπορίου στο μητρικό κύτταρο, το οποίο θεωρείται «κοιμώμενο» κύτταρο (dormant cell). Συνήθως σχηματίζονται μετά την εκθετική φάση, όπου και παρατηρείται έλλειψη θρεπτικών συστατικών. Κατά κανόνα σχηματίζεται ένα ενδοσπόριο κατά κύτταρο, το οποίο ονομάζεται σποριαγγείο. Με λύση του σποριαγγείου αποδεσμεύεται το ενδοσπόριο, το οποίο βλαστάνει και δίνει βλαστικό κύτταρο πολλαπλασιαζόμενο περαιτέρω με κυτταρική διαίρεση (Μπαλατσούρας, 2006). Τα είδη των κλωστρίδιων έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν μεταβολικά ανενεργά σπόρια, τα οποία εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στη θέρμανση, τα περιβαλλοντικά στρες, την ακτινοβολία και τις χημικές ουσίες (Li and McClane, 2006).



Εικόνα 3: Στάδια εκβλάστησης του σπορίου. (Setlow, 2003).

### 1.6.1.1 *Clostridium botulinum*

Το *Clostridium botulinum* απαντάται ευρέως στα χερσαία και υδάτινα περιβάλλοντα, και επομένως μπορεί να βρεθεί στο κρέας, τα ιχθυηρά, τα γαλακτοκομικά και τα λαχανικά (Dodds, 1993). Οι ορθές πρακτικές υγιεινής κατά τη σφαγή ελαχιστοποιούν τις πιθανότητες να βρίσκεται στα σφάγια, αν και είναι αδύνατο να απουσιάζει πλήρως, με τις υπάρχουσες τεχνολογίες. Είναι ένα ετερογενές είδος, το οποίο περιλαμβάνει τέσσερις (4) ομάδες Gram θετικών, σποριογόνων, αναερόβιων βακτηρίων, τα οποία έχουν την ικανότητα παραγωγής της βοτουλινικής τοξίνης. Η ομάδα I (πρωτεολυτικά) και η ομάδα II (μη πρωτεολυτικά στελέχη) είναι υπεύθυνα για τα περισσότερα κρούσματα τροφιμογενούς αλλαντίασης, ενώ η ομάδα III για την εκδήλωση αλλαντίασης σε ζώα. Η αλλαντίαση ή βοτουλισμός προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμου, στο οποίο έχει αναπτυχθεί και παράξει τοξίνη ο παθογόνος μικροοργανισμός. Η τοξίνη αποδεσμεύεται με τη θανάτωση και την αυτόλυση των κυττάρων (Μπαλατσούρας, 2006). Τα συμπτώματα της νόσου είναι νευρολογικής φύσεως και συχνά ξεκινούν με θολή όραση. Διακρίνονται 7 νευροτοξίνες (A-G) ανάλογα με τον παραγωγό ορολογικό τύπο (Πίνακας 3), μικρή ποσότητα των οποίων (~30 ng) είναι πιθανότατα θανατηφόρα (Peck, 2006). Μέρος της τοξίνης αδρανοποιείται με τη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων του πεπτικού σωλήνα. Μετά από μια περίοδο επώασης, που επηρεάζεται από τη δόση της τοξίνης, εκδηλώνονται σοβαρές διαταραχές στη λειτουργία του περιφερειακού νευρικού συστήματος, λόγω παρεμπόδισης της αποδέσμευσης της ακετυλοχολίνης, απαραίτητης για τη διάδοση των συσπάσεων στους μύες (Μπαλατσούρας, 2006).

**Πίνακας 3: Οι 4 ομάδες του *Clostridium botulinum* και οι νευροτοξίνες που παράγουν (Peck, 2006).**

Clostridia	Neurotoxins formed
<i>Cl. botulinum</i> group I (proteolytic <i>Cl. botulinum</i> )	A, B, F
<i>Cl. botulinum</i> group II (nonproteolytic <i>Cl. botulinum</i> )	B, E, F
<i>Cl. botulinum</i> group III	C, D
<i>Cl. botulinum</i> group IV ( <i>Cl. argentinense</i> )	G

Οι συνθήκες που ευνοούν την ανάπτυξή του, καθώς και την παραγωγή τοξίνης περιλαμβάνουν υψηλή υγρασία, χαμηλή περιεκτικότητα άλατος, χαμηλής οξύτητας τρόφιμα (pH > 4.6) αποθηκευμένα σε συνθήκες περιορισμένου οξυγόνου και σε



θερμοκρασία υψηλότερη από την ελάχιστη για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (3°C για τα μη-πρωτεολυτικά στελέχη και 10°C για τα πρωτεολυτικά) (EFSA Journal, 2003).

**Πίνακας 4: Οι ελάχιστες τιμές για την ανάπτυξη και η θερμοανθεκτικότητα των σπορίων του *Clostridium botulinum* των τύπων A, B, E και F (από διάφορες πηγές) (EFSA Journal, 2003).**

Properties	Group	
	Proteolytic strains	Non-proteolytic strains
Toxin types	A, B, F	B, E, F
Inhibitory pH	4.6	5.0
Inhibitory NaCl concentrations	10%	5%
Minimal $a_w$ for growth	0.94	0.97
Temperature range for growth	10 - 48° C	3 – 35° C
$D_{100}^*$ of spores	25 min	< 0.1 min

Δεδομένου πως τα πρωτεολυτικά στελέχη δεν αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 10°C ή χαμηλότερη, η ορθή αποθήκευση των ψυγμένων προϊόντων θα αναστείλει την ανάπτυξη, καθώς και την παραγωγή νευροτοξίνης από το μικροοργανισμό. Ωστόσο, η θερμοκρασιακή κακομεταχείριση των τροφίμων οδηγεί στην εμφάνιση κρουσμάτων βοτουλισμού. Τα στελέχη αυτά παράγουν τις τοξίνες A, B ή F, αν και είναι δυνατό να σχηματίζονται περισσότερες από μια τοξίνες. Τα παραγόμενα σπόρια είναι θερμοανθεκτικά και αποτελούν το βασικό κίνδυνο των χαμηλής οξύτητας κονσερβοποιημένων τροφίμων. Θερμική επεξεργασία στους 121,1 °C για 3 min ή ισοδύναμη αυτής έχει καθοριστεί ως η ελάχιστη για τα κονσερβοποιημένα τρόφιμα (Stumbo et al. 1975). Η ανάπτυξή τους παρεμποδίζεται σε pH  $\leq$  4,6 ή 10% NaCl, και η ελάχιστη τιμή της ενεργότητας ύδατος που παρατηρείται ανάπτυξη είναι 0,96 και 0,93, με χλωριούχο νάτριο και γλυκερόλη αντίστοιχα (Lund & Peck, 2000). Αξίζει να σημειωθεί πως τα πρωτεολυτικά στελέχη αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με τα μη πρωτεολυτικά σε θερμοκρασία 30 °C και χαμηλότερη, όταν οι υπόλοιποι παράγοντες δεν είναι περιοριστικοί.

Τα μη πρωτεολυτικά στελέχη είναι ψυχρότροφα και λαμβάνουν την απαραίτητη, για την ανάπτυξή τους, ενέργεια από την αποικοδόμηση των σακχάρων. Παράγουν τις τοξίνες B, E ή F. Τα σχηματιζόμενα σπόρια εμφανίζουν μέτρια θερμοανθεκτικότητα. Ως εκ τούτου, η θέρμανση στους 80-85 °C για 5-10 min

αδρανοποιεί το σύστημα εκβλάστησης των σπορίων οδηγώντας σε υποθανάτιο τραυματισμό (Lund & Peck, 1994). Ωστόσο, ένα μικρό κλάσμα (0,1-1%) των τραυματισμένων σπορίων είναι δυνατό να αναπτυχθεί παρουσία λυσοζύμης (Peck & Stringer 2005). Η λυσοζύμη προκαλεί υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης, επάγοντας την εκβλάστηση των σπορίων. Η ανάπτυξή τους, καθώς και η παραγωγή τοξίνης παρεμποδίζεται σε  $\text{pH} < 5$  ή  $> 5$  NaCl, και η ελάχιστη τιμή της ενεργότητας ύδατος που παρατηρείται ανάπτυξη είναι 0,97 και 0,94, με χλωριούχο νάτριο και γλυκερόλη αντίστοιχα (Lund & Peck, 2000).

Σύμφωνα με τον Peck (2006) η λανθάνουσα φάση είναι δύσκολο να εκτιμηθεί με ακρίβεια, διότι εξαρτάται από την ιστορία των σπορίων. Η φάση αυτή μπορεί να χωριστεί στα εξής στάδια: εκβλάστηση (germination), εμφάνιση-ανάδυση του κυττάρου (emergence), ωρίμανση του κυττάρου (cell maturation) και διπλασιασμό (doubling) (Stringer et al., 2005). Η παραλλακτικότητα που παρατηρείται στη λανθάνουσα φάση είναι αποτέλεσμα της παραλακτικότητας των επιμέρους σταδίων, δεδομένου ότι, σύμφωνα με τους Stringer et al. (2005), το σπόριο που εκβλάστησε πρώτο, δεν ήταν εκείνο που δημιούργησε θυγατρικό κύτταρο.

Κρούσματα αλλαντίασης που σχετίζονται με τα πρωτεολυτικά στελέχη αφορούν κονσερβοποιημένα τρόφιμα, στα οποία συνέβη αστοχία κατά την θερμική επεξεργασία, ενώ αυτά που σχετίζονται με τα μη πρωτεολυτικά αφορούν κυρίως καπνιστά, αποξηραμένα ή αλατισμένα ιχθυηρά.

### 1.6.1.2 *Clostridium perfringens*

Το *Clostridium perfringens* είναι ένα θετικό κατά gram, σποριογόνο, αεράντοχο βακτήριο (βάκιλλος), για την ανάπτυξη του οποίου δεν απαιτείται πλήρη αναεροβίωση. Δεν διαθέτει ικανότητα κίνησης και τα παραγόμενα σπόρια εμφανίζουν θερμοανθεκτικότητα. Απαντά στο έδαφος, τα απόβλητα, τα τρόφιμα, καθώς και ως μέρος της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας των ανθρώπων και ζώων (Xiao et al., 2015). Για το λόγο αυτό, μπορεί να βρεθεί στα προϊόντα κρέατος ως αποτέλεσμα διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Συχνά σχετίζεται με την εκδήλωση τροφιμογενών και μη ασθενειών του γαστρεντερικού συστήματος (Udomprijitkul et al, 2012). Σε πολλές χώρες περισσότερα από τα μισά κρούσματα τροφικών δηλητηριάσεων προκαλούνται από το κρέας και τα προϊόντα του, τα οποία σχετίζονται, κυρίως, με την εκδήλωση τοξικολοίμωξης από το *C. perfringens* (Petran et al, 2012). Η κατανάλωση τροφίμου με πληθυσμό  $10^8$  ή μεγαλύτερο βλαστικών κυττάρων του παθογόνου, τα οποία είναι ικανά να παράγουν εντεροτοξίνη, προκαλεί κοιλιακό άλγος, ναυτία και οξεία διάρροια.

Το ποσοστό του πληθυσμού, το οποίο επιβιώνει από την έκθεση στο όξινο περιβάλλον του στομάχου, σχηματίζουν στη συνέχεια σπόρια στο παχύ έντερο παράγοντας ταυτόχρονα την εντεροτοξίνη (EFSA, 2005). Η εντεροτοξίνη είναι πρωτεΐνη που προορίζεται για το περίβλημα των ενδοσπορίων, περίσσεια δε αυτής προξενεί τροφική δηλητηρίαση (Bartholomew & Stringer, 1984).

Ζυμώνει τα σάκχαρα σχηματίζοντας ως τελικά προϊόντα οξικό και βουτυρικό οξύ, καθώς και βουτανόλη. Ακετοΐνη παράγεται από ελάχιστα στελέχη. Είναι δυνατό να αναπτυχθεί σε εύρος pH από 5,5 – 8,0, όχι όμως σε τιμές κάτω από 5,0 και άνω του 9,0, καθώς επίσης και σε εύρος θερμοκρασίας από 20° έως 50°C, όχι όμως σε θερμοκρασίες κατώτερες των 15° και ανώτερες των 52°C. Υπάρχουν, ωστόσο, στελέχη τα οποία αναπτύσσονται ικανοποιητικά στους 15°C. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 45°C (Μπαλατσούρας, 2006). Οι Gibson και Roberts (1986) έδειξαν πως το *Clostridium perfringens* παρουσίασε ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό μέσο με pH 6,8 και 6,2 έπειτα από 1 εβδομάδα στους 15°C. Με μείωση του pH στο 5,6 παρεμποδίστηκε η ανάπτυξή του για 4 εβδομάδες.

Είναι νοσογόνο τόσο για τους ανθρώπους, όσο και για τα ζώα λόγω της ικανότητάς του να παράγει τουλάχιστον 15 διαφορετικές τοξίνες όταν βρίσκεται στο εσωτερικό του γαστρεντερικού σωλήνα. Οι εν λόγω τοξίνες εμφανίζουν δύο κοινά χαρακτηριστικά: α) είναι πολυπεπίδια μετρίου μεγέθους (~25-35 kDa), αν και στερούνται ομοιογένειας ακολουθίας και β) δρουν σχηματίζοντας πόρους ή κανάλια στις πλασματικές μεμβράνες των κυττάρων του ξενιστή. Μεμονωμένα κύτταρα του *Clostridium perfringens* είναι ικανά να παράγουν μέρος των τοξινών αυτών. Έτσι, τα διάφορα στελέχη κατηγοριοποιούνται σε 5 ομάδες με βάση την ικανότητά τους να παράγουν τις 4 κύριες τοξίνες α, β, ε και ι. Ορισμένα στελέχη, εκτός από τις προαναφερθέντες τοξίνες, είναι ικανά να παράγουν εντεροτοξίνη (CPE) στον γαστρεντερικό σωλήνα οδηγώντας σε διάρροια (McClane et al., 2006). Η CPE εντεροτοξίνη παράγεται από σχεδόν όλα τα στελέχη της ομάδας A, αλλά και από κάποια των ομάδων C και D. Οι διαφοροποιήσεις αυτές βοηθούν ώστε να κατανοηθεί η πολυπλοκότητα του μικροοργανισμού αυτού, ο οποίος προκαλεί τόσο εντερικές όσο και ιστοτοξικές λοιμώξεις, το φάσμα των οποίων κυμαίνεται από χαμηλή συχνότητα / υψηλή θνησιμότητα σε υψηλή συχνότητα / χαμηλή θνησιμότητα (*C. perfringens* type A food poisoning).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την εντεροτοξίνη (cpe) απαντάται στο 1-5% των απομονώσεων γενικά (Li et al., 2007) και στο 11-15,6% των τροφιμογενών απομονώσεων (Xiao et al., 2012). Βρίσκεται, συνήθως στο βακτηριακό χρωμόσωμα

(C-cpe), μπορεί όμως να βρεθεί και σε πλασμίδια (P-cpe) (Wen et al., 2004). Μέχρι πρότινος, η τροφική δηλητηρίαση συνδεόταν με στελέχη τα οποία φέρουν το γονίδιο αυτό στο χρωμόσωμα (Li et al., 2007). Ωστόσο, στελέχη τα οποία αποκτούν το γονίδιο αυτό μέσω πλασμιδίων αποτελούν πλέον πιθανούς αιτιολογικούς παράγοντες τροφικής δηλητηρίασης (Lahti et al., 2008, Tanaka et al., 2003). Τόσο οι βλαστικές μορφές όσο και τα σπόρια των C-cpe στελεχών εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα στη θέρμανση, το οσμωτικό στρες και τα νιτρώδη άλατα συγκριτικά με τα P-cpe στελέχη (Li and McClane, 2006). Η αφαίρεση τόσο του γονιδίου, όσο και των πλασμιδίων δεν μετέβαλλε την ανθεκτικότητα των αντίστοιχων στελεχών, το οποίο σημαίνει πως αυτή συνδέεται με παραμέτρους διαφορετικές από την παραγωγή εντεροτοξίνης (CPE) (Li and McClane, 2006). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα P-cpe στελέχη συνήθως απαντώνται στο έντερο, ενώ τα C-cpe στο περιβάλλον των τροφίμων, η αυξημένη ανθεκτικότητα των οποίων τους προσδίδει ανταγωνιστικό πλεονέκτημα. Οι διακριτές τους διαφορές ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων, καθώς και της εξελικτικής προσαρμογής σε μια συγκεκριμένη βιοθέση (Xiao et al., 2015).

Οι Xiao et al. (2015) έδειξαν πως τα βλαστικά κύτταρα των C-cpe στελεχών παρουσίασαν χαμηλότερο δυναμικό ανάπτυξης συγκριτικά με τα P-cpe, καθώς και με αυτά τα οποία δεν φέρουν το γονίδιο αυτό (cpe-negative), σε μαγειρεμένο μοσχαρίσιο κιμά συσκευασμένο υπό κενό στους 12°C. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όταν η θερμοκρασία συντήρησης ανήλθε στους 25°C. Επομένως, η παρουσία σπορίων των C-cpe στελεχών, τα οποία εμφανίζουν θερμοανθεκτικότητα και ενδεχομένως να επιβιώσουν σε μια ανεπαρκή θερμική επεξεργασία, είναι πιθανό να οδηγήσει σε γρήγορο πολλαπλασιασμό, εάν οι συνθήκες ψύξης δεν είναι οι κατάλληλες. Αν, όμως, η θερμοκρασία του προϊόντος μειωθεί κάτω των 12°C, η ανάπτυξή τους θα περιοριστεί. Μεγαλύτερο κίνδυνο αποτελούν τα P-cpe στελέχη, τα οποία, μέσω των χειριστών, είναι δυνατό να επιμολύνουν το τρόφιμο, θέτοντας σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία. Για το λόγο αυτό, οι συνθήκες υγιεινής μετά την επεξεργασία του τροφίμου είναι ιδιαίτερα κρίσιμες.

Πίνακας 5: Ταξινόμηση των απομονώσεων του *Clostridium perfringens* με βάση τις παραγόμενες α, β, ε και ι τοξίνες (Smedley et al., 2004).

Toxinotype	Toxins produced:			
	<i>Alpha</i>	<i>Beta</i>	<i>Epsilon</i>	<i>Iota</i>
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

### 1.6.1.3 *Clostridium sporogenes*

Το *Clostridium sporogenes* είναι θετικός κατά gram, σποριογόνος, αναερόβιος βάκιλλος που απαντά στο έδαφος, καθώς και στον εντερικό σωλήνα των σπονδυλωτών. Διαθέτει ικανότητα κίνησης και το μέγεθος των κυττάρων κυμαίνεται μεταξύ 3-6\*0,5\*1 μm. Είναι αλλοιογόνος μικροοργανισμός, διασπά τις πρωτεΐνες υπό αναερόβιες συνθήκες σχηματίζοντας δύσσομα προϊόντα. Ζυμώνει και τα σάκχαρα, με τελικά προϊόντα βουτυρικό οξύ, μικροποσότητες οξικού, ισοβουτυρικού, ισοβαλεριανικού και ισοκαπρωϊκού οξέως. Επιπρόσθετα, σχηματίζονται και μικροποσότητες προπυλικής, ισοβουτυλικής και ισοαμυλικής αλκοόλης (Μπαλατσούρας, 2006). Είναι ικανό να αναπτύσσεται σε μέσα, στα οποία δεν περιέχονται υδατάνθρακες. Η προσθήκη, όμως, γλυκόζης ενισχύει την ανάπτυξή του (Cammack et al., 1999).

Το βακτήριο αυτό, και ιδιαίτερα το στέλεχος PA 3679 (Putrefactive Anaerobe), χρησιμοποιείται σε μετρήσεις θερμοαντοχής των σποριογόνων βακτηρίων. Ενώ η τιμή  $D_{121,1^{\circ}\text{C}}$  των σπορίων του είδους αυτού κυμαίνεται μεταξύ 0,1-1,5 min στα κονσερβοποιημένα προϊόντα κρέατος (Pflug, 1987), το εν λόγω στέλεχος παρουσιάζει τιμή  $D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 3 \text{ min}$  (Cameron, Leonard, & Barrett, 1980). Η επιλογή του στηρίχθηκε στο γεγονός πως το εν λόγω στέλεχος αποκρίνεται έναντι της θέρμανσης όπως και το τοξινογόνο για τον άνθρωπο *Clostridium botulinum*. Επομένως, τα ευρήματα των πειραμάτων που βασίστηκαν στο πρώτο, είναι εφαρμόσιμα και στην περίπτωση του δεύτερου, και συγκεκριμένα για τα πρωτεολυτικά στελέχη (τύποι B, E, F) (Μπαλατσούρας, 2006, Lund & Peck, 2000). Οι Bradbury et al. (2012) αναφέρουν πως υπάρχει μεγάλος βαθμός συσχέτισης μεταξύ της αλληλουχίας του γονιδιώματος του *C. sporogenes* PA 3679 και των πρωτεολυτικών στελεχών του *C. botulinum* που εξετάστηκαν.

## 1.7 Μικροβιολογία πρόρρησης

Η διασφάλιση της μικροβιολογικής ασφάλειας, καθώς και του χρόνου ζωής των τροφίμων εξαρτάται από την ελαχιστοποίηση του αρχικού επιπέδου μικροβιολογικής επιμόλυνσης, την πρόληψη ή/και τον περιορισμό του ρυθμού ανάπτυξης των μικροβίων ή τη θανάτωση των πληθυσμών. Τα τελευταία χρόνια η συχνότητα εμφάνισης των τροφιμογενών ασθενειών αυξήθηκε στο βιομηχανοποιημένο κόσμο, παρά την καθιέρωση του HACCP και των κανονισμών σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων (McMeekin et al., 1997). Την ίδια ώρα οι καταναλωτές επιθυμούν μεγαλύτερη ποικιλία λιγότερο επεξεργασμένων τροφίμων, γεγονός που δημιουργήσε την ανάγκη για παροχή εγγυήσεων σχετικά με την ασφάλεια και την ποιότητα των τροφίμων, οι οποίες θα βασίζονται σε ταχείες και ακριβείς μεθόδους.

Μια εναλλακτική μέθοδος σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους για την εκτίμηση του χρόνου ζωής των τροφίμων αποτελεί η μικροβιολογία πρόβλεψης ή προρρητική μικροβιολογία. Η προρρητική μικροβιολογία συνδυάζει στοιχεία μικροβιολογίας, μαθηματικών και στατιστικής με στόχο την ανάπτυξη και εφαρμογή μοντέλων πρόβλεψης της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα μοντέλα αποτελούν μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν την ανάπτυξη, επιβίωση ή βιοχημική διεργασία του υπό μελέτη μικροοργανισμού.

Το πεδίο της μικροβιολογίας πρόρρησης διαθέτει ποικίλα συστήματα ταξινόμησης των μικροβιακών μοντέλων. Το επικρατέστερο από αυτά είναι το σύστημα των Whiting και Buchanan (1993) σύμφωνα με το οποίο οι περισσότεροι τύποι μοντέλων είναι δυνατό να ομαδοποιηθούν σε τρία επίπεδα: τα πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή μοντέλα (McDonald & Sun, 1999).

### 1.7.1 Πρωτογενή μοντέλα

Τα πρωτογενή μοντέλα περιγράφουν τη μεταβολή του πληθυσμού των μικροοργανισμών με το χρόνο κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες και συνθήκες καλλιέργειας. Η απόκριση μπορεί να μετρηθεί άμεσα με τον ολικό αριθμό ζώντων κυττάρων (total viable count, TVC), με το σχηματισμό τοξίνης, το επίπεδο του υποστρώματος ή τα προϊόντα μεταβολισμού. Επιπλέον, μπορεί να μετρηθεί έμμεσα από την απορρόφηση, την οπτική πυκνότητα ή την αντίσταση. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται πληροφορίες σχετικά με τις κινητικές παραμέτρους του μικροοργανισμού, όπως ο χρόνος διπλασιασμού, η διάρκεια της λανθάνουσας

φάσης, ο εκθετικός ρυθμός αύξησης, καθώς και η μέγιστη πυκνότητα του πληθυσμού.

Για την αξιολόγηση της ακριβείας των πρωτογενών μοντέλων χρησιμοποιείται η τετραγωνική ρίζα του μέσου τετραγώνου του σφάλματος (root mean square error, RMSE), καθώς και το  $R^2$ .

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\text{observed } i - \text{predicted } i)^2}{\sum_{i=1}^n (\text{observed } i - \text{mean})^2} \quad (1)$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum (\text{observed } i - \text{predicted } i)^2}{n}} \quad (2)$$

Όπου, observed  $i$ , οι παρατηρούμενες τιμές, predicted  $i$ , οι προβλέψεις του μοντέλου και  $n$ , το πλήθος των παρατηρήσεων.

### 1.7.2 Δευτερογενή μοντέλα

Τα δευτερογενή μοντέλα περιγράφουν την επίδραση των περιβαλλοντικών μεταβλητών (Τ, pH, % NaCl κτλ.) στις κινητικές παραμέτρους, οι οποίες υπολογίστηκαν από τα πρωτογενή μοντέλα (McMeekin et al., 2006).

Για παράδειγμα, έστω ότι έχει μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Salmonella typhimurium* στο βόειο κρέας μεταξύ 15 και 40°C. Ο μικροοργανισμός θα μπορούσε να αναπτύσσεται σε ορισμένες θερμοκρασίες εντός αυτού του εύρους. Για κάθε θερμοκρασία, θα μπορούσε να υπολογιστεί ένας χρόνος διπλασιασμού του μικροβιακού πληθυσμού χρησιμοποιώντας ένα πρωτογενές μοντέλο. Στη συνέχεια, τα δεδομένα αυτά επεξεργάζονται με τη χρήση ενός δευτερογενούς μοντέλου ώστε η επίδραση της θερμοκρασίας να περιγράφεται από μια μαθηματική εξίσωση. Η εξίσωση αυτή επιτρέπει στον τελικό χρήστη να προσδιορίσει το χρόνο διπλασιασμού σε μια δεδομένη θερμοκρασία Τ.

Για να εκτιμηθεί η ακρίβεια του μοντέλου υπολογίζονται ο συντελεστής αβεβαιότητας (bias factor, Bf) και ο συντελεστής ακριβείας (accuracy factor, Af) σύμφωνα με τις εξισώσεις (3) και (4) (Ross, 1996).

$$B_f = 10^{\sum \frac{\log(\frac{\text{predicted } i}{\text{observed } i})}{n}} \quad (3)$$

$$A_f = 10^{\sum |\log(\frac{\text{predicted } i}{\text{observed } i})| / n} \quad (4)$$

Όπου,  $observed\ i$ , οι παρατηρούμενες τιμές,  $predicted\ i$ , οι προβλέψεις του μοντέλου και  $n$ , το πλήθος των παρατηρήσεων.

Ο δείκτης  $B_f$  περιγράφει την απόκλιση του μοντέλου. Όταν η τιμή του είναι ίση με 1.00, τότε αυτό δεν υπερεκτιμά ή υποεκτιμά την μικροβιακή ανάπτυξη (Ross, 1999). Μια τιμή  $>1$  δηλώνει υποεκτίμηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών οδηγώντας σε ένα «fail-dangerous» μοντέλο, δεδομένου ότι η μικροβιακή ανάπτυξη θα είναι ταχύτερη από την πρόβλεψη του μοντέλου. Αντίστοιχα, μια τιμή  $<1$  δηλώνει υπερεκτίμηση της ανάπτυξης οδηγώντας σε ένα «fail-safe» μοντέλο, με την ανάπτυξη να πραγματοποιείται με πιο αργό ρυθμό σε σχέση με την πρόβλεψη του μοντέλου.

Παρόλο που ο δείκτης αβεβαιότητας είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στο να χαρακτηρίζει το μοντέλο ως «fail-dangerous» ή «fail-safe», δεν δίνει κάποια πληροφορία σχετικά με το πόσο ακριβές είναι. Για το λόγο αυτό, υπολογίζεται ο δείκτης ακρίβειας. Σύμφωνα με τον Ross (1996), όσο μεγαλύτερη η τιμή του συντελεστή ακρίβειας, τόσο μεγαλύτερη η μέση απόκλιση των προβλέψεων του μοντέλου από τις παρατηρούμενες τιμές. Όταν η τιμή του είναι ίση με 1.00, δεν παρατηρείται καμία απόκλιση μεταξύ προβλέψεων και παρατηρούμενων τιμών.

### 1.7.3 Τριτογενή μοντέλα

Τα τριτογενή μοντέλα αποτελούν "εργαλεία" του υπολογιστή που ενσωματώνουν τα πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα σε μορφή φιλική προς το χρήστη. Περιλαμβάνουν δύο συνιστώσες: τις βάσεις δεδομένων και τα λογισμικά πρόβλεψης. Η μελέτη του επιστημονικού αυτού αντικείμενου εμπίπτει τόσο στην βιοπληροφορική, όσο και στα βιομαθηματικά. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας των Η/Υ έκανε δυνατή την εκτέλεση πολύπλοκων μαθηματικών υπολογισμών. Το γεγονός αυτό αξιοποιήθηκε από την μικροβιολογία πρόρρησης ώστε να αναπτυχθούν τα λογισμικά πρόβλεψης που βασίζονται σε ένα ή περισσότερα πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα (McDonald & Sun, 1999). Η ευρύτερη χρήση των μοντέλων στη βιομηχανία τροφίμων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα φιλικών λογισμικών προς το χρήστη, που περιλαμβάνουν μοντέλα πρόβλεψης και παρέχουν τη δυνατότητα ανάκτησης πληροφοριών με γρήγορο και εύκολο τρόπο (McMeekin et al., 2006).



## 1.8 Υπόθεση Εργασίας

Η κατανάλωση προϊόντων ζωικής προέλευσης συμπεριλαμβανομένου του κρέατος και των κρεατοσκευασμάτων έχει αυξηθεί σε παγκόσμιο επίπεδο. Παράλληλα, οι καταναλωτές απαιτούν τρόφιμα υψηλής ποιότητας, απουσία χημικών συντηρητικών, τα οποία είναι μικροβιολογικά ασφαλή και έχουν αυξημένο χρόνο ζωής.

Είναι γνωστό πως το πάστωμα του κρέατος περιλαμβάνει την προσθήκη νιτρικών αλάτων. Τα νιτρικά σταθεροποιούν το χρώμα των παστεριωμένων αλλαντικών, εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση, συμβάλλουν στην ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης, καθώς επίσης αναστέλλουν την ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Η αντιμικροβιακή δράση δεν προέρχεται από τα νιτρικά άλατα αυτά καθαυτά, αλλά από ενώσεις όπως το νιτρικό οξύ (nitrous acid), το μονοξειδίο του αζώτου (nitric oxide) κτλ. που παράγονται κατά την επεξεργασία και αποθήκευση των τροφίμων (Cammack et al., 1999). Ωστόσο, η παραγωγή βλαβερών ουσιών, οι οποίες σχηματίζονται από την υπολειπόμενη ποσότητα νιτρικών με ενώσεις που περιέχουν άζωτο, τόσο στο ίδιο το προϊόν όσο και μετά την κατανάλωσή του, οδήγησε τη βιομηχανία κρέατος στην αναζήτηση τρόπων ώστε να μειωθεί η προσθήκη, καθώς και η υπολειπόμενη ποσότητα νιτρικών στα κρεατοσκευάσματα. Για το λόγο αυτό, ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον παρατηρείται σχετικά με τη χρήση φυσικών αντιμικροβιακών μέσων στα εν λόγω προϊόντα. Το ενδιαφέρον αυτό ενισχύεται από την απαίτηση των καταναλωτών για παστεριωμένα αλλαντικά με μειωμένη περιεκτικότητα νιτρικών αλάτων. Αν και η αντικατάσταση των νιτρικών με ένα μόνο αντιμικροβιακό παράγοντα παρουσιάζει δυσκολίες, λόγω της ευρέως φάσματος δραστηριότητάς τους (Pegg & Shahidi, 2000), η συνδυαστική χρήση αυτών μπορεί να είναι αποτελεσματική.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη πεδίου της δράσης εμπορικού σκευάσματος φυσικού αντιμικροβιακού έναντι των νιτρικών αλάτων: α) στην εκβλάστηση ή/και ανάπτυξη των βακτηρίων *Clostridium sporogenes* και *Clostridium perfringens*, ως προς τη θερμοκρασία συντήρησης σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό. β) στη μικροβιακή αλλοίωση των εν λόγω προϊόντων, με τελικό στόχο την ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της απόκρισης της αλλοιογόνου χλωρίδας ως προς τη θερμοκρασία συντήρησης.

## ΕΝΟΤΗΤΑ 2

### Υλικά και μέθοδοι

#### 2.1 Μικροοργανισμοί

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 2 στελέχη του μικροοργανισμού *Clostridium perfringens* και 5 στελέχη του *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404, ATCC 11437, CECT 485\*, CECT 892\*, CECT 4990\*), τα οποία ανήκουν στη μικροβιακή συλλογή του εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

*\* τα στελέχη παραχωρήθηκαν από τον Καθηγητή Prof. Dr. Antonio Valero, Dpt. Food Science and Technology, Campus Universitario de Rabanales, Κόρδοβα, Ισπανία*

#### 2.2 Προετοιμασία εμβολίου

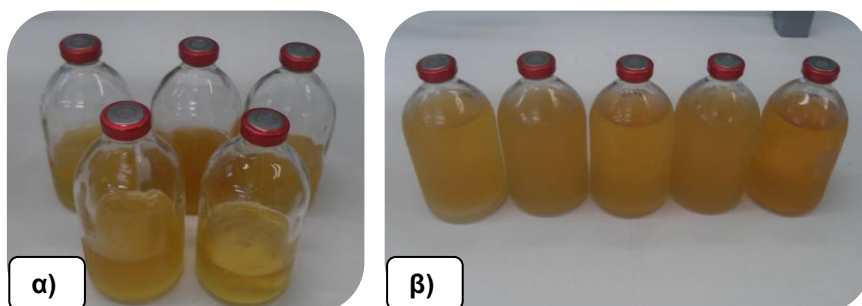
Τα βακτηριακά στελέχη ήταν αποθηκευμένα σε θρεπτικό υλικό Reinforced Clostridium Medium (RCM) με 20% v/v γλυκερόλη στους -20°C. Για την προετοιμασία του εμβολίου, προηγείται η διαδικασία της ανανέωσης της καλλιέργειας του μικροοργανισμού, καθώς και η διαδικασία δημιουργίας σπορίων, και ακολουθούσε ο καθαρισμός του εμβολίου.

Η ανανέωση των μικροοργανισμών γίνεται προκειμένου να ανακτήσουν τη ζωτικότητα τους και να απαλειφθεί η καταπόνηση που δημιουργείται κατά την παραμονή τους σε συνθήκες κατάψυξης. Η ανανέωση των ανωτέρω στελεχών έλαβε χώρα με μεταφορά με σύριγγα 0,5 ml της καλλιέργειας, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε 50 ml αποστειρωμένου Reinforced Clostridium Medium, όπου προηγουμένως έχει γίνει πλήρωση του υπερκείμενου χώρου με άζωτο (N<sub>2</sub>). Ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 37°C για 24h.

Στη συνέχεια, με σκοπό την σποριογονία των εν λόγω στελεχών, όγκος 5 ml από την ανανέωση μεταφέρθηκε με σύριγγα, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε 100 ml αποστειρωμένου μέσου για τη δημιουργία σπορίων, η σύσταση του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 6. Όπως και προηγουμένως, πραγματοποιήθηκε πλήρωση του υπερκείμενου χώρου με άζωτο. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 30°C για 7 μέρες. Η θερμοκρασία είναι χαμηλότερη από τη βέλτιστη για την επαγωγή της σποριογονίας.

Πίνακας 6: Σύσταση μέσου για τη δημιουργία σπορίων (sporulation media).

Trypticase	3%
Peptone	1%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1%



Εικόνα 4: α) Φιάλες χρησιμοποιούμενες κατά τη διαδικασία ανανέωσης της καλλιέργειας και β) δημιουργίας σπορίων.

Στη συνέχεια, ο καθαρισμός του εμβολίου είχε σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού, καθώς και των μικροβιακών μεταβολικών προϊόντων που υφίστανται στο μέσο. Για τον καθαρισμό, η καλλιέργεια των σπορίων μεταφέρθηκε σε δοχεία φυγοκέντρησης και, εν συνεχεία, φυγοκεντρήθηκε σε θερμοκρασία 4°C στις 3600 rpm για 20 min. Ακολούθησε απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση των ιζημάτων του συνόλου των στελεχών για το κάθε είδος σε περίπου 100 ml νερό. Ο εμβολιασμός της κρετόπαστας πραγματοποιούνταν, ώστε να δημιουργηθούν τελικά 3 (τρία) επίπεδα εμβολίου στην κρετόπαστα. Πιο συγκεκριμένα, για το *Clostridium perfringens* ήταν 1-5 σπόρια/g και για το *Clostridium sporogenes* 10<sup>2</sup> και 10<sup>4</sup> σπόρια/g (επίπεδο μικροβιακού πληθυσμού πριν την παστερίωση και τον καπνισμό).

### 2.3 Πειραματικός σχεδιασμός

Αρχικά, έλαβε χώρα η προετοιμασία της κρετόπαστας με την ανάμειξη σύγκοπτου κρέατος γαλοπούλας, λίπους, νερού, καθώς και τον απαραίτητων, επιπλέον, συστατικών. Πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 (τέσσερις) μεταχειρίσεις: δείγματα στα οποία έγινε προσθήκη νιτρωδών (150 ppm), δείγματα με εμπορικό σκεύασμα φυσικού αντιμικροβιακού σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις (0.5 και 1% w/w), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας). Στην παρούσα μελέτη η παρουσία νιτρωδών κωδικοποιείται ως RCB, το φυσικό συντηρητικό ως

Green και ο μάρτυρας ως Control. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός της κρεατόπαστας με τα προαναφερθέντα είδη *Clostridium* spp. και ενθήκευση της κρεατόπαστας, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μπαστούνιων περίπου 3kg το καθένα. Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ανεμβολίαστη κρεατόπαστα για τη μελέτη της αλλοίωσης των προϊόντων αυτών. Ακολούθησε θερμική επεξεργασία συνολικής διάρκειας 2h, όπου η θερμοκρασία που επιτεύχθηκε στο γεωμετρικό κέντρο των μπαστούνιων ήταν 74°C. Έπειτα, έλαβε χώρα ψύξη και, εν συνεχεία, κάπνιση των κρεατοσκευασμάτων για 2h στους 84°C. Ακολούθησε ψύξη και τεμαχισμός, σε φέτες βάρους περί τα 200g. Τέλος, έλαβε χώρα η συσκευασία υπό κενό, σε αυτόματη συσκευαστική μηχανή, και η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης.

Στη συνέχεια, τα δείγματα συντηρήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες (5, 6, 10, 12, 15, 20 και 25°C) ώστε να ελεγχθεί τόσο η ασφάλεια, όσο και η αλλοίωση του τελικού προϊόντος. Επιπλέον, συντηρήθηκαν και σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (Πίνακας 7), προσομοιάζοντας ένα πιο ρεαλιστικό προφίλ θερμοκρασιών που δύναται να απαντηθεί στην αλυσίδα παρασκευής και διανομής των προϊόντων. Το 1<sup>ο</sup> θερμοκρασιακό προφίλ προσομοιάζει τις συνθήκες στη βιομηχανία, το 2<sup>ο</sup> τη διανομή των τροφίμων και την παραμονή τους στα σημεία πώλησης και το 3<sup>ο</sup> τις συνθήκες κατά το χειρισμό αυτών από τον τελικό καταναλωτή.

**Πίνακας 7: Μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες κατά τη συντήρηση των παστεριωμένων αλλαντικών.**

<b>Θερμοκρασιακό προφίλ</b>	
<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>
2, 7, 5°C	1 <sup>ος</sup> μήνας
4, 10, 7°C	2 <sup>ος</sup> μήνας
8, 15, 12°C	3 <sup>ος</sup> μήνας

 Η εναλλαγή των θερμοκρασιών γινόταν κάθε 8 h.

## **2.4 Μικροβιολογικές αναλύσεις**

Δείγμα 10 g ζυγίστηκε, ασηπτικά, σε σακούλα stomacher, προστέθηκαν 90 ml αποστειρωμένου αραιωτικού υγρού ¼ strength Ringer's solution και στη συνέχεια

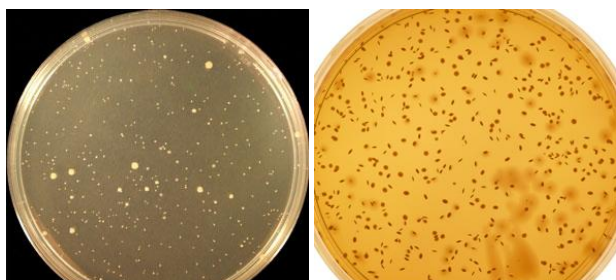
ομογενοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε stomacher για 1 min. Ακολούθησε η παρασκευή των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και ο εμβολισμός κατάλληλων στερεών θρεπτικών υλικών. Τα υλικά και οι συνθήκες επώασης ανά κατηγορία μικροοργανισμού που προσδιορίστηκε ήταν οι ακόλουθες:

- **Θειοαναγωγικά κλωστρίδια:** ποσότητα 10 ml από τη σειρά των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ή/και από τη σακούλα stomacher, ενοφθαλμίστηκε σε γυάλινους σωλήνες χωρητικότητας 60ml με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε 20 ml επιλεκτικού υποστρώματος TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine), στο οποίο είχε προστεθεί το αντιβιοτικό D-Cycloserine, και προσθήκη επιφανειακής στρώσης παραφίνης (περίπου 5 ml). Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24-48h και καταμέτρηση των μαύρων αποικιών που σχηματίζονται λόγω παραγωγής υδρόθειου (το οποίο αντιδρά με άλατα σιδήρου και παράγει μαύρο άλας θειούχου σιδήρου).



Εικόνα 5: Ανίχνευση θειοαναγωγικών κλωστρίδιων σε TSC agar με παραφίνη.

- **Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (OMX):** Ποσότητα 1 ml από τη σειρά των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμίστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα PCA (Plate Count Agar). Ακολούθησε επώαση στους 30°C για 3 ημέρες και καταμέτρηση των αποικιών.
- **Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB):** Ποσότητα 1 ml από τη σειρά των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος ενοφθαλμίστηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης (διπλή στρώση) στο επιλεκτικό υπόστρωμα MRS Agar. Ακολούθησε επώαση στους 30°C για 3 ημέρες και καταμέτρηση των αποικιών.



Εικόνα 6: Τυπικές αποικίες σε PCA και MRS Agar.

## 2.5 Μέτρηση pH

Σε όλες τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν μετρήθηκε το pH κάθε δείγματος με τη χρήση ψηφιακού pHμέτρου (Multical WTW 526 pH meter). Πριν την μέτρηση των τιμών του pH προηγήθηκε η βαθμονόμηση του οργάνου με τη χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων (pH 4.0 και pH 7.0). Στη συνέχεια, το ηλεκτρόδιο εμβαπτιζόταν στο ομογενοποιημένο δείγμα, μετά το πέρας κάθε μικροβιολογικής ανάλυσης.

## 2.6 Πρωτογενές μοντέλο Baranyi

Τα πειραματικά δεδομένα (μετρήσεις πληθυσμών) μετατράπηκαν σε λογαριθμικές τιμές (log CFU/g). Στη συνέχεια, προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο των Baranyi & Roberts (Baranyi & Roberts 1994) με το λογισμικό πρόγραμμα DMfit ([www.ifr.ac.uk/Safety/DMfit/default.html](http://www.ifr.ac.uk/Safety/DMfit/default.html)) ώστε να προσδιοριστούν οι κινητικές παράμετροι, όπως η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag phase, λ) και ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ).

## 2.7 Μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας

Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (κυρίαρχοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης) μοντελοποιήθηκε συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης με τη χρήση του δευτερογενούς μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας (Ratkowsky et al., 1982).

$$\sqrt{k} = b(T - T_{min}) \quad (5)$$

όπου  $b$  είναι σταθερά,  $T$  η θερμοκρασία και  $T_{\min}$  η ελάχιστη θερμοκρασία που παρατηρείται αύξηση.

Οι Pooni & Mead (1984) σύγκριναν την ανωτέρω εξίσωση με άλλα μοντέλα με δεδομένα από 14 δημοσιευμένες μελέτες πάνω στην αλλοίωση των πουλερικών και συμπέραναν πως η εξίσωση (1) ήταν η καταλληλότερη για την πρόβλεψη της αλλοίωσης σε θερμοκρασίες από  $-2$  έως  $15^{\circ}\text{C}$ . Το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στην πρόβλεψη της επίδρασης της θερμοκρασίας στο ρυθμό της βακτηριακής αύξησης σε πρόβειο κρέας (Smith, 1987), καθώς και του παθογόνου *Salmonella* σε μοσχαρίσιο κιμά (Mackey and Kerridge, 1988).

## 2.8 Ταυτοποίηση αλλοιογόνων μικροοργανισμών

Με σκοπό την ταυτοποίηση των αλλοιογόνων οξυγαλακτικών βακτηρίων για κάθε διαφορετική μεταχείριση (μάρτυρας, νιτρώδη, φυσικό αντιμικροβιακό), απομονώθηκαν 10-15 αποικίες (10% του συνολικού αριθμού των αποικιών στο τρυβλίο) από τα τρυβλία MRS που αντιστοιχούσαν στο τέλος της αλλοίωσης των αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας στους  $12^{\circ}\text{C}$ . Ο καθαρισμός των παραπάνω απομονώσεων πραγματοποιήθηκε με διαδοχική γραμμική επίστρωση σε στερεό θρεπτικό υλικό MRS ( $30^{\circ}\text{C}$ , 72h), ενώ ακολούθησε υγρή καλλιέργεια αυτών σε υγρό θρεπτικό υλικό MRS broth ( $30^{\circ}\text{C}$ , 24-48h). Ακολούθησε απομόνωση DNA και ομαδοποίηση των βακτηριακών απομονώσεων με χρήση της μεθόδου RAPD-PCR (Rapid Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) (Paramithiotis et al., 2014). Η ανάλυση των τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5% w/V, ενώ η χρώση αυτών με εμβάπτιση σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου. Οι εικόνες των πηκτωμάτων αγαρόζης παραλήφθηκαν με χρήση του συστήματος GelDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων (ανάλυση συστάδων-cluster analysis) πραγματοποιήθηκε με χρήση του λογισμικού Bionumerics (Applied Maths NV, SintMartens-Latem, Belgium). Πιο συγκεκριμένα, για τη δημιουργία των φυλογενετικών δέντρων, χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (Pearson coefficient) και η μέθοδος ομαδοποίησης μη σταθμισμένων ζευγών (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA). Στη συνέχεια, οι αντιπροσωπευτικές ανά συστάδα απομονώσεις, χαρακτηρίστηκαν με ανάλυση του τμήματος V1-V3 του *16SrRNA* (Cocolin et al 2004) και τη συνέχεια αλληλούχιση αυτού.

## ΕΝΟΤΗΤΑ 3

### Αποτελέσματα & Συζήτηση

#### 3.1 Ασφάλεια των παστεριωμένων αλλαντικών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο βουτουλισμός είναι μια σοβαρή τροφιμογενής ασθένεια, η οποία προκαλείται από την κατανάλωση τροφίμου στο οποίο έχει αναπτυχθεί και παράξει τοξίνη το *Clostridium botulinum*. Η ασθένεια σχετίζεται με τα πρωτεολυτικά στελέχη του παθογόνου, τα οποία έχουν ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 10-12°C και μέγιστη τους 45-50°C (Diao et al., 2014). Επομένως, η απουσία ή η μη ικανότητα εκβλάστησης των спорίων του *C. botulinum* διασφαλίζει την ασφάλεια των τροφίμων χαμηλής οξύτητας. Το *Clostridium sporogenes* θεωρείται μη τοξινογόνο ισοδύναμο (surrogate) των πρωτεολυτικών στελεχών του *C. botulinum*, το οποίο προκαλεί αλλοίωση των προϊόντων κρέατος.

Το *Clostridium perfringens* (τύπος A) θεωρείται σημαντική αιτία τροφικής δηλητηρίασης. Οι Adak et al. (2002) εκτίμησαν πως το 2000 ήταν η 2<sup>η</sup> πιο κοινή αιτία τροφικής λοίμωξης (1<sup>η</sup> ήταν το *Campylobacter*), καθώς και θανάτου που σχετίζεται με τρόφιμα (1<sup>η</sup> ήταν το *Salmonella*) στην Αγγλία και την Ουαλία. Απαντάται σε πληθώρα τροφίμων και ιδιαίτερα σε κρέας και πουλερικά και σχετίζεται με την εκδήλωση τροφικής δηλητηρίασης όταν εφαρμόζεται ανεπαρκής ψύξη (Le Marc et al., 2008).

Οι στρατηγικές που ακολουθούνται από τη βιομηχανία τροφίμων ώστε τα σπόρια των κλωστριδίων να μην αποτελούν κίνδυνο για τα τελικά προϊόντα αφορούν την εκτίμηση του αρχικού πληθυσμού, την αδρανοποίηση των спорίων, καθώς και το κατάλληλο εύρος θερμοκρασίας ώστε να αποτραπεί η ανάπτυξη αυτών, εάν δεν μπορεί να επιτευχθεί πλήρης αδρανοποίηση. Ως εκ τούτου, κρίσιμο σημείο αποτελεί η ταχεία ψύξη των τροφίμων, δεδομένου ότι το *Clostridium perfringens* αναπτύσσεται με γρήγορο ρυθμό σε θερμοκρασίες μεταξύ 37 και 45°C (Xiao et al., 2015), καθώς και η διατήρησή τους σε θερμοκρασία < 10-12°C (EFSA, 2005).

##### 3.1.1 Ικανότητα ανάπτυξη των *Clostridium sporogenes* και *Clostridium perfringens* σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης

Με σκοπό τη μελέτη της ικανότητας ανάπτυξης στελεχών του *Clostridium sporogenes* και *Clostridium perfringens* σε αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας, η κρεατόπαστα εμβολιάστηκε με σπόρια και βλαστικές μορφές των εν λόγω μικροοργανισμών. Τα αρχικά επίπεδα των спорίων στην κρεατόπαστα ήταν για το



*Clostridium perfringens* 1-5 σπόρια/g και για το *Clostridium sporogenes*  $10^2$  και  $10^4$  σπόρια/g (δύο επίπεδα αρχικού πληθυσμού). Όπως φαίνεται στα Γραφήματα 1-3 ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο τελικό προϊόν, μετά τη θερμική επεξεργασία, τον καπνισμό και την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης, διαμορφώθηκε για *Clostridium perfringens* 0.1 σπόρια/g (κάτω του ορίου καταμέτρησης) και για το *Clostridium sporogenes* 0.1 (κάτω του ορίου καταμέτρησης) και  $10^2$  σπόρια/g.

Είναι γνωστό πως τα σπόρια εμφανίζουν υψηλή ανθεκτικότητα στη θέρμανση, σε χημικούς παράγοντες, την ακτινοβολία, καθώς και την υπερυψηλή πίεση (Setlow, 2003), χάρη της δομής τους. Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης (cortex), π.χ., και η εσωτερική μεμβράνη εμφανίζουν χαμηλή διαπερατότητα σε υδρόφιλα μόρια. Επιπρόσθετα, το υψηλό ποσοστό διπικολινικού οξέως (DPA) στον πυρήνα του σπορίου (spore core) είναι υπεύθυνο για την χαμηλή περιεκτικότητά του σε νερό, το οποίο αν και σε ελεύθερη κατάσταση εμφανίζει υψηλό ιξώδες (de Vries, 2006; Sunde, Setlow, Hederstedt, et al., 2009).

Ανάλογα, λοιπόν, με το επίπεδο της πίεσης και θερμοκρασίας που εφαρμόζεται, μεταβάλλεται η φυσιολογία των σπορίων, το οποίο μπορεί να επάγει την εκβλάστησή τους ή επακόλουθα να οδηγήσει στην αδρανοποίησή τους. Επομένως, στην παρούσα μελέτη η θερμική επεξεργασία πιθανόν οδήγησε στη θανάτωση των βλαστικών μορφών και στην ενεργοποίηση των σπορίων του *Clostridium* spp..Εν συνεχεία, η διαδικασία της κάπνισης (2h, 84°C) καθώς και η εφαρμογή της υπερυψηλής πίεσης πιθανόν οδήγησε στη θανάτωση μέρους των ενεργοποιημένων σπορίων. Σύμφωνα με τους Gould & Sale (1970), η εφαρμογή πίεσης 150 - 400 MPa σε θερμοκρασία περιβάλλοντος επάγει την εκβλάστηση των σπορίων χωρίς την παρουσία θρεπτικών συστατικών, ενεργοποιώντας, όμως, τους αντίστοιχους υποδοχείς (Setlow, 2003). Η ενεργοποίησή τους προκαλεί την απελευθέρωση του διπικολινικού οξέως (DPA), το οποίο επακόλουθα ενεργοποιεί τα λυτικά ένζυμα (CLEs) που διασπούν το περίβλημα του σπορίου (Reineke et al., 2012). Ωστόσο, λόγω της ετερογένειας του εκάστοτε πληθυσμού ο βαθμός αδρανοποίησης ποικίλει και ένα μέρος αυτού παραμένει ανθεκτικό στην εφαρμοζόμενη πίεση (Heinz & Knorr, 2001).

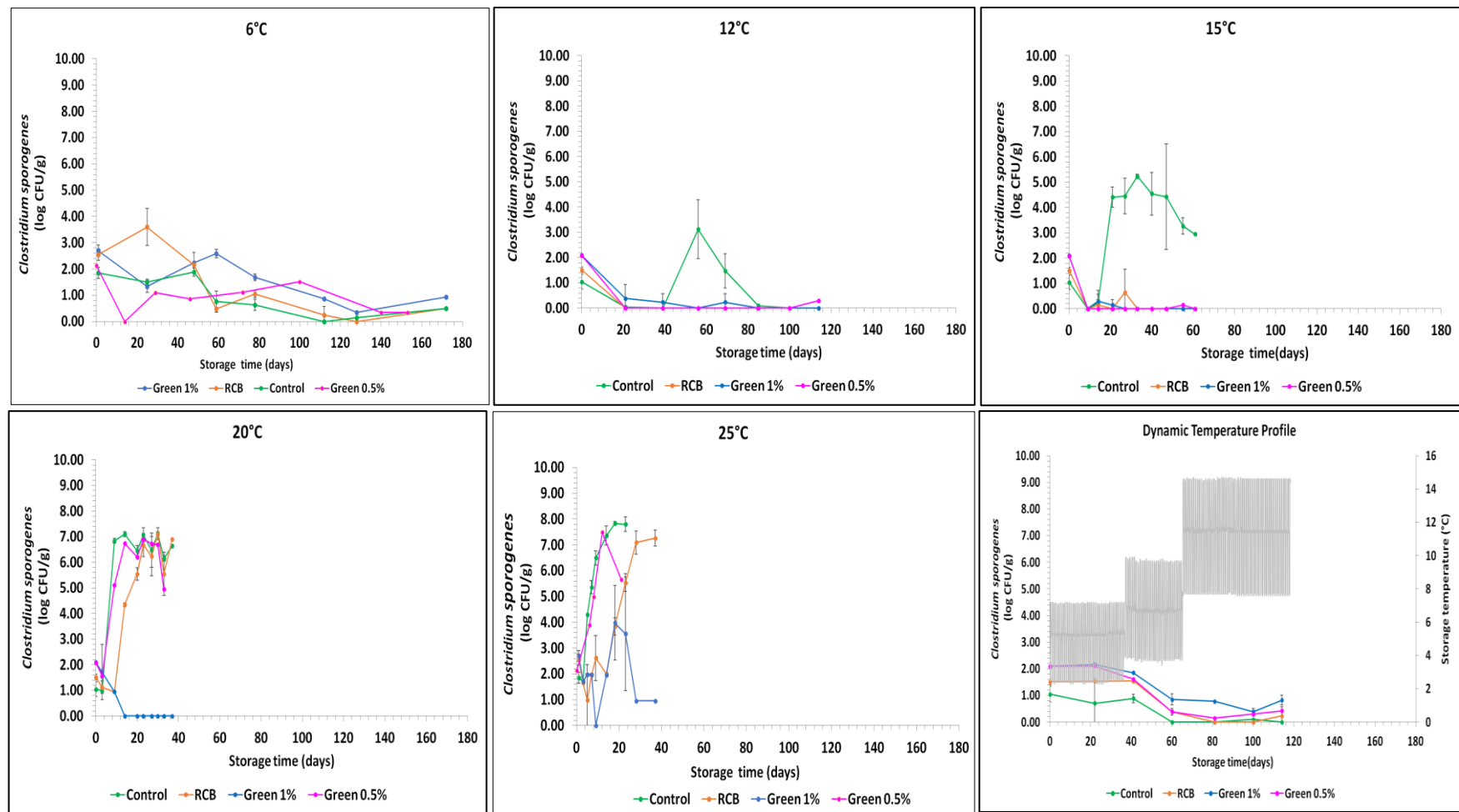
Όσον αφορά στην ανάπτυξη των *Clostridium* spp. κατά τη διάρκεια συντήρησης, τα αποτελέσματα συνοψίζονται στα Γραφήματα 1, 2 και 3. Σύμφωνα με το Γράφημα 1, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *C. sporogenes*, με αρχικό πληθυσμό  $10^4$  σπόρια/g, κατά τη συντήρηση στους 6, 12, 15°C, καθώς και στις μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες, παρουσία των αντιμικροβιακών μέσων. Στους 12°C, ο

μάρτυρας έφτασε τους 3.12 log CFU g<sup>-1</sup> την 56<sup>η</sup> μέρα συντήρησης, ενώ στους 15°C ο μέγιστος πληθυσμός ήταν 5.24 log CFU g<sup>-1</sup> την 33<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. Όπως φαίνεται, στους 20°C παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε όλες τις μεταχειρίσεις, εκτός από την περίπτωση του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 1% w/w. Οι μέγιστοι πληθυσμοί δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων φτάνοντας τους 7.13, 7.12 και 6.90 log CFU g<sup>-1</sup> στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 0.5% w/w, αντίστοιχα. Σε θερμοκρασία συντήρησης 25°C, δε, παρ' όλο που παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού παρουσία του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 1% w/w, ο μέγιστος πληθυσμός παρέμεινε χαμηλός, φτάνοντας τους 3.98 log CFU g<sup>-1</sup> τη 18<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. Οι μέγιστοι πληθυσμοί στις υπόλοιπες μεταχειρίσεις κυμαίνονταν σε παρόμοια επίπεδα και πιο συγκεκριμένα ήταν 7.84, 7.26 και 7.49 log CFU g<sup>-1</sup>, στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 0.5% w/w, αντίστοιχα.

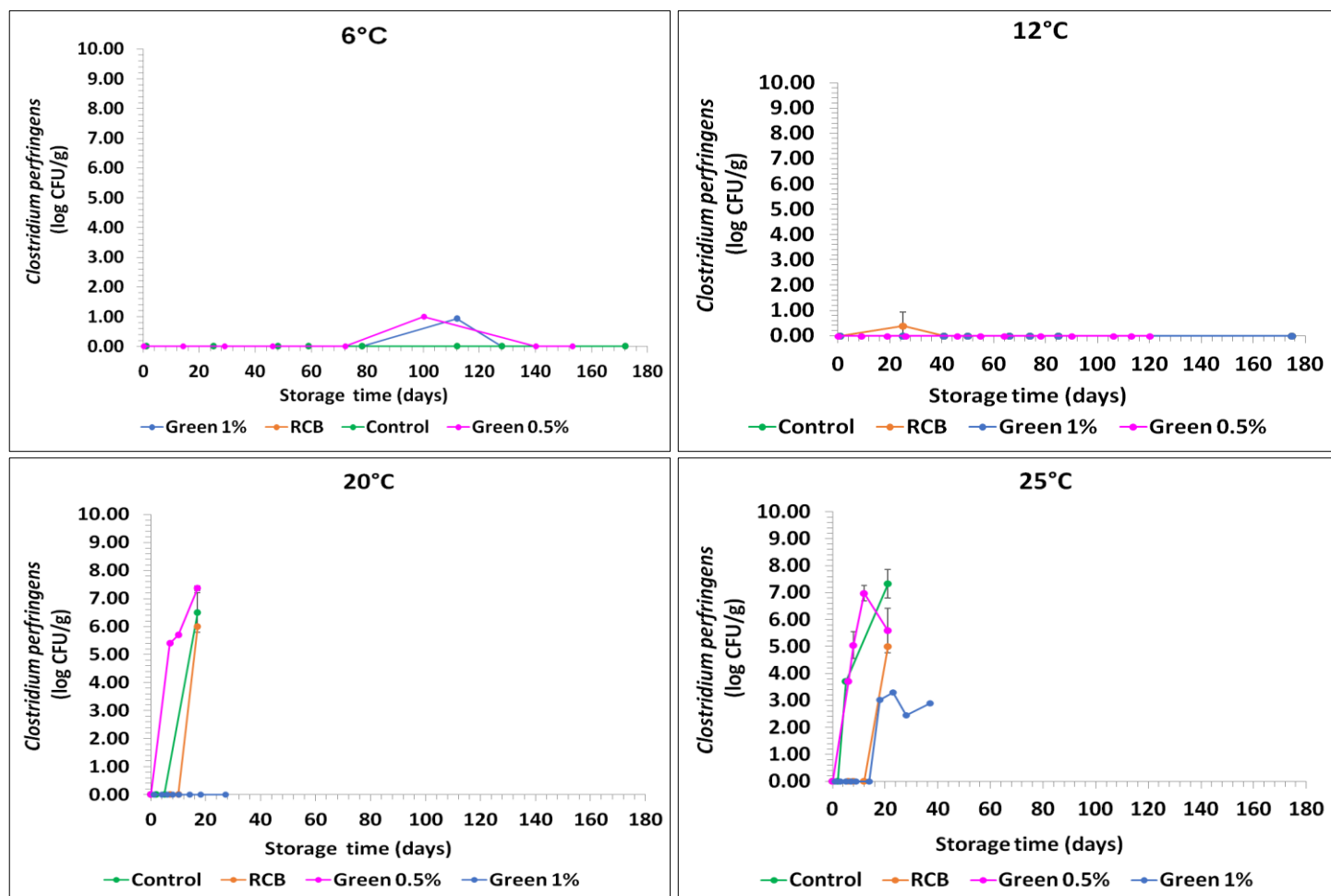
Συγκρίνοντας τα Γραφήματα 2 και 3, παρατηρούμε ότι οι *C. sporogenes* και *C. perfringens* παρουσίασαν παρόμοιο δυναμικό αύξησης. Πιο συγκεκριμένα κανείς από τους δύο μικροοργανισμούς δε σημείωσε ανάπτυξη κατά τη συντήρηση στους 6 και 12°C σε καμία από τις μεταχειρίσεις. Στους 20°C, το *C. perfringens* παρουσίασε ανάπτυξη σε όλες τις μεταχειρίσεις, εκτός από την περίπτωση του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 1% w/w, με τους μέγιστους πληθυσμούς να φτάνουν τους 6.50, 6.00 και 7.36 log CFU g<sup>-1</sup>, στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 0.5% w/w, αντίστοιχα. Στην ίδια θερμοκρασία, παρόμοια είναι και η εικόνα του *C. sporogenes*, με τους μέγιστους πληθυσμούς να φτάνουν τους 7.30, 6.00, 7.75 log CFU g<sup>-1</sup>, στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 0.5% w/w, αντίστοιχα. Στους 25°C, παρατηρήθηκε ανάπτυξη των κλωστριδίων σε όλες τις μεταχειρίσεις, με χαμηλότερους πληθυσμούς να σημειώνονται στην περίπτωση του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 1% w/w, όπου έφτασε τους 3.30 και 3.34 log CFU g<sup>-1</sup>, την 23<sup>η</sup> και την 37<sup>η</sup> μέρα συντήρησης, για το *C. perfringens* και *C. sporogenes*, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, στα Γραφήματα 1 και 3 είναι εμφανής η επίδραση του αρχικού πληθυσμού στην ανάπτυξη του *C. sporogenes*, φαινόμενο που εντείνεται στις χαμηλές θερμοκρασίες. Πιο συγκεκριμένα, συντήρηση στους 12°C είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού στην περίπτωση του χαμηλού αρχικού πληθυσμού, ενώ παρατηρήθηκε ανάπτυξη μόνο στην περίπτωση του υψηλού εμβολίου (10<sup>4</sup> σπόρια/g). Σύμφωνα με τους Koutsoumanis και Sofos (2005), ένας υψηλότερος αρχικός πληθυσμός αυξάνει την

πιθανότητα ένα ή περισσότερα κύτταρα να είναι ικανά να αναπτυχθούν, σε συνθήκες κοντά στις οριακές για την ανάπτυξη.

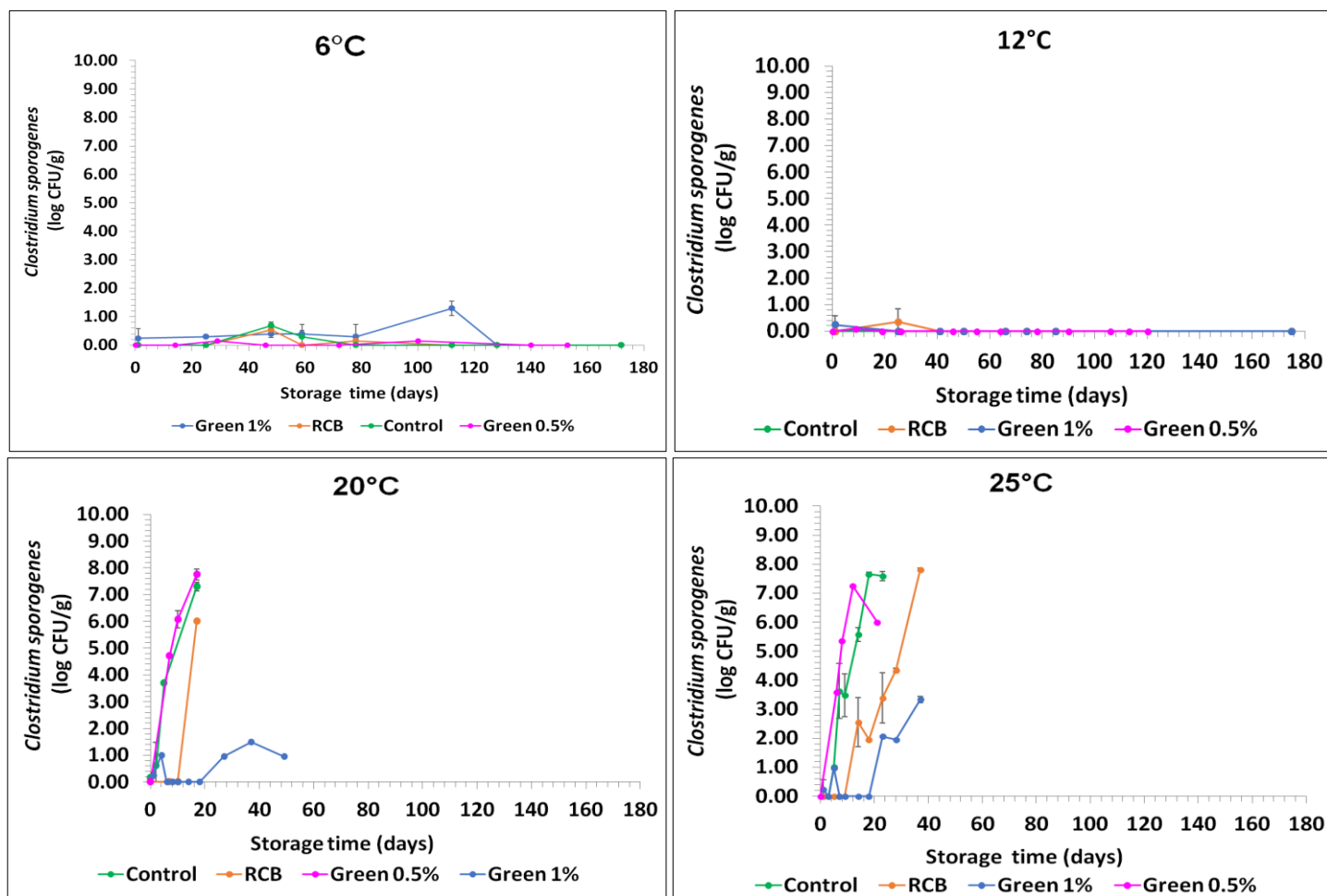
Τα ανωτέρω ευρήματα συνάδουν με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί το *C. perfringens* δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες < 15°C. Σύμφωνα με άλλες μελέτες δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε θερμοκρασία 8 (Prevost et al., 2013) και 10°C (Juneja et al., 2008) σε φουά γκρα και μοσχαρίσιο κιμά, αντίστοιχα. Ωστόσο, οι Xiao et al. (2015) έδειξαν πως η ικανότητα παραγωγής σπορίων, καθώς και η ικανότητα ανάπτυξης του *Clostridium perfringens* σε διαφορετικές θερμοκρασίες διαφέρει σημαντικά μεταξύ των στελεχών. Όσον αφορά το *C. sporogenes*, οι πληροφορίες σχετικά με την ανάπτυξή του στα τρόφιμα είναι περιορισμένες. Σύμφωνα με τους Hong et al. (2016) δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θερμοκρασίες < 15°C σε μοσχαρίσιο κιμά καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης (25 μέρες).



Γράφημα 1: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *Clostridium sporogenes* σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό στους 6, 12, 15, 20, 25°C, καθώς και σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες με τη χρήση νιτρωδών ( —□— ), φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0,5 ( —◇— ) και 1% w/w ( —△— ), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) ( —○— ). Το επίπεδο του αρχικού εμβολίου (κρεατόπαστα) ήταν  $10^4$  σπόρια/g.



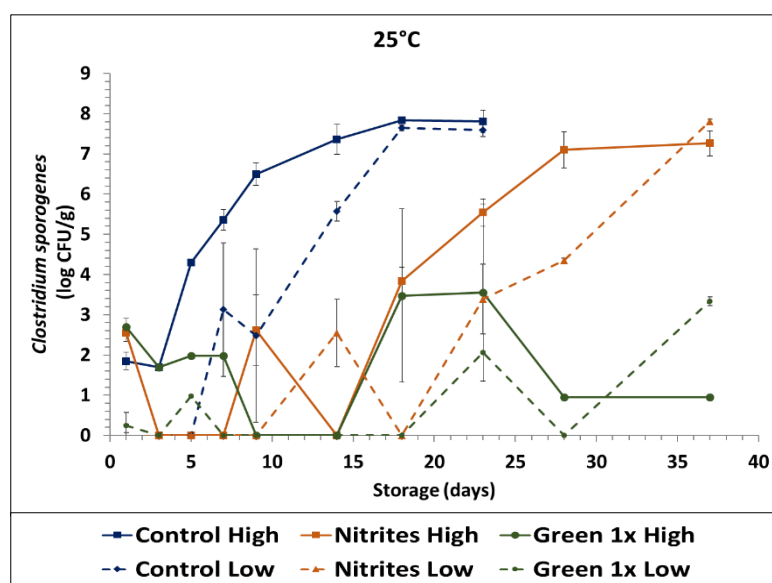
Γράφημα 2: : Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *Clostridium perfringens* σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό στους 6, 12, 20 και 25°C με τη χρήση νιτρωδών (—○—), φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0,5 (—■—) και 1% w/w (—◆—), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) (—●—). Το επίπεδο του αρχικού εμβολίου (κρεατόπαστα) ήταν 1-5 σπόρια/g.



Γράφημα 3: Γραφική απεικόνιση της κινητικής ανάπτυξης του *Clostridium sporogenes* σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό στους 6, 12, 20 και 25°C με τη χρήση νιτρωδών ( —●— ), φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0,5 ( —●— ) και 1% w/w ( —●— ), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) ( —●— ). Το επίπεδο του αρχικού εμβολίου (κρεατόπαστα) ήταν  $10^2$  σπόρια/g.

### 3.1.2 Επίδραση του επιπέδου του εμβολίου

Για τη μελέτη την επίδρασης του επιπέδου του αρχικού πληθυσμού στην μετέπειτα ανάπτυξη του *Clostridium sporogenes*, η κρεατόπαστα εμπολιάστηκε με  $10^2$  (χαμηλό εμβόλιο) και  $10^4$  σπόρια/g (υψηλό εμβόλιο). Μετά το πέρας όλων των βιομηχανικών διεργασιών για την προετοιμασία του προϊόντος (θερμική επεξεργασία, κάπνιση, συσκευασία υπό κενό, υπερυψηλή πίεση) ο πληθυσμός του *C. sporogenes* για υψηλό και χαμηλό εμβόλιο διαμορφώθηκε στα 2-3 logCFU/g και 0.1 logCFU/g αντίστοιχα.



Γράφημα 4: Γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης του χαμηλού ( $100$  σπόρια/g), καθώς και του υψηλού εμβολίου ( $10000$  σπόρια/g) του *Clostridium sporogenes* σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό στους  $25^{\circ}\text{C}$ .

Στο Γράφημα 4 παρουσιάζεται η επίδραση του αρχικού πληθυσμού του *Clostridium sporogenes* στην μετέπειτα ανάπτυξη του μικροοργανισμού για θερμοκρασία συντήρησης  $25^{\circ}\text{C}$ . Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8, ο υψηλότερος αρχικός πληθυσμός έχει ως αποτέλεσμα μικρότερη φάση προσαρμογής, καθώς αυξάνεται η πιθανότητα να υπάρχει τουλάχιστον ένα κύτταρο στην κατάλληλη φυσιολογική κατάσταση ώστε να ξεκινήσει τις κυτταροδιαίρέσεις. Άλλες μελέτες, επίσης, αναφέρουν την επίδραση του επιπέδου του αρχικού πληθυσμού στην μετέπειτα ικανότητά του να αναπτυχθεί (Robinson et al., 2001; Pascual et al., 2001). Όπως αναφέρουν οι Robinson et al. (2001), απαιτείται μόλις ένα κύτταρο *Listeria monocytogenes* ώστε να ξεκινήσει ανάπτυξη σε βέλτιστες συνθήκες, ενώ παρουσία  $1.8 \text{ M NaCl}$ , ο αριθμός των κυττάρων ανέρχεται στα  $10^5$ .

Πίνακας 8: Τιμές των κινητικών παραμέτρων αύξησης για τα διαφορετικά επίπεδα (Χαμηλό, Υψηλό) αρχικού πληθυσμού του *Clostridium sporogenes* στους 25°C, για κάθε μεταχείριση, όπως προέκυψαν από το πρωτογενές μοντέλο Baranyi & Roberts (1994). Στις παρενθέσεις αναφέρεται το αντίστοιχο τυπικό σφάλμα (standard error) για κάθε τιμή.

Κινητικές παράμετροι αύξησης για <i>Clostridium sporogenes</i>				
Μεταχείριση	$\mu_{max}$ (days <sup>-1</sup> )		$\lambda$ (days)	
	Υψηλό	Χαμηλό	Υψηλό	Χαμηλό
<b>Control</b>	0.63 (0.14)	1.49 (0.77)	-	4.10 (2.02)
<b>RCB</b>	0.43 (0.12)	0.36 (0.18)	14.02 (2.13)	16.66 (1.22)
<b>Green 1%</b>	0.45 (0.11)	-	16.00 (1.32)	> 30

### 3.1.3 Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης

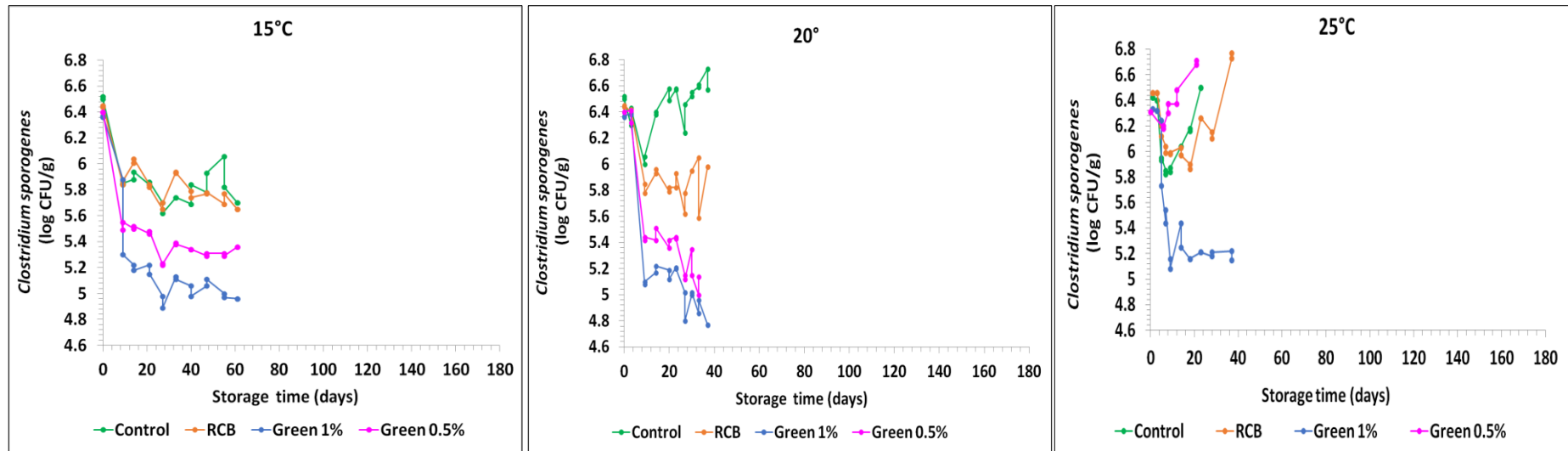
Η αλλοιογόνος μικροχλωρίδα των αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας σε συσκευασία υπό κενό αποτελείται κυρίως από οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως αναφέρθηκε στη εισαγωγή. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 5, οι αρχικές τιμές του pH κυμαίνονταν από 6.36-6.52. Στους 15°C σημειώθηκε πτώση της τιμής του pH σε όλες τις μεταχειρίσεις, με μεγαλύτερη μεταβολή να παρατηρείται στην περίπτωση του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές στο τέλος της διάρκειας συντήρησης ήταν 5.7, 5.65, 5.36 και 4.96, στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0.5% και 1% w/w, αντίστοιχα. Η πτώση του pH πιθανόν οφείλεται στην ανάπτυξη και την παραγωγή μεταβολικών προϊόντων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καθώς και στην παραγωγή οξέων λόγω της ζύμωσης των σακχάρων από το κλωστρίδιο (για την περίπτωση του μάρτυρα).

Στους 20°C παρατηρήθηκε άνοδος της τιμής του pH μόνο στην περίπτωση του μάρτυρα. Η άνοδος πιθανόν να οφείλεται στα προϊόντα διάσπασης των πρωτεϊνών, όπως η αμμωνία, λόγω της ανάπτυξης του κλωστριδίου (δεδομένου ότι σε αυτή τη θερμοκρασία όλα τα υπό μελέτη στελέχη αναπτύχθηκαν). Στην περίπτωση των νιτρωδών και του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0.5% w/w, αν και σημειώθηκε ανάπτυξη του κλωστριδίου, παρατηρήθηκε μείωση του pH. Η μείωση αυτή δύναται να οφείλεται αφενός στην ταχεία ανάπτυξη των οξυγαλακτικών



βακτηρίων στη θερμοκρασία αυτή και αφετέρου στην παραγωγή οξέων από το κλωστρίδιο, όπως προαναφέρθηκε. Ομοίως με προηγουμένως, η μεγαλύτερη μεταβολή στην πτώση του pH παρατηρήθηκε στην περίπτωση του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w. Στο τέλος της διάρκειας συντήρησης οι τιμές του pH ήταν 6.57, 5.98, 5.14 και 4.77, στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0.5% και 1%w/w, αντίστοιχα.

Στους 25°C παρατηρήθηκε άνοδος της τιμής του pH σε όλες τις μεταχειρίσεις εκτός από την περίπτωση του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w. Οι τιμές στο τέλος της διάρκειας συντήρησης ήταν 6.5, 6.77, 6.71 και 5.15 στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0.5% και 1% w/w, αντίστοιχα. Η υψηλότερη τιμή του pH για την περίπτωση του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w, σε σχέση με τις ανωτέρω θερμοκρασίες, οφείλεται στην ανάπτυξη του κλωστριδίου, ο μέγιστος πληθυσμός του οποίου έφτασε τους 3.98 log CFU g<sup>-1</sup> την 18<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. Η διαφορετική μεταβολή στο pH που φαίνεται να σχετίζεται με τις διαφορετικές μεταχειρίσεις, πιθανόν να οφείλεται στο διαφορετικό προφίλ των μικροοργανισμών που απαρτίζουν την αλλοιογόνο μικροβιακή χλωρίδα σε κάθε περίπτωση, γεγονός όμως που θα διερευνηθεί σε επόμενο στάδιο.



Γράφημα 5: Μεταβολή του pH κατά τη συντήρηση παστεριωμένων αλλαντικών, εμβολιασμένων με το *Clostridium sporogenes* και συσκευασμένων υπό κενό, στους 15, 20 και 25°C με τη χρήση νιτρικών ( — ), φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 0,5 ( — ) και 1% w/w ( — ), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) ( — ). Το επίπεδο του εμβολίου ήταν  $10^4$  σπόρια/g.

## 3.2 Αλλοίωση των παστεριωμένων αλλαντικών

Η αλλοίωση του κρέατος και των προϊόντων του είναι μια διαδικασία, η οποία προκαλείται κυρίως από τη μικροβιακή ανάπτυξη και τη συσσώρευση μεταβολικών προϊόντων (Nychas et al., 2007). Υπεύθυνο είναι ένα κλάσμα της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας, οι ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (specific spoilage organisms, SSOs). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τους ειδικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό (Mataragas et al. 2006, Nychas et al. 2007, Slongo et al. 2009).

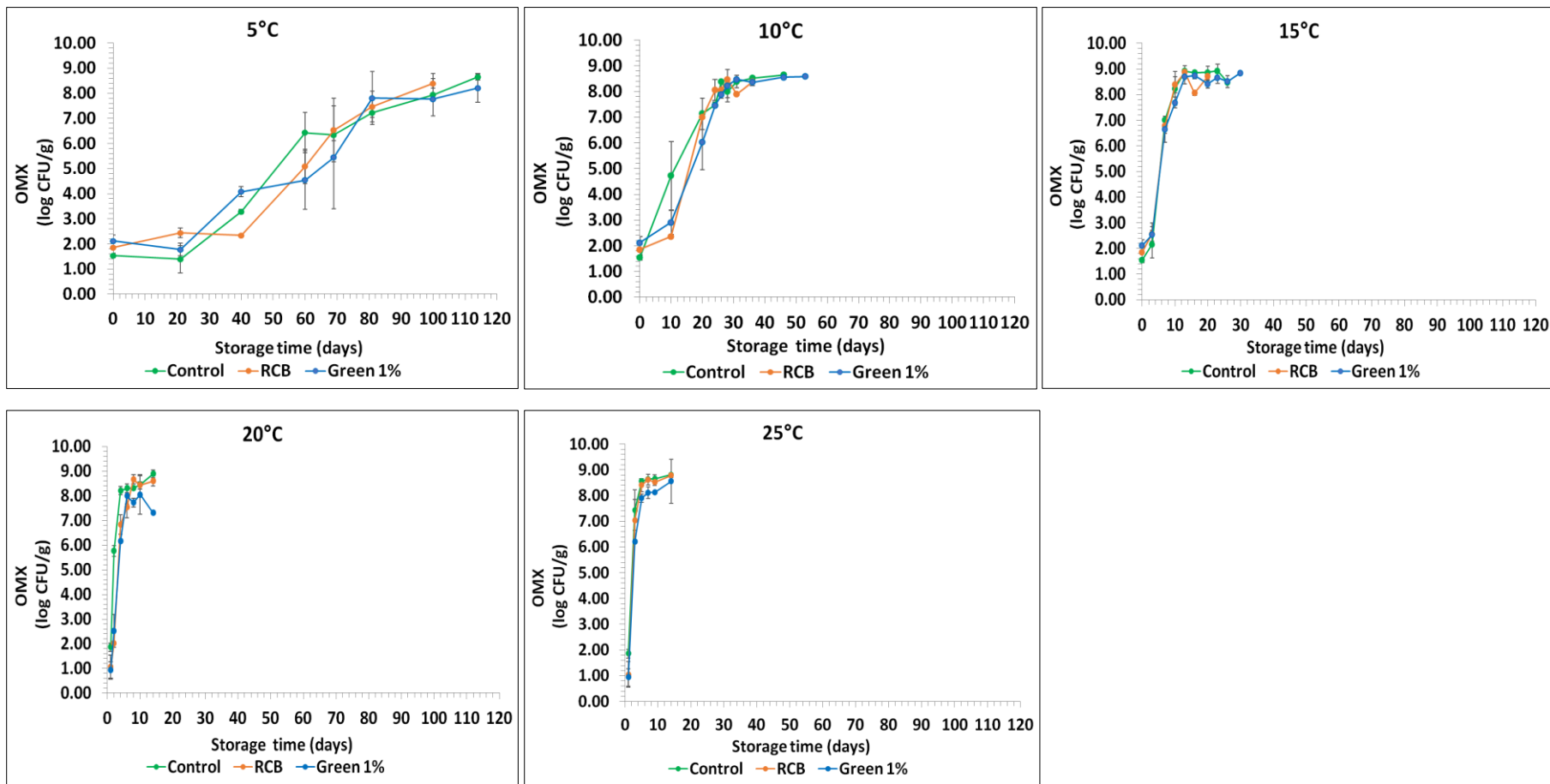
Η χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου, η υψηλή ενεργότητα ύδατος (μεταξύ 0.96 και 0.98), καθώς και η τιμή του pH (pH=6.0) είναι μερικές από τις παραμέτρους που ευνοούν την ανάπτυξη των εν λόγω μικροοργανισμών (Mataragas et al., 2006). Επιπρόσθετα, η επικράτηση τους ενισχύεται από την παρουσία νιτρικών αλάτων, τα οποία αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων (Kreyenschmidt et al., 2010).

### 3.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στην ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας και των οξυγαλακτικών βακτηρίων

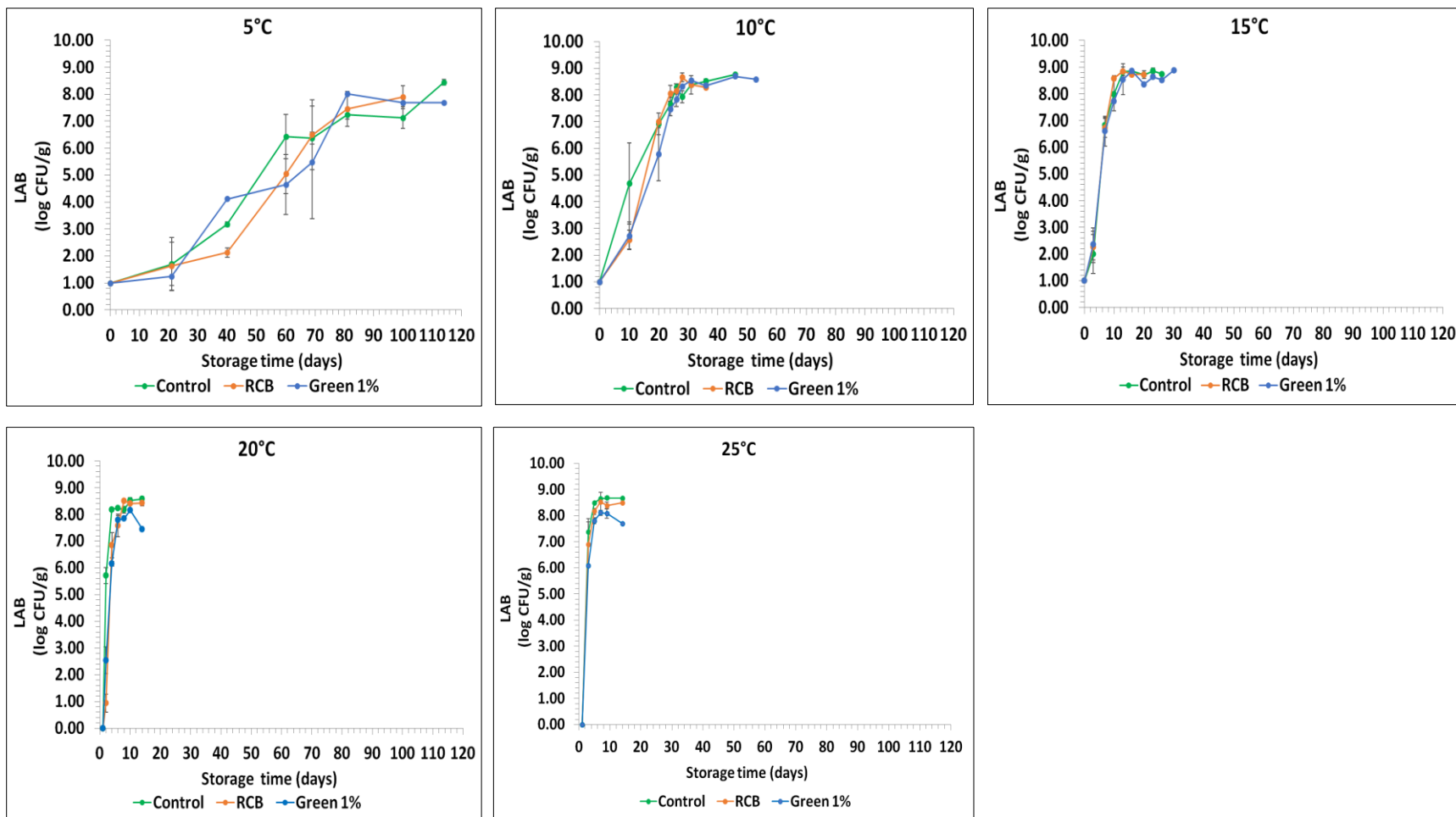
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ενότητας 3.1.1, το φυσικό αντιμικροβιακό ήταν αποτελεσματικό έναντι των *Clostridium* spp. μόνο σε συγκέντρωση 1% w/w, ενώ το 0.5% δεν είχε καμία επίδραση στη ανάπτυξη των παθογόνων, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας και είδους μικροοργανισμού. Για το λόγο αυτό, στην μελέτη της αλλοίωσης των εν λόγω προϊόντων, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί μόνο η συγκέντρωση 1% w/w του φυσικού αντιμικροβιακού.

Ο αρχικός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην πλειοψηφία των δειγμάτων ήταν στα επίπεδα του ορίου καταμέτρησης της μεθόδου (10 κύτταρα/g), ενώ ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας κυμαίνονταν από 0.83 - 2.28 log CFU g<sup>-1</sup> (Γραφήματα 6 και 7). Κατά τη διάρκεια συντήρησης, ανεξαρτήτως μεταχείρισης, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών έγινε κυρίαρχος, δεδομένου ότι η ανάπτυξη αυτών και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ήταν σχεδόν πανομοιότυπη σε όλες τις θερμοκρασίες και μεταχειρίσεις που εξετάστηκαν. Στο τέλος της συντήρησης, ο μέγιστος πληθυσμός τους δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές σε εύρος θερμοκρασίας 5 με 25°C. Πιο συγκεκριμένα, ο μέγιστος πληθυσμός κυμαινόταν από 7.00 – 9.16 log CFU g<sup>-1</sup> και 7.00 – 8.95 log CFU g<sup>-1</sup>, για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, αντίστοιχα. Παρατηρούμε, επίσης, πως δεν υπήρξε

λανθάνουσα φάση στις θερμοκρασίες 20 και 25°C, ενώ για τους 5, 10 και 15°C η λανθάνουσα φάση για τα οξυγαλακτικά βακτήρια κυμαίνονταν από 17 - 36, 0 - 7 και 1 - 3 μέρες, για τους 5, 10 και 15°C, αντίστοιχα.

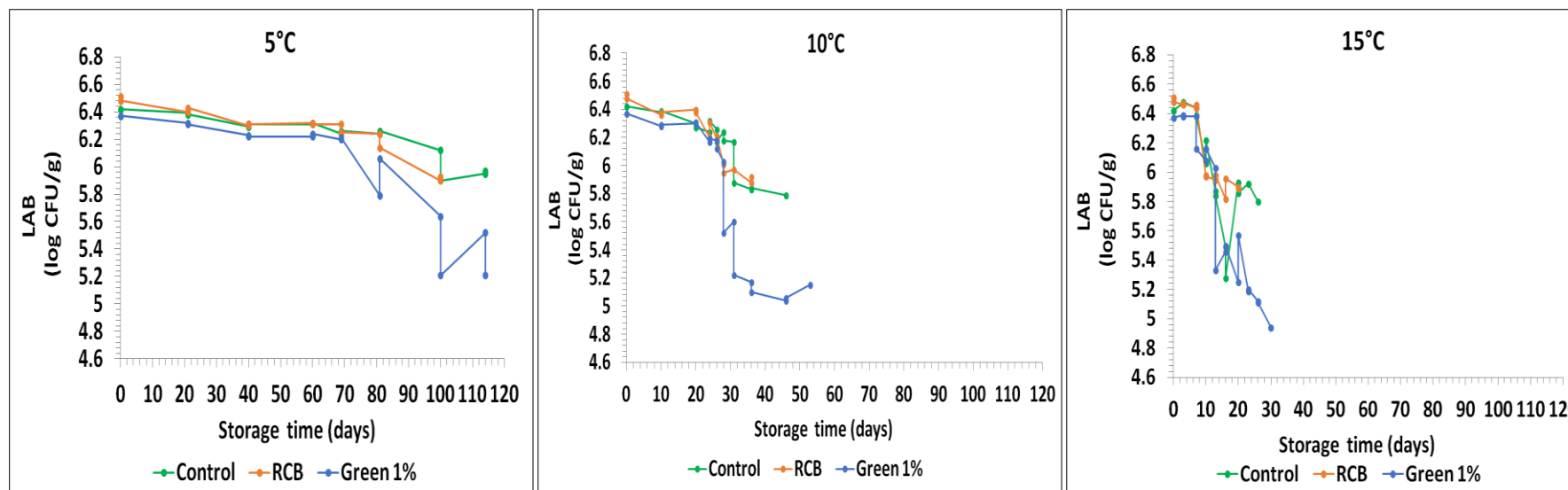


Γράφημα 6: Γραφική αναπαράσταση της αύξησης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό στους 5, 10, 15, 20 και 25°C, με τη χρήση νιτρωδών ( —■— ), φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w ( —▲— ), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) ( —●— ).



Γράφημα 7: Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό στους 5, 10, 15, 20 και 25°C με τη χρήση νιτρωδών ( — ), φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w ( — ), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) ( — ).

### 3.2.2 Μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια συντήρησης



Γράφημα 8: Μεταβολή του pH κατά τη συντήρηση παστεριωμένων αλλαντικών συσκευασμένων υπό κενό, στους 5, 10 και 15°C με τη χρήση νιτρωδών ( —●— ), φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w ( —●— ), καθώς και με απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) ( —●— ).

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 8, αρχικά, οι τιμές pH των δειγμάτων κυμαίνονταν από 6.37-6.51. Κατά τη διάρκεια συντήρησης το pH παρέμεινε σχετικά σταθερό έως ότου ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έφτασε περίπου τους 7.00 log CFU g<sup>-1</sup>. Στο σημείο αυτό ξεκίνησε να μειώνεται, με την τελική του τιμή να καθορίζεται από το είδος της μεταχείρισης. Πιο συγκεκριμένα στους 5°C, έφτασε το 5.97, 5.93 και 5.21, στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w, αντίστοιχα. Στους 10 και 15°C δεν παρατηρήθηκαν διαφορές, με τις τελικές τιμές να είναι 5.8, 5.89 και 4.94, στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών και του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w, αντίστοιχα.

Η πτώση του pH οφείλεται στην παραγωγή μεταβολικών προϊόντων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η παραγωγή των μεταβολικών προϊόντων, όπως το D-γαλακτικό οξύ είναι εντονότερη κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης (Mataragas et al., 2006). Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως ενώ παρατηρείται αύξηση του D-γαλακτικού οξέως, το L-γαλακτικό οξύ μειώνεται λόγω της κατανάλωσής του από τους μικροοργανισμούς, ως πηγή άνθρακα, σε περίπτωση απουσίας ή περιορισμένης συγκέντρωσης της γλυκόζης (Nychas et al., 1998).

Επιπρόσθετα, οι διαφορές που παρατηρούνται στη μεταβολή του pH στην περίπτωση του φυσικού αντιμικροβιακού οφείλονται στο διαφορετικό επίπεδο ζυμώσιμων υδατανθράκων, καθώς και στα μεταβολικά προϊόντα των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία καθορίζονται από το γένος, το είδος και τις συνθήκες ανάπτυξης (Borch et al., 1991). Επομένως, είναι πιθανόν η διαφορετική μεταβολή του pH, η οποία χαρακτηρίζει τις διαφορετικές μεταχειρίσεις, να υποδεικνύει και την ύπαρξη διαφορετικού μικροβιακού προφίλ αλλοιογόνων μικροοργανισμών.



### 3.2.3 Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της μικροβιακής αλλοίωσης προϊόντων θερμικής επεξεργασίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ανάπτυξη και εφαρμογή μαθηματικών εξισώσεων που περιγράφουν την κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών έχει κερδίσει αυξανόμενη προσοχή, καθώς αποτελεί μέσο πρόβλεψης της ανάπτυξης τόσο των παθογόνων όσο και των αλλοιογόνων βακτηρίων, προσδιορίζοντας έτσι το χρόνο ζωής του προϊόντος (Koutsoumanis & Nychas, 2000). Ως εκ τούτου, η μικροβιολογία πρόρρησης αποτελεί ένα αξιόπιστο και οικονομικό εργαλείο για την γρήγορη εκτίμηση της διάρκειας ζωής των τροφίμων.

Η κύρια παράμετρος που επιδρά στη μικροβιακή αλλοίωση είναι η θερμοκρασία, η οποία επηρεάζει το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης, καθώς και τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής των μικροοργανισμών (Mataragas et al., 2006). Καθώς η θερμοκρασία μπορεί να παρουσιάζει διακυμάνσεις στην αλυσίδα παραγωγής και διανομής τροφίμων, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια μαθηματική έκφραση για να περιγράψει την παραλλακτικότητα χρόνου-θερμοκρασίας (Koutsoumanis, 2001). Μέχρι σήμερα, έχουν δημοσιευτεί μελέτες σχετικά με την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης σε προϊόντα κρέατος σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (Mataragas et al. 2006, Kreyenschmidt et al. 2010).

Στην παρούσα μελέτη οι προβλέψεις της μικροβιακής ανάπτυξης βασίστηκαν σε μαθηματικά μοντέλα για την κινητική απόκρισης των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεδομένου ότι αποτελούν τους κυρίαρχους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς στα προϊόντα αυτά.

Αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα ότι τα δεδομένα κινητικής που παραλήφθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi & Roberts (1994) με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος DMfit. Από τις καμπύλες ανάπτυξης που προέκυψαν συλλέχθηκαν σημαντικές πληροφορίες (κινητικές παράμετροι της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, όπως είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης, η φάση προσαρμογής και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός), οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για τις φάσεις ανάπτυξης και την απόκριση των μικροοργανισμών στις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης, ανεξαρτήτως μεταχείρισης, γεγονός που επιβεβαιώνει τον καθοριστικό ρόλο της θερμοκρασίας στο χρόνο ζωής των τροφίμων. Όπως είναι φανερό από τους Πίνακες 8-9, μειούμενης της θερμοκρασίας συντήρησης αυξάνει η φάση προσαρμογής και μειώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα θερμοκρασία

συντήρησης 25°C είχε ως αποτέλεσμα  $\mu_{\max}$  2.3-2.9 ( $\text{days}^{-1}$ ) και απουσία φάσης προσαρμογής, ενώ συντήρηση στους 5°C είχε ως αποτέλεσμα μειωμένο  $\mu_{\max}$  (0.10-0.16  $\text{days}^{-1}$ ) και αυξημένη φάση προσαρμογής  $\lambda$  (16-36 days). Επιπρόσθετα, οι μικρές διαφορές στις κινητικές παραμέτρους των οξυγαλακτικών βακτηρίων για τις διαφορετικές μεταχειρίσεις υποδεικνύουν την περιορισμένη επίδραση των μεταχειρίσεων αυτών στην αλλοιογόνο μικροχλωρίδα.

**Πίνακας 9:** Τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{\max}$ ) των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του αντίστοιχου τυπικού σφάλματος (σε παρένθεση), ανά μεταχείριση και θερμοκρασία συντήρησης όπως προέκυψαν από το πρωτογενές μοντέλο Baranyi & Roberts (1994).

Οξυγαλακτικά βακτήρια, $\mu_{\max}$ ( $\text{days}^{-1}$ )							
Μεταχείριση	Θερμοκρασία						
	5 °C	6 °C	10 °C	12 °C	15 °C	20 °C	25 °C
<b>Control</b>	0.12 (0.03)	0.07 (0.01)	0.31 (0.02)	0.28 (0.02)	1.23 (0.19)	2.06 (0.07)	2.93 (0.11)
<b>RCB</b>	0.16 (0.04)	0.06 (0.01)	0.46 (0.03)	0.26 (0.03)	1.18 (0.11)	1.92 (0.18)	2.73 (0.14)
<b>Green 1%</b>	0.10 (0.02)	0.05 (0.01)	0.36 (0.03)	0.29 (0.02)	0.96 (0.09)	1.65 (0.11)	2.38 (0.11)

**Πίνακας 9:** Τιμές της φάσης προσαρμογής ( $\lambda$ ) των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του αντίστοιχου τυπικού σφάλματος (σε παρένθεση), ανά μεταχείριση και θερμοκρασία συντήρησης όπως προέκυψαν από το πρωτογενές μοντέλο Baranyi & Roberts (1994).

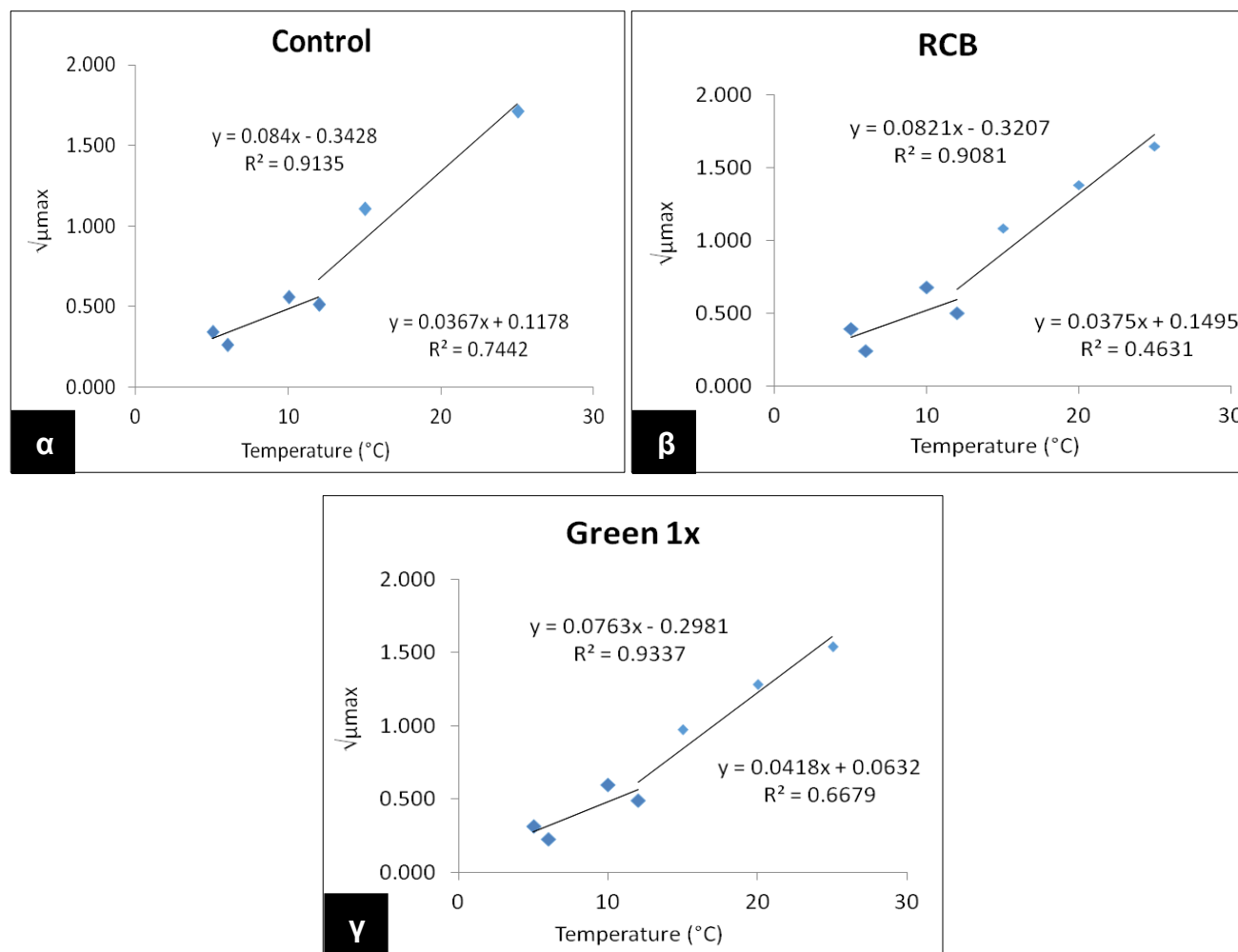
Οξυγαλακτικά βακτήρια, $\lambda$ (days)							
Μεταχείριση	Θερμοκρασία						
	5 °C	6 °C	10 °C	12 °C	15 °C	20 °C	25 °C
<b>Control</b>	19.59 (9.97)	26.31 (16.14)	1.26 (1.57)	0.95 (1.33)	2.28 (0.75)	-	-
<b>RCB</b>	36.41 (7.13)	25.68 (20.63)	6.88 (0.91)	0.81 (2.3)	2.10 (0.47)	-	-
<b>Green 1%</b>	16.64 (9.55)	47.11 (28.90)	6.12 (1.85)	1.27 (1.01)	1.40 (0.49)	-	-

Στη συνέχεια, ο ειδικός ρυθμός αύξησης μοντελοποιήθηκε, συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης με τη χρήση του δευτερογενούς μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας (Ratkowsky et al., 1982). Οι εξισώσεις που περιγράφουν το εν λόγω μοντέλο είναι της μορφής  $y=ax+b$  και παριστάνονται στο Γράφημα 9. Τα αποτελέσματα από το πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε σταθερές θερμοκρασιακές συνθήκες έδειξε ότι το δευτερογενές μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας δύναται να περιγράψει την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των οξυγαλακτικών

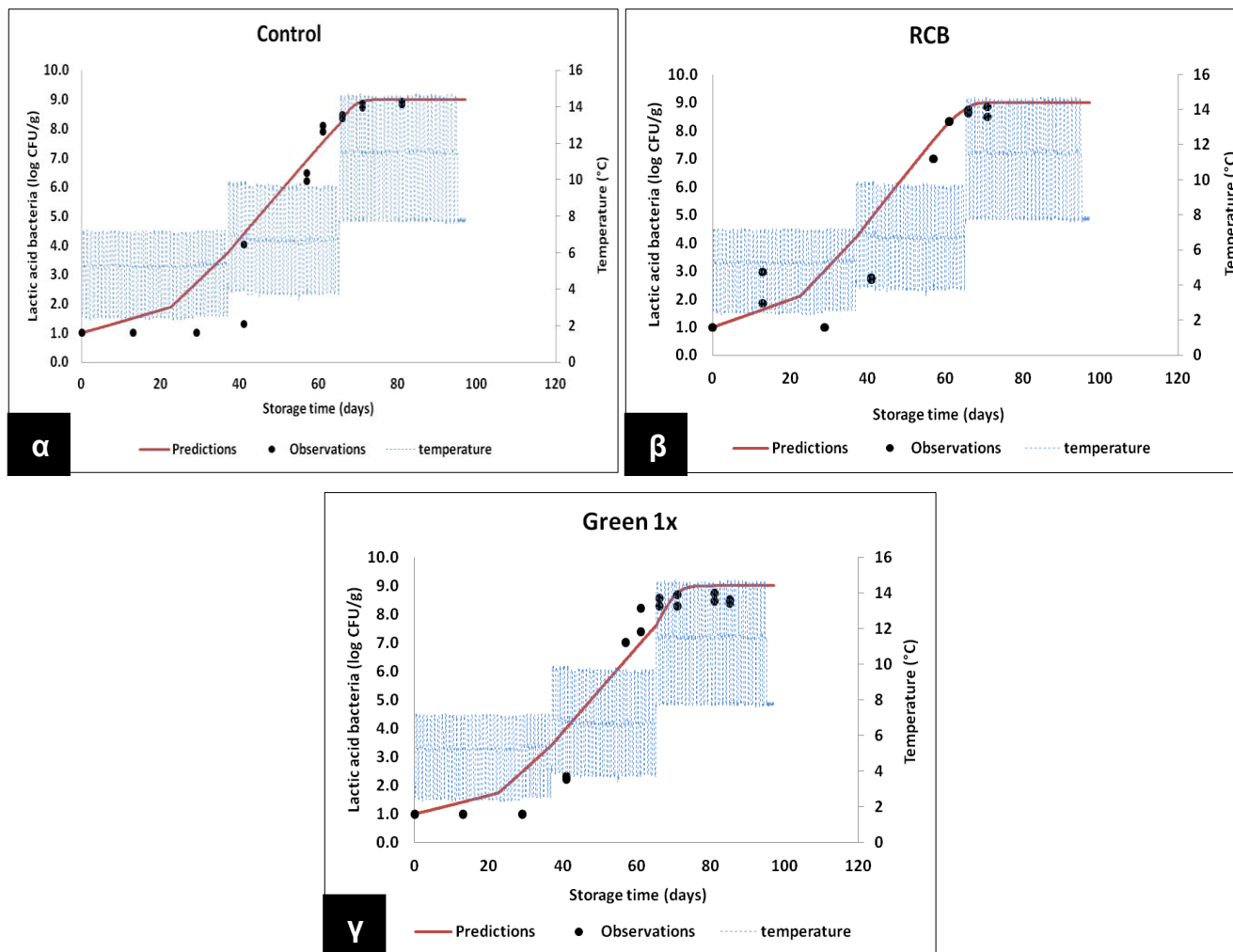
βακτηρίων σε θερμοκρασιακό εύρος 5-12 και 12-25°C. Η ανάπτυξη μοντέλων για κάθε θερμοκρασιακό εύρος είχε σκοπό την καλύτερη πρόβλεψη της μικροβιακής απόκρισης. Στη συνέχεια, η επικύρωση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας.

**Πίνακας 10: Εκτιμώμενες τιμές των παραμέτρων b και T<sub>min</sub>, όπως προκύπτουν από το δευτερογενές μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας.**

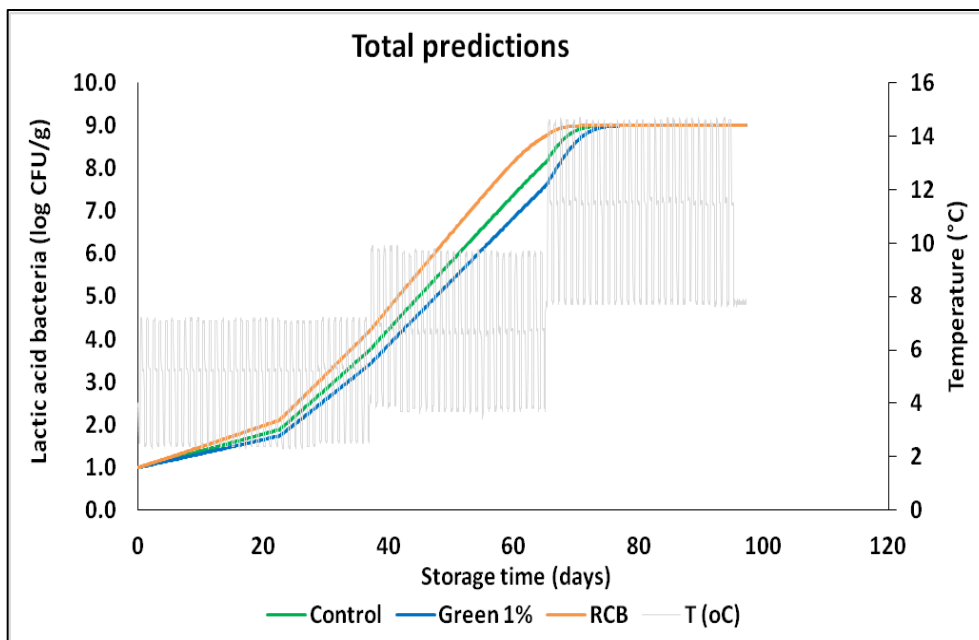
<b>Οξυγαλακτικά βακτήρια</b>						
<b>Παράμετροι</b>	<b>Control</b>		<b>RCB</b>		<b>Green 1x</b>	
	(5-12°C)	(12-25°C)	(5-12°C)	(12-25°C)	(5-12°C)	(12-25°C)
a	0.0367	0.084	0.0375	0.0821	0.0418	0.0763
b	0.1178	-0.3428	0.1495	-0.3207	0.0632	-0.2981
T <sub>min</sub>	-3.210	4.081	-3.987	3.906	-1.512	3.907
R <sup>2</sup>	0.7442	0.9135	0.4631	0.9081	0.6679	0.9337



Γράφημα 9: Διαγράμματα του δευτερογενούς μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας που απεικονίζουν την επίδραση της θερμοκρασίας στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης ( $\mu_{max}$ ) των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο α) μάρτυρα, β) με προσθήκη νιτρωδών, καθώς και γ) φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 1% w/w. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις παρατηρούμενες τιμές (observed), ενώ οι ευθείες γραμμές αναπαριστούν την ευθεία γραμμικής παλινδρόμησης.



Γράφημα 10: Γραφική αναπαράσταση της προβλεπόμενης και παρατηρούμενης ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε παστεριωμένα αλλαντικά συσκευασμένα υπό κενό συντηρούμενα σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες. Εξετάστηκαν τρεις μεταχειρίσεις: α) μάρτυρας, β) με προσθήκη νιτρωδών, καθώς και γ) φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 1% w/w.



Γράφημα 11: Κινητική ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως προβλέπεται από το μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας, παρουσία νιτρωδών, φυσικού αντιμικροβιακού (1% w/w), καθώς και απουσία αντιμικροβιακού μέσου (μάρτυρας) υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες T.

Η επικύρωση του μοντέλου ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας με εύρος από 5-25°C, δεδομένου ότι πολύ συχνά η ψυκτική αλυσίδα διακόπτεται κατά τη παραγωγή, διανομή και χειρισμό των τροφίμων από τον τελικό καταναλωτή. Από την ταυτόχρονη παράθεση των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων καμπυλών ανάπτυξης στις μεταβαλλόμενες συνθήκες (T) (Γράφημα 10), παρατηρείται πως υπάρχει απόκλιση μεταξύ των παρατηρούμενων τιμών και των προβλέψεων, η οποία μπορεί να περιγραφεί ποιοτικά και ποσοτικά με τους συντελεστές αβεβαιότητας και ακρίβειας που κυμαίνονται 1.2-1.3 για όλες τις μεταχειρίσεις. Σύμφωνα με τον Ross (1999), όταν η τιμή του συντελεστή αβεβαιότητας ( $B_f$ ) βρίσκεται εντός του εύρους 0.90-1.05, τότε το μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά την ανάπτυξη του υπό μελέτη μικροοργανισμού. Όταν βρίσκεται εντός των διαστημάτων 0.70-0.90 ή 1.06-1.15 θεωρείται αποδεκτό, ενώ όταν η τιμή του  $B_f$  είναι  $< 0.70$  ή  $> 1.15$  θεωρείται μη αποδεκτό. Οι αποκλίσεις που προκύπτουν αφορούν κυρίως την απόκριση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην 1<sup>η</sup> φάση συντήρησης, δηλαδή σε θερμοκρασίες 3-7°C. Οι χαμηλές θερμοκρασίες συντήρησης, στην παρούσα μελέτη, συντελούσαν μαζί με την πολυπλοκότητα του τροφίμου, καθώς και το γεγονός ότι πρόκειται για πείραμα πεδίου, στην αύξηση της παραλλακτικότητας των μικροβιακών αποκρίσεων.

Οι αποκλίσεις αυτές δύναται να μειωθούν με ενσωμάτωση ενδιάμεσων θερμοκρασιών σε σχέση με αυτές που μελετήθηκαν, με διενέργεια επιπλέον επαναλήψεων, καθώς και με ενσωμάτωση της επίδρασης του έργου προσαρμογής των κυττάρων ( $h_0$ ) στην μικροβιακή ανάπτυξη.

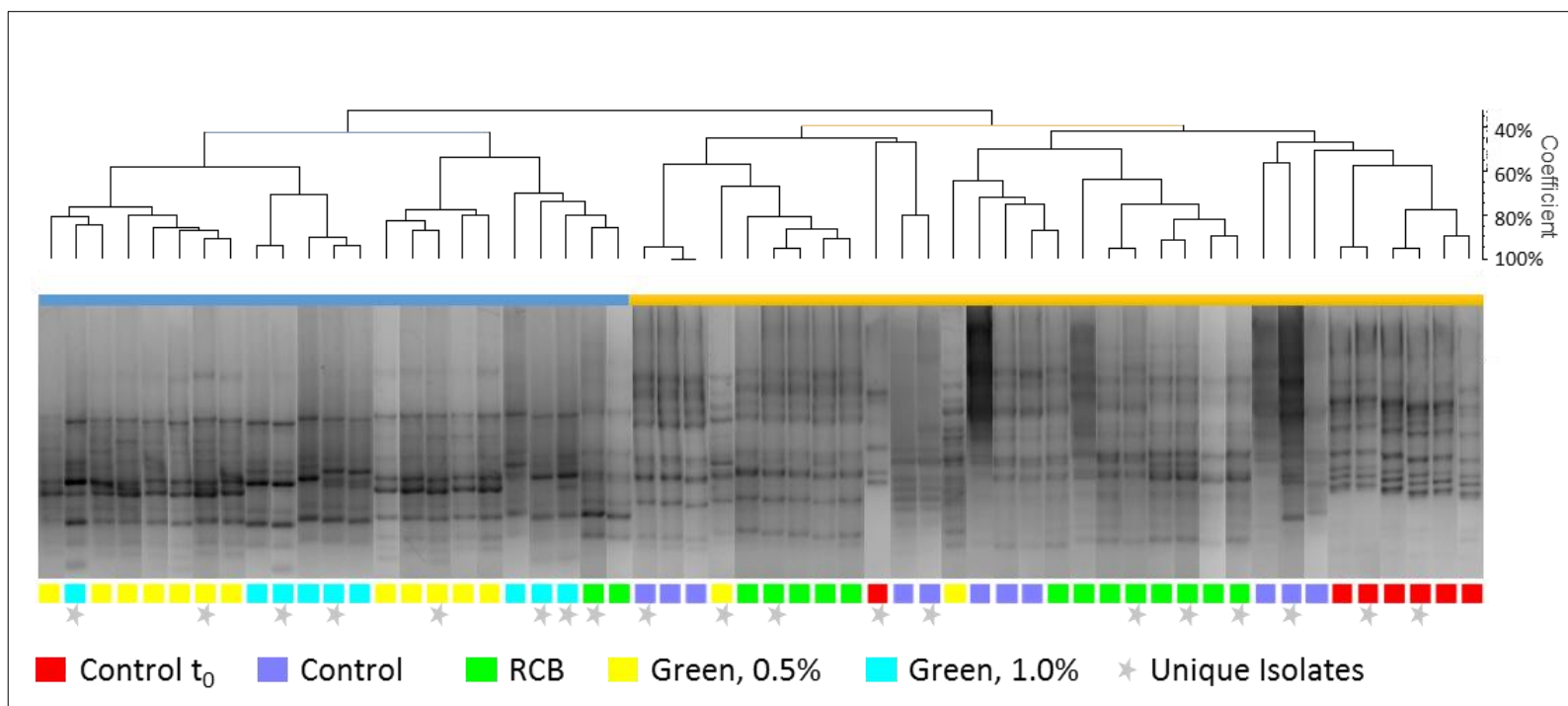
**Πίνακας 11:** Συντελεστής αβεβαιότητας (bias factor, Bf) και συντελεστής ακριβείας (accuracy factor, Af) για το μοντέλο πρόβλεψης της μικροβιακής απόκρισης στην περίπτωση του μάρτυρα, των νιτρωδών, καθώς και του φυσικού συντηρητικού σε συγκέντρωση 1% w/w.

	<b>Control</b>	<b>RCB</b>	<b>Green 1%</b>
<b>Af</b>	1.28	1.32	1.25
<b>Bf</b>	1.26	1.20	1.19

Όσον αφορά στην επίδραση των νιτρωδών και του φυσικού συντηρητικού στην αλλοίωση των υπό μελέτη αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας, αυτή αποτυπώνεται στο Γράφημα 11. Παρατηρείται πως η χρήση του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% έχει μικρή επίδραση στην ανάπτυξη της αλλοιογόνου χλωρίδας, καθυστερώντας την ανάπτυξη των αλλοιογόνων οξυγαλακτικών βακτηρίων σε σύγκριση με το μάρτυρα ή τα νιτρώδη. Ως εκ τούτου δύναται να συμβάλλει πιθανόν στη μικρή μόνο επέκταση του χρόνου ζωής του προϊόντος (βάσει μικροβιολογικών κριτηρίων).

### **3.3 Απομόνωση και ταυτοποίηση αλλοιογόνου μικροβιακής χλωρίδας**

Σε προηγούμενη παράγραφο αναφέρθηκε ότι οι διαφορετικές μεταχειρίσεις (μάρτυρας, νιτρώδη, φυσικό αντιμικροβιακό) είχαν ως αποτέλεσμα διαφορετικό pH στο αλλαντικό στο τέλος της συντήρησής, με το φυσικό αντιμικροβιακό να σχετίζεται με το χαμηλότερο pH. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι αυτή η διαφορά στο pH δύναται να συσχετιστεί με την παρουσία διαφορετικών ειδών οξυγαλακτικών βακτηρίων. Για το λόγο αυτό, απομονώθηκαν και αναλύθηκαν με RAPD-PCR αποικίες οξυγαλακτικών βακτηρίων από κάθε μεταχείριση στο τέλος της συντήρησης των αλλαντικών στους 12°C. Σύμφωνα με το Γράφημα 12, προέκυψαν δύο ανεξάρτητες συστάδες-ομάδων απομονώσεων που αντιστοιχούσαν στη χρήση νιτρωδών ή το μάρτυρα και το φυσικό αντιμικροβιακό αντίστοιχα, ενισχύοντας έτσι την αρχική υπόθεση ότι η χρήση του φυσικού αντιμικροβιακού δύναται να σχετίζεται με διαφορετικό προφίλ αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε σχέση με το μάρτυρα και τα νιτρώδη.



Γράφημα 12: Δενδρόγραμμα (UPGMA ανάλυση συστάδων) των 57 απομονώσεων οξυγαλακτικών βακτηρίων βάσει των RAPD προφίλ, που προέρχονται από τα αλλαντικά θερμικής επεξεργασίας, στο τέλος συντήρησής τους, στους 12°C. Τα διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στις διαφορετικές μεταχειρίσεις των προϊόντων. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι απομονώσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων που αντιστοιχούν στην αρχή της συντήρησης, ενώ τα αστεράκια υποδεικνύουν τα διαφορετικά RAPD-μοτίβα (συντελεστής συσχέτισης <80%).



### 3.4 Συμπεράσματα

Τα τελευταία χρόνια η βιομηχανία τροφίμων, σύμφωνα με την τάση των καταναλωτών προς υγιεινό τρόπο ζωής και κατανάλωση φυσικών προϊόντων με μειωμένα πρόσθετα, τείνει προς τη χρήση φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών προς αντικατάσταση των χημικών πρόσθετων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα νιτρώδη που προστίθενται κατά κόρον στην παρασκευή των αλλαντικών θερμικής επεξεργασίας, θα μπορούσαν να αντικατασταθούν από το υπό μελέτη φυσικό αντιμικροβιακό, δεδομένου ότι ανέστειλε αποτελεσματικότερα την ανάπτυξη των *Clostridium* spp. σε όλο το φάσμα θερμοκρασιών συντήρησης. Η ανάπτυξη των κλωστριδίων επηρεάστηκε, επίσης, από τον αρχικό πληθυσμό και τη θερμοκρασία συντήρησης. Όσο χαμηλότερος ο αρχικός πληθυσμός του *Clostridium sporogenes*, τόσο μεγαλύτερη η διάρκεια της λανθάνουσας φάσης, ενώ δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη τόσο του *Clostridium perfringens*, όσο και του *Clostridium sporogenes* σε θερμοκρασία < 12°C, ανεξαρτήτως μεταχείρισης. Επιπλέον, τα νιτρώδη δεν εμφάνισαν δράση έναντι της αλλοιογόνου χλωρίδας, ενώ η προσθήκη του φυσικού αντιμικροβιακού σε συγκέντρωση 1% w/w φάνηκε να έχει μικρή επίδραση, οδηγώντας πιθανόν όμως σε διαφορετικό μικροβιακό προφίλ αλλοίωσης. Εν κατακλείδι, τα νιτρώδη θα μπορούσαν να αντικατασταθούν στα συγκεκριμένα προϊόντα από αντιμικροβιακές ουσίες φυσικής προέλευσης, οδηγώντας στην παραγωγή προϊόντων "καθαρής ετικέτας" (clean label products). Παρ' όλα αυτά, για εφαρμογή-επέκταση των παρόντων αποτελεσμάτων σε άλλα προϊόντα κρέατος θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εγγενή χαρακτηριστικά των εκάστοτε προϊόντων.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **A) Ελληνική**

Μπαλατσούρας, Γ. (2006). Μικροβιολογία Τροφίμων. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.

Μπλούκας, Ι. Γ. (2007). Τεχνολογία Κρέατος. Κρέας. Προϊόντα Κρέατος. Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα.

Ραμαντάνης, Σ. Β. (2006). Τεχνολογία Κρέατος και Προϊόντων του. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

### **B) Ξενόγλωσση**

Abbona, C. C., Stagnitta P. V. (2016). *Clostridium perfringens*: Comparative effects of heat and osmotic stress on non-enterotoxigenic and enterotoxigenic strains. *Anaerobe* 39, 105-113.

Adak, G.K., Long, S.M., O'Brien, S.J. (2002). Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut* 51, 832-841.

Alahakoon, A. U., Jayasena, D. D., Ramachandra, S., Jo, C. (2015). Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 37-49.

Ambrosiadis, I. (2005). New production technologies for traditional Greek meat products. *Biotechnology in Animal Husbandry* 21, 321-330.

Atef Yekta, M., Verdonck, F., Van Den Broeck, W., Goddeeris, B. M., Cox, E., Vanrompay, D. (2010). Lactoferrin inhibits *E. coli* O157:H7 growth and attachment to intestinal epithelial cells. *Veterinární Medicína*, 55, 359-368.

Axelsson, L. T. C., Chung, W. J., Dobrogosz, W. J., Lindgren, S. E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2, 131-136.

Baranyi, J., Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol.* 23(3-4):277-94.

Bradbury, M., Greenfield, P., Midgley, D., Li, M., Tran-Dinh, N., Vriesekoop, F. (2012). Draft genome sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Bacteriology*, 194, 1631-1632.

- Brewer, M. S., Rostogi, B. K., Argoudelis, L., Sprouls, G. K. (1995). Sodium lactate/sodium chloride effects on aerobic plate counts and color of aerobically packaged ground pork. *Journal of Food Science*, 60, 58-62.
- Cameron, M.S., Leonard, S.J., Barrett E.L. (1980). Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphate buffer and in buffered pea puree. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 43-949.
- Cammack, R., Joannou, C.L., Cui, X.Y., Martinez, C.T., Maraj, S.R., Hughes, M.N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1411, 475-488.
- Chan, T.Y. (1996). Food-borne nitrates and nitrites as a cause of methemoglobinemia, Southeast Asian. *J. Trop. Med. Public Health*, 27,189-192.
- Choksi, P. A., Joshi, V. Y. (2007). A review on lycopene-extraction, purification, stability and applications. *International Journal of Food Properties*, 10, 289-298.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Urso R, Cantoni C and Comi G. (2004). Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl Environ Microbiol* 70:1883–1894.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- Cui, H., Gabriel, A. A., & Nakano, H. (2010). Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control*, 21, 1030-1036.
- Dainty, R. H. (1992). The relationship between the phenotypic properties from chilled stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Bacteriology*, 33, 19-33.

- Davidson, P. M., Branen, A. L. (2005). Food Antimicrobials - An introduction. In: Davidson, P. M, Sofos, J. N., Branen A. L. (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp 1–10) (3rd ed.). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Deda, M.S., Bloukas, J.G., Fista, G.A. (2007). Effect of tomato paste and nitrite level on processing and quality characteristics of frankfurters. *Meat Science* 76, 501-508.
- de Vries, Y. P. (2006). *Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination. PhD, Wageningen, Wageningen University.
- Diao, M.M., André, S., Membré, J.M. (2014). Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *International Journal of Food Microbiology* 174, 23-30.
- Dodds, K. (1993). *Clostridium botulinum* in foods. p. 53-68. In A.H.W. Hauschild, and K.L. Dodds (ed.), *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. Marcel Dekker., New York, NY.
- Dong, Q., Tu, K., Guo, L., Li, H., Zhao, Y. (2007). Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. *Food Microbiology*, 24, 624-632.
- Doores, S. (2005). Organic acids. In P. M. Davidson, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in foods* (3rd ed.). (pp. 95e136). New York, NY: Marcel Dekker Inc.
- EFSA. (2003). The effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. The EFSA Journal, 14, 1-31.
- EFSA. (2005). Opinion of the scientific panel on biological hazards on a request from the commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs (Question number: EFSA-Q-2004-009). Adopted on 9e10 March 2005. The EFSA Journal, 199, 1-65.
- Francis, D. M., Barringer, S. A., Whitemoyer, R. E. (2000). Ultrastructural characterization of yellow shoulder disorder in a uniformripening tomato genotype. *Hort Science*, 35, 1114-1117.

- Fратиани, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breastmeat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75, M528-M535.
- Friedman, M. (2002). Tomato glycoalkaloids: Role in the plant and in diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5751-5780.
- Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M., Ávila, M. (2014). Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. *Food Control*, 44, 22-25.
- Gibson, A. M., T. A. Roberts. (1986). The effect of pH, sodium chloride, sodium nitrite and storage temperature on the growth of *Clostridium perfringens* and faecal streptococci in laboratory media. *Int. J. Food Microbiol.* 3, 195-210.
- Gould, G. W., & Sale, A. J. H. (1970). Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure. *Journal of General Microbiology*, 60, 335-346.
- Hao, Y.Y., Brackett, R.E., Doyle, M.P. (1998). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. *J. Food Prot.* 61, 307–312.
- Heinz, V., Knorr, D. (2001). Effects of High Pressure on Spores. *Ultra High Pressure Treatments of Foods.* 77-113.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science.* 78, 68-76.
- Hoque, M. M., Bari, M. L., Juneja, V. K., & Kawamoto, S. (2008). Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria, and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken meat with their essential oils. *Report of National Food Research Institute*, 72, 9-21.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1996). *Clostridium perfringens*, p. 112-125. In T. A. Roberts (ed.), *Microorganisms in foods*. Chapman & Hall, London.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). New York: Springer.

- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science* 59, 5-13.
- Jones, G., Betts, G. (2009). Safety and shelf life of modified atmosphere packed and vacuum packed chilled food products with respect to risks of psychrotrophic *Clostridium botulinum*. Campden BRI, R&D Report no. 277.
- Juneja, V.K., Marks, H., Thippareddi, H. (2008). Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured beef. *Food Microbiology*, 25, 42-55.
- Kim, Y. H., Hunt, M. C., Mancini, R. A., Seyfert, M., Loughin, T. M., Kropf, D. H. (2006). Mechanism for lactate-color stabilization in injection-enhanced beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7856-7862.
- King, A. M., Glass, K. A., Milkowski, A. L., Sindelar, J. J. (2015). Comparison of the Effect of Curing Ingredients Derived from Purified and Natural Sources on Inhibition of *Clostridium perfringens* Outgrowth during Cooling of Deli-Style Turkey Breast. *Journal of Food Protection*, Vol. 78, No. 8, 1527-1535.
- Knobeloch, L., Salna, B., Hogan, A., Postle, J., Anderson, H. (2000). Blue babies and nitrate-contaminated well water. *Environ. Health Perspect.*, 108, 675.
- Koutsoumanis, K., Nychas, G.-J.E. (2000). Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. *Int J Food Microbiol*, 60:171-84.
- Koutsoumanis, K. (2001). Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 67, No. 4, 1821-1829.
- Koutsoumanis, K. P., Sofos, J. N. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and  $a_w$  limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 104, No. 1, 83-91.
- Kramer, B., Theilmann, J., Hickisch, A., Muranyi, P., Wunderlich, J., Hauser, C. (2015). Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 648-657.
- Kreyenschmidt J., Hußner, A., Beierle, E., Chonsch, L., Scherer, A., Petersen B. (2010). Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the

- growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 510-520.
- Lahti, P., Heikinheimo, A., Johansson, T., Korkeala, H. (2008). *Clostridium perfringens* type A strains carrying a plasmid-borne enterotoxin gene (genotype IS1151-cpe or IS1470-like-cpe) as a common cause of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 46, 371–373.
- Lauková, A. (2011). Using natural and novel antimicrobials to improve the safety and shelf-life stability of processed meat products. Processed Meats. Improving Safety, Nutrition and Quality. In: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 299-330.
- Ledesma, E., Rendueles, M., Díaz, M. (2016). Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention. *Food Control*, 60, 64-87.
- Le Marc, Y., Plowman, J., Aldus, C.F., Munoz-Cuevas, F., Baranyi, J., Peck, M.W. (2008). Modelling the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of bulk meat. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 41-50.
- Li, J., McClane, B. A. (2006). Further Comparison of Temperature Effects on Growth and Survival of *Clostridium perfringens* Type A Isolates Carrying a Chromosomal or Plasmid-Borne Enterotoxin Gene. *Applied and environmental microbiology*. 4561-4568.
- Li, J., Sayeed, S., McClane, B.A. (2007). Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates in Pittsburgh (Pennsylvania) area soils and home kitchens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7218-7224.
- Lin, Y.T., Labbe, R.G., Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(9), 5672–5678.
- Losso, J. N., Nakai, S., Charter, E. A. (2000). Lysozyme. In A. S. Naidu (Ed.), *Natural food antimicrobial systems* (pp. 185–210). Boca Raton, FL: CRC Press LLC.
- Lund, B.M., Peck, M.W. (1994). Heat resistance and recovery of non-proteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated processed foods with an extended shelf-life. *J Appl Bacteriol* 76, 115-128.

- Lund, B.M., Peck, M.W. (2000). *Clostridium botulinum*. In: The Microbiological Safety and Quality of Food ed. Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. and Gould, G.W. pp. 1057-1109. Gaithersburg: Aspen.
- Maas, M. R., Glass, K. A., Doyle, M. P. (1989). Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. *Applied Environmental Microbiology*, 55, 2226-2229.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Vaidanis, A., Metaxopoulos, I. (2006). Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *J Food Sci* 71, 157–167.
- McClane, B.A., Lysterly, D.M., Wilkins, T.D. (2006). Enterotoxigenic clostridia: *Clostridium perfringens* type A and *Clostridium difficile*, In: Fischetti, V.A. (Ed.), Gram-positive pathogens, 2nd ed. ASM, Washington, DC, pp. 703-714.
- McDonald, K., Sun, D. W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 52, 1-27.
- McMeekin, T. A., Brown J., Krist K., Miles, D., Neumeyer K., Nichols D. S., Olley J., Presser K., Ratkowsky D. A., Ross T., Salter, M., Soontranon S. (1997). Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerg Infect Dis*. 3(4): 541-549.
- McMeekin, T. A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., Schmid, S., Zwietering, M. H. (2006). Information systems in food safety management. *Int J Food Microbiol*. 112(3):181-94.
- Meng, J., Genigeorgis, C. (1994). Delaying toxigenesis of *Clostridium botulinum* by sodium lactate in sous-vide products. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 20-23.
- Merino, L., Örnemark, U., Toldrá, F. (2016). Analysis of Nitrite and Nitrate in Foods: Overview of Chemical, Regulatory and Analytical Aspects. *Advances in Food and Nutrition Research*.
- Mottram, D.S., Patterson, R.L.S., Rhodes, D.N. and Gough, T.A. (1975). Influence of ascorbic acid and pH on the formation of n-nitroso and n-nitrosodimethylamine in cured pork containing added dimethylamine. *J. Sci. Food & Agric*. 26 (1): 47-53.



- Murkovic, M., Steinberger, D., Pfannhauser, W. (1998). Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *European Food Research and Technology*, 207, 477-480.
- Naidu, A. S. (2002). Activated lactoferrin-a new approach to meat safety. *Food Technology*, 56, 40-45.
- Nevas, M., Koronen, A.-R., Lindstrom, M., Turkki, P., Korkeala, H. (2004). Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, 67, 199-202.
- Nychas, G.-J.E., Marshall, D., Sofos, J. (2007). Meat poultry and seafood. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 3rd edn* ed. Doyle, M.P. and Beuchat, L.R. 105–140. Washington, DC: ASM press.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science*, 73, 236-244.
- Paramithiotis, S., Kouretas, K., Drosinos, H. E. (2014). Effect of Ripening Stage on the Development of the Microbial Community during Spontaneous Fermentation of Green Tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(8):1600–1606.
- Parker, M.D., Barrett, P.I., Shepherd, J., Price, L.J., Bull, S.D. (2015). Characterisation of non-toxigenic *Clostridium* spp. strains, to use as surrogates for non-proteolytic *Clostridium botulinum* in chilled food challenge testing. *Journal of Microbiological Methods*. 108, 83-91.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocio, M.J., Aboaba, O.O., Mackey B.M. (2001). The effect of inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 33 , 257-361.
- Peck, M.W., Stringer, S.C. (2005) The safety of pasteurized in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Sci* 70, 461-475.
- Peck, M.W. (2006). *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue?. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 556-570.

- Pegg, R. B., Shahidi, F. (1997). Unraveling the chemical identity of meat pigment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 561-589.
- Peg, B. R., Shahidi, F. (2000). *Nitrite curing of meat: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*. Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition Press, Inc.
- Perez-Alvarez, J. A. (2008). Overview of meat products as functional foods. In J. Fernandez-Lopez, & J. A. Perez-Alvarez (Eds.), *Technological strategies for functional meat products development* (pp. 1e17). Kerala, India: Transworld Research.
- Petran, R. L., White, B. W., Hedberg, C. W. (2012). Using a Theoretical Predictive Tool for the Analysis of Recent Health Department Inspections at Outbreak Restaurants and Relation of This Information to Foodborne Illness Likelihood. *Journal of Food Protection* Vol. 75, No. 11, 2016-2027.
- Pflug, I.J. (1987). Factors important in determining the heat process value, FT, for low-acid canned foods. *Journal of Food Protection*, 50 (6), 528-533.
- Pooni, G.S., Mead, G.C. (1984). Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf life of non-frozen poultry meat products. *Food Microbiol.* 1, 67-78.
- Prevost, S., Cayol, J.L., Zuber, F., Tholozan, J.L., Remize, F. (2013). Characterization of clostridial species and sulfite-reducing anaerobes isolated from foie gras with respect to microbial quality and safety. *Food Control*, 32 222-227.
- Ramírez-Suárez, J. C., Pacheco-Aguilar, R., Scheuren-Acevedo, S. M., García-Sánchez, G., Carvallo-Ruiz, G., Lugo-Sánchez, M. E., Cumplido-Barbeitia, G., Jiménez-Ruiz, E. I. (2015). Microbiological and physicochemical quality changes in frankfurters made from jumbo squid (*Dosidicus Gigas*) mantle muscle in the presence and absence of a natural antimicrobial agent. *Journal of Food Safety*, 35, 473-481.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* 154, 1222-1226.

- Reineke, K. (2012). Mechanisms of *Bacillus* spore germination and inactivation during high pressure processing, In Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, 112-119, Technische Universitat Berlin.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M. (2001). The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 70 , 163-173.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *J Appl Bacteriol* 81, 501-508.
- Ross, T. (1999). Predictive food microbiology models in the meat industry. In Meat and Livestock. Sydney, Australia final report. p. viii and p. 38.
- Rywotycki, R. (2002). The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham. *Meat Science*. 60, 335-339.
- Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 10-17.
- Sebranek, J. G., Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues?. *Meat Science* 77, 136-147.
- Sebranek, J. G., Jackson-Davis, A. L., Myers, K. L., Lavieri, N. A. (2012). Beyond celery and starter culture: advances in natural/organic curing processes in the United States. *Meat Science*, 92, 267-273.
- Seman, D. L., Borger, A.C., Meyer, J. D., Hall, P .A., & Milkowski, A. L. (2002). Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready-to-eat meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate and product moisture content. *Journal of Food Protection*, 65, 651-658.
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 550-556.
- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., Ahn, D. U. (2007). Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science*, 72, 388-395.

- Slongo, A. P., Rosenthal, A., Camargo, L. M. Q., Deliza, R., Mathias, S. P., de Argao, G.M.F. (2009). Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. *Food Sci Technol* 42, 303-306.
- Smedley, J. G. III, Fisher, D. J., Sayeed, S., Chakrabarti, G., McClane, B. A. (2004). The enteric toxins of *Clostridium perfringens*. In: *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152, 183-204. Springer-Verlag.
- Smith, M.G. (1987). Calculation of the expected increases of coliform organisms, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, in raw blended mutton tissue. *Epidemiol. Infect.* 99, 323-331.
- Sperber, W. H., Doyle, M. P. (2009). Food microbiology and food safety. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Springer.
- Stringer, S. C., Webb, M. D., George, S. M., Pin, C., Peck, M. W. (2005). Heterogeneity of Times Required for Germination and Outgrowth from Single Spores of Nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 4998-5003.
- Stumbo, C.R., Purohit, K.S., Ramakrishna, T.V. (1975). Thermal process lethality guide for low-acid foods in metal containers. *J Food Sci* 40, 1316-1323.
- Sunde, E. P., Setlow, P., Hederstedt, L., et al. (2009). The physical state of water in bacterial spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 19334-19339.
- Tanaka, D., Isobe, J., Hosorogi, S., Kimata, K., Shimizu, M., Katori, K., Gyobu, Y., Nagai, Y., Yamagishi, T., Karasawa, T., Nakamura, S. (2003). An outbreak of food-borne gastroenteritis caused by *Clostridium perfringens* carrying the cpe gene on a plasmid. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, 137–139.
- Tapiero, H., Townsend, D. M., Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58, 100-110.
- Tarté, R. (2009). *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. Springer Editions.

- Ueda, S., Yamashita, H., Kuwabara, Y. (1982). Inhibition of *Clostridium botulinum* and *Bacillus* sp. by spices and flavoring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29, 389-392.
- Udompijittkul, P., Paredes-Sabja, D., Sarker, M. R. (2012). Inhibitory effects of nisin against *Clostridium perfringens* food poisoning and nonfood-borne isolates. *Journal of Food Science*, 71, M51-M56.
- USFDA (2000b). *GRAS Notice No. GRN 000065*. Washington, DC: U.S. Food and Drug Administration.
- Wen, Q. McClane, B.A. (2004). Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2685-2691.
- WHO/FAO. (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO technical report series 916*. World Health Organisation (WHO)/Food and Agriculture Organization of United Nations (FAO). Retrieved October 9, 2014 from: [http://whqlibdoc.who.int/trs/who\\_trs\\_916.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf).
- Wilms, M. (2000). The developing of modern smokehouses - ecological and economical aspects. *Fleischwirtschaft International*, 80, 4-5.
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science* 120, 118-132.
- Xiao, Y., Wagendorp, A., Moezelaar, R., Abee, T., Wells-Bennik, M.H.J. (2012). A wide variety of *Clostridium perfringens* type A food-borne isolates that carry a chromosomal cpe gene belong to one multilocus sequence typing cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 7060-7068.
- Xiao, Y., Wagendorp, A., Abee, T., Wells-Bennik, M. H.J. (2015). Differential outgrowth potential of *Clostridium perfringens* food-borne isolates with various cpe-genotypes in vacuum-packed ground beef during storage at 12°C. *International Journal of Food Microbiology* 194, 40-45.
- Yetim, H., Kayacier, A., Kesmen, Z., Sagdic, O. (2006). The effects of nitrite on the survival of *Clostridium sporogenes* and the autoxidation properties of the Kavurma. *Meat Science*, 72 (2), 206-210.

