



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ - ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της χρήσης καινοτόμων νανοϋλικών στην ασφάλεια
και διάρκεια ζωής φρέσκου τυριού

Κωνσταντίνος Σ. Ζαχαριουδάκης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Ακτύπης Αναστάσιος, Καθηγητής ΓΠΑ

**Αθήνα
2021**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της χρήσης καινοτόμων νανοϋλικών στην ασφάλεια
και διάρκεια ζωής φρέσκου τυριού

“Study of the use of innovative nanomaterials in the safety
and shelf life of fresh cheese”

Κωνσταντίνος Σ. Ζαχαριουδάκης

Εξεταστική Επιτροπή:

Ακτύπης Αναστάσιος, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Νυχάς Γ. Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

Γιαννακάς Άρης, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστήμιο Πατρών

Μελέτη της χρήσης καινοτόμων νανοϋλικών στην ασφάλεια και διάρκεια ζωής φρέσκου τυριού

ΠΜΣ Σύγχρονη Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το τυρί αποτελεί ένα βασικό προϊόν για τη διατροφή του ανθρώπου και η σταδιακή αύξηση της ζήτησης του, επιφέρει συνολική ανάπτυξη για τον κλάδο εμπορίας τυριού. Η μόλυνση του τυριού είναι ένα συχνό φαινόμενο, γεγονός που ταλανίζει επί δεκαετίες. Η ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών τόσο κατά την αποθήκευση (ιδίως όταν αυτή συμβαίνει εν απουσία κατάλληλης συσκευασίας), όσο και κατά τη μεταφορά, υποβαθμίζει την ασφάλεια και την ποιότητα του τυριού, προκαλώντας σημαντικές απώλειες για τις εταιρείες που δραστηριοποιούνται στο συγκεκριμένο κλάδο. Οι συμβατικές συσκευασίες ωστόσο, στηρίζονται ως επί τω πλείστον σε υλικά που έχουν ως βάση το πετρέλαιο (πλαστικό). Το σύγχρονο αίτημα των καταναλωτών για μείωση των συντηρητικών και την μείωση της εξάρτησης από πλαστικές συσκευασίες, έρχεται σε αρμονία με την παρούσα εργασία, η οποία πέραν των φιλμ που αποτελούνται από άλας αλγινικού οξέος και ζεόλιθου, η καινοτομία της κρύβεται στην παρουσίαση υλικών που μπορούν να εμβαπτιστούν απευθείας στο προϊόν, ενισχύοντας την άμυνα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και το «πράσινο αίσθημα». Συγκεκριμένα στην εργασία αυτή σκοπός είναι η ανάδειξη της ωφέλειας πράσινων υλικών συσκευασίας για το φρέσκο τυρί τύπου cottage έναντι ισχυρών παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Listeria monocytogenes* και ο *Staphylococcus aureus*. Τα υλικά εμβάπτισης αποτελούν ο ζεόλιθος ενισχυμένος με θυμαρέλαιο (50%) και το μικρογαλάκτωμα ενισχυμένο με θυμαρέλαιο. Από την άλλη, το άλας αλγινικού οξέος σε αναλογίες 0%, 5%, 10% και 15% ενθυλακωμένου ζεόλιθου αποτελούν τα φιλμ. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν φανερώνουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα τόσο για τα υλικά ενσωμάτωσης, όσο και για τα φιλμ, με έμφαση το ζεόλιθο με θυμαρέλαιο και το άλας αλγινικού οξέος με ζεόλιθο σε αναλογία 10%.

Επιστημονική περιοχή: Ασφάλεια τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: υλικά ενσωμάτωσης, φιλμ, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, ζεόλιθος, άλας αλγινικού οξέος, θυμαρέλαιο μικρογαλάκτωμα

Study of the use of innovative nanomaterials in the safety and shelf life of fresh cheese

MSc Modern Food Technology

Department of Food Science & Human Nutrition

Dairy Laboratory

ABSTRACT

Cheese is a basic product for human nutrition and the gradual increase in demand brings an overall growth for the cheese industry. Cheese contamination is a common phenomenon, a fact that has plagued the industry for decades. The growth of pathogenic microorganisms both during storage (especially when this occurs in the absence of proper packaging) and during transport, degrades the safety and quality of the cheese, causing significant losses for companies operating in this industry. Conventional packaging, however, is mostly based on petroleum-based materials (plastic). The modern demand of consumers for the reduction of preservatives and the reduction of dependence on plastic packaging, is in line with the present work, which in addition to films consisting of sodium alginate and zeolite its innovation lies in the presentation of materials that can be immersed directly in the product, strengthening the defense against pathogenic microorganisms and the "green mindset". In particular, the purpose of this study is to highlight the benefits of environmentally friendly packaging materials for fresh cottage cheese against strong pathogenic microorganisms such as *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. The immersion materials are the zeolite fortified with thyme oil (50%) and the microemulsion fortified with thyme oil. On the other hand, the sodium alginate in proportions of 0%, 5%, 10% and 15% encapsulated zeolite are the films. Findings coming out, indicate statistically significant results for both the embedding materials and the films, with an emphasis on zeolite with thyme oil and sodium alginate with zeolite in a proportion of 10%.

Scientific area: Food safety

Keywords: embedding materials, film, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, zeolite, sodium alginate, thyme oil microemulsion

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική και ερευνητική εργασία, πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο «Γαλακτοκομίας», στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος του τμήματος «Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου» που υπάγεται της σχολής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο σημείο αυτό, και πριν την παρουσίαση των αποελεσμάτων, έχω την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου, στους ανθρώπους που συνέβαλαν στη δημιουργία και ολοκλήρωση της εν λόγω ερευνητικής εργασίας.

Πρώτον και Κύριον, τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον καθηγητή μου Ακτύπη Αναστάσιο για τη στενή και αποτελεσματική συνεργασία που είχαμε τον τελευταίο ένα χρόνο, κατευθύνοντάς με στη διεξαγωγή των απαραίτητων μεθόδων για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Ευχαριστώ που ήταν πάντα με το ίδιο, αμείωτο ενδιαφέρον του να με στηρίξει σε ό,τι χρειάστηκε.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Γιαννακά Άρη για τη συμβολή του στην σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των υλικών στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Πατρών και έδρα το Αγρίνιο, καθώς επίσης και σε διάφορα θέματα εργαστηρίου που χρειάστηκαν οι γνώσεις και η εμπειρία του.

Ακόμη πολλά ευχαριστώ στον καθηγητή Νυχά Γ. Ιωάννη που βοήθησε στο σχεδιασμό της πτυχιακής αλλά και με τις επεξηγήσεις ορισμένων κρίσιμων εννοιών.

Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω την πολυμελή οικογένειά μου για την ψυχολογική και υλική υποστήριξη, καθώς επίσης και τον φίλο μου Βάρδα Εμμανουήλ απόφοιτο του ΕΤΗ Ζυρίχης για τη διαρκή στήριξή του.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	4
Ευχαριστίες.....	5
Εισαγωγή	10
Σκοπός της εργασίας.....	11
Δομή εργασίας	12
Κεφάλαιο 1: Cottage cheese	13
1.1 Προφίλ τυριού.....	13
1.2 Μόλυνση και έλεγχος του τυριού	14
1.2.1 Listeria	14
1.2.2 Staphylococcus	16
Κεφάλαιο 2: Συσκευασία τροφίμων	18
2.1 Εισαγωγή	18
2.2 Βρώσιμα film και coatings για τυρί.....	18
2.3 Επίδραση βρώσιμων film και coating στις ιδιότητες του τυριού	20
2.3.1 Χιτοζάνη	25
2.3.2 Αλας αλγινικού οξέως.....	26
2.3.3 Ζεόλιθος.....	28
2.3.4 Αιθέρια έλαια.....	30
2.3.4 Ενθυλάκωση αιθέριου ελαίου σε μικρογαλάκτωμα	32
2.4 Μέθοδοι εφαρμογής βρώσιμων επιστρώσεων και φιλμ σε τυρί.....	33
2.5 Εμπορικές εφαρμογές και μελλοντικές τάσεις	34
Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι	37
3.1 Υλικά.....	37
3.1.1 Προετοιμασία τυριού	37
3.1.2 Μικροοργανισμοί και προετοιμασία εμβολίου.....	37

3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός	38
3.1.4 Θρεπτικά Υλικά	39
3.1.5 Υλικά συσκευασίας.....	42
3.2 Μέθοδοι	43
3.2.1 Αρίθμηση μικροοργανισμών	43
3.2.2 Προσδιορισμός pH.....	44
3.2.3 Έλεγχος παρεμποδιστικότητας με τη μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ (Agar Diffusion Test).....	45
3.2.4 Έλεγχος ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμπόδισης (MIC) του ζεόλιθου με θυμαρέλαιο.....	46
3.2.5 Έλεγχος παρεμποδιστικής δράσης των φιλμ στο τυρί.....	48
3.2.6 Έλεγχος παρεμποδιστικής δράσης των υλικών ενσωμάτωσης στο τυρί	49
3.2.7 Στατιστικός έλεγχος.....	50
Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα.....	52
4.1 Έλεγχος παρεμποδιστικότητας των υλικών ενσωμάτωσης με τη μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ (Agar Diffusion Test).....	52
4.2 Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμποδιστικότητας (MIC) σε broth	53
4.4 Μελέτη της παρεμποδιστικής ικανότητας των Υλικών Ενσωμάτωσης στο τυρί	56
4.5 Μελέτη της παρεμποδιστικής ικανότητας των Υλικών επίστρωσης/ film στο τυρί.....	60
5. Συμπέρασμα.....	64
6. Βιβλιογραφία	65
Παράρτημα 1ο Στατιστικός έλεγχος υλικών επίστρωσης	73
Παράρτημα 2ο Στατιστικός έλεγχος υλικών ενσωμάτωσης.....	75

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του <i>Staphylococcus aureus</i> και της παραγωγής εντεροτοξινών.....	16
Πίνακας 2 Η βάση των υλικών για την παρασκευή υλικών φιλμ και επίστρωσης που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία.	21
Πίνακας 3 Παραδείγματα πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και κεριών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό βρώσιμης επικάλυψης για εφαρμογή σε διάφορους τύπους τυριού.....	24
Πίνακας 4 Συγκεντρώσεις ζεόλιθου με θυμαρέλαιο που δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμποδιστικότητας σε broth (MIC), έναντι των εξεταζόμενων μικροοργανισμών.	46
Πίνακας 5. Διαμετρος ζωνών (mm) μέσω του Agar Diffusion Test, του ζεόλιθου με θυμαρέλαιο και του Μικρογαλακτώματος με θυμαρέλαιο έναντι των εξεταζόμενων παθογόνων α) <i>E. faecalis</i> , β) <i>L. monocytogenes</i> , γ) <i>S. aureus</i>	52
Πίνακας 6. Προσδιορισμός της Ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμποδιστικότητας (MIC) του υλικού Ζεόλιθου-θυμαρέλαιου στο broth	54
Πίνακας 7. Προσδιορισμός της Ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμποδιστικότητας (MIC) του υλικού Ζεόλιθου-θυμαρέλαιου στο γάλα.....	55
Πίνακας 8. Αποτελέσματα ανάπτυξης <i>S. aureus</i> σε τυρί cottage με υλικά ενσωμάτωσης και αποθήκευση τους 8 βαθμούς.....	57
Πίνακας 9. Αποτελέσματα ανάπτυξης <i>L. monocytogenes</i> σε τυρί cottage με υλικά ενσωμάτωσης και αποθήκευση τους 8 βαθμούς.....	59
Πίνακας 10. Φιλμ AlgNa ενισχυμένα με ζεόλιθο στους 28 °C.....	61
Πίνακας 11 Αποτελέσματα δειγμάτων τυριού cottage με επικάλυψη-φιλμ έναντι του <i>S. aureus</i> σε θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C για 10 ημέρες.....	62

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1. Επιβιωσιμότητα του <i>S. aureus</i> σε τυρί με υλικά ενσωμάτωσης κατά την συντήρηση στους 8°C για χρονικό διάστημα 15 ημερών.....	58
Διάγραμμα 2. Επιβιωσιμότητα της <i>L. monocytogenes</i> σε τυρί με υλικά ενσωμάτωσης κατά την συντήρηση στους 8 οC για χρονικό διάστημα 15 ημερών	60
Διάγραμμα 3. Επιβίωση <i>S. aureus</i> μετά από 12 ώρες στους 28 οC -Έλεγχος Film επικάλυψης.....	61
Διάγραμμα 4. Επιβίωση <i>S. aureus</i> μετά από 10 μέρες στους 10 °C -Έλεγχος Film επικάλυψης.....	63

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Τρυβλία με μόλυσμα <i>S. aureus</i> 10 ⁴ , και επικάλυψη με AlgNa φιλμ σε αναλογίες ζεόλιθου α) 0% ζεόλιθο, β) 5% ζεόλιθο, γ) 10% ζεόλιθο, δ) 15% ζεόλιθο και ε) ο Μάρτυρας χωρίς φιλμ.....	49
Εικόνα 2. Ζώνες αναστολής της ανάπτυξης των α) <i>E. faecalis</i> , β) <i>L. monocytogenes</i> , γ) <i>S. aureus</i> από μικρογαλάκτωμα θυμαρελαίου με συγκέντρωσεις 0.25-1%	53
Εικόνα 3. Προσδιορισμός MIC του μικρογαλακτώματος σε BHI Broth έναντι στελεχών <i>L. lactis</i> και <i>L. monocytogenes</i>	54
Εικόνα 4. Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμποδιστικότητας ζεόλιθου με θυμαρέλαιο, έναντι LAB στο γάλα.....	56

Εισαγωγή

Το τυρί είναι ένα προϊόν διατροφής που υποστηρίζεται από τα αρχαία κιάλας χρόνια, ενώ μπορεί να παρασκευαστεί από διαφορετικούς τύπους γάλακτος. Είναι πολύ διαφορετικό σε υφές, γεύσεις, αρώματα και σχήματα, ενώ συχνά αποτελεί μέρος της διατροφής των ανθρώπων, λόγω της σύνθεσής του (υψηλή περιεκτικότητα πρωτεΐνης, ασβεστίου, μετάλλων και βιταμινών). Η κατανάλωση τυριού έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια σε όλο τον κόσμο και κατά συνέπεια, ο κλάδος εμπορίας τυριού έχει πλέον εξελιχθεί σε ένα παγκόσμιο εγχείρημα, όπου η έρευνα έχει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της διάρκειας ζωής του, ενώ κρίσιμος είναι ο ρόλος της προώθησης της ποιότητας και της ασφάλειας των τυροκομικών προϊόντων.

Μία από τις κύριες απώλειες κατά την εμπορευματοποίηση του τυριού συμβαίνει την περίοδο της αποθήκευσης, όπου η μόλυνση του τυριού από βακτήρια, μύκητες και ζύμες είναι συχνή, και ως εκ τούτου μπορεί να συμβεί η ανάπτυξη δυσάρεστων οσμών, υποβαθμίζοντας την ποιότητα του τυριού, κυρίως όταν αποθηκεύεται χωρίς να εμπεριέχεται σε κάποια συσκευασία. Επίσης, η υψηλή απώλεια υγρασίας σε ορισμένα είδη τυριών μπορεί να είναι πρόβλημα, αυξάνοντας τη σκληρότητα τους και οδηγώντας σε ανεπιθύμητες οργανοληπτικές ιδιότητες. Διάφορα συστήματα συσκευασίας έχουν προταθεί για την επίλυση αυτών των προβλημάτων, συμπεριλαμβανομένων συσκευασιών κενού και τροποποιημένης ατμόσφαιρας που εφαρμόζονται σε διάφορα είδη τυριών. Σήμερα, συνήθως χρησιμοποιούνται υλικά όπως πολυαιθυλένιο, πολυαμίδιο και πολυπροπυλένιο.

Τα τελευταία χρόνια, οι καταναλωτές συνειδητοποιούν όλο και περισσότερο τον κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία που συνεπάγεται η χρήση χημικών συντηρητικών στα τρόφιμα. Αντίθετα, η αυξανόμενη ζήτηση από τη γαλακτοβιομηχανία για παράταση της διάρκειας ζωής και πρόληψη της αλλοίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων εγείρει την ανάπτυξη νέων συντηρητικών και μεθόδων συντήρησης, οι οποίες να είναι φιλικές τόσο για τον άνθρωπο, όσο και για το περιβάλλον (Silva 2018).

Τα επιχρίσματα (coatings) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στη συντήρηση και τη συσκευασία του τυριού. Μπορούν να λειτουργήσουν ως μεμονωμένο υλικό συσκευασίας αλλά και ως πρόσθετη προστασία εάν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα υλικά συσκευασίας. Τα συμβατικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την

παραγωγή επικάλυψης έχουν βάση το πετρέλαιο (π.χ. κερί και πολυβινυλοχλωρίδιο), αν και στις μέρες μας με περιβαλλοντικά ζητήματα και θέματα βιωσιμότητας καθώς και με νομοθετικούς περιορισμούς, η χρήση βρώσιμων υλικών και υλικών επικάλυψης εκμεταλλεύεται, αποδεικνύοντας ότι είναι πολύ ελπιδοφόρα δυνατότητα αφού, όπως τα συμβατικά υλικά επικάλυψης, επιτρέπει την πρόληψη της αλλοίωσης, την παράταση της διάρκειας ζωής και τη μείωση της απώλειας νερού.

Έχουν γίνει πολλές μελέτες που αποσκοπούν στην αξιολόγηση και κατανόηση των επιδράσεων των βρώσιμων film και των coatings σε διάφορα είδη τυριών. Οι Cerqueira et al., 2009 εφάρμοσαν πολυσακχαρίτες από εναλλακτικές πηγές για τις επιστρώσεις σε τυρί. Η γαλακτομαννάνη παρουσίασε τις καλύτερες επιδόσεις ως προς τη διαπερατότητα της υγρασίας και αερίων, ενώ τα δείγματα ελέγχου χωρίς δηλαδή επίστρωση εμφάνισαν μούχλα. Οι Mastromatteo et al., 2014 μελέτησαν την επέκταση του κύκλου ζωής της μοτσαρέλα με επιστρώσεις αλγινικού νατρίου, όπου σε συνδυασμό με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα έδειξαν επέκταση ως και 160 μέρες για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4 βαθμούς, 40 για τους 8 και 11 μέρες για αποθήκευση στους 14 βαθμούς. Τα βρώσιμα film και coatings μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς αντιμικροβιακών παραγόντων και να φέρουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών coatings, όπως η καλύτερη διασπορά, η ποικιλομορφία και η διαλυτότητα (Ramos et al., 2012).

Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία παρουσιάζει τόσο τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των film, όσο και των υλικών διάχυσης, σε αλοιφώδες τυρί τύπου cottage cheese. Η καινοτομία σε σχέση με τα όσα εφαρμόζονται στη βιβλιογραφία, είναι πως τα εν λόγω υλικά ενσωματώνονται με ανάδευση στο τυρί και στη συνέχεια παρακολουθείται η ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Τα υλικά διάχυσης αποτελούν το μικρογαλάκτωμα θυμαρέλαιου και ο τροποποιημένος ζεόλιθος με θυμαρέλαιο. Από την άλλη, τα φιλμ έχουν ως βάση το αλγινικό νάτριο και διαφοροποιείται το ποσοστό του ζεόλιθου που εμπεριέχεται σε αυτά.

Δομή εργασίας

Στην 1η ενότητα παρουσιάζεται το θεωρητικό υπόβαθρο γύρω από το τυρί που μελετάται, ως προς το προφίλ του, τις ιδιότητες και τις απειλές από μικροοργανισμούς που ενδέχεται να αντιμετωπίζει.

Στη 2η ενότητα, εμφανίζεται η θεωρητική προσέγγιση των συστημάτων συσκευασίας που έχουν μελετηθεί τόσο ως προς τον τρόπο που ενεργούν, όσο και στην αποτελεσματικότητα που προκύπτει μέσα από τη βιβλιογραφία.

Στην 3η ενότητα ξεδιπλώνεται η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την διεξαγωγή των αναλύσεων σχετικά με την αντιμικροβιακότητα.

Η 4η ενότητα παρουσιάζει αναλυτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις εργαστηριακές αναλύσεις, ενώ στην 5η ενότητα τα αποτελέσματα συνοψίζονται.

Κεφάλαιο 1: Cottage cheese

1.1 Προφίλ τυριού

Το φρέσκο τυρί τύπου Cottage είναι ένα δημοφιλές είδος ανάμεσα σε πολλά τυριά που προτιμάται ιδιαίτερος σε χώρες όπως και η Μεγάλη Βρετανία. Η παραγωγή του τυριού γίνεται σε δύο μορφές, αυτή των πλήρη και χαμηλών λιπαρών. Ενώ το κανονικό τυρί cottage έχει μόνο 4% λίπος κατά βάρος, το τυρί cottage χαμηλών λιπαρών έχει μόλις 2%. Το τυρί αυτό ενδείκνυται ανέκαθεν ως μια ιδανική πηγή πρωτεΐνης και έλκει το ενδιαφέρον όσων ακολουθούν μια ισορροπημένη διατροφή με στόχο μάλιστα την απώλεια βάρους, επειδή μπορεί να δύνται να παρασκευαστεί σε πληθώρα μορφών χαμηλών λιπαρών, συνδυαστικά με τη χαμηλή τιμή τους, προτείνεται και εν τέλει βρίσκει ευρείας χρήσεως στον χώρο της γαστρονομίας. Η αγοραία αξία του τυριού cottage που καταναλώνονται στις Η.Π.Α εκτιμάται σε δις δολάρια (statista, 2018), πιθανώς ως αποτέλεσμα της αντίληψης του καταναλωτικού κοινού για το τυρί cottage ως υγιεινή τροφή.

Η παραγωγή τυριού cottage τυπικά ξεκινά με τον εμβολιασμό παστεριωμένου αποβουτυρωμένου γάλακτος με καλλιέργεια εκκίνησης, για να χαμηλώσει την τιμή του pH, ενώ με την πυτιά επιταχύνεται η πήξη. Η πυτιά προστίθεται για ταχεία πήξη του γάλακτος στη διαδικασία της τυροκομίας. Ανάλογα με το είδος του τυριού cottage που παράγεται και την ποσότητα καλλιέργειας εκκίνησης που χρησιμοποιείται, το εμβολιασμένο γάλα διατηρείται από 5 ως και 16 ώρες σε θερμοκρασία 32 C. Στη συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη κρέμας (ανάλογα με το είδος του τυριού cottage) και αλατιού.

Αυτό επιτρέπει στον εκκινητή και να οξινίζει το γάλα και το μίγμα να πήξει σωστά. Το πήγμα που προκύπτει, κόβεται στη συνέχεια σε κύβους σχηματίζοντας το τυρόπηγμα που φαίνεται στο τυρί cottage. Στη συνέχεια, το μίγμα κόβεται, αυξάνει την αποστράγγιση του ορού γάλακτος και ξεπλένεται με κρύο νερό. Στη συνέχεια ασκείται ελαφρώς πίεση, σε αντίθεση με άλλα πιο σκληρά τυριά, διατηρώντας έτσι σημαντικά περισσότερη υγρασία και δεν σχηματίζει ένα στερεό μπλοκ.

1.2 Μόλυνση και έλεγχος του τυριού

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το cottage cheese προκύπτει από άμεση οξίνιση και η διάρκεια ζωής του κυμαίνεται μεταξύ 10 και 12 ημερών υπο ψύξη, εξαιτίας της υψηλής ενεργότητας, αφού η υγρασία είναι κοντά στο 75%, τη στιγμή που το pH κυμαίνεται στα υψηλά επίπεδα του 5 (Makhal et al., 2012). Η κύρια αιτία αλλοίωσης του τυριού cottage αποδίδεται σε μικροβιακή εισβολή. Από το σύνολο των μικροοργανισμών που δύναται να μολύνουν το τυρί cottage, τα ψυχρόφιλα βακτήρια καθώς και οι ζύμες και οι μύκητες θεωρούνται οι πιο σοβαροί (Harmon & Smith, 1956a.). Η πηγή προέλευσης της μόλυνσης βρίσκεται σε μια ευρεία γκάμα παραγόντων και μερικά από αυτά ενδεικτικά μπορεί να είναι το γάλα, το νερό πλύσης, πηκτικό, καλλιέργεια εκκίνησης, εξοπλισμός, αέρας, υλικά συσκευασίας κ.λπ. (Emmons & Tuckey 1967). Αυτό επηρεάζει εκτενώς το μάρκετινγκ και τη διανομή του (Scafer, 1958). Ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη για τη βελτίωση της διάρκειας ζωής του άμεσου οξυνισμένου τυριού cottage χρησιμοποιώντας θυμόλη, ένα φυτοφαινολικό φυσικό αντιμικροβιακό παράγοντα (Angevine 1959).

Στη μελέτη των Markal et al., 2012 μελετήθηκε η επίδραση τριών διαφορετικών επιπέδων, δηλαδή 30, 40 και 50 ppm διαλύματος θυμόλης 30 % σε βουτυρέλαιο, στις φυσικοχημικές, μικροβιολογικές και οργανοληπτικές ιδιότητες, εντός 4 ημερών κατά την αποθήκευση υπό ψύξη στους 4° C. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αφήνουν ενθαρρυντικά μηνύματα για το μέλλον, αφού η περιεκτικότητα 40ppm θυμόλης ήταν αρκετή για την αναστολή της ανάπτυξης ψυχρότροφων μικροοργανισμών, ενώ παράλληλα επετεύχθη η αναστολή της πρωτεόλυσης στο τυρί cottage. Πέραν του αντιμικροβιακού ελέγχου της θυμόλης στο τυρί έναντι των μικροοργανισμών, μελετήθηκε εκτενώς και η διατήρηση των ποιοτικών του χαρακτηριστικών μέσω της μέτρησης απόρροιας υγρασίας και πράγματι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού παρέμειναν αναλλοίωτα για 8 συνεχόμενες μέρες.

1.2.1 Listeria

Σε ερευνητική μελέτη των Hicks & Lund (1991) υποστηρίχτηκε πως υπάρχει δυσκολία στη διασφάλιση παραγωγής του τυριού cottage χωρίς να συμπεριλαμβάνεται ως κίνδυνος πιθανή ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes*. Έτσι διερεύνησαν την ικανότητα επιβίωσης του συγκεκριμένου βακτηρίου σε συνθήκες θερμοκρασίας ψυγείου αλλά και χρήσης. Για τη μελέτη τους, παρέλαβαν εντός 24

ωρών από την παραγωγή τρεις παρτίδες με κρεμώδες τυρί τύπου cottage, και τα εμβολίασαν με το στελέχος *Listeria monocytogenes*, ενώ ακολούθησε η αποθήκευση τους σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 4, 8 και 12 C. Οι τρεις παρτίδες διέφεραν στο αρχικό τους pH, την ογκομετρική οξύτητα, την περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ και την ολική μικροβιακή χλωρίδα. Δεν παρατηρήθηκε αύξηση του αριθμού *L. monocytogenes* στα τυριά cottage κατά την αποθήκευση σε αυτές τις συνθήκες. Ο πληθυσμός της *Listeria* συνολικά μειώθηκε. Παρόλα αυτά ο ρυθμός μείωσης διέφερε στατιστικά σημαντικά στα προϊόντα από τις τρεις πηγές και ήταν εντονότερος στο προϊόν με το χαμηλότερο pH και τη υψηλότερη περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ. Ως πιθανή εξήγηση, θεωρήθηκε πως ο σχηματισμός οξέος από βακτήρια γαλακτικού οξέος κατά την αποθήκευση των προϊόντων συνέβαλε στην αναστολή της *Listeria*.

Στην προσπάθεια διασφάλισης της ασφάλειας παραγωγής τυριού cottage, οι McAuliffe et al. (2012) μελέτησαν την αποτελεσματικότητα της χρήσης καλλιέργειας εκκίνησης που παράγει lacticin 3147, δηλαδή μια καλλιέργεια που φέρει προστατευτικό ρόλο. Εντούτοις, κάνοντας χρήση ενός διασυζεύγματος στελεχών που παράγει βακτηριοκίνη και προέρχεται από το DPC4268 (*Lactococcus*), βρέθηκε πως σε υψηλότερες θερμοκρασίες αποθήκευσης, το ποσοστό θανάτωσης ήταν πιο γρήγορο. Η συγκέντρωση της βακτηριοκίνης στο τυρόπηγμα μετρήθηκε στα 2560 AU ml⁻¹ και η δραστηριότητα της βακτηριοκίνης μπορούσε να ανιχνευθεί καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου αποθήκευσης 1 εβδομάδας. Σε δείγματα τυριού cottage που διατηρήθηκαν στους 4 βαθμούς C, υπήρξε η αξιοσημείωτα δραστική μείωση κατά 99,9% στον πληθυσμό της *L. monocytogenes*. Μελετώντας της δράση της βακτηριοκίνης στο τυρί για 5 ημερες μειώθηκε, ενώ στο μάρτυρα (δείγμα ελέγχου) ο πληθυσμός παρέμεινε αναλλοίωτος. Αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύουν την αποτελεσματικότητα της λακτίνης 3147 ως αναστολέα του *L. monocytogenes* σε ένα σύστημα τροφίμων όπου η μόλυνση μετά την παραγωγή από αυτόν τον οργανισμό θα μπορούσε να είναι προβληματική.

Στο ίδιο μήκος κύματος, οι Bello et al (2011) μελέτησαν τη δυνατότητα περιορισμού της ανάπτυξης *Listeria monocytogenes* σε τυρί cottage, κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της αποθήκευσης, μέσω της παραγωγής βακτηριοσίνης από οξυγαλακτικές καλλιέργειες. Έπειτα από τη σύγκριση διάφορων στελεχών ήταν πλέον εφικτό να πραγματοποιηθεί περιορισμός – έλεγχος της ανάπτυξης του παθογόνου μέσω του *L. lactis* 40FEL3.

1.2.2 Staphylococcus

Ο *Staphylococcus aureus* ανήκει στην οικογένεια *Micrococcaceae*, χαρακτηρίζεται ως προαιρετικά αερόβιος, θετικός κατά Gram, ενώ η μορφή του μοιάζει με εκείνη των σταφυλιών (Goodfellow et al. 2012). Οι φυσικοχημικές παράμετροι που συμβάλλουν στην ανάπτυξη του *S. aureus* και στην παραγωγή εντεροτοξινών φαίνονται στον Πίνακα 1

Πίνακας 1 Χαρακτηριστικά της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* και της παραγωγής εντεροτοξινών.

	Βέλτιστη ανάπτυξη	Όρια ανάπτυξης	Βέλτιστες συνθήκες τοξίνης	Όρια τοξίνης
Θερμοκρασία (°C)	35-41	7-48	34-40	10-46
pH	6.7-7.5	4.5-9.8	7.5	4.6-9.6
wa	0.99	≥0.83	0.99	≥0.85
NaCl (%)	0-4	0-20	0	0-10
Οξειδοαναγωγικό Δυναμικό	>+200 mV	≥200-> +200 mV	>+200 mV	≥100-> +200 mV
Ατμόσφαιρα	αερόβια	αναερόβια-αερόβια	αερόβια	αναερόβια-αερόβια

Παραγωγή εντεροτοξίνης

Η πρόκληση τροφικής δηλητηρίασης από τον *S. aureus*, προκύπτει από την κατάποση σταφυλοκοκκικών εντεροτοξινών που παράγονται κατά την ανάπτυξη του *S. aureus* στα τρόφιμα (σε ποσότητες μεγαλύτερες των 10⁵ UFC/g). Οι εντεροτοξίνες είναι ισχυρές γαστρεντερικές εξωτοξίνες που συντίθενται από τον *S. aureus* σε όλη τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, είτε κατά τη μετάβαση από την εκθετική στη στάσιμη φάση. Μπορεί να είναι ενεργή είτε σε χαμηλές ή μεγάλες νανο-ποσότητες, είναι επίσης ανθεκτική σε θερμοκρασίες κατάψυξης αλλά και σε ξηρό περιβάλλον, ενώ είναι ανθεκτικό και σε χαμηλό pH (Goodfellow et al. 2012).

Τρόπος επιμόλυνσης

Ο *Staphylococcus aureus*, μπορεί να βρεθεί στο γάλα απευθείας από το μαστό του ζώου, ή τις εξωτερικές επιφάνειες των ζώων, το περιβάλλον, τον εξοπλισμό ή το

προσωπικό. Οι παράγοντες που επηρεάζουν αυτές τις οδούς μόλυνσης περιλαμβάνουν: α) Παράγοντες που σχετίζονται με τα ζώα π.χ. υγεία των ζώων, μέγεθος κοπαδιών, ηλικία και κατάσταση παραγωγής. β) Παράγοντες που σχετίζονται με το περιβάλλον π.χ. στέγαση, περιττώματα, ζωοτροφές, χώμα και νερό. γ) Άρμεγμα και λειτουργία των συντελεστών εξοπλισμού άρμεξης.

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση αποτελεί επίσης μια τέτοια πηγή, ενώ το στάδιο παραγωγής τυριών είναι κομβικό μαζί με τις συνθήκες αποθήκευσης

Ο τύπος του γαλακτοκομικού προϊόντος καθορίζει κυρίως τον τύπο του μικροοργανισμού αλλοίωσης. Το μικροβιολογικό φορτίο ενός προϊόντος συσχετίζεται με τα στάδια της κατασκευής. Το τυρί κρέμα και το επεξεργασμένο τυρί σχετίζονται με μύκητες, βακτήρια που σχηματίζουν σπόρια. Τα ψυχοτρόφα, τα κολοβακτηρίδια, οι μύκητες, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος και η ενζυματική τους διάσπαση ευθύνονται για την αλλοίωση των μαλακών, φρέσκων τύπου τυριών. Οι συνήθεις τύποι μικροοργανισμών αλλοίωσης του τυριού cottage είναι τα ψυχοτρόφα, τα κολοβακτηρίδια, οι ζύμες και οι μούχλες (Ledenbach & Marshall, 2009). Το cottage cheese βρέθηκε να ανήκει σε εκείνα τα είδη που θεωρούνται περισσότερο επιρρεπή και η επιμόλυνση με *Staphylococcus aureus* μπορεί να συμβεί αν και σε μικρότερο βαθμό από τα επεξεργασμένα τυριά Laslo & Eva (2018).

Γενικά, στη μικροβιακή αλλοίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων, δύο κύριες ομάδες μικροοργανισμών παίζουν κεντρικό ρόλο: τα ψυχοτρόφα που μπορούν να αναπτύσσονται στους 5-7 °C και τα θερμοάντοχα που επιβιώνουν της παστερίωσης. Στα γαλακτοκομικά προϊόντα, μπορούν να εντοπιστούν διάφορα είδη βακτηρίων που ανήκουν σε διαφορετικά γένη: τόσο θετικά κατά Gram (*Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* κ.λπ.) όσο και κατά Gram αρνητικά είδη (*Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter*) (Andreani & Fasolato, 2017).

Κεφάλαιο 2: Συσκευασία τροφίμων

2.1 Εισαγωγή

Έχουν εντοπιστεί τέσσερις κύριες, αλληλένδετες λειτουργίες συσκευασίας (Robertson, 2013): συγκράτηση, προστασία, ευκολία και επικοινωνία. Πριν από τη μεταφορά των τροφίμων, είναι απαραίτητη προϋπόθεση να περιέχονται σε συσκευασία για την αποφυγή δυνητικής επιμόλυνσης τους.

Η προστασία θεωρείται συχνά ως η κύρια λειτουργία της συσκευασίας: η προστασία του περιεχομένου της από εξωτερικές περιβαλλοντικές επιδράσεις, όπως νερό, υδρατμοί, αέρια, οσμές, μικροοργανισμοί, σκόνη, κραδασμοί, κραδασμοί και δυνάμεις συμπίεσης.

Για την πλειοψηφία των τροφίμων, η προστασία που παρέχει η συσκευασία είναι ένα ουσιαστικό μέρος της διαδικασίας συντήρησης. Για παράδειγμα, ασηπτικά συσκευασμένο γάλα και χυμοί φρούτων σε χαρτόκουτα από πολυστρωματικό χαρτόνι παραμένουν ασηπτικά μόνο για όσο διάστημα η συσκευασία παρέχει προστασία. Ομοίως, το κρέας συσκευασμένο σε κενό δεν θα επιτύχει την επιθυμητή διάρκεια ζωής του εάν η συσκευασία επιτρέπει την είσοδο του O₂ και τα αποξηραμένα τρόφιμα θα αλλοιωθούν εάν η συσκευασία επιτρέπει την είσοδο υγρασίας.

2.2 Βρώσιμα film και coatings για τυρί

Το τυρί έχει μια περίπλοκη σύνθεση λόγω των πολλών βιολογικών και βιοχημικών αντιδράσεων που συμβαίνουν από το στάδιο της παραγωγής έως το στάδιο της αποθήκευσης, επηρεάζοντας τα φυσικά, οργανοληπτικά και χημικά χαρακτηριστικά του, όπως η υφή, το άρωμα και το χρώμα (Robertson, 2006). Η εντατική ανάπτυξη ζυμομυκήτων, μούχλας και βακτηρίων μπορεί να συμβεί στην επιφάνεια του τυριού λόγω των εξωτερικών περιβαλλοντικών συνθηκών κατά το χειρισμό και την αποθήκευση, οι οποίες μειώνουν σημαντικά την ποιότητα του τυριού και τις απαιτήσεις για την ανάπτυξη προσαρμοσμένων υλικών συσκευασίας για την αποφυγή αλλοίωσης (Fajardo et al., 2010). Οι απαιτήσεις συσκευασίας αλλάζουν ανάλογα με τον τύπο του τυριού, καθώς οι ρυθμοί ωρίμανσης, η περιεκτικότητα σε νερό και η μηχανική σταθερότητα εξαρτώνται από τη σύνθεσή του. Έχει προταθεί ότι τα φρέσκα τυριά (π.χ. τυρί κρέμα, μαλακό τυρί και τυρί cottage) πρέπει να συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα που περιέχει N₂ και/ή CO₂ αντί O₂ (Mannheim & Sofer, 1996). Ωστόσο, λόγω της παρουσίας ζυμομυκήτων και βακτηρίων, η

αλλοίωση μπορεί να συμβεί ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα O₂ και υψηλά επίπεδα CO₂ (Westall & Filtenborg, 1998) καθιστώντας τη τροποποιημένη συσκευασία ατμόσφαιρας μια λύση που πρέπει να χρησιμοποιείται προσεκτικά λαμβάνοντας υπόψη αυτούς τους παράγοντες. Παρόλα αυτά, οι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή ενός υλικού συσκευασίας είναι σχεδόν ίδιοι για όλα τα τυριά, όπως η διαπερατότητα σε αέρια, οι μηχανικές ιδιότητες και η διαφάνεια.

Μερικά από τα χρησιμοποιούμενα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για τη συσκευασία τυριού, αποτελούν μεταξύ άλλων, το πολυαιθυλένιο, το πολυαμίδιο, το πολυπροπυλένιο είναι μη βιοδιασπώμενα και μη βρώσιμα και μπορούν να οδηγήσουν σε οικολογικά προβλήματα καθώς και να αντιμετωπίσουν προκλήσεις από την αυστηρή νομοθεσία σχετικά με την επικείμενη μετανάστευση των υλικών στο τυρί. Για τα coatings, η μετανάστευση μπορεί να είναι ένα πρόβλημα, αφού μετά την εφαρμογή στην επιφάνεια του τυριού και τη στερεοποίησή του (με κρυστάλλωση στην περίπτωση κεριών και/ή με εξάτμιση διαλύτη) μπορεί να συμβεί η μετανάστευση μερικών υλικών επικάλυψης στο τυρί. Αυτές οι μεγάλες ανησυχίες οδήγησαν τη βιομηχανία στην αναζήτηση νέων λύσεων συσκευασίας και στη συνέχεια μια αυξανόμενη έρευνα σχετικά με τα βρώσιμα υλικά συσκευασίας (Fajardo et al., 2010). Σε αυτό το πλαίσιο, τα βιοπολυμερή και τα φυσικά λιπίδια εμφανίζονται ως εναλλακτική πηγή για την ανάπτυξη νέων υλικών συσκευασίας.

Τα βρώσιμα films και coatings που βασίζονται σε αυτά τα υλικά μπορούν να εγγυηθούν την ποιότητα των τροφίμων, λειτουργώντας ως ημιδιαπερατό φράγμα στο οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και τους υδρατμούς, επιτρέποντας τη μείωση της απώλειας νερού και τον ρυθμό ωρίμανσης (Garcia & Barret, 2002). Επιπλέον, βρώσιμα φίλτρα και επικαλύψεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς αντιμικροβιακών παραγόντων και επομένως να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη μικροβιακή ανάπτυξη στην επιφάνεια του τυριού (Cerqueira et al., 2009; Cerqueira et al., 2010).

Η χρήση των βρώσιμων films και coatings έχει αποδειχθεί πως συνεισφέρει στη βελτίωση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων, κυρίως μέσω της επέκτασης του της χρονικής διάρκειας ζωής του τροφίμου, καθώς επίσης και στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και της θρεπτικής αξίας του τυριού (Rojas-Grau et al., 2009). Αξίζει να σημειωθεί, πως παρουσιάζουν και άλλα

αξιοσημείωτα στοιχεία (Robertson, 2013): Αρχικά μπορούν να καταναλωθούν μαζί με το τυρί αποφεύγοντας την παραγωγή αποβλήτων, αφού δεν δημιουργούνται υπολείμματα συσκευασίας που πρέπει να απορριφθούν, και δεν υπάρχει πρόβλημα αν τελικά δεν καταναλωθούν και απλώς απορριφθούν καθώς είναι βιοδιασπώμενα (Wang et al., 2007). Οι οργανοληπτικές και θρεπτικές ιδιότητες του τυριού μπορούν να ενισχυθούν, είτε λόγω της σύνθεσης film/ coating που μπορεί να έχει ωφέλιμες ιδιότητες από μόνα του, είτε λόγω της ικανότητάς τους να ενσωματώνουν συστατικά όπως αρώματα, ή γλυκαντικά, που καταναλώνονται μέσω των coatings (Artiga et al., 2017); μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς δραστικών συστατικών που φέρουν δηλαδή ιδιότητες αντιμικροβιακού και αντιοξειδωτικού χαρακτήρα, και έτσι διασφαλίζεται μέσω αυτών, η διασφάλιση του τυριού με ταυτόχρονο έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσης αυτών των ουσιών στο τυρί (π.χ., σε ορισμένες χώρες όπου η μετανάστευση της ναταμυκίνης είναι περιορισμένη). Οι τρόποι που μπορούν να ενσωματωθούν αυτά τα ενεργά συστατικά στα βρώσιμα film και coatings αναφέρονται ως εξής (Embuena et al., 2016):

- **Μικροενθυλάκωση**, δίνοντας με αυτό τον τρόπο τη δυνατότητα της αποτελεσματικής και ελεγχόμενου ρυθμού απελευθέρωσης των δραστικών ουσιών στο τυρί (Cui et al., 2016).
- **Πολλαπλά στρώματα**, δίνοντας με αυτό τον τρόπο τη δυνατότητα της χρήσης μιας ευρείας γκάμας από υλικά και έτσι δύναται να βελτιώνονται οι οργανοληπτικές ιδιότητες, αφού διαθέτει ιδιότητες φραγμού και ενσωμάτωσης διαφορετικών υλικών (π.χ. λιπόφιλων και υδρόφιλων δραστικών ενώσεων) στο τυρί (Duan et al., 2007).
- **Εφαρμογή σε μικρές μερίδες τυριού**, δρώντας έτσι ως μεμονωμένη συσκευασία για κάθε μερίδα, το οποίο αποτελεί μια επιπρόσθετη ωφέλεια συγκριτικά πάντα με τη βρώσιμη συσκευασία (Balaguer et al., 2014).

2.3 Επίδραση βρώσιμων film και coating στις ιδιότητες του τυριού

Ένα άλλο κεφάλαιο που απασχολεί τους ερευνητές των coatings & films, είναι η αποτελεσματικότητά τους. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά κάθε φιλμ φαίνεται πως προδιαγράφουν μια συγκεκριμένη κατηγορία τυριού που μπορούν να περιβάλλουν. Σε αυτό παίζουν ρόλο η διαλυτότητα, η πυκνότητα, το ιξώδες και η επιφανειακή τους τάση. Βεβαίως οι μηχανικές ιδιότητες αντανakλούν τη δυνατότητά τους να παραμένουν αναλλοίωτα ανάλογα με το είδος τυριού, καθώς επίσης και να είναι

οπτικά εμφανή και ελκυστικά (Martins et al., 2012). Επίσης, η μέθοδος εφαρμογής των επιχρισμάτων (που μπορεί να γίνει είτε με εμβάπτιση, ψεκασμό και τύλιγμα), θα διαφοροποιείται ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της κάθε κατηγορίας τυριού και τις απαιτήσεις τις οποίες φέρει (π.χ αν είναι φρέσκο τυρί, ή ωρίμανσης) (Soradech, et al., 2012). Τα βρώσιμα film και coating διαφέρουν ανάλογα με τον τρόπο που παράγονται και εφαρμόζονται. Οι βρώσιμες επικαλύψεις, διαθέσιμες σε υγρή μορφή, εφαρμόζονται απευθείας στην επιφάνεια των τροφίμων όπου μετά το στέγνωμα σχηματίζεται ένα λεπτό στρώμα, ενώ τα φύλλα στεγνώνουν ξεχωριστά σχηματίζοντας ένα αυτόνομο υλικό που στη συνέχεια χρησιμοποιείται για την κάλυψη των τροφίμων.

Οι πρωτεΐνες, οι πολυσακχαρίτες και λιπίδια είναι τα υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανάπτυξη βρώσιμων film και coating για εφαρμογή στο τυρί.

Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει μια σύνοψη της βιβλιογραφίας στη βάση των υλικών που προτιμώνται για την παρασκευή υλικών φιλμ και επίστρωσης.

Πίνακας 2 Η βάση των υλικών για την παρασκευή υλικών φιλμ και επίστρωσης που χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία.

Κατηγορία	Είδος	Αναφορές
Πρωτεΐνες	πρωτεΐνη ορού γάλακτος	Ramos et al., 2012b, Rodriguez-Turienzo et al., 2012
Πολυσακχαρίτες	Χιτοζάνη	Bourbon et al., 2011
	Γαλακτομαννάνες	Martins et al., 2012
Λιπίδια	Καλαμποκέλαιο και Γλυκερόλη	Cerqueira, et al., 2012
	κολλαγόνο -βούτυρο κακάο	Al-Hassan & Norziah, 2012

Οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν ως κύριο πλεονέκτημα τη διαλυτότητά τους στο νερό, ενώ για λιπίδια και κεριά, ένας οργανικός διαλύτης ή μέθοδοι θερμής τήξης, αντίστοιχα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή. Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να συμπεριληφθεί ένας επιπρόσθετος παράγοντας αντιμικροβιακού χαρακτήρα κατά την παρασκευή – σύνθεση του coating

και αφορά τη διαλυτότητα του εν λόγω παράγοντα, συνάμα της πιθανής αλληλεπίδρασης με το ίδιο το σύστημα, το οποίο ενδεχομένως μπορεί να αποτελεί εν δυνάμει παράγοντα που επηρεάζει την απόδοσή τους κατά την επιχείρηση εφαρμογής του coating στο τυρί.

Οι Lucera et al (2013), μελέτησαν την επίδραση των επιστρώσεων με γνώμονα την αποτελεσματικότητα τους υπό του πρίσματος της αντιμικροβιακής τους ιδιότητας αλλά και της οργανοληπτικής τους. Η εργασία χωρίστηκε σε δύο επόμενα πειραματικά βήματα: Το πρώτο είχε ως στόχο την επιλογή της βέλτιστης δραστικής ένωσης μεταξύ διαφορετικών ουσιών, όπως το σορβικό κάλιο (PS), το βενζοϊκό νάτριο (SB), το γαλακτικό ασβέστιο (CL) και το ασκορβικό ασβέστιο (CA).

Κατά το δεύτερο πειραματικό μονοπάτι, μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1%, 2%, 3%, β/ο) της καλύτερης (PS) η οποία επιλέχθηκε ως η πιο αποτελεσματική. Στο σύνολό τους οι δραστικές ενώσεις διασκορπίστηκαν σε διάλυμα αλγινικού οξέος του νατρίου, η οποία διαδικασία προηγήθηκε της επικάλυψης του τυριού. Προκειμένου να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα των coating, επιλέχθηκε ένας φρέσκος τύπος τυριού, η μοτσαρέλα, στην οποία ο μάρτυρας, ή αλλιώς το δείγμα ελέγχου, δεν έφερε καμία επίστρωση. Η περίοδος αποθήκευσης που μελετήθηκε η επίδραση των φιλμ χαρακτηρίζεται από θερμοκρασία στους 8°C +/- 1. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πρώτο στάδιο εφαρμογής του coating με CL και CA, δεν επέφεραν κάποια ποιοτική αναβάθμιση στο τυρί. Από την άλλη μεριά, ιδιαίτερος ενθαρρυντικά κρίνονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή των coatings με PS και SB, τα οποία ενίσχυσαν την ποιότητα του τυριού. Σε επόμενο βήμα η επικάλυψη του τυριού με PS σε αναλογία 3%, επέφερε ανασταλτική δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών για 8 μέρες, δηλαδή ο πληθυσμός τους κινήθηκε στα επιτρεπτά όρια, για 8 μέρες συνεχόμενα, κάτι που αποτελεί διπλάσιο αριθμό ημερών συντήρησης σε σχέση με τον μάρτυρα, ο οποίος στις 4 ημέρες απορρίφθηκε.

Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και λιπίδια που χρησιμοποιούνται ως επικαλύψεις σε διάφορους τύπους τυριού, τη σύνθεση επικάλυψης και τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για εφαρμογή.

Οι Otero et al (2014), στην προσπάθειά τους να μελετήσουν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες που μπορούν να προσφέρουν τόσο το αιθέριο έλαιο *Origanum vulgare* (OR) και Αργινικού αιθυλεστέρα HCL, τα ενσωμάτωσαν σε μεμβράνες συσκευασίας τύπου PP & PET σε αναλογίες (0, 4, 6 & 8%). Ο αντιμικροβιακός έλεγχος δοκιμάστηκε

έναντι δύο στελεχών του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli O157: H7* κάνοντας χρήση συστημάτων in vitro συστήματα και ενός πρόβειου τυριού Zamorano, το οποίο παρασκευάζεται με απαστερίωτο γάλα.

Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε η επίδραση των αντιμικροβιακών υλικών, στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού. Αξίζει να αναφερθεί πως η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση και ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση που φέρουν τα ακρωνύμια MBC και MIC αντίστοιχα, ήταν ίδιες τιμές και για τα δύο στελέχη. Παρόλα αυτά για τον Αργινικό αιθυλεστέρα οι τιμές ήταν χαμηλότερες σε σύγκριση με το *Origanum vulgare*.

Και τα δύο φιλμ επικαλυμμένα με αιθυλεστέρα δοκιμάστηκαν με μέθοδο διάχυσης σε άγαρ. Συνολικά, οι δοκιμές in vitro ήταν αποτελεσματικές και στα δύο στελέχη. Η ανασταλτική δραστηριότητα διαφοροποιείται από τη συγκέντρωση της δραστικής ένωσης, το στέλεχος που τίθεται ως στόχος καθώς επίσης και το υλικό συσκευασίας, με το PET να απαντάται ως αποτελεσματικότερο έναντι του PP. Παρόλα αυτά, οι μεμβράνες με OR και HCL (0 & 4%) δε μείωσαν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο 1% τον πληθυσμό των δύο στελεχών *Escherichia coli O157: H7* στις φέτες τυριού που εμβολιάστηκαν σε μια περίοδο 7 ημερών όπου και εξετάστηκαν.

Αντιθέτως, οι μεμβράνες PET που ενσωματώνουν σε αναλογίες 6 και το 8% των OR και HCL σε επίπεδο σημαντικότητας 5%, θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η μείωση του συνολικού πληθυσμού των δύο στελεχών. Τα HCL PP, OR PET και HCL PET δεν επηρέασαν στατιστικά σημαντικά ($p > 0,05$) τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού Zamorano. Συνολικά το συμπέρασμα που προέκυψε από την εν λόγω έρευνα, είναι πως οι μεμβράνες PET επικαλυμμένες με $\geq 6\%$ σε συγκέντρωση HCL μπορεί να είναι κομβική στην προσπάθεια μείωσης του πληθυσμού *E. Coli O157: H7* στο πρόβειο τυρί.

Πίνακας 3 Παραδείγματα πολυσακχαριτών, πρωτεϊνών και κεριών που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό βρώσιμης επικάλυψης για εφαρμογή σε διάφορους τύπους τυριού.

Υλικό χρήσης	Τύπος Τυριού	Σύνθεση Coating/film	Μέθοδος εφαρμογής	Βιβλιογραφία
Αλγινικό Νάτριο	Μοτσαρέλλα	Νερό και χλωριούχο ασβέστιο Νερό και γλυκερόλη	Εμβάπτιση Εμβάπτιση επικάλυψη Ψεκασμός	(Mastromatteo et al., 2014) (Zhong et al., 2014)
Χιτοζάνη		Νερό, οξικό οξύ και γλυκερόλη	Ηλεκτροστατικός ψεκασμός Εμβάπτιση Πλήρης κάλυψη Ψεκασμός Ηλεκτροστατικός ψεκασμός	(Zhong et al., 2014)
	Τοπικό τυρί Saloio	Νερό, γαλακτικό οξύ, γλυκερόλη, σορβιτόλη και καλαμποκέλαιο	Βούρτσισμα	(Cerqueira et al., 2009, 2010)
	Ricotta	Νερό και HCl	Εμβάπτιση	(Di Pierro et al., 2011)
	Cheddar	Νερό, οξικό οξύ, γλυκερόλη και νισίνη- πυρίτιο	N/A	(Cui et al., 2016)
	Τυρί από πρόβειο γάλα	λιποσώματα ή λιποσώματα νισίνης Νερό, οξικό οξύ, δεντρολίβανο και αιθέριο έλαιο ρίγανης	Εμβάπτιση	(Embuena et al., 2016)
	Emmental Αιγυπτιακό μαλακό τυρί	Διάλυμα υδατικού οξέος Νερό, νανοσωματίδια οξικού οξέος, καρβοξυμεθυλοκυτταρίνης ψευδαργύρου	Εμβάπτιση Τύλιγμα	(Coma et al., 2002) (Youssef, et al., 2016)
Γαλακτομαννάνες	Τοπικό τυρί Saloio	Νερό, γλυκερόλη, σορβιτόλη και καλαμποκέλαιο	Βούρτσισμα	(Cerqueira et al., 2009, 2010)
	Ricotta	Νερό, γλυκερόλη και καλαμποκέλαιο	Εμβάπτιση	(Martins et al., 2010)
	Ημι-μαλακό τυρί Port Salut	Νερό, γλυκερόλη, νισίνη, ναταμυκίνη	Επιφανειακή επαφή Ψεκασμός	(Ollé et al., 2014)
Καζεϊνικό νάτριο	Τυρί πάστα φιλάτα Kashar	Νερό και γλυκερόλη	Immersion Τύλιγμα	(Moreira et al., 2011)
Όξινη καζεΐνη		Νερό, γλυκερόλη, χλωριούχο ασβέστιο και ναταμυκίνη	Εμβάπτιση	(Yangilar &Yildiz, 2015)
Ζεΐνη		Ethanol Αιθανόλη, γλυκερόλη, λυσοζύμη, κατεχίνη και γαλλικό οξύ	Τύλιγμα	(Ünal et al., 2013)
Πρωτεΐνη ορού γάλακτος Πρωτεΐνη από ασπράδι αυγού	Ricotta Φρέσκο τυρί Lor	Νερό, HCl, χιτοζάνη Νερό, σορβιτόλη, αιθέριο έλαιο φασκόμηλου ή αιθέριο έλαιο βάλσαμο λεμονιού	Εμβάπτιση Εμβάπτιση	(Di Pierro et al., 2011) (Kavas & Kavas, 2014)
Συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού γάλακτος (WPC)	Ημί-σκληρο	Νερό, γλυκερόλη, κόμμι γκουάρ, αντηλιακό λάδι, Polysorbate 20, lactic acid, natamycin	Βούρτσισμα	(Henriques et al., 2013)
Απομονωμένη πρωτεΐνη ορού γάλακτος	Τυρί πάστα φιλάτα Kashar Φρέσκο τυρί Lor	Νερό σορβιτόλη, αλγινικό, αιθέριο έλαιο τζίντζερ Νερό, σορβιτόλη, αιθέριο έλαιο μέντας, Polysorbate 20	Εμβάπτιση Εμβάπτιση	(Kavas & Kavas, 2014) (Kavas & Kavas, 2014)
Κερί μέλισσας	Kashar		Εμβάπτιση	(Yilmaz & Dagdemir, 2012)

2.3.1 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη αποτελεί έναν από τους ελάχιστους κατιονικούς πολυσακχαρίτες, και απαντάται σε μύκητες ή σε όστρακα (Fajardo et al., 2010). Επιπρόσθετα, το ενδιαφέρον των ερευνητών στρέφεται γύρω από τις εκπληκτικές ιδιότητες που φέρει στις συσκευασίες βρώσιμου χαρακτήρα, αφού αναγνωρίζεται για τις αντιμικροβιακές δράσεις που επιφέρει έναντι βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών (Rabea et al., 2003). Εξαιτίας λοιπόν όλων των ιδιοτήτων, χρησιμοποιείται και στις επικαλύψεις τυριού με το εν λόγω υλικό ως coating αλλά και ως φιλμ. Στο σημείο αυτό ακολουθεί μια βιβλιογραφική επισκόπηση στην κατεύθυνση της ανάδειξης όλων εκείνων των ευεργητικών ιδιοτήτων στην επικάλυψη τυριού.

Αρχικά, οι Coma et al (2002) στην προσπάθειά τους να μελετήσουν τον αντιμικροβιακό χαρακτήρα της χιτοζάνης σε τυρί Emmental, εμβολίασαν ένα τέτοιο τυρί με *Listeria innocua*, έναν ισχυρό παθογόνο μικροοργανισμό και στη συνέχεια επικάλυψε το τυρί με χιτοζάνη σε αναλογία 1%. Ο στόχος ήταν η αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων. Στις πρώτες 5,5 μέρες που δοκιμάστηκε, είχε σα συνέπεια την ολική αναστολή του παθογόνου οργανισμού, ύστερα από επώαση στους 37° C. Στην ίδια κατεύθυνση, οι Duan et al (2007) εφάρμοσαν μια επικάλυψη χιτοζάνης με 60% λυσοζύμη σε ένα ωριμασμένο, χαμηλής υγρασίας, τεμαχισμένο τυρί μοτσαρέλα. Διαπιστώθηκε, πως ύστερα από την αποθήκευση του τυριού για 14 ημέρες στους 10 ° C, βεβαιώθηκαν λογαριθμική μείωση του πληθυσμού κατά 1,25 log (CFU/g) *Escherichia coli*, 1,4 log (CFU/g) για *Pseudomonas fl uorescens* και 1,35 log (CFU/g) *L. monocytogenes*, σε σύγκριση με δείγματα ελέγχου- μάρτυρες.

Μια άλλη μελέτη που χρησιμοποίησε επίσης χιτοζάνη ως φορέα αντιμικροβιακών παρουσιάστηκε από τους Fajardo et al. (2010) που εξέτασαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ναταμυκίνης σε επικάλυψη με βάση χιτοζάνη. Χρησιμοποίησαν τη βύθιση ως μέθοδο εφαρμογής σε φέτες πάχους 0,5 εκατοστών σε ημίσκληρο τυρί και διαπιστώθηκε λογαριθμική μείωση κατά 1,1 log (CFU/g) σε ζύμες μετά από διάστημα 27 ημερών (σχεδόν 1 μήνα) συντήρησης στους 4 βαθμούς , κάνοντας χρήση - εφαρμογή 0,5 mg/mL ναταμυκίνης, σε σύγκριση με δείγμα ελέγχου. Άλλη μελέτη, είχε ως στόχο τον προσδιορισμό του αριθμού ημερών που θα μπορούσε να επέλθει ως επέκταση της διάρκειας ζωής του φρέσκου τυριού τύπου Ricotta, κάνοντας χρήση της

επικάλυψης με χιτοζάνης σε συνδυασμό με ένα συμπύκνωμα πρωτεΐνης ορού του γάλακτος. Το αποτέλεσμα που προέκυψε, έδειξε ισχυρή παράταση της διάρκειας ζωής σε συνθήκες αποθήκευσης 4°C για 30 ημέρες. Στο δείγμα ελέγχου – μάρτυρα, παρατηρήθηκε πως η οριακή τιμή μικροβιακής αποδοχής, που προσδιορίστηκε σε 7 λογαριθμικούς κύκλους, επετεύχθη στις πρώτες 7 ημέρες για τα μεσόφιλα βακτήρια μεταξύ 7 και 14 ημερών για τα ψυχρότροφα βακτήρια και σε διάστημα 21 ημερών για τους οξυγαλακτικούς μικροοργανισμούς. Επιπρόσθετα ως προς τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, τα επίπεδα της οξύτητας δε μεταβλήθηκαν ανεξέλεγκτα και άμεσα, ενώ η υφή τους (σκληρότητα) που μελετήθηκε με βάση της απώλεια σε υγρασία, διατηρήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα σε σύγκριση με το μάρτυρα. (Di Pierro et al., 2011). Ένα ενδιαφέρον γεγονός ήταν η αργή ανάπτυξη οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) στα τυριά που επέφεραν τη χαρακτηριστική επικάλυψη, που απαντάται στην ποικιλία διαφορετικών τιμών της μέγιστης οξύτητας. Συγκεκριμένα, είναι χαρακτηριστικό πως στα επικαλυμμένα τυριά η υψηλότερη τιμή επιτεύχθηκε ύστερα από 1 μήνα, τη στιγμή που ο μάρτυρας- δείγμα ελέγχου χρειάστηκαν μόλις 14 ημέρες, ως αποτέλεσμα της αυξητικής τάσης της παραγωγής οργανικών οξέων από τα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Συνεπώς οι ανωτέρω έρευνες που παρατέθηκαν, μας οδηγούν στο συμπέρασμα πως η χιτοζάνη, μπορεί να διαφοροποιήσει ριζικά τις βρώσιμες συσκευασίες και να χρησιμοποιηθεί εκτενώς, τόσο σε φρέσκου όσο και σε ωριμασμένου τύπου τυριών ως επικαλύψεις και φιλμ. Χαρακτηριστικές ήταν τόσο οι ευεργετικές επιδράσεις της ως προς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, πολλώ δε μάλλον για τον αντιμικροβιακό χαρακτήρα που τα διέπει και δύναται η συντήρησή τους για εκτενέστερο διάστημα σε σύγκριση με τα συμβατικά υλικά που χρησιμοποιούνται ως και σήμερα.

2.3.2 Αλας αλγινικού οξέως

Το αλγινικό νάτριο, αποτελεί ένα υλικό που έρχεται να επιφέρει ισχυρές ανατροπές στο ερευνητικό πεδίο των βρώσιμων υλικών συσκευασίας. Αρχικά, η προέλευση του εν λόγω υλικού απαντάται στην επεξεργασία των φυκιών (Nieto, 2009). Συγκεκριμένα, σχηματίζεται ένα υμένιο συγκριτικά αποδοτικότερο των συνηθισμένων όπως το καζεϊνικό νάτριο και το άμυλο πατάτας τόσο ως προς τους φραγμούς που θέτει προς την υγρασία, όσο και ως προς τις μηχανικές τους ιδιότητες (Wang et al., 2007). Μία εκ των ιδιαίτερα σημαντικών και ελκυστικών ιδιοτήτων,

αφορά τη δημιουργία σταυροειδών δεσμών τη στιγμή που υπολλείματα από γλουκουρονικό οξύ δεσμεύονται σε ιόντα Ca^{2+} , σχηματίζοντας τη χαρακτηριστική δομή «egg-box». Η συγκεκριμένη ικανότητα επιτρέπει την ανάπτυξη εξατομικευμένων δομών και με αυτό τον τρόπο δύναται να αναπτυχθούν κατάλληλοι φραγμοί αλλά και να αναδειχθούν κατόπιν τροποποίησης οι μηχανικές τους ιδιότητες ως προς τα τροποποιημένα φιλμ και coating του AlgNa. Σε μια μελέτη των Mastromatteo et al., 2014, το ενδιαφέρον τους στράφηκε στην ανάδειξη των ευεργετικών ιδιοτήτων του αλγινικού. Για το λόγο αυτό, η μελέτη παρουσίασε το συνδυασμού του φιλμ με τροποποιημένη ατμόσφαιρα με σύσταση 50% CO_2 και 50% N_2 . Το προϊόν που επελέγη ήταν η μοτσαρέλα, ένα φρέσκο τυρί και η θερμοκρασία συντήρησης ήταν οι 4 βαθμοί Κελσίου. Ο παθογόνος οργανισμός που επιλέχθηκε για την ανάδειξη τυ αντιμικροβιακού παράγοντα της συσκευασίας ήταν ο *Pseudomonas spp.* Για τον προσδιορισμό των ευεργετικών χαρακτηριστικών της συσκευασίας, πέραν του αντιμικροβιακού χαρακτήρα, ελέγχθηκε επιπλέον η επίδραση στην ποιότητα του τυριού. Συνολικά λοιπόν, η εικόνα που αποτυπώθηκε με βάση τα αποτελέσματα ενισχύουν το επιχείρημα περί αντιμικροβιακής δράσης του αλγινικού, αφού μείωσε σταδιακά τον πληθυσμό κατά 2 λογαριθμικούς κύκλους. Πέραν αυτού, από τη μέτρηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, η διάρκεια ζωής του τυριού επεκτάθηκε από τις 53 που βρέθηκε για το δείγμα ελέγχου – μάρτυρα, σε 160 ημέρες.

Η αποτελεσματικότητα των τροποποιημένων επιχρισμάτων με το αλγινικό άλας δύναται να ενισχυθεί έτοι περαιτέρω, αφού υπάρξει ενσωμάτωση άλλων αντιμικροβιακών φορέων. Σε αυτή την κατεύθυνση κινήθηκε η μελέτη των Lucera et al. (2014), οι οποίοι στην προσπάθεια αξιολόγησης της αποδοτικότητας των φιλμ, ενσωμάτωσαν σορβικό κάλιο σε αναλογία 3%. Το challenge test έγινε έναντι των παθογόνων οργανισμών *Enterobacteriaceae* και *Pseudomonas spp.*, σε τυρί Μοτσαρέλα. Οι συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων ήταν σε θερμοκρασία 8 ° C κατά την αποθήκευση. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η μοτσαρέλα διατηρήθηκε για 8 μέρες εντός των ορίων αποδοχής, ενώ ο μάρτυρας-δείγμα ελέγχου μόλις για 4 ημέρες.

Σε μια άλλη εργασία, οι Zhong et al. (2014) χρησιμοποίησαν αλγινικό νάτριο ως επικάλυψη για τυρί μοτσαρέλα χαμηλής υγρασίας και στόχος ήταν ο προσδιορισμός της καταλληλότερης μεθόδου εφαρμογής που θα προσδώσει τα μέγιστα στην ποιότητα του προϊόντος. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν οι: εμβάπτιση, επάλειψη,

ψεκασμός και ηλεκτροστατικός ψεκασμός. Στα πλαίσια ελέγχου της ποιοτικής υποβάθμισης, μελετήθηκε ο ρυθμός απώλειας υγρασίας, ως ένδειξη σκληρότητας του τυριού. Συνολικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν, έδειξαν πως για 14 μέρες, το τυρί με επικάλυψη αλγινικού νατρίου παρουσίασε τιμές σκληρότητας 113-135, τη στιγμή όπου ο μάρτυρας κινήθηκε σε επίπεδα άνω των 300N. Η δυνατότητα του αλγινικού να λειτουργεί ως φραγμός στη διαπερατότητα υγρασίας και μάλιστα η μεγαλύτερη επίδραση του εν λόγω coating επήλθε από την εφαρμογή με ψεκασμό και ηλεκτροψεκασμό.

2.3.3 Ζεόλιθος

Οι περισσότερες συσκευασίες τροφίμων στηρίζονται κυρίως στην επεξεργασία πετρελαίου. Με την εμφάνιση νέων μορφών συσκευασιών, όπως ενεργές, έξυπνες και βιοδιασπώμενες συσκευασίες. Αυτές μάλιστα προσφέρουν ένα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα που σχετίζεται με την παράταση της διάρκειας ζωής, όπως είναι μεταξύ άλλων των φρέσκων λαχανικών.

Η εξάλειψη του αιθυλενίου, χρησιμοποιώντας το ζεόλιθο ως προσροφητικό, έχει λάβει σημαντική προσοχή τόσο στη βιομηχανία όσο και στη γεωργία. Ως εκ τούτου, οι καθαριστές (scavengers) αιθυλενίου με βάση τον ζεόλιθο αποτελούν άξιο υλικό για εμπορικές εφαρμογές (Yam, 2010). Αναφέρεται ότι οι ευεργετικές ιδιότητες του υλικού υπάρχουν στο μεγάλο εσωτερικό ζεόλιθο. Η πιο διακριτική ιδιότητα των ζεόλιθων είναι η πορώδης τρισδιάστατη δομή τους με ιδιότητες εναλλαγής κατιόντων, προσρόφησης και μοριακού διαχωρισμού.

Έτσι, οι ζεόλιθοι έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες βιομηχανικές και γεωργικές εφαρμογές, καθώς επίσης και ως ένα υλικό καθαρισμού αιθυλενίου ενσωματωμένο σε υλικό συσκευασίας όπως το φιλμ. Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι η ενσωμάτωση ζεόλιθων επιτρέπει υψηλή διαπερατότητα αερίων των υλικών συσκευασίας μέσω της κρυσταλλικής πορώδους τρισδιάστατης δομής τους (Dirim et al. 2004).

Οι Coloma et al (2014) ανέπτυξαν καθαριστή αιθυλενίου με βάση τον ζεόλιθο με τη χρήση μοντμοριλονίτη και ενσωματώθηκαν περαιτέρω με πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας. Με την χρήση του καθαριστή σε συγκέντρωση 10% επιτεύχθηκε μετά από 50 ώρες, η αποβολή του 37% του αιθυλενίου που υπήρχε στο χώρο της συσκευασίας.

Σύμφωνα με αυτό, οι Tzeng et al (2019) ανέπτυξαν και εφάρμοσαν καθαριστή (scavenger) με βάση ζεόλιθο τροποποιημένο με παλλάδιο για καθυστέρηση της διάρκειας ζωής μιας μπανάνας. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ζεόλιθος που τροποποιήθηκε με παλλάδιο καθυστέρησε την ωρίμανση της μπανάνας και ανέκτησε τη σταθερότητα της και το χρώμα φλούδας των φρούτων σημαντικά.

Ο στόχος των Barreda et al (2020) ήταν να αναπτυχθεί μια βιοδιασπώμενη ενεργή συσκευασία και ένας δείκτης ωρίμανσης για τα φρέσκα άνθη μπρόκολου (*Brassica oleracea*), προκειμένου να αυξηθεί η διάρκεια ζωής και να παρακολουθείται η αποσύνθεση του λαχανικού. Οι βιοδιασπώμενες δραστικές συσκευασίες παρήχθησαν με εμφυσημένη εξώθηση που περιείχε ζεόλιθο ως καθαριστή αιθυλενίου και προσδιορίστηκαν οι μηχανικές τους ιδιότητες, η διαπερατότητα των υδρατμών και οι ισόθερμες απορροφήσεις του νερού.

Τα φρέσκα μπρόκολα συσκευάστηκαν σε διάτρητη και μη διάτρητη βιοδιασπώμενη ενεργή συσκευασία και αποθηκεύτηκαν στους 12 C, και η απώλεια βάρους, η περιεκτικότητα σε βιταμίνη C, το χρώμα και η υφή τους αξιολογήθηκαν κατά την αποθήκευση. Τα BAP ήταν αποτελεσματικά στη μείωση του μεταβολισμού των φρέσκων ανθέων μπρόκολου αποθηκευμένων στους 12 C, διατηρώντας το χρώμα και την περιεκτικότητα σε βιταμίνη C για 7 ημέρες. Οι ετικέτες ενδείξεων ωρίμανσης μπόρεσαν να ανιχνεύσουν CO₂ σε συσκευασίες χωρίς διάτρηση.

Σε αυτή τη μελέτη, τρεις τύποι φιλμ με βάση το πολυπροπυλένιο (PP) (δύο ενεργά νανოსύνθετα και ένα φιλμ ελέγχου) που περιέχουν νανοδομημένα οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO NPs), ζεόλιθο 4A (4A Z) και εκχύλισμα πράσινου τσαγιού μελετήθηκαν ως σύγχρονα ενεργές συσκευασίες που μπορούν να ρυθμίσουν την απελευθέρωση αντιμικροβιακών παραγόντων.

Σε συνέχεια, οι Lalabadi1 et al. (2020), δοκίμασαν τρεις τύπους ενεργούς συσκευασίας με βάση το πολυπροπυλένιο (PP) σε φρέσκο σολομό. Τα δύο εξ αυτών περιείχαν νανοδομημένα οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO NPs), ζεόλιθο 4A (4A Z) και εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (GTE) με σκοπό τη ρύθμιση της απελευθέρωσης αντιμικροβιακών παραγόντων, ενώ το τρίτο ήταν ο μάρτυρας. Η επίδραση του PP με Ζεόλιθο σε 3 και 6% έδειξε καθαρή ζώνη (inhibition zone) στα 10.98 ± 0.03 , ενώ οι οργανοληπτικές ιδιότητες του σολομού παρέμειναν αναλλοίωτες για 9 ημέρες σε σχέση με τον μάρτυρα.

Οι García et al, (2014) αξιολόγησαν η επίδραση των επιχρισμάτων χιτοζάνης σε συνδυασμό με ζεόλιθο στα ποιοτικά χαρακτηριστικά της τομάτας (*Lycopersicon esculentum* cv. FA-180 HAZERA) κατά τη χρονική περίοδο αποθήκευσης στο ψυγείο. Οι επικαλύψεις εφαρμόστηκαν με διπλή εμφάνιση ντοματών σε διαλύματα σχηματισμού μεμβράνης για 5 λεπτά, ανάλογα με τις εφαρμογές: (α) χιτοζάνη σε 1,5% (β/ο) σε γαλακτικό οξύ 1% (v/v), (β) χιτοζάνη σε 1,5% (w/v) σε γαλακτικό οξύ 1% (v/v) και Tween 80 σε 0,1% (w/v) και (γ) χιτοζάνη σε 1,5% (β/ο) σε γαλακτικό οξύ 1% (v/v) και ζεόλιθος σε 3% (β/β με βάση χιτοζάνη). Οι ντομάτες αφέθηκαν να στεγνώσουν για 2 ώρες στους 25 ° C, ενώ στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους 10 ° C για 37 ημέρες. Η αποτελεσματικότητα των εφαρμογών στην παράταση της διάρκειας ζωής των φρούτων αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό της μυκητιακής αποσύνθεσης, του ρυθμού αναπνοής, των ποιοτικών χαρακτηριστικών και της συνολικής οπτικής εμφάνισης. Δεν παρατηρήθηκε κανένα σημάδι αποσύνθεσης μυκήτων κατά την περίοδο αποθήκευσης. Η προσθήκη ζεόλιθου στο 3% (με βάση τη χιτοζάνη) και η εφαρμογή Tween 80 στο 0,1% (o/o) σε διάλυμα χιτοζάνης, βελτίωσε τις ιδιότητες της επικάλυψης καθυστερώντας την ωρίμανση των τοματών, αν και δεν αποτελούσε αποτελεσματικό φράγμα έναντι των απωλειών βάρους.

2.3.4 Αιθέρια έλαια

Είναι γεγονός πως τα αιθέρια έλαια που μπορούν να προκύψουν από μια ευρεία γκάμα φυτών καταφέρνουν να αναστέλουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, ενώ την ίδια στιγμή προσδίδουν επιπρόσθετη αξία στο τυρί μέσω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων που οδηγούν στην επέκταση της διάρκειας ζωής του τυριού. Έχουν μάλιστα εγκριθεί από την ΕΕ ως ασφαλή προϊόντα από το 2008.

Ως προς τις μελέτες που διατίθενται στη βιβλιογραφία για επικαλύψεις σε τυριά, μια πρώτη ανάγνωση σε έρευνα των Kuorwel et al., 2013, το τροποποιημένο άμυλο με αιθέρια έλαια λιναλόλης, καρβακρόλης και θυμόλης προσέδωσαν αντιμυκητιακή δράση έναντι του *Aspergillus niger* που ελέγχθηκε απαστερίωτο ημίσκληρο τυρί cheddar. Συγκεκριμένα η εμφανής αντιμικροβιακή δράση φανέρωσε συρρίκνωση του πληθυσμού κατά 2 λογαριθμικούς κύκλους. Μια άλλη εφαρμογή του αιθέριου ελαίου ρίγανης, αφορά στην ενσωμάτωση σε νανογαλάκτωμα αλγινικού νατρίου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι ιδιαίτερος ικανοποιητικά αφού η αναστολή της

δράσης του παθογόνου *S. aureus* μειώθηκε κατά 2 λογαριθμικούς κύκλους, όταν η αναλογία σε ριγανέλαιο ήταν 2% και η επέκταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος προσδιορίστηκε στις 15 ημέρες σε θερμοκρασία 4°C. Από την άλλη με τη χρήση 2.5% ριγανέλαιο στο νανογαλάκτωμα, η αναστολή της ανάπτυξης των ψυχρόφιλων μικροοργανισμών αφορούσε 6 ημέρες, ενώ τα ποιοτικά χαρακτηριστικά παρέμειναν αναλλοίωτα για 24 ημέρες (Artiga-Artigas et al., 2017).

Επιπρόσθετα, σε έρευνα των Han et al (2014), αναπτύχθηκε ένας αντιμικροβιακός «σάκος» ο οποίος εμπεριείχε αφρώδες άμυλο σε μικροκυτταρική μορφή, στο οποίο ενσωματώθηκαν αιθέρια έλαια δεντρολίβανου και θυμαριού. Σκοπός της έρευνας αποτέλεσε η δυνατότητα αναστολής ανάπτυξης βακτηρίων τυρί Mozzarella που επιλέχθηκε. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως υπήρξε μια ευρεία ποικιλία αποτελεσμάτων όσον αφορά την πτητικότητα τους και αυτή καθορίστηκε από τις αναλογίες-συγκεντρώσεις που ενσωματώθηκαν. Η μοτσαρέλα εμβολιάστηκε με πέντε στελέχη *L. monocytogenes* με αρχικό πληθυσμό 3 log CFU/g. Τα αποτελέσματα των αιθέρων ελαίων από την πτητική τους δράση κρίθηκαν ιδιαιτέρως σημαντικά, αφού η μείωση του πληθυσμού των *L. monocytogenes*, προσδιορίζεται σε 2,5 log CFU/g σε διάστημα 9 ημερών και θερμοκρασία συντήρησης τους 10°C. Επιπροσθέτως, η πτητική ικανότητα των αιθερέων ελαίων επηρέασαν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και της ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Συγκεκριμένα, σε θερμοκρασία 10 °C, οι πληθυσμοί LAB και OMX στα δείγματα με τα αιθέρια έλαια, εμφάνισαν μια λογαριθμική μείωση κατά 1,2 και 1,4 log CFU/g, για το έλαιο δεντρολίβανου και θυμαριού, συγκριτικά με τον μάρτυρα όπου η ανάπτυξη ήταν ανεξέλεγκτη. Αξίζει βέβαια να αναφερθεί πως ο έντονος χαρακτήρας του αρώματος και της γεύσης που προσέδωσαν στο τυρί, δεν ήταν αποδεκτός από τους συμμετέχοντες κατά την αξιολόγηση.

Σε συνέχεια αυτού του μειονεκτήματος που παρουσιάζουν τα αιθέρια έλαια, σε έρευνα του Yangilar (2016), επιχειρήθηκε η ενσωμάτωση ιχθυέλαιου σε φιλμ χιτοζάνης για την ανάδειξη της αντιμικροβιακής ιδιότητας που εν τέλει επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του τυριού Göbek Kashar. Πράγματι τα αποτελέσματα της έρευνας με το ιχθυέλαιο έδειξαν σαφή μείωση του πληθυσμού των μικροοργανισμών κατά 2 λογαριθμικών κύκλων. Συγκεκριμένα το τυρί με επικάλυψη παρουσίασε μετά από 90 μέρες 1,15 log CFU/g, ενώ ο μάρτυρας, δηλαδή το τυρί χωρίς επικάλυψη εμφάνισε πληθυσμό περίπου 4 λογαριθμικών κύκλων. Παρόλα αυτά, η χρήση αιθέρων ελαίων

μπορεί να βελτιώσει από τη μια μεριά την ασφάλεια και την ποιότητα του τυριού, ωστόσο κατά τη βιομηχανική εφαρμογή, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο οργανοληπτικός έλεγχος.

2.3.4 Ενθυλάκωση αιθέριου ελαίου σε μικρογαλάκτωμα

Είναι γεγονός πως τα κολλοειδή συστήματα όπως τα νανογαλακτώματα και τα μικρογαλακτώματα μπορούν να διασκορπίσουν αποτελεσματικά το αιθέριο έλαιο (EO) στο νερό (Xue and Zhong, 2014). Αυτό έχει ως συνέπεια τη δυνατότητα διατήρησης των τροφίμων τόσο μέσω της αντιμικροβιακής τους δράσης, όσο και στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά (Ma and Zhong, 2015). Αυτές οι ιδιότητες, αποτέλεσαν ένα ερευνητικό πεδίο στο οποίο οι ερευνητές προσδιορίζουν τη μεγιστοποίηση της ωφελιμότητας των μικρο και νανο γαλακτωμάτων μεταξύ άλλων προϊόντων και σε τυριά (Wu et al., 2014). Συνήθως στα γαλακτώματα αυτά ενσωματώνονται και αιθέρια έλαια. Παρόλα αυτά, η αστάθεια που χαρακτηρίζει τη θερμοδυναμικότητά τους, δύναται να αποσταθεροποιήσουν την ωρίμανση Ostwald και αυτό μπορεί να επιφέρει τροποποιήσεις ως προς μέγεθος και την κατανομή μεγέθους των σωματιδίων. Ένα χαρακτηριστικό αυτής της επίπτωσης είναι ο διαχωρισμός της κρέμας που προκύπτει από το διαχωρισμό των φάσεων (McClements, 2012). Επιπλέον, είναι κρίσιμο για τη σύνθεση των νανογαλακτωμάτων να υπάρχει εισροή σε υψηλή ενέργεια μέσω της ομογενοποίησης με υψηλή ταχύτητα και πίεση (Xue et al., 2015).

Μια διαφορετική προσέγγιση συμβαίνει ως προς τα μικρογαλακτώματα, τα οποία σε αντίθεση με τα νανο, χαρακτηρίζονται ως θερμοδυναμικά σταθερά όταν οι συνθήκες σύνθεσης, αλλά και του περιβάλλοντος, δύναται να σχηματιστούν με ανάμειξη νερού, ελαίου και επιφανειοδραστικών με σαφώς μικρότερη χρήση ενέργειας, που προκύπτει για την ανάδευση και τη θέρμανση (McClements, 2012). Με αυτό τον τρόπο, τα μικρογαλακτώματα προσφέρουν ωφέλειες τόσο ως προς τη διάρκεια ζωής των προϊόντων, όσο και ως προς το μειωμένο κόστος παραγωγής (McClements, 2012). Στο σημείο αυτό, είναι σημαντικό να παρατεθούν έρευνες από τη βιβλιογραφία οι οποίες στρέφουν το ερευνητικό τους ενδιαφέρον στις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Μια πολύ χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η έρευνα των Zhang et al. (2007) οι οποίοι μελέτησαν την αντιμικροβιακή δράση της μονολαουρικής γλυκερίνης σε

μικρογαλακτώματα τα οποία παρασκευάστηκαν με τη χρήση Tween 80 έναντι *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*. Η αντιμικροβιακή δράση του μικρογαλακτώματος χαρακτηρίστηκε στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 1%, αφού η μείωση του πληθυσμού προσδιορίστηκε στους 6 λογαριθμικούς κύκλους έναντι δύο βακτηρίων. Σε συνέχεια της έρευνάς τους, τα αποτελέσματα για την αντιμικροβιακή δράση του μικρογαλακτώματος, βρέθηκε πως η μονολαυρική πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτανή, εμφάνισε στατιστικά σημαντικότερη δράση σε σύγκριση με τη γλυκερίνη (Zhang et al., 2009).

Σε έρευνα των Gaysinsky et al., 2007, εντοπίστηκε πως η αντιμικροβιακή δράση της ευγενόλης φέρει στατιστικά αποτελεσματικότερα αποτελέσματα όταν αυτή βρίσκεται ενθυλακωμένη σε μικρογαλακτώμα κατά την αξιολόγηση έναντι των *Listeria monocytogenes* και *E. coli O157:H7* σε γάλα υψηλής παστερίωσης. Στην ίδια γραμμή με τις προηγούμενες έρευνες, οι Deng et al. (2015) προσδιόρισαν τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των μικρογαλακτωμάτων που αποτελούνται από θυμόλη/αιθανόλη, Tween 80, και νερό και τα εφάρμοσαν έναντι των παθογόνων *E. coli* και *S. aureus*. Οι ερευνητές όπως αξιολόγησαν, συμπαίραναν πως η αντιμικροβιακή δράση των μικρογαλακτωμάτων φέρει αντιστρόφως ανάλογη δράση, όσο αυξάνεται η περιεκτικότητα στην υδατική φάση. Συνεπώς, οι αντιμικροβιακές δράσεις του μικρογαλακτώματος διαφοροποιείται δραστικά από τη σύνθεσή τους, αλλά και τους μικροοργανισμούς που αυτά εξετάζονται.

Σε μια διαφορετική μελέτη, των Ma και Zhong (2015), παρασκευάστηκαν μικρογαλακτώματα τα οποία ήταν ενισχυμένα με αιθέρια έλαια χρησιμοποιώντας το Tween 80 ως επιφανειοδραστικό, καθώς επίσης και ίσες μάζες νερού αλλά και προπυλενογλυκόλης (PG) ως πολική φάση. Η ενσωμάτωση ελαίου σόγιας (SBO) παράτεινε σημαντικά τις συνθήκες για τη διαμόρφωση μικρογαλακτωμάτων με ευρεία γκάμα αναλογιών σε αιθέρια έλαια (Ma & Zhong, 2015). Η ενσωμάτωση του SBO στη λιπαρή φάση μπορεί επίσης να συμβάλει στη μείωση του ρυθμού απελευθέρωσης των πτητικών ουσιών όπως είναι μεταξύ άλλων και η θυμόλη, την περίοδο αποθήκευσης-συντήρησης (Zhang et al., 2015).

2.4 Μέθοδοι εφαρμογής βρώσιμων επιστρώσεων και φιλμ σε τυρί

Μία από τις σημαντικές παραμέτρους που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη προτού γίνει χρήση των φιλμ και των coatings, η μέθοδος με την οποία θα εφαρμοστεί στο τυρί.

Στις παραμέτρους αυτές, συμπεριλαμβάνονται τόσο το μέγεθος όσο και ο τύπος του τυριού. Είναι λογικό πως η λήψη μιας τέτοιας απόφασης θα καθορίσει τόσο την αποτελεσματικότητα ως προς την ωφέλεια των φιλμ, όσο και στο κόστος που τελικά θα διαμορφωθεί (Zhong et al., 2014). Επιπλέον σημαντικό είναι να ληφθεί υπόψη το στάδιο παραγωγής που θα εφαρμοστεί. Οι κυριότεροι μέθοδοι εφαρμογής μιας βρώσιμης συσκευασίας είναι μεταξύ άλλων η εμβάπτιση, ο ψεκασμός, ο ηλεκτροστατικός ψεκασμός (Resa et al., 2012).

Για τη βιομηχανία, η επιφάνεια του προϊόντος και το κόστος αποτελούν τα βασικά κριτήρια με τα οποία γίνεται η λήψη αποφάσεων (Yangilar & Oğuzhan, 2015). Θα πρέπει για παράδειγμα να ελεγχθεί αν δύναται να καλυφθεί το σύνολο της επιφάνειας του τυριού με τη μέθοδο της εμβάπτισης, ή αν είναι ευκολότερο ή και πιο οικονομικό με άλλη μέθοδο. Η περίσσεια επιφάνεια μπορεί να αφαιρείται απλώς από την αποστράγγιση ή χρησιμοποιώντας ένα μέσω που θα βοηθήσει στην κατεύθυνση της στεγανοποίησης (Mastromatteo et al., 2015).

Από την άλλη πλευρά, εάν ο στόχος είναι να επιτευχθεί πιο διακριτική και ομοιόμορφη επικάλυψη, ο ψεκασμός είναι τείνει να θεωρείται ως μια πιο αποτελεσματική μέθοδος (Zhong et al., 2014). Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας μπορεί να ενισχυθεί εάν πραγματοποιείται η μέθοδος του ηλεκτροστατικού ψεκασμού. Αυτή η μέθοδος προσαρμόζεται στη βιομηχανία τροφίμων και επιτρέπει υψηλές αποδόσεις αποφεύγοντας τη σπατάλη υλικών, το οποίο είναι το σημαντικότερο μειονέκτημα της μεθόδου εμβάπτισης (Barringer & Sumonsiri, 2015).

Το τύλιγμα αποτελεί ένα διαφορετικό τρόπο προσέγγισης της χρήσης βρώσιμων συσκευασιών για την επίτευξη της παράτασης της διάρκειας ζωής του τυριού. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται films, τα οποία όπως τυλίγουν το τυρί, καλύπτουν τη συνολική επιφάνειά του (Duan et al., 2007). Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, αναδεικνύεται η αντιμικροβιακή δράση των φιλμ, έναντι βακτηρίων και επιφανειακής μούχλας και να είναι ένα αποτελεσματικό υλικό συσκευασίας (Moreira et al., 2011; Ture et al., 2011).

2.5 Εμπορικές εφαρμογές και μελλοντικές τάσεις

Τα φιλμ αλλά και τα coatings, δεν αποτελούν απλώς ένα ερευνητικό πεδίο, όπου δοκιμάζονται συνδυασμοί υλικών, συνθηκών και προϊόντων, αλλά διατίθενται ήδη

στην παγκόσμια αγορά. Πράγματι πολλές είναι οι εταιρείες που δραστηριοποιούνται στην ανάπτυξη και διάθεση βρώσιμων υλικών συσκευασίας για τυρί. Για την παραγωγή τέτοιων υλικών, λαμβάνεται εξασφαλισμένα η καταλληλότητα και μεγιστοποίηση της ωφέλειας των επιχρισμάτων και των φιλμ στο τυρί. Χαρακτηριστικά η Improveat η οποία βρίσκεται στην Πορτογαλία, παράγει πολλές επικαλύψεις βρώσιμου χαρακτήρα, ενώ το χαρτοφυλάκιο της BecorBarbanza που εδρεύει στην Ισπανία διαθέτει πολλούς διαφορετικούς τύπους coatings και φιλμ, όπως επίσης και η γερμανική Vink GmbH & Co που έχει πολλές επικαλύψεις μεταξύ των οποίων είναι φυσικές επικαλύψεις για τυρί. Επιπρόσθετα, πολλές είναι και οι ευρεσιτεχνίες οι οποίες έχουν διατεθεί για τη χρήση της τεχνολογίας και την εμπορική αξία.

Το γεγονός πως ήδη πολλές εταιρείες από διαφορετικές χώρες προσδίδουν εμπορικό χαρακτήρα στις βρώσιμες συσκευασίες και η πρόβλεψη της διαθνούς αγοράς είναι αυξητική, σημαίνει πως το μέλλον είναι ανοιχτό και οι βρώσιμες συσκευασίες θα αναγνωριστούν πολύ περισσότερο από τους καταναλωτές (Costa et al., 2018).

Η βιομηχανική εφαρμογή βρώσιμων coatings και φιλμ στα τρόφιμα, κυρίως στα τυριά που αποτελεί και το ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής, συνεχώς καλείται να αντιμετωπίσει συγκεκριμένες προκλήσεις όπως αυτές παρουσιάζονται παρακάτω (Costa et al., 2018):

1. η επίδρασή τους στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τυριού, όπως μεταξύ άλλων είναι το χρώμα και το άρωμα, δεν αποκλείεται να είναι αποκρουστικές στην καταναλωτική προτίμηση.
2. η δυσκολία να επιτευχθεί ομοιογενής κάλυψη της επιφάνειας των τροφίμων,
3. η προσφορά μεγάλων ποσοτήτων φυσικών δραστικών ενώσεων για τη διαμόρφωση αποτελεσματικών επικαλύψεων και φιλμ,
4. η τιμή ορισμένων υλικών που χρησιμοποιούνται, μπορεί να αυξάνει το κόστος εφαρμογής αυτού του είδους της τεχνολογίας στη βιομηχανία τυριού.

Η χρήση της νανοτεχνολογίας, αποτελεί μια αδιαμφισβήτητη μέθοδος που θα βοηθήσει στην κατεύθυνση της ανάδειξης νέων λειτουργιών (Livney, 2015). Το πιο ενδιαφέρον για τα βρώσιμα επιχρίσματα και φιλμ είναι η δυνατότητά τους να ενισχύουν τη διαλυτότητα των ενώσεων, σχηματίζοντας φραγμούς έναντι ανεπιθύμητων αρωματικών ενώσεων, προστατεύοντας συνάμα τη λειτουργικότητα

των ενώσεων από τη χημική και ελεγχόμενη απελευθέρωση των δραστικών ενώσεων (O'Callaghan & Kerry, 2016).

Στην πραγματικότητα, η χρήση δομών που εμπίπτουν στη νανοκλίμακα και μάλιστα ενσωματώνουν δραστικές ενώσεις σε coatings και φιλμ, είναι ευρέως διαδεδομένη και δεν είναι λίγοι οι ερευνητές οι οποίοι στρέφουν το ενδιαφέρον τους σε αυτές τις δομές για την ανάδειξη της μέγιστης ωφελιμότητας, ύστερα από τους κατάλληλους συνδυασμούς (Fuciños et al., 2017). Πέραν του οικολογικού χαρακτήρα αλλά και της συντήρησης που υπόσχονται τα βρώσιμα υλικά, η βελτίωση της ποιότητας του τυριού αποτελεί μια ακόμη παράμετρο που ενισχύει το ενδιαφέρον των ερευνητών (Medeiros et al., 2013). Εντούτοις, η χρήση της νανοτεχνολογίας σε βρώσιμα προϊόντα θα πρέπει να αξιολογείται και να επικυρώνεται με γνώμονα τη διασφάλιση της υγείας του τελικού καταναλωτή.

Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά

3.1.1 Προετοιμασία τυριού

Το τυρί cottage που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία ήταν ένα εμπορικό δείγμα που αγοράστηκε από τοπικό κατάστημα και μεταφέρθηκε άμεσα στο ψυγείο του εργαστηρίου σε θερμοκρασία 4 °C, με καθαρό βάρος τα 170gr η κάθε συσκευασία. Συνολικά χρειάστηκαν 3 συσκευασίες από τις οποίες μοιράστηκαν 30 gr τυριού για κάθε δείγμα.

Ο παρακάτω πίνακας διασαφηνίζει τα κυριότερα χαρακτηριστικά του εμπορικού τυριού τύπου cottage cheese, που αποκτήθηκε για την μελέτη της δράσης των παραπάνω υλικών συσκευασίας :

Τυρί Cottage cheese	
Χαρακτηριστικά	Τιμές
Ολική μικροβιακή χλωρίδα PCA	7.52 log cfu/g
pH	4.9
Αλάτι	1.26 g
Υγρασία	79%
Λίπος επί ξηρού	19%

3.1.2 Μικροοργανισμοί και προετοιμασία εμβολίου

Ως μικροοργανισμοί για τον έλεγχο αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των υλικών στο τυρί χρησιμοποιήθηκαν: α) τα οξυγαλακτικά στελέχη *Streptococcus thermophilus* ST 112 και *Lactobacillus bulgaricus* ACA-DC 127 και β) οι παθογόνοι *Listeria monocytogenes* NCTC 10527, *Listeria welshimeri* LCDO 1754, *Enterococcus faecalis* EF1 και *Staphylococcus aureus* ATCC 1538. Τα στελέχη δοκιμάστηκαν ως προς τη δυνατότητα επιβίωσης και ανάπτυξης σε broth και γάλα με τη μέθοδο ελέγχου της ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμπόδισης των υλικών αλλά και τη μέθοδο παρεμποδιστικότητας με τη μέθοδο Διάχυσης σε αγαρ (Agar Diffusion Test). Τελικά παρατηρήθηκε πως οι μεγαλύτερες ζώνες αναστολής ήταν για τα στελέχη *E. faecalis* EF1 και *S. aureus* ATCC 1538.

Όλα τα εξεταζόμενα στελέχη κατά τη χρονική διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας βρίσκονταν σε συνθήκες κατάψυξης στους -80 °C σε φιαλίδια με κρυοπροστατευτικά σφαιρίδια (bits) και μάλιστα με γλυκερόλη 10% διαλύματος με σκοπό την προστασία των κυττάρων. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τα στελέχη, τοποθετούνται σε BHI broth και επωάζονται για 24h στους 30 °C μέσω της χρήσης των Ringer πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις για την εξέταση του επιθυμητού αρχικού πληθυσμού. Η μέτρηση του πλυθισμού των δύο παθογόνων που χρησιμοποιήθηκαν για το τυρί ήταν:

Μέτρηση πληθυσμού μολύσματος

Μικροοργανισμοί	Συγκέντρωση
<i>L. monocytogenes</i>	$1.6 \cdot 10^8$
<i>St. aureus</i>	$2.2 \cdot 10^8$

3.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Συσκευές και όργανα

- LaminAir Holten HV 2436
- Αναδευτήρας με θέρμανση
- Αναλυτικός ζυγός
- Κεφαλές φυγοκέντρωσης
- Κλίβανος αποστείρωσης`
- Κλίβανος επώασης 10, 30 και 37 °C
- Αναδευτήρας στροβιλισμού (Vortex)
- Μετρητής αποικιών (Colony Counter Gallenkamp)
- Πεχάμετρο (Methohm Herisau, 632 pH – Meter, Swizerland)
- Συσκευή φυγοκέντρωσης Biofuge 22R
- Υδατόλουτρο με δυνατότητα προσαρμογής σε διάφορες θερμοκρασίες
- Ψυγείο 4 °C

Σκεύη

- Eppendorf 1.5 mL
- Tips 1000μL και 200 μL

- Αυτόματες πιπέττες Brand έως 1000 μl και 200 μl
- Γκαζάκι
- Διανομέας
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Μαγνητάκια ανάδευσης
- Μπουκάλια δειγματοληψίας
- Ογκομετρικοί κύλινδροι
- Πιπέττες Pasteur 150mm
- Ποτήρια ζέσεως
- Προχοΐδα 25 ml
- Στατώ
- Γλωσσοπίεστρα
- Τριγωνάκια επιφανειακής εξάπλωσης
- Τρυβλία στρογγυλά διαμέτρου 9cm από PS

Αντιδραστήρια/ Θρεπτικά υλικά

- M.R.S. broth (pH 6.9) OXOID/CM0361
- NaCl 0.9% (ως ringer)
- Palcam Listeria Selective – Supplement
- Palcam Listeria-Selective agar (OXOID/ CM0877)
- BAIRD PARKER AGAR (CONDA/ 1100.00)
- BRAIN HEART INFUSION BROTH (BIOLIFE/ 401230)
- Απιονισμένο νερό
- Μέθοδοι
- Ρυθμιστικά διαλύματα pH 7 και 4
- Τυρί cottage Λύτρας

3.1.4 Θρεπτικά Υλικά

Brain Heart Infusion Broth – BHI προετοιμασία

Το BHI αποτελεί ένα ισοτονικό θρεπτικό μέσο, το οποίο εμπεριέχει ένα μίγμα πεπτονών γάλακτος και κρέατος, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο μια ευρεία γκάμα

από υποστρώματα. Χρησιμοποιείται μάλιστα μια χαμηλή συγκέντρωση σε γλυκόζη. Μάλιστα η χρήση αυτού του υλικού έγινε με σκοπό την ανάδειξη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των υλικών συσκευασίας.

Στοιχεία που εμπεριέχονται	Γραμμάρια/ λίτρο
BHI Mixture	17.5
Τρυπτόζη	10.0
Γλυκόζη	2.0
Χλωριούχο νάτριο	5.0
Υδροφωσφορικό δινάτριο	2.5

Προετοιμασία

Σε 1000mL απιονισμένο νερό προστέθηκαν 47g μίγματος BHI agar. Αφού διαλυθεί το μίγμα σε θερμοκρασία βρασμού, πραγματοποιείται αποστείρωση στους 121°C για 15min. Τέλος τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα τρυβλία (Petri dishes).

PALCAM AGAR BASE

Για την αρίθμηση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε το PALCAM AGAR της Oxoid, το οποίο φέρει την σύσταση όπως αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στοιχεία	gm/litre
Columbia Blood Agar Base	39.0
Yeast extract	3.0
Glucose	0.5
Aesculin	0.8
Ferric ammonium citrate	0.5
Mannitol	10.0
Phenol red	0.08
Lithium chloride	15.0
pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C	

Προετοιμασία

Μετά την προσθήκη 34.5g σε 500mL καθαρού νερού, το μίγμα διαλύεται σε θερμοκρασία βρασμού, ενώ ακολουθεί στη συνέχεια η αποστείρωσή του για 15min στους 121 °C. Όταν η θερμοκρασία του μίγματος πέσει στους 50, προστίθεται με ασυπτικές διαδικασίες ένα επιλεκτικό αντιβιοτικού SR0150, διαλυμένο σε 2mL καθαρού νερού. Μετά από μια καλή ανάδευση, το θρεπτικό υλικό τοποθετείται σε τρυβλία (Petri dishes).

BAIRD-PARKER AGAR BASE

Για την αρίθμηση του *S. aureus* χρησιμοποιήθηκε το BP agar, το οποίο μέσω του συμπληρώματος που έχει επιτρέπει επιλεκτικά την ανάπτυξη του εν λόγω παθογόνου. Η σύσταση του θρεπτικού αποτυπώνεται στον παρακάτω πίνακα:

Στοιχεία που εμπεριέχονται	Γραμμάρια/ λίτρο
Pancreatic digest of casein	10.0
Meat extract	5.0
Sodium pyruvate	10.0
Yeast extract	1.0
Glycine	12.0
Lithium chloride	5.0
Agar	20.0

Προετοιμασία

Σε 90mL καθαρού νερού προστίθενται 6.3g του άγαρ, ενώ στη συνέχεια διαλύεται σε θερμοκρασία βρασμού, πριν μεταφερθεί για αποστείρωση στους (121 °C /20min). Όταν η θερμοκρασία πέσει στους 48 °C προστίθεται 1 δίσκιο SR0122A το οποίο εφαρμόζεται αμέσως. Στη συνέχεια τοποθετείται σε τρυβλία petri dish.

Διάλυμα NaCl (0.9%)

Σε 1000mL καθαρό νερό αντιστοιχούν 9 g sodium chloride. Μετά τη διάλυσή τους σε θερμοκρασία βρασμού, τοποθετούνται σε σωληνάκια των 10mL, 9mL ανά σωληνάκι. Ακολουθεί η διαδικασία της αποστείρωσης, η οποία ακολουθείται από την

ψύξη τους πριν τη χρήση. Το ισότονο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων των δειγμάτων κατά την αρίθμηση των μικροοργανισμών με την μέθοδο της μετασποράς σε τρυβλία.

3.1.5 Υλικά συσκευασίας

Τα υλικά συσκευασίας που αποτελούν τόσο τα υλικά ενσωμάτωσης, όσο και τα υλικά επίστρωσης, παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο Τεχνολογίας Τροφίμων, του τμήματος «Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων» που υπάγεται στη Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Πανεπιστημίου Πατρών.

3.1.5.1 Υλικά ενσωμάτωσης στο τυρί

1. Εμπορικός ζεόλιθος τροποποιημένος με θυμαρέλαιο - TO@NZ

Η τροποποίηση του ζεόλιθου με το θυμαρέλαιο έγινε με μία καινοτόμα-πράσινη μέθοδο προσρόφησης με εξάτμιση σύμφωνα με την μελέτη των Giannakas et al 2017 (A novel method for the preparation of inorganic and organo-modified montmorillonite essential oil hybrids, Applied Clay Science 146 (2017) 362–370). Το τελικό ποσοστό τροποποίησης του ζεόλιθου με θυμαρέλαιο προσδιορίστηκε σταθμικά ίσο με περίπου 75% (wt). Για τις ανάγκες της εργασίας ο τροποποιημένος ζεόλιθος με θυμαρέλαιο θα ονομάζεται από δώ και κάτω ως TO@NZ (thyme oil @ nanozeolite)

2. Μικρογαλάκτωμα θυμαρέλαιου 5% v/v – microTO_5

Το μικρογαλάκτωμα λάδι σε νερό (oil in water) θυμαρέλαιου παρασκευάστηκε αναμειγνύοντας 55ml απεσταγμένο νερό, 25ml επιφανειοδραστικής ουσίας TWEEN-80, 15ml αιθανόλης ως συν-επιφανειοδραστικής ουσίας και 5ml θυμαρέλαιο υπό συνεχή ανάδευση (1000rpm)

Υλικά ενσωμάτωσης στο τυρί	Κωδική Ονομασία δειγμάτων επιμολυσμένων με παθογόνα	
	<i>St. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Τυρί χωρίς υλικό (Μάρτυρας)	St0	Lm0
Μικρογαλάκτωμα 0.5%	St1	Lm1
Μικρογαλάκτωμα 1%	St2	Lm2
z/t 0.5%	St3	Lm3
z/t 1%	St4	Lm4

3.1.5.2 Υλικά επικάλυψης/coating

Τα υλικά επικάλυψης με βάση το αλγινικό νάτριο, χρύση γλυκερόλης ως πλαστικοποιητή και προσθήκη TO@NZ ως βιοδραστικό παράγοντα (bioactive agent) παρασκευάστηκαν ως εξής:

Αρχικά σε 100ml νερό έγινε η προσθήκη 2gr αλγινικό νάτριο και 1gr γλυκερόλης υπό ανάδευση (1000rpm) και θέρμανση στους 150oC. Μετά την δημιουργία μιας ομογενούς γέλης έγινε η προσθήκη της βιοδραστικής νανοδομής (TO@NZ) σε ποσοστά 5, 10 και 15%κ.β. Τα εναιωρήματα αφέθησαν υπό ανάδευση (1500rpm) για 12 ώρες και στη συνέχεια αποχύθηκαν σε πλαστικά τρυβλία (10-11cm διάμετρο) για να στεγνώσουν και να πάρουμε λεπτά υμένια μέσου πάχους 100-120mm και διαμέτρου 10cm.

Υλικά επικάλυψης στο τυρί	Κωδική Ονομασία δειγμάτων με προσθήκη "coatings"
Φιλμ Αλγινικού χωρίς ζεόλιθο (Μάρτυρας)	AlgNa
Zeolite 0%	AlgNa_0%_Zeolite
Zeolite 5%	AlgNa_5%_Zeolite
Zeolite 10%	AlgNa_10%_Zeolite
Zeolite 15%	AlgNa_15%_Zeolite

3.2 Μέθοδοι

3.2.1 Αρίθμηση μικροοργανισμών

Η προετοιμασία των τριβλίων με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα αποτελεί το κύριο σημείο της εφαρμογής μεθόδου αρίθμησης των μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης του πειράματος. Μετά την προετοιμασία των τριβλίων ακολουθεί το στάδιο της επώασης τους, στις συνθήκες που προβλέπεται για κάθε ομάδα μικροοργανισμών. Η αρίθμηση τελικά πραγματοποιείται στον αντίστοιχο μετρητή αφού επέλθει το απαραίτητο χρονικό διάστημα της επώασης. Πιο αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν περιγράφονται ως εξής:

1. Αρχικά έγινε η απαραίτητη προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων. Για τις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες, οι οποίοι εμπεριείχαν 9ml ισοτονικού διαλύματος NaCl 0.9%. Για τις δεκαδικές αραιώσεις μεταφερόταν κάθε φορά 1ml από το αρχικό δείγμα.

2. Επόμενο στάδιο αποτέλεσε ο εμβολιασμός και ενσωμάτωση ή επιφανειακή εξάπλωση, μεταφέροντας με ασηπτικές διαδικασίες το δείγμα σε δύο τριβλία.

I. Για τους παθογόνους μικροοργανισμούς πραγματοποιήθηκε επιφανειακή επίστρωση σε Palcam agar για *Listeria monocytogenes* και *L. welshimeri* και Baird Parker για *E. faecalis* και *S. aureus*. Συγκεκριμένα 0.1 ml προστέθηκαν 0.1ml από το δείγμα, ενώ χρησιμοποιήθηκε το τριγωνάκι για την εξάπλωση. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν η μηδενική, η 10^{-1} , η 10^{-2} και η 10^{-3} .

II. Από την άλλη μεριά, για την περίπτωση των οξυγαλακτικών *L. lactis* και *S. thermophilus* χρησιμοποιήθηκε η ενσωμάτωση του δείγματος 1ml με χρήση πιπέτας στο θρεπτικό υπόστρωμα M17 και MRS αντίστοιχα. Η επώαση τους έγινε σε κλίβανο επώασης στους 37 °C για τον *S. thermophilus* και 30 °C για τον *L. lactis* για 24 ώρες.

3. Όσον αφορά την αρίθμηση αποικιών, επιλέχθηκαν τα τριβλία δύο διαδοχικών αραιώσεων που αριθμούν από 10 έως 300 αποικίες (IDF), έχοντας ως βοήθεια τον μετρητή αποικιών, ενώ για τον υπολογισμό των ζώντων εξεταζόμενων βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω εξίσωση: $cfu/ml = \Sigma C / (n_1 + 0.1n_2)d$, στην οποία το ΣC δηλώνει το άθροισμα των αποικιών από τα τριβλία, n_1 ο αριθμός των τριβλίων των πρώτων αραιώσεων και n_2 ο αριθμός των τριβλίων από τις δεύτερες αραιώσεις, ενώ τέλος το d εκφράζει τη δεκαδική αραιώση από την πρώτη επιλεγείσα αραιώση. Η δύναμη του 10 εκφράζει τα αποτελέσματα που εξάγονται.

3.2.2 Προσδιορισμός pH

Ο προσδιορισμός του pH είναι πολύ σημαντικός κατά την πειραματική διαδικασία. Η μέτρηση γίνεται μέσω του πεχάμετρου με ηλεκτρόδιο, το οποίο μετρά τον πληθυσμό των ατόμων υδρογόνου. Αρχικά τοποθετούμε στο ηλεκτρόδιο τα απαραίτητα ρυθμιστικά διαλύματα pH 4 και 7, ώστε να γίνει η απαραίτητη βαθμονόμηση

(calibration). Στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα με το τυρί και ύστερα από λίγο χρονικό διάστημα εμφανίζεται το τελικό αποτέλεσμα.

3.2.3 Έλεγχος παρεμποδιστικότητας με τη μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ (Agar Diffusion Test)

Προτού ελεγχθεί η αντιμικροβιακή ιδιότητα των εξεταζόμενων υλικών στο τυρί. Κρίθηκε απαραίτητο, να πραγματοποιηθεί η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ προκειμένου να παρατηρηθεί αν υπάρχει εξ αρχής αντιμικροβιακή ιδιότητα και σε ποια ποσότητα. Για τον ποιοτικό προσδιορισμό της δράσης του θυμαρέλαιου ενθυλακωμένου στο μικρογαλάκτωμα και το ζεόλιθο, ακολούθησε η εξής διαδικασία:

- Αρχικά προστέθηκε τριβλίο με 0.1 ml κάθε εξεταζόμενου στελέχους πρόσφατης ανανέωσης. Μάλιστα η αραιώση από όπου πάρθηκε το στέλεχος ήταν σε 10^{-1} σε ισοτονικό διάλυμα NaCl, έτσι ώστε ο τελικός πληθυσμός των μικροοργανισμών στο άγαρ να είναι σε επίπεδο 10^6 cfu/ml.
- Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη BHI agar και έγινε ανάδευση για καλή ομοιογενή διασπορά των μικροοργανισμών στο τρυβλίο.
- Μετά τη στερεοποίηση του BHI agar το τρυβλίο τοποθετήθηκε αναστραμμένο σε κλίβανο επώασης στους 42 °C για 30min για μερική αφυδάτωση και στη συνέχεια ανοίχτηκαν οπές 6mm, όπου προστέθηκαν 50μl από τα υλικά προς διερεύνηση.
- Το τριβλίο στη συνέχεια παρέμεινε στους 4 °C για περίπου 1-2 h, έως ότου απορροφηθούν στο άγαρ οι ελεγχόμενες ενώσεις.
- Κατόπιν τούτου, επώαστηκε στον κλίβανο στους 37 °C για 24h.
- Τέλος, μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών παρεμπόδισης ανάπτυξης του κάθε στελέχους ανά τριβλίο καθώς επίσης και η διάνυγιά τους.

Τα υλικά που προστέθηκαν στις οπές είναι: 1) ζεόλιθος 1%, 2) ζεόλιθος 0.5%, 3) ζεόλιθος 0.25%, 4) ζεόλιθος με θυμαρέλαιο 1%, 4) Ζεόλιθος με θυμαρέλαιο 0.5% 5) ζεόλιθος με θυμαρέλαιο 0.25% 6) μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 5%, 7) μάρτυρας.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mm και παρουσιάζεται ακόμα η διάλυση των ζωνών.

3.2.4 Έλεγχος ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμπόδισης (MIC) του ζεόλιθου με θυμαρέλαιο

Σε συνέχεια των προκαταρκτικών-διαγνωστικών τεστ περί αντιμικροβιακότητας των υλικών, σκοπός πλέον ήταν η ανίχνευση – προσδιορισμός της ελάχιστης ποσότητας – αναλογίας υλικών που απαιτείται προκειμένου να δρα ανασταλτικά.

3.2.4.1 Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμποδιστικότητας σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Στη συνέχεια, προκειμένου να ελεγχθεί η ελάχιστη δυνατή ποσότητα (αναλογία) των υλικών ενσωμάτωσης, εφαρμόστηκε η μέθοδος MIC σε σωληνάκια με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (Thielmann et al., 2019) στα οποία είχαν προστεθεί τα υλικά σε διάφορες συγκεντώσεις, όπως φαίνονται στον Πίνακα 3. Ακολούθως, για κάθε έλεγχο μικροοργανισμών έγινε εμβολιασμός του στα αντίστοιχα BHI broth με συγκεντρώσεις των ενώσεων αντίστοιχης ποσότητας εμβολίου πρόσφατης ανανέωσης, έτσι ώστε ο τελικός πληθυσμός να είναι σε τάξη μεγέθους 10^6 cfu/ml υγρού υποστρώματος. Μετά από την επώαση ακολούθησε η καλλιέργεια σε τριβλία, ως τρόπος ελέγχου της ανασταλτικής δυνατότητας έναντι των μικροοργανισμών.

Πίνακας 4 Συγκεντρώσεις ζεόλιθου με θυμαρέλαιο που δοκιμάστηκαν για τον προσδιορισμό της ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμποδιστικότητας σε broth (MIC), έναντι των εξεταζόμενων μικροοργανισμών.

Αρχικός πληθυσμός 10^6 cfu/ml	Μικροοργανισμοί	Συγκεντρώσεις ζεόλιθου με θυμαρέλαιο που δοκιμάστηκαν				
		0.01%	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%
	<i>S. therm</i>	0.01%	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%
	<i>L. lactis</i>	0.01%	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%
	<i>St. aureus</i>	0.01%	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%
	<i>L monocytogenes</i>	0.01%	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%
	<i>E. faecalis</i>	0.01%	0.025%	0.05%	0.075%	0.1%

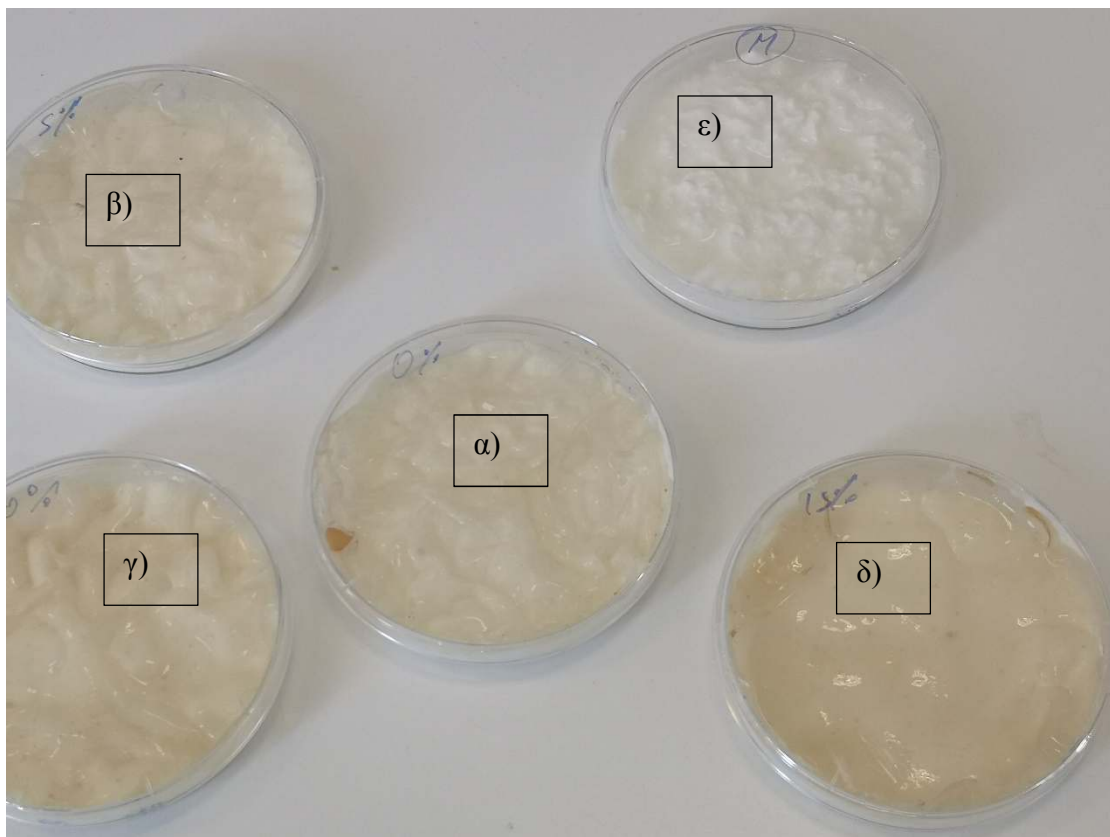
3.2.4.2 Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμποδιστικότητας στο γάλα

Ομοίως με την προηγούμενη διαδικασία στο broth, αυτή τη φορά η ανίχνευση ελάχιστης παρεμποδιστικής συγκέντρωσης ζεόλιθου με θυμαρέλαιο χρησιμοποιήθηκε στο γάλα, αφού είναι και το κύριο συστατικό του τυριού, προκειμένου να παρατηρηθεί αν υπάρχει μεταβολή ως προς την ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιοι μικροοργανισμοί και οι ίδιες συγκεντρώσεις ζεόλιθου με θυμαρέλαιο. Μάλιστα ως προς τους οξυγαλακτικούς μικροοργανισμούς *L. lactis* και *S. thermophilus* ως κρίσιμο όριο ήταν η χαμηλότερη συγκέντρωση που δε θα επέτρεπε την πήξη στο γάλα. Για τους υπόλοιπους παθογόνους μικροοργανισμούς πραγματοποιήθηκε έλεγχος μέσω καλλιέργειας σε τρυβλία.

3.2.5 Έλεγχος παρεμποδιστικής δράσης των φιλμ στο τυρί

Για τα φιλμ, το τυρί τοποθετήθηκε με ασηπτικές διαδικασίες σε τριβλία με ισόποσο βάρος τα 30gr. Το σύνολο των δειγμάτων (τρυβλίων) που εξετάστηκαν ήταν 5. Σε κάθε τριβλίο που περιείχε το τυρί εμβολιάστηκε με 1% *S aureus* σε συγκέντρωση 10^4 . Στη συνέχεια αναδεύτηκε για αρκετή ώρα με μια ράβδο (αποστειρωμένη) και έπειτα ακολούθησε η επικάλυψη του τυριού με τα φιλμ. Το δείγμα ελέγχου – μάρτυρας δεν έφερε κανένα υλικό συσκευασίας, παρά μόνο το στέλεχος με το οποίο εμβολιάστηκε (1%), προκειμένου να ελεγχθεί και να συγκριθεί η ανάπτυξη του παθογόνου έναντι των υπολοίπων δειγμάτων με αλγινικό νάτριο και τις αναλογίες σε ζεόλιθο που αυτό εμπεριέχει. Οι αναλογίες σε περιεκτικότητα ζεόλιθου βρίσκεται σε 0%, 5%, 10% και 15%. Τα επιστρωμένα τρυβλία με τα δείγματα βρισκόντουσαν υπό συνθήκες επώασης στις θερμοκρασίες των 10 και 28 °C όπου και εξετάστηκαν. Για τη δειγματοληψία, χρησιμοποιήθηκαν γλωσσοπίεστρα αποστειρωμένα, τα οποία βοήθησαν στη συλλογή 1gr δείγματος ασηπτικά, ενώ στη συνέχεια τοποθετούταν σε αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες, στους οποίους προστίθετο το αραιωτικό διάλυμα 9mL ginger και μετά από ανάδευση, σε αναδευτήρα στροβιλισμού για να ακολουθήσουν οι διαδοχικές αραιώσεις και καλλιέργειες για την καταμέτρηση αποικιών των εξεταζόμενων παθογόνων. Η επιλογή της εξέτασης των υλικών σε θερμοκρασία 10 °C είναι για τον έλεγχο της επίδρασης (ανασταλτικά) έναντι των παθογόνων, είτε σε συνθήκες «κακής» συντήρησης, όπως μπορεί να συμβαίνει στις οικίες των καταναλωτών, αλλά ταυτόχρονα όταν οι συνθήκες logistics (αποθήκευση

ως και διανομή) δεν είναι οι κατάλληλες, και κατά μέσο όρο οι θερμοκρασία αυξάνει σε τέτοιο βαθμό που να επιτρέπει την ανάπτυξη των *L. monocytogenes* και την παραγωγή τοξίνης από τον *S. aureus*. Από την άλλη η θερμοκρασία των 28 °C, είναι μια ακραία συνθήκη, όπου συναντάται ακόμη και το καλοκαίρι από τους καταναλωτές, όταν το διάστημα που εκτίθενται στις έντονα υψηλές θερμοκρασίας μέχρι την τοποθέτηση στο ψυγείο είναι μεγάλο. Συνολικά εξετάζεται αν επηρεάζεται (υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά) μεταξύ των θερμοκρασιών αλλά και των υλικών. Η εξεταζόμενη διάρκεια των αντιμικροβιακών αντιδράσεων διήρκτησε 5 μέρες.



Εικόνα 1. Τρυβλία με μόλυσμα *S. aureus* 10^4 , και επικάλυψη με AlgNa φιλμ σε αναλογίες ζεόλιθου α) 0% ζεόλιθο, β) 5% ζεόλιθο, γ) 10% ζεόλιθο, δ) 15% ζεόλιθο και ε) ο Μάρτυρας χωρίς φιλμ.

3.2.6 Έλεγχος παρεμποδιστικής δράσης των υλικών ενσωμάτωσης στο τυρί

Όσον αφορά τα υλικά ενσωμάτωσης, αποτελεί μια καινοτομία της παρούσας πτυχιακής, που αντί για να γίνει μια κρούστα (coating) στο αλοιφώδες τυρί, ενσωματώθηκαν με ανάδευση μέσα στο προϊόν. Συγκεκριμένα, τοποθετήθηκαν από

30gr τυριού cottage σε 10 αποστειρωμένους ουροσυλλέκτες των 100mL. Στα πρώτα 5 προστέθηκε μόλυσμα *L. monocytogenes* 1% και στα υπόλοιπα 5 τοποθετήθηκε μόλυσμα από *S. aureus*. Συγκεκριμένα ένα δείγμα από κάθε εξεταζόμενο μικροοργανισμό ήταν ο μάρτυρας, ο οποίος περιείχε μόνο το εμβόλιο σε αναλογία 1%. Στα υπόλοιπα δείγματα υπήρχαν τα εξής υλικά: 1) μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 1%, 2) μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 0.5%, 3) Ζεόλιθος με θυμαρέλαιο 1%, 4) Ζεόλιθος με θυμαρέλαιο 0.5%. Αφού έγινε καλή ανάδευση με τη βοήθεια μιας ράβδου (αποστειρωμένης) έτσι ώστε να υπάρχει ομογενοποίηση των δειγμάτων αποθηκεύτηκαν στους 8 βαθμούς, μια θερμοκρασία που συναντάται στα ψυγεία των καταναλωτών, και επιτρέπει την ανάπτυξη των παθογόνων. Για τη δειγματοληψία, 1gr τυρί λαμβανόταν επί 15 ημέρες για την εποπτεία (παρακολούθηση) της εξέλιξης της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών σε όλα τα δείγματα. Το δείγμα ενός γραμμαρίου τοποθετείτο σε ισοτονικό διάλυμα NaCl 0.9%, 9ml και πραγματοποιούταν καλή ανάδευση με τη χρήση αναδευτήρα στροβιλισμού (vortex) μέχρι να ομογενοποιηθεί. Στη συνέχεια μέσα από διαδοχικές αραιώσεις έως 10^{-3} μεταφέρονταν στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για επώαση και μετρούνταν οι αποικίες των τρυβλίων. Η εξεταζόμενη χρονική διάρκεια ήταν 10 μέρες.

3.2.7 Στατιστικός έλεγχος

Για το στατιστικό έλεγχο των αποτελεσμάτων από τις διαδοχικές μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει σημαντική (στατιστικά) διαφορά μεταξύ του τυριού cottage χωρίς υλικά (μάρτυρες) και των δειγμάτων με υλικά (επίστρωσης και ενσωμάτωσης) πραγματοποιήθηκε έλεγχος ANOVA συμπεριλαμβανομένου και του Tukey HSD. Η διαδικασία Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) διευκολύνει τις συγκρίσεις κατά ζεύγη στα δεδομένα ANOVA. Το στατιστικό F καθορίζει εάν υπάρχει συνολική διαφορά μεταξύ των μέσων του δείγματος. Ο έλεγχος HSD του Tukey επιτρέπει τον προσδιορισμό σημαντικής διαφοράς (αν υπάρχει) στις συγκρίσεις κατά ζεύγη. Ο έλεγχος σημαντικότητας πραγματοποιήθηκε σε επίπεδα 10, 5 και 1%. Ως μηδενική υπόθεση (H_0) θεωρείται ότι ο μάρτυρας δε διαφέρει από τα υπόλοιπα δείγματα με τα υλικά. Από την άλλη ως (H_1) είναι η υπόθεση πως διαφέρουν τα δείγματα σημαντικά.

Κεφάλαιο 4 Αποτελέσματα

4.1 Έλεγχος παρεμποδιστικότητας των υλικών ενσωμάτωσης με τη μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ (Agar Diffusion Test)

Προτού ελεγχθεί η αντιμικροβιακή ιδιότητα των εξεταζόμενων υλικών στο τυρί, κρίθηκε απαραίτητο, να πραγματοποιηθεί η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ προκειμένου να παρατηρηθεί αν υπάρχει εξ αρχής αντιμικροβιακή ιδιότητα και σε ποια ποσότητα. Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης του θυμαρέλαιου ενθυλακωμένου στο μικρογαλάκτωμα και το ζεόλιθο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (Agar Diffusion Test)

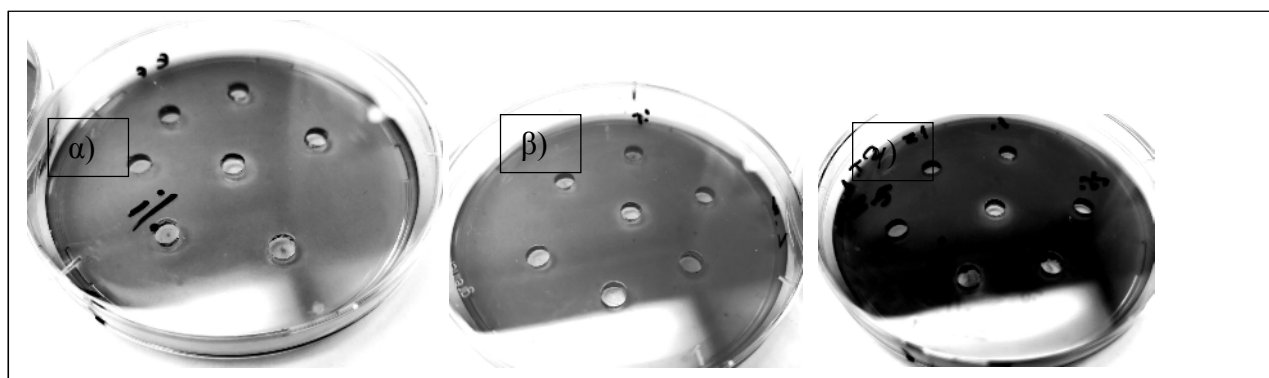
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τον έλεγχο παρεμποδιστικότητας με τη μέθοδο διάχυσης είναι ποικίλα. Στα θετικά, τόσο το μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο, όσο και ο ζεόλιθος με θυμαρέλαιο σχηματίζουν ζώνες μεγάλες και διαυγείς και στους τρεις εξεταζόμενους μικροοργανισμούς α) *E. faecalis*, β) *L. monocytogenes*, γ) *S. aureus*. Συγκεκριμένα οι ζώνες (mm) που σχηματίζονται για τους τρεις αυτών οργανισμούς αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 5. Διαμετρος ζωνών (mm) μέσω του Agar Diffusion Test, του ζεόλιθου με θυμαρέλαιο και του Μικρογαλακτώματος με θυμαρέλαιο έναντι των εξεταζόμενων παθογόνων α) *E. faecalis*, β) *L. monocytogenes*, γ) *S. aureus*.

Agar Diffusion Test – Διάμετρος ζωνής ανάσχεσης (mm)		
Μικροοργανισμοί	Ζεόλιθος με θυμαρέλαιο 1%	Μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο
<i>E. faecalis</i>	8 mm	9.5 mm
<i>L. monocytogenes</i>	6.8 mm	7 (μερική) mm
<i>S. aureus</i>	7.9 mm	8 mm

Από την άλλη μεριά, τόσο ο ζεόλιθος χωρίς θυμαράλαιο, όσο και οι μικρότερες συγκεντρώσεις <1% για τον ζεόλιθο με θυμαρέλαιο δεν επιφέρουν θετικά αποτελέσματα, δηλαδή δε σχηματίζουν τις απαραίτητες ζώνες προκειμένου να αναδειχθεί η αντιμικροβιακή τους ιδιότητα.

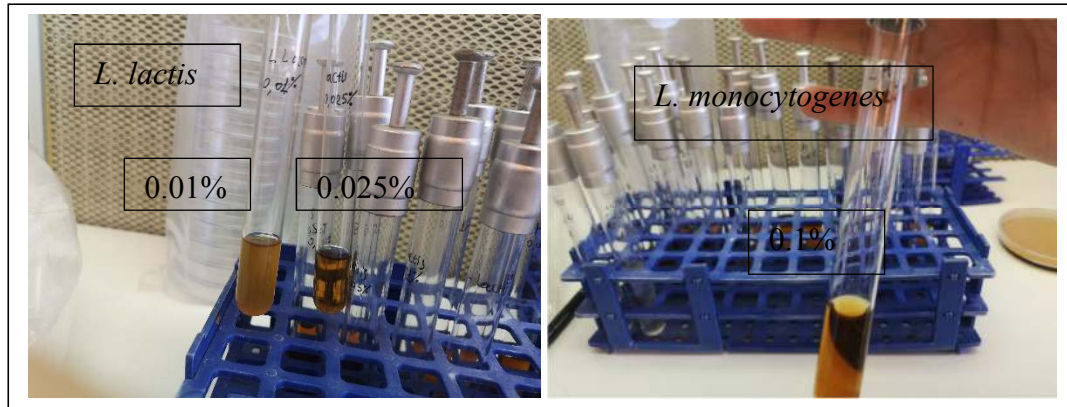
Στην Εικόνα 2 μάλιστα αποτυπώνεται εμφανώς η διαφανής ζώνη ανασχεσης στο κέντρο όπου βρίσκεται το μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο.



Εικόνα 2. Ζώνες αναστολής της ανάπτυξης των α) *E. faecalis*, β) *L. monocytogenes*, γ) *S. aureus* από μικρογαλάκτωμα θυμαρελαίου με συγκέντρωσεις 0.25-1%

4.2 Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμποδιστικότητας (MIC) σε broth

Στη συνέχεια το μικρογαλάκτωμα Ζεόλιθου-θυμαρέλαιου μελετήθηκε ως προς την παρεμποδιστική ικανότητα του έναντι διαφόρων μ.ο. προσδιορίζοντας την MIC έναντι αυτών σε υγρό θρεπτικά υποστρώματα. Τα δείγματα μετρήθηκαν σε BHI Broth και τα αποτελέσματα που προκύπτουν δείχνουν πως μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών σε ποσοστό 0.1% και 0.05% για τον *S. aureus* με το μίγμα ζεόλιθου ενώ για τους *L. lactis* και *S. thermophilus* το ποσοστό κινείται ακόμα χαμηλότερα, σε 0.025%. Στην Εικόνα 3, **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.** διακρίνεται στα αριστερά η παρεμποδιστική δράση του ζεόλιθου, αφού σε συγκέντρωση 0.01% το σωληνάκι με το broth έχει θολώσει και είναι ένδειξη της πληθυσμιακής ανάπτυξης του μικροοργανισμού, ενώ σε 0.025 είναι διαυγές χωρίς ανάπτυξη. Η ίδια εικόνα παρατηρείται και για τη *Listeria monocytogenes* (δεξιά), όπου σε ποσοστό 0.1% είναι διαυγές.



Εικόνα 3. Προσδιορισμός MIC του μικρογαλακτώματος σε BHI Broth έναντι στελεχών *L. lactis* και *L. monocytogenes*

Ο **Πίνακας 6** δείχνει τις ελάχιστες τιμές παρεμποδιστικής δράσης των μικροοργανισμών LAB και τριών παθογόνων. Ο αρχικός πληθυσμός των στελεχών ήταν 10^6 , ενώ το μόλυσμα 0.1ml ή 100μ.L.

Το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που προκύπτει είναι οι χαμηλές τιμές LAB που μπορεί να παρεμποδίζει και αυτό μπορεί να έχει ιδιαίτερη σημασία για το ρόλο που διαδραματίζουν, τόσο στη συντήρηση της ζωής του γάλακτος, καθώς είναι εύλογο να σκεφτούμε πως θα παρεμποδίζεται η πηκτική τους δράση.

Πίνακας 6. Προσδιορισμός της Ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμποδιστικότητας (MIC) του υλικού Ζεόλιθου-θυμαρέλαιου στο broth

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) του Ζεόλιθου με θυμαρέλαιο	
Μικροοργανισμοί (10^6 cfu/ml)	MIC
<i>L. lactis</i>	0.025%
<i>S. therm</i>	0.025%
<i>St. aureus</i>	0.05%
<i>L. monocytogenes</i>	0.1%
<i>E. faecalis</i>	0.1%

Ακολούθησε ο έλεγχος της MIC στο γάλα έναντι των διαφόρων οξυγαλακτικών και παθογόνων μ.ο δεδομένου της χρήσης του ως πρώτης ύλης στην παραγωγή

γαλακτοκομικών προϊόντων και της πιθανής επίδρασης των συστατικών του (πρωτεΐνες, λίπος κ.α) στην παρεμποδιστική ικανότητα του γαλακτώματος που μελετάμε.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την MIC στο γάλα σε σχέση με τα οξυγαλακτικά στελέχη που μελετήθηκαν , έρχονται σε συμφωνία με εκείνα της έρευνας των Moritz et al. (2012) που βρήκαν ανάλογες τιμές εξετάζοντας τα αιθέρια έλαια κανέλας, γαρύφαλου και μέντας σε ποσοστά 0.025%, 0.2 και 0.4 αντίστοιχα για το στέλεχος *Lactobacillus rhamnosus*. Συγκεκριμένα βρέθηκε πως ο ζεόλιθος με το θυμαρέλαιο εμφανίζει MIC σε 0.025% για τα στελέχη *L. lactis* και *S. thermophilus*. Για την περίπτωση των παθογόνων *S. aureus* και *E. faecalis* το ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης είναι η 0.25%.

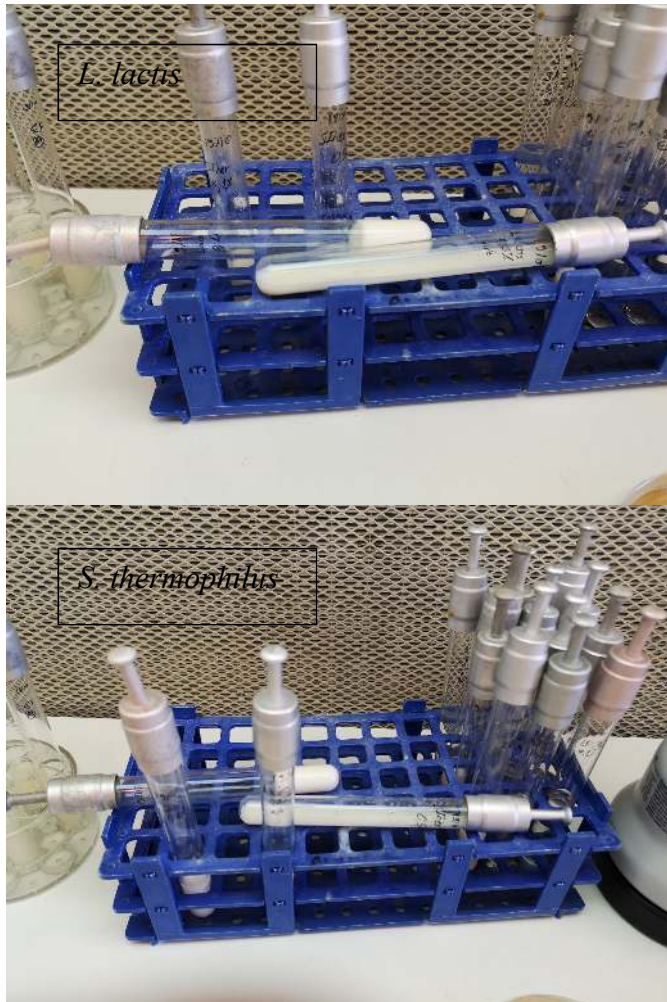
Πίνακας 7. Προσδιορισμός της Ελάχιστης συγκέντρωσης παρεμποδιστικότητας (MIC) του υλικού Ζεόλιθου-θυμαρέλαιου στο γάλα

ΓΑΛΑ ΤΕΣΤ MIC	
Μικροοργανισμοί (10 ⁶ cfu/ml)	Ελάχιστη συγκέντρωση ζεόλιθου με θυμαρέλαιο
<i>L. lactis</i>	0.25%
<i>S. thermophilus</i>	0.25%
<i>S. aureus</i>	0.5%
<i>E. faecalis</i>	0.5%

Στην Εικόνα **Σφάλμα!** Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε. 4, φαίνεται η πήξη του γάλακτος μετά από την επώαση των *lactis* (πάνω) και *thermophilus* (κάτω) στους 30 και 37 °C αντίστοιχα. Αυτό συμβαίνει γιατί το 0.1% του ζεόλιθου με το θυμαρέλαιο, επιτρέπει την πλήρη ανάπτυξη του, σε αντίθεση με τη συγκέντρωση 0.5%, όπου το δείγμα παραμένει σε ρευστή μορφή, γεγονός που επιβεβαιώνει την ανασταλτική του δράση έναντι των LAB.

Ομοίως και οι Cetin et al., (2013) τα *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* ήταν τα πιο ευαίσθητα στελέχη στα αιθέρια έλαια. Συμπεραίνεται ότι το υψηλό επίπεδο θυμαρέλαιου μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη μικροχλωρίδα και

ιδιαίτερα την ποιότητα των τροφών που έχουν υποστεί ζύμωση. **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**



Εικόνα 4. Ελάχιστη συγκέντρωση παρεμποδιστικότητας ζεόλιθου με θυμαρέλαιο, έναντι LAB στο γάλα

4.4 Μελέτη της παρεμποδιστικής ικανότητας των Υλικών Ενσωμάτωσης στο τυρί

Η καινοτομία της εργασίας βασίζεται στην άμεση ενσωμάτωση του ζεόλιθου ενισχυμένου με θυμαρέλαιο σε ποσοστό 50% μικρογαλακτώματος με 5% θυμαρέλαιο. Έτσι λοιπόν δοκιμάστηκαν υλικά βρώσιμου χαρακτήρα στο τυρί τύπου cottage σε θερμοκρασία αποθήκευσης τους 8 °C για 15 μέρες.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν δείχνουν μια ικανοποιητική δράση έναντι των Gram+ παθογόνων *St. aureus* και *Listeria monocytogenes*.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ανασταλτικότητα των υλικών έναντι του *S. aureus*, προκύπτει από την ανάλυση ANOVA πως πράγματι υπάρχουν τουλάχιστον 1 δείγμα που διαφέρει στατιστικά σημαντικά, αφού η p-value <0.05. Εφαρμόζοντας το Tukey HSD τεστ τα critical values Q για $\alpha= 0.01$ και 0.05 είναι 5.2937 και 4.2322 αντίστοιχα. Έτσι λοιπόν συγκρίνοντας τα δείγματα κατά ζεύγη, προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του τυριού χωρίς υλικά (μάρτυρας) και των δειγμάτων με:

- 1) Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 1% (Δείγμα T3) και
- 2) Τυρί με ζεόλιθο με θυμαρέλαιο 1% (Δείγμα T4).

Και στα δύο υλικά παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο 1%, με $Q= 4.35$ ($p=0.04192$) για το δείγμα T3 και $Q= 5.80$ ($p=0.00446$) για το T4. Η συνολική διαφορά των T3 και T4 έναντι του μάρτυρα είναι 1 λογαριθμικός κύκλος την 5η μέρα.

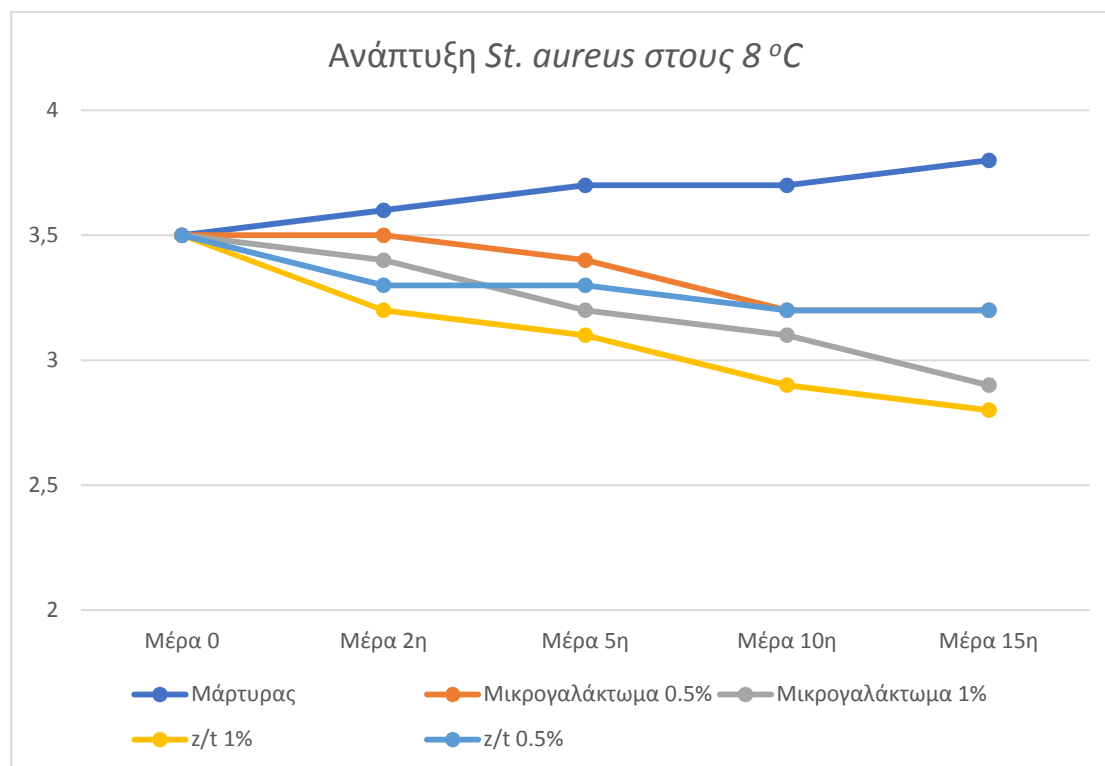
Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η λογαριθμική μεταβολή του *S. aureus* στο τυρί με τα υλικά ενσωμάτωσης σε διάστημα 15 ημερών. Η Μέρα 0 είναι η στιγμή που εμβολιάστηκε με *S.aureus*, όπου τα αποτελέσματα έδειξαν συγκέντρωση της τάξεως 10^3 .

Πίνακας 8. Αποτελέσματα ανάπτυξης *S. aureus* σε τυρί cottage με υλικά ενσωμάτωσης και αποθήκευση τους 8 βαθμούς

Μετρήσεις πληθυσμού (log cfu/ml) με υλικά ενσωμάτωσης σε τυρί στους 8°C					
Υλικά	Μέρα 0	Μέρα 2η	Μέρα 5η	Μέρα 10η	Μέρα 15η
Τυρί με μόλυσμα (<i>S. aureus</i>) χωρίς υλικά (S1)	3.5	3.6	3.7	3.7	3.8
Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 0.5% (S2)	3.5	3.5	3.4	3.2	3.2
Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 1% (S3)	3.5	3.4	3.2	3.1	2.9
Τυρί με ζεόλιθο με θυμαρέλαιο 1% (S4)	3.5	3.2	3.1	2.9	2.8
Τυρί με ζεόλιθο με θυμαρέλαιο 0.5% (S5)	3.5	3.3	3.3	3.2	3.2

Η γραφική απεικόνιση της ανάπτυξης *S. aureus*, διευκολύνει στη σύγκριση. Παρατηρείται μια συνεχής αύξηση του τυριού – μάρτυρα που αυξάνει σε διάστημα 15 ημερών κατά 1 λογαριθμικό κύκλο, ενώ αντίθετα το θυμαρέλαιο που βρίσκεται ενθυλακωμένο τόσο στο ζεόλιθο όσο και στο μικρογαλάκτωμα, μειώνουν τον πληθυσμό του παθογόνου. Σημαντικότερο αποτέλεσμα βρίσκεται στην απόδοση του

θυμαρέλαιου στο ζεόλιθο (z/t) σε συγκέντρωση 1%, ενώ ακολουθεί το μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο στην ίδια συγκέντρωση. Η χαμηλότερη συγκέντρωση σε z/t 0.5%, παρότι εμφανίζει μεγαλύτερη ανασταλτικότητα έναντι του *S. aureus* την 2η μέρα, στη συνέχεια παρουσιάζει κάποιες διακυμάνσεις, ενώ τερματίζει μαζί με τη 0.5% συγκέντρωση σε μικρογαλάκτωμα.



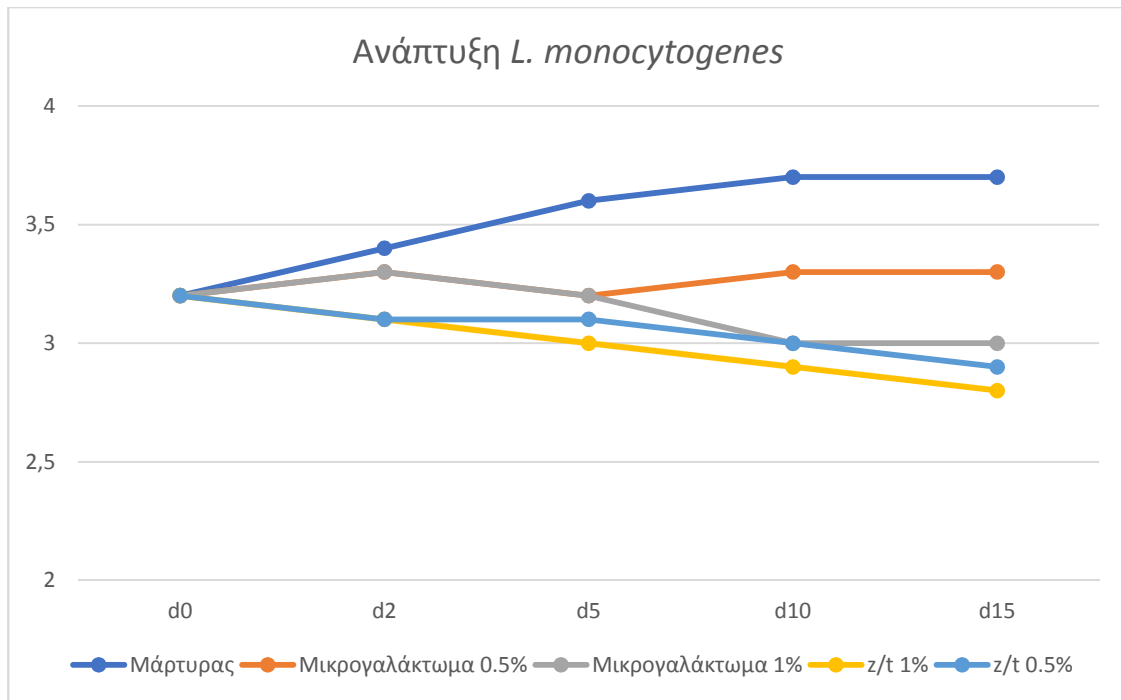
Διάγραμμα 1. Επιβιωσιμότητα του *S. aureus* σε τυρί με υλικά ενσωμάτωσης κατά την συντήρηση στους 8°C για χρονικό διάστημα 15 ημερών

Προχωρώντας την ανάλυση στην ανασταλτικότητα των υλικών έναντι της *L. monocytogenes*, βρίσκεται μέσω της ANOVA πως από τα αποτελέσματα του Πίνακα 8, προκύπτουν τουλάχιστον 1 στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα με F-ratio value 9.9717. Η p-value είναι 0.000132 και συνεπώς το αποτέλεσμα είναι σημαντικό σε επίπεδο 1%. Μέσω του Tukey HSD βρίσκεται ότι οι διαφορές μεταξύ του μάρτυρα-L1 και των δειγμάτων τυρί με Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 1% (L3) Τυρί με ζεόλιθο με μικρογαλάκτωμα 1% και (L4) Τυρί με ζεόλιθο με μικρογαλάκτωμα 0.5% (L5) είναι στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο 1%.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα ανάπτυξης *L. monocytogenes* σε τυρί cottage με υλικά ενσωμάτωσης και αποθήκευση τους 8 βαθμούς

Μετρήσεις (log) με υλικά ενσωμάτωσης 8°C					
Υλικά	Μέρα 0	Μέρα 2η	Μέρα 5η	Μέρα 10η	Μέρα 15η
Τυρί με μόλυσμα (<i>L. monocytogenes</i>) χωρίς υλικά (L1)	3.2	3.4	3.6	3.7	3.7
Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 0.5% (L2)	3.2	3.3	3.2	3.3	3.3
Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 1% (L3)	3.2	3.3	3.2	3	3
Τυρί με ζεόλιθο με μικρογαλάκτωμα 1% (L4)	3.2	3.1	3	2.9	2.8
Τυρί με ζεόλιθο με μικρογαλάκτωμα 0.5% (L5)	3.2	3.1	3.1	3	2.9

Αναπαριστώντας και γραφικά την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, στο **Διάγραμμα 2**, φαίνεται πως ο Μάρτυρας αναπτύσσεται ταχέως, ενώ ο ζεόλιθος με θυμαρέλαιο σε συγκέντρωση 1% καταγράφει τη βέλτιστη απόδοση με διαφορά 1 λογαριθμικού κύκλου σε διάστημα 15 ημερών. Αρκετά κοντά βέβαια είναι τα αποτελέσματα του μικρογαλακτώματος με θυμαρέλαιο στο 1% αλλά και του z/t με 0.5%. Αντίθετα, ενώ μικρογαλάκτωμα σε συγκέντρωση 0.5% ύστερα από μια παρόμοια πορεία ως τις 5 μέρες, στη συνέχεια υπάρχει μια αύξηση ως τις 15 ημέρες.



Διάγραμμα 2. Επιβιωσιμότητα της *L. monocytogenes* σε τυρί με υλικά ενσωμάτωσης κατά την συντήρηση στους 8 οC για χρονικό διάστημα 15 ημερών

4.5 Μελέτη της παρεμποδιστικής ικανότητας των Υλικών επίστρωσης/ film στο τυρί

Εκκινώντας τις μετρήσεις για τα υλικά επίστρωσης, η κεντρική ιδέα ήταν να εξεταστεί η δυνατότητα των φιλμ, να προστατεύουν το cottage cheese από την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών σε δύο περιπτώσεις. Στη μια περίπτωση έντονα κακής θερμοκρασιακής μεταχείρισης του τροφίμου, όταν η θερμοκρασία είναι 28 βαθμούς κελσίου, που αντιστοιχεί σε μια περίπτωση μεταφοράς του τροφίμου όπως μεταξύ άλλων και το αυτοκίνητο, ενώ η δεύτερη περίπτωση αφορά την έκθεση του τροφίμου υπό ελλιπή ψύξη δηλαδή πάνω από τους 4 βαθμούς και συγκεκριμένα στους 10 °C. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν δίνουν μια σαφή υπεροχή των φιλμ έναντι των δειγμάτων ελέγχου – μαρτύρων. Συγκεκριμένα με μόλυσμα $2.9 \cdot 10^3$, για τους 28 °C ο μάρτυρας αυξήθηκε στο 3.9, έναν λογαριθμικό κύκλο μετά από 12 ώρες. Η επικάλυψη του τυριού με φιλμ αλγινικού Na με προσθήκη 5% ζεόλιθου στο φιλμ του αλγινικού εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι του *S. aureus* μειώνοντας στους 2 λογαριθμικούς κύκλους, ενώ τόσο η συγκέντρωση 10 και 15% σε ζεόλιθο, δεν επέτρεψε την ανίχνευση του παθογόνου.

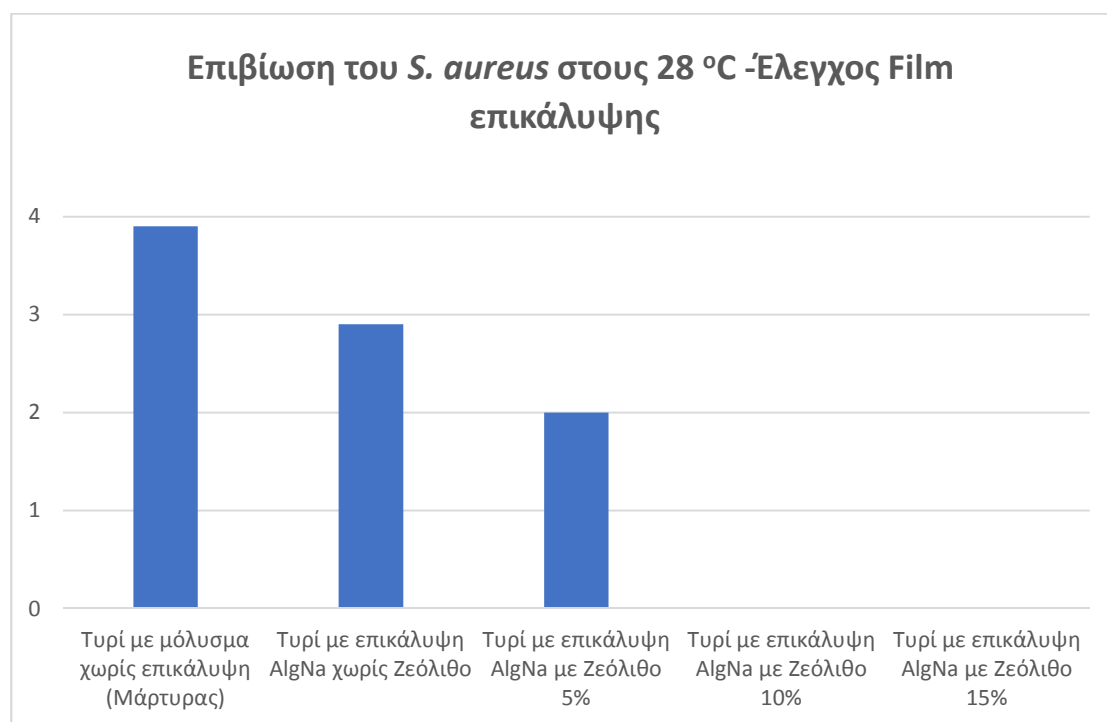
Πίνακας 10. Φίλμ AlgNa ενισχυμένα με ζεόλιθο στους 28 °C

Coating AlgNa ενισχυμένο με Ζεόλιθο 28° C μετά απο 12 ώρες

Υλικά	Αποτέλεσμα log
Τυρί με μόλυσμα χωρίς επικάλυψη (Μάρτυρας)	3.9
Τυρί με επικάλυψη AlgNa χωρίς Ζεόλιθο	2.9
Τυρί με επικάλυψη AlgNa με Ζεόλιθο 5%	2
Τυρί με επικάλυψη AlgNa με Ζεόλιθο 10%	ND*
Τυρί με επικάλυψη AlgNa με Ζεόλιθο 15%	ND*

*ND: Not detected

Στο **Διάγραμμα 3** παρατηρείται η ανάπτυξη του *St. aureus* στους 28 °C. Διαπιστώνεται και γραφικά η ανάγκη για φίλμ, ώστε σε δύσκολες θερμοκρασιακά καταστάσεις να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Η ανάγκη για εφαρμογή τέτοιων φίλμ μάλιστα επιβεβαιώνεται και στατιστικά, αφού με χρήση ANOVA η ανάγκη κρίνεται στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 1%.



Διάγραμμα 3. Επιβίωση *S. aureus* μετά από 12 ώρες στους 28 °C -Έλεγχος Film επικάλυψης

Στην περίπτωση του ελέγχου ανάπτυξης στον *S. aureus* σε συνθήκες 10°C, η ανάπτυξη συμβαίνει σαφώς πιο αργά

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν για τον έλεγχο του τυριού σε συνθήκες αποθήκευσης σε ψυγείο τους 10 °C, έρχονται σε συμφωνία με εκείνα των Jingsong et al., (2018), αφού η εφαρμογή του αλγινικού φιλμ μείωσε κατά δύο τουλάχιστον λογαριθμικούς κύκλους τον πληθυσμό του *St. aureus*. Τα εργαστηριακά αποτελέσματα των Gialamas et al. (2010) ομοίως αναδεικνύουν παρόμοια εξέλιξη ύστερα από βρώσιμα φιλμ καζεϊνικού νατρίου, όπου η υψηλότερη συγκέντρωση οδήγησε σε υψηλότερη απόδοση αντιμικροβιακών ιδιοτήτων.

Από την ανάλυση με ANOVA προκύπτει ότι η p-value σε συνάρτηση με την F είναι χαμηλότερη του 0.05. Συνεπώς υπάρχουν τουλάχιστον 1 ή περισσότερα δείγματα που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Με τον έλεγχο Tukey HSD, δύναται να προσδιοριστούν οι συνδυασμοί (ζευγάρια) που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Προκύπτει λοιπόν, πως οι στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο 1% αφορούν το μάρτυρα και τα φιλμ 0 και 5% ζεόλιθου, με τα φιλμ αλγινικού με 10 και 15%, ενώ σε επίπεδο σημαντικότητας 5% διαφέρουν τα δείγματα με φιλμ αλγινικού και 5% ζεόλιθο έναντι των φιλμ με 10 και 15%. Τα αποτελέσματα αποτυπώνονται στον παρακάτω πίνακα:

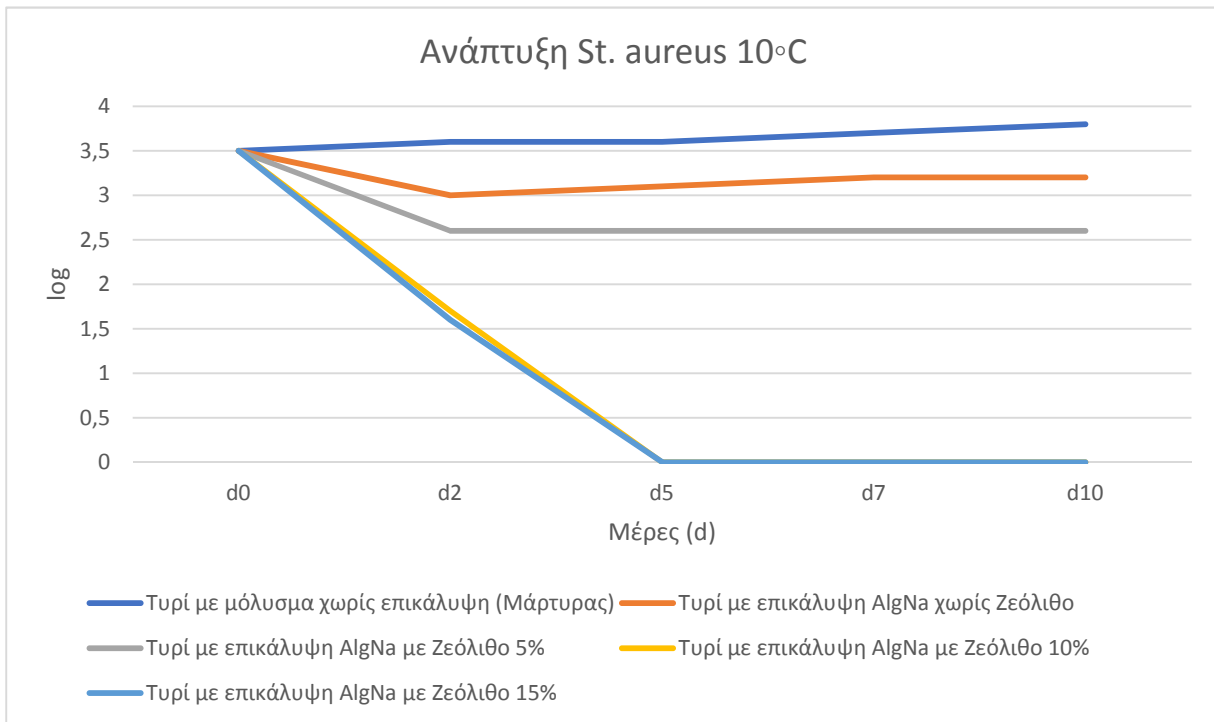
Πίνακας 11 Αποτελέσματα δειγμάτων τυριού cottage με επικάλυψη-φιλμ έναντι του *S. aureus* σε θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C για 10 ημέρες.

Ανάπτυξη (log cfu/gr) <i>S. aureus</i> σε τυρί cottage με επικαλύψεις στους 10°C για 10 ημέρες					
Υλικά	Μέρα 0	Μέρα 2η	Μέρα 5η	Μέρα 7η	Μέρα 10η
Τυρί με μόλυσμα χωρίς επικάλυψη (Μάρτυρας)	3.5	3.6	3.6	3.7	3.8
Τυρί με επικάλυψη AlgNa χωρίς Ζεόλιθο	3.5	3	3.1	3.2	3.2
Τυρί με επικάλυψη AlgNa με Ζεόλιθο 5%	3.5	2.6	2.6	2.6	2.6
Τυρί με επικάλυψη AlgNa με Ζεόλιθο 10%	3.5	ND*	ND*	ND*	ND*
Τυρί με επικάλυψη AlgNa με Ζεόλιθο 15%	3.5	ND*	ND*	ND*	ND*

* ND: Not detected

Στο **Διάγραμμα 4** φαίνεται η πορεία του *St. aureus* στο τυρί στους 10 °C στη διάρκεια 10 ημερών. Φαίνεται και σχηματικά πλέον η ταχύτερη αύξηση του παθογόνου στο δείγμα Μάρτυρα, ενώ από την άλλη στο φιλμ ενισχυμένο με ζεόλιθο σε ποσοστό 10% και 15% ο πληθυσμός πέφτει απότομα στο 0. Επιπρόσθετα, στη

περίπτωση μη ύπαρξης ζεόλιθου στο φιλμ Αλγινικού Να, ή μείωση του πληθυσμού του *S. aureus* είναι περίπου 2 λογαριθμικές μονάδες σε σχέση με τον Μάρτυρα (χωρίς επικάλυψη). Επιπλέον, η περιεκτικότητα ζεόλιθου σε ποσοστό 15%, επέφερε δυσμενέστερα αποτελέσματα σε σύγκριση με εκείνα του 5 και 10%.



Διάγραμμα 4. Επιβίωση *S. aureus* μετά από 10 μέρες στους 10 °C -Έλεγχος Film επικάλυψης

5. Συμπέρασμα

Συμπερασματικά, η παρούσα εργασία ανέδειξε τη σπουδαιότητα της χρήσης φιλμ και υλικών ενσωμάτωσης εν τη απουσία πλαστικού, για τη δημιουργία μιας ισχυρής άμυνας στο προϊόν cottage cheese που χρησιμοποιήθηκε, έναντι ισχυρών παθογόνων. Αναλύθηκε εκτενώς η αντιβακτηριακή ιδιότητα των υλικών ενσωμάτωσης τόσο σε οξυγαλακτικά στελέχη (LAB), όσο και στους *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis* και *Listeria welshimeri* προσδιορίζοντας μάλιστα την ελάχιστη συγκέντρωση παρεμπόδισης σε <0.03 και 0.1% για LAB και παθογόνους αντίστοιχα.

Η συγκέντρωση ζεόλιθου 0.5% σε broth παρεμπόδισε την ανάπτυξη των μικροοργανισμών *E. faecalis* και *St. aureus* μετά από 5 ημέρες επώασης στους 37 και 30 °C αντίστοιχα. Με την εφαρμογή της μεθόδου διάχυσης σε αگار, η διαυγής ζώνη του μικρογαλακτώματος έναντι του *E. faecalis* ήταν 9.5mm έναντι των 8mm του ζεόλιθου, θεωρείται στατιστικά σημαντική σε επίπεδο 5%. Για τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς η διαφορά δε θεωρείται σημαντική αφού η διαφορά τους είναι στο 0.2 και 0.1 για τους παθογόνους *Listeria welshimeri* και *S. aureus* αντίστοιχα. Επιπλέον, το θυμαρέλαιο παρουσίασε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα όντας ενθυλακωμένο στο ζεόλιθο συγκριτικά με το μικρογαλάκτωμα έναντι του *Staphylococcus aureus*, και του *Listeria monocytogenes*.

Όσον αφορά τα φιλμ, η διαφορά θερμοκρασίας, επηρέασε μεν το δείγμα ελέγχου χωρίς επίστρωση, ενώ η παρουσία αλγινικού νατρίου δεν παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις και λειτούργησε ανασταλτικά στην ανάπτυξη του *S. aureus*, ενώ η αναλογία 10% και 15% σε ζεόλιθο απεδείχθη καθοριστικής σημασίας, αφού τόσο στους 28 °C όσο και στους 10 °C βαθμούς για 10 ημέρες, δεν παρουσιάστηκε καμία ανάπτυξη.

Συνεπώς τα θετικά αποτελέσματα των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να λειτουργήσουν ως αντικείμενο ιδιαίτερης σημασίας στην κατεύθυνση της ελαχιστοποίησης των επιπρόσθετων συντηρητικών, όσο και των πλαστικών συσκευασιών.

6. Βιβλιογραφία

1. Al-Hassan, A. A., & Norziah, M. H. (2012). Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 108–117.
2. Andreani N. A., L. Fasolato, Pseudomonas and related Genera. In: A. Bevilacqua, M. R. Corbo, M. Sinigaglia (eds.), *The microbiological quality of food*. Woodhead Publishing. Amsterdam (2017).
3. Artiga, María & Fani, Alejandra & Martin-Belloso, Olga. (2017). Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing oregano essential oil and mandarin fiber. *Food Control*. 76. 1-12. 10.1016/j.foodcont.2017.01.001.
4. Azizi-lalabadi, Maryam & Rafiei, Leila & Divband, Baharak & Ehsani, Ali. (2020). Active packaging for Salmon stored at refrigerator with Polypropylene nanocomposites containing 4A zeolite, ZnO nanoparticles, and green tea extract. *Food Science & Nutrition*. 8. 10.1002/fsn3.1934.
5. Bourbon, A. I., Pinheiro, A. C., Cerqueira, M. A., Rocha, C. M. R., Avides, M. C., Quintas, M. A. C., & Vicente, A. A. (2011). Physico-chemical characterization of chitosan- based edible films incorporating bioactive compounds of different molecular weight. *Journal of Food Engineering*, 106(2), 111–118.
6. Cerqueira, M. A., Sousa-Gallagher, M. J., Macedo, I., Rodriguez-Aguilera, R., Souza, B. W. S., TeiXeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “regional” cheese. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 87–94.
7. Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., TeiXeira, J. A., & Vicente, A. A. (2012). Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films – A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 175–184.
8. Cerqueira, M.A.; Sousa-Gallagher, M.J.; Macedo, I.; Rodriguez-Aguilera, R.; Souza, B.W.S.; Teixeira, J.A.; Vicente, A.A. Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. *J. Food Eng.* 2010, 97, 87–94.

9. Cetin B., Cakmakci S., and Gurses M (2013). Anti-probiotic effects of essential oils from some Turkish endemic thyme species, *Asian J. Chem.* 25, 8625-8628.
10. Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Food Microbiology and Safety*, 67(3), 1162–1169.
11. Costa, M.J., Maciel, L.C., Teixeira, J., Vicente, A., & Cerqueira, M. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food research international*, 107, 84-92 .
12. Cui, H. Y., Wu, J., Li, C. Z., & Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 8598–8606.
13. Dal Bello B, Cocolin L, Zeppa G, Field D, Cotter PD, Hill C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *Int J Food Microbiol.* 2012 Feb 1;153(1-2):58-65. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016. Epub 2011 Oct 30. PMID: 22104121.
14. Deng, Jianping & Yang, Bowen & Chen, Chao & Liang, Junya. (2015). Renewable Eugenol-Based Polymeric Oil-Absorbent Microspheres: Preparation and Oil Absorption Ability. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 3. 599-605. 10.1021/sc500724e.
15. Di Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., & Porta, R. (2011). Chitosan/whey protein film as active coating to extend ricotta cheese shelf-life. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2324–2327.
16. Duan, J., Park, S.-I., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2007). Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of mozzarella cheese. *Journal of Food Science*, 72(9) (M355-62).
17. Eva, Laslo & György, Éva. (2018). Evaluation of the microbiological quality of some dairy products. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*. 11. 27-44. 10.2478/ausal-2018-0002.
18. Fajardo, Paula & Martins, Joana & Fuciños, Clara & Pastrana, Lorenzo & Teixeira, José & Vicente, António. (2010). Evaluation of chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering*. 101. 349-356. 10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029.

19. Gaikwad, Kirtiraj & Singh, Suman & Negi, Yuvraj Singh. (2019). Ethylene scavengers for active packaging of fresh food produce. *Environmental Chemistry Letters*. 18. 1-16. 10.1007/s10311-019-00938-1.
20. Garcia, E., & Barret, D. M. (2002). Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables. In O. Lamikanra (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables science* (pp. 267–304). Boca Raton: CRC Press.
21. García, Mario & Casariego, Alicia & Diaz, Raul & Roblejo, Liuver. (2013). Effect of edible chitosan/zeolite coating on tomatoes quality during refrigerated storage. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 26. 10.9755/ejfa.v26i3.16620.
22. Ghorani, B., & Tucker, N. (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology. *Food Hydrocolloids*, 51, 227–240.
23. Gialamas, H., Zinoviadou, K., Biliaderis, C., & Koutsoumanis, K. (2010). Development of a novel bioactive packaging based on the incorporation of *Lactobacillus sakei* into sodium-caseinate films for controlling *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Research International*, 43, 2402-2408.
24. Giannakas, Aris & Tsagkalias, I.s & Achilias, Dimitris & Ladavos, A.. (2017). A novel method for the preparation of inorganic and organo-modified montmorillonite essential oil hybrids. *Applied Clay Science*. 145. 362–370. 10.1016/j.clay.2017.06.018.
25. Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki K, Ludwig W, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer New York. 2012. ISBN 978-0-387-68233-4. 1750 pp.
26. Han, Jung & Patel, Dhaval & Kim, Jung Eun & Min, Sea Cheol. (2014). Retardation of *Listeria Monocytogenes* Growth in Mozzarella Cheese Using Antimicrobial Sachets Containing Rosemary Oil and Thyme Oil. *Journal of Food Science*. 79. 10.1111/1750-3841.12659.
27. Henriques, M., Santos, G., Rodrigues, A., Gomes, D., Pereira, C., & Gil, M. (2013). Replacement of conventional cheese coatings by natural whey protein edible coatings with antimicrobial activity. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 3, 34–47.

28. Hicks SJ, Lund BM. The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *J Appl Bacteriol.* 1991 Apr;70(4):308-14. doi: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb02941.x. PMID: 1905281.
29. https://www.statista.com/statistics/945014/us-private-label-and-overall-cottage-cheese-sales/?fbclid=IwAR2vQugAdMcK_6Yai3_OsFhzzUFoqkv5M1BKtwB7xR049hK0oI7wIzpY_8Q
30. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(1), 154–160.
31. Jingsong Ye & Donghui Ma & Qin, Wen & Liu, Yaowen. (2018). Physical and Antibacterial Properties of Sodium Alginate—Sodium Carboxymethylcellulose Films Containing *Lactococcus lactis*. *Molecules*. 23. 2645. 10.3390/molecules23102645.
32. Kavas, G., & Kavas, N. (2014). The effects of mint (*Mentha spicata*) essential oil fortified edible films on the physical, chemical and microbiological characteristics of lor cheese. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 12(3–4), 40–45.
33. Langer AJ., Ayers T, Grass J, Lynch M, Angulo FJ, Mahon BE. Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws. United States, 1993–2006. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(3):385-391.
34. Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Curr. Med. Chem.* 2009;16:4003-4019.
35. Ledenbach H. L., R. T. Marshall, *Microbiological spoilage of dairy products*. In: W. H. Sperber, M. P. Doyle (eds), *Compendium of the 43 microbiological spoilage of foods and beverages, food microbiology and food safety*. Springer, New York (2009).
36. Lucera A. & Mastromatteo, Marianna & Conte, Amalia & Zambrini, Angelo Vittorio & Faccia, Michele & MA, Del. (2014). Effect of active coating on microbiological and sensory properties of fresh mozzarella cheese. *FOOD PACKAGING AND SHELF LIFE*. 1. 10.1016/j.fpsl.2013.10.002.
37. Mannheim, C. H., & Soifer, T. (1996). Shelf-life extension of cottage cheese by modified atmosphere packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 29(8), 767–771.

38. Marzano-Barreda LA, Yamashita F, Bilck AP. Effect of biodegradable active packaging with zeolites on fresh broccoli florets. *J Food Sci Technol*. 2021 Jan;58(1):197-204. doi: 10.1007/s13197-020-04529-9. Epub 2020 May 23. PMID: 33505064; PMCID: PMC7813911.
39. Mastromatteo, Marianna & Conte, Amalia & Faccia, Michele & Nobile, Matteo & Zambrini, Angelo Vittorio. (2014). Combined effect of active coating and modified atmosphere packaging on prolonging the shelf life of low-moisture Mozzarella cheese. *Journal of dairy science*. 97. 10.3168/jds.2013-6999.
40. McAuliffe O, Hill C, Ross RP. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lactacin 3147-producing starter culture. *J Appl Microbiol*. 1999 Feb;86(2):251-6. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00663.x. PMID: 10063625.
41. Medeiros, B. G. S., Souza, M. P., Pinheiro, A. C., Bourbon, A. I., Cerqueira, M. A., Vicente, A. A., & Carneiro-da-Cunha, M. G. (2013). Physical characterisation of an alginate/ lysozyme nano-laminate coating and its evaluation on “Coalho” cheese shelf life. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), 1088–1098.
42. Miguel A. Cerqueira, Álvaro M. Lima, Bartolomeu W. S. Souza, José A. Teixeira, Renato A. Moreira, and António A. Vicente *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009 57 (4), 1456-1462 DOI: 10.1021/jf802726d
43. Moreira, M. R., Pereda, M., Marcovich, N. E., & Roura, S. I. (2011). Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein polymers: Assessment on carrot, cheese, and salami. *Journal of Food Science*, 76(1), M54–M63.
44. Moritz, C. M., Rall, V. L., Saeki, M. J., & Júnior, A. F. (2012). Inhibitory effect of essential oils against *Lactobacillus rhamnosus* and starter culture in fermented milk during its shelf-life period. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43(3), 1147–1156. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120003000042>
45. Nieto, M. B. (2009). Structure and Function of Polysaccharide Gum-Based Edible Films and Coatings. In K. Huber, & M. Embuscado (Eds.). *Edible Films and Coatings for Food Applications* (pp. 57–112). New York: E. Springer.

46. Ollé Resa, Carolina & Gerschenson, Lia & Rosa, Jagus. (2012). Effect of Natamycin on Physical Properties of Starch Edible Films and Their Effect on *Saccharomyces cerevisiae* Activity. *Food and Bioprocess Technology*. 6. 10.1007/s11947-012-0960-0.
47. Otero, Verónica & Becerril, Raquel & Santos, Jesus & Rodríguez-Calleja, José & Nerín, Cristina & García-López, María-Luisa. (2014). Evaluation of two antimicrobial packaging films against *Escherichia coli* O157:H7 strains in vitro and during storage of a Spanish ripened sheep cheese (Zamorano). *Food Control*. 42. 10.1016/j.foodcont.2014.02.022.
48. Ouattara, B., Simard, R. E., Pielt, G., Bégin, A., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 139–148.
49. Rabea, Entsar & Badawy, Mohamed & Stevens, Christian & Smagghe, Guy & Steurbaut, Walter. (2003). Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 4. 1457-65. 10.1021/bm034130m.
50. Ramos, Oscar & Santos, Arménia & Leão, Mariana & Pereira, Joana & Baptista da Silva, Sara & Fernandes, João & Franco, M. & Pintado, Manuela & Malcata, Francisco. (2012). Antimicrobial activity of edible coatings prepared from whey protein isolate and formulated with various antimicrobial agents. *International Dairy Journal*. 25. 132-141. 10.1016/j.idairyj.2012.02.008.
51. Reys, A., Drychowski, L. J., Tomasik, J., & Wiñniewska, K. (2002). Natamycin in ripening cheeses. *Pakistan Journal of Nutrition*, 1(5), 243–247.
52. Robertson Edible G.L. (2013), biobased and biodegradable food packaging materials G.L. Robertson (Ed.), *Food packaging - Principles and practice*, CRC press, Boca Raton (2013), pp. 49-90
53. Robertson G.L (2006). *Packaging of dairy products* G.L. Robertson (Ed.), *Food Packaging: Principles and Practice*, CRC press, Boca Raton, pp. 524-525
54. Robertson, G. L. (2014). *Food Packaging*. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 232–249. doi:10.1016/b978-0-444-52512-3.00063-2
55. Rodríguez-Turiénzo, L., Cobos, A., & Diaz, O. (2012). Effects of edible coatings based on ultrasound-treated whey proteins in quality attributes of

- frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 92–98.
56. Silva CCG, Silva SPM and Ribeiro SC (2018) Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Front. Microbiol.* 9:594. doi: 10.3389/fmicb.2018.00594
57. Soradech, S., Nunthanid, J., Limmatvapirat, S., & Luangtana-anan, M. (2012). An approach for the enhancement of the mechanical properties and film coating efficiency of shellac by the formation of composite films based on shellac and gelatin. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 94–102.
58. Thielmann, J., Muranyi, P., & Kazman, P. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(6), e01860. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01860>
59. Thielmann, Julian & Muranyi, Peter & Kazman, Pamina. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*. 5. e01860. 10.1016/j.heliyon.2019.e01860.
60. Ture, H., Eroglu, E., Ozen, B., & Soyer, F. (2011). Effect of biopolymers containing natamycin against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii* on fresh kashar cheese.
61. Wang, L., Liu, L., Holmes, J.D., Kerry, J.F., & Kerry, J.P. (2007). Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1128-1138.
62. Westall, S., & Filtenborg, O. (1998). Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiology*, 15(2), 243–249.
63. Yangilar, F., & Oğuzhan Yıldız, P. (2015). Casein/natamycin edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological, chemical and sensory properties during the ripening of Kashar cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96,2328–2336 (January).
64. Yilmaz, F., & Dagdemir, E. (2012). The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2582–2589.

65. Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Salama, H. H., & Dufresne, A. (2016). Enhancement of Egyptian soft white cheese shelf life using a novel chitosan/car- boXymethyl cellulose/zinc oXide bionanocomposite film. *Carbohydrate Polymers*, 151, 9–19.
66. Zambrano-Zaragoza, M. L., Mercado-Silva, E., Del Real, L. A., Gutiérrez-Cortez, E., Cornejo-Villegas, M. A., & Quintanar-Guerrero, D. (2014). The effect of nano-coatings with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut “red delicious” apples. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 188–196.
67. Zhong, Y., Cavender, G., & Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on mozzarella cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 1–8.

Παράρτημα 1ο Στατιστικός έλεγχος υλικών επίστρωσης

One-Way ANOVA, συμπεριλαμβανομένου της Tukey HSD

Σύνοψη δεδομένων (10°C)						
	Μάρτυρας	AlgNa_0%	AlgNa_5%	AlgNa_10%	AlgNa_15%	Σύνολο
N	5	5	5	5	5	25
Σ%	18.2	15.5	13.9	5.2	5.1	57.9
M.O	3.64	3.1	2.78	1.04	1.02	2.316
Σχ ²	66.3	48.49	39.29	15.14	14.81	184.03
Τυπ. Απόκλιση	0.114	0.3317	0.4025	1.5598	1.5498	1.4424

Αποτελέσματα				
Source	SS	df	MS	
Between-treatments	29.4536	4	7.3634	F=7.19082 p(0.00929)
Within-treatments	20.48	20	1.024	
Σύνολο	49.9336	24		

Συγκρίσεις κατά ζεύγη		HSD _{.05} = 1.9151 HSD _{.01} = 2.3955	Q _{.05} = 4.2319 Q _{.01} = 5.2933
Μάρτυρας: AlgNa_0%	M ₁ =3.64 M ₂ =3.10	0.54	Q= 1.19 (p=0.91358)
Μάρτυρας: AlgNa_5%	M ₁ =3.64 M ₂ =2.78	0.86	Q= 1.90 (p=0.66837)
Μάρτυρας: AlgNa_10%	M ₁ =3.64 M ₃ =1.04	2.60	Q= 5.75 (p=0.0456)
Μάρτυρας: AlgNa_15%	M ₁ =3.64 M ₄ =1.02	2.62	Q= 5.79 (p=0.00456)
AlgNa_0%: AlgNa_5%	M ₂ =3.10 M ₃ =2.78	0.32	Q= 0.71 (p=0.98643)
AlgNa_0%: AlgNa_10%	M ₂ =3.10 M ₄ =1.041	2.06	Q= 4.55 (p=0.03121)
AlgNa_0%: AlgNa_15%	M ₂ = 3.10 M ₅ =1.02	2.08	Q= 4.60 (p=0.02921)
AlgNa_5%: AlgNa_10%	M ₃ =2.78 M ₄ =1.04	1.74	Q= 3.84 (p=0.08630)
AlgNa_5%: AlgNa_15%	M ₃ =2.78 M ₅ =1.02	1.76	Q= 3.89 (p=0.08121)
AlgNa_10%: AlgNa_15%	M ₁ =1.04 M ₅ =1.02	0.02	Q= 0.04 (p=0.000)

Παράρτημα 2ο Στατιστικός έλεγχος υλικών ενσωμάτωσης

One-Way ANOVA Υλικά ενσωμάτωσης – *S. aureus*

Σύνοψη Δεδομένων						
	Μάρτυρας T1	Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 0.5% T2	Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 1% T3	Τυρί με ζεόλιθο με θυμαρέλαιο 1% T4	Τυρί με ζεόλιθο με θυμαρέλαιο 0.5% T5	Σύνολο
N	5	5	5	5	5	25
Σ^x	17.9	16.6	16.1	15.5	16.5	82.6
M.O	3.58	3.32	3.22	3.1	3.3	3.304
Σ^2	64.11	55.18	52.07	48.35	54.51	274.22

Αποτελέσματα				
Source	SS	df	MS	
Between-treatments	0.6256	4	0.1564	F= 4.5731 p=0.08727
Within-treatments	0.684	20	0.0342	
Σύνολο	1.3096	24		

Συγκρίσεις κατά ζεύγη		HSD _{.05} = 0.3500 HSD _{.01} = 0.4378	Q _{.05} = 4.2319 Q _{.01} = 5.2933
T1:T2	M ₁ =3.58 M ₂ =3.32	0.26	Q= 3.14 (p=0.21179)
T1:T3	M ₁ =3.58 M ₃ =3.22	0.36	Q= 4.35 (p=0.04192)
T1:T4	M ₁ =3.58 M ₄ =3.10	0.48	Q= 5.80 (p=0.00446)
T1:T5	M ₁ =3.58 M ₅ =3.30	0.28	Q= 3.39 (p=0.15784)
T2:T3	M ₂ =3.32 M ₃ =2.78	0.10	Q= 1.21 (p=0.90976)
T2:T4	M ₂ =3.32 M ₄ =3.10	0.22	Q= 2.66 (p=0.35868)
T2:T5	M ₂ = 3.32 M ₅ =3.30	0.02	Q= 0.24 (p=0.99979)
T3:T4	M ₃ =3.22 M ₄ =3.10	0.12	Q= 1.45 (p=0.84044)
T3:T5	M ₃ =3.22 M ₅ =3.30	0.08	Q= 0.97 (p=0.95767)
T4:T5	M ₁ =1.04 M ₅ =3.30	0.20	Q= 2.42 (p=0.45046)

One-Way ANOVA Υλικά ενσωμάτωσης – *L. monocytogenes*

Σύνοψη Δεδομένων						
	Μάρτυρας T1	Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 0.5% T2	Τυρί με μικρογαλάκτωμα με θυμαρέλαιο 1% T3	Τυρί με ζεόλιθο με θυμαρέλαιο 1% T4	Τυρί με ζεόλιθο με θυμαρέλαιο 0.5% T5	Σύνολο
N	5	5	5	5	5	25
Σ^x	17.6	16.3	15.7	15	15.3	79.9
M.O	3.52	3.26	3.14	3	3.06	3.196
Σ^2	64.14	53.15	49.37	45.1	46.87	256.63
Τυπική απόκλιση	0.2168	0.0548	0.1342	0.1581	0.114	0.23

Αποτελέσματα				
Source	SS	df	MS	
Between-treatments	0.8456	4	0.2114	F=9.9717 *p=0.00132
Within-treatments	0.424	20	0.0212	
Σύνολο	1.2696	24		

Συγκρίσεις κατά ζεύγη		HSD _{.05} = 0.3500 HSD _{.01} = 0.4378	Q _{.05} = 4.2319 Q _{.01} = 5.2933
T1:T2	M ₁ =3.52 M ₂ =3.26	0.26	Q= 3.99 (p=0.07028)
T1:T3	M ₁ =3.52 M ₃ =3.14	0.38	Q= 5.84 (p=0.0424)
T1:T4	M ₁ =3.52 M ₄ =3	0.52	Q= 7.99 (p=0.0014)
T1:T5	M ₁ =3.52 M ₅ =3.06	0.46	Q= 7.06 (p=0.00060)
T2:T3	M ₂ =3.26 M ₃ =3.14	0.12	Q= 1.84 (p=0.69240)
T2:T4	M ₂ =3.26 M ₄ =3	0.26	Q= 3.99 (p=0.07028)
T2:T5	M ₂ = 3.26 M ₅ =3.06	0.20	Q= 3.07 (p=0.23038)
T3:T4	M ₃ =3.14 M ₄ =3	0.14	Q= 2.15 (p=0.56192)
T3:T5	M ₃ =3.14 M ₅ =3.06	0.08	Q= 1.23 (p=0.90496)
T4:T5	M ₁ =1.04 M ₅ =3.06	0.06	Q= 0.92 (p=0.96434)