



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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριου ελαίου ρίγανης ελεύθερου και εγκλεισμένου σε β-κυκλοδεξτρίνη στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Κλείτσα Β. Χριστίνα, Χημικός

Επιβλέπων καθηγητής:

Σκανδάμης Ν. Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

**ΑΘΗΝΑ
2022**

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριου ελαίου ρίγανης ελεύθερου και εγκλεισμένου σε β-κυκλοδεξτρίνη στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

Study of the antimicrobial effect of free and encapsulated in b-cyclodextrin oregano essential oil against the survival of the pathogen *Salmonella* spp.

Κλείτσα Β. Χριστίνα, Χημικός

Εξεταστική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Πανάγου Ευστάθιος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, κύριο Σκανδάμη Ν. Παναγιώτη που με δέχτηκε στο εργαστήριο και η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς την υποστήριξή του.

Επίσης, την κυρία Γουναδάκη Αντωνία για την ανιδιοτελή προσφορά της, για το σημαντικό χρόνο που αφιέρωσε και τις πολύτιμες πληροφορίες που μετέδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης και συγγραφής της.

Χρυστάω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στην ερευνήτρια Μεσημέρη Ειρήνη για την αμέριστη βοήθεια της και για την άριστη συνεργασία που είχαμε στο πλαίσιο της εκπόνησης της διπλωματικής, τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε για να μου δώσει σημαντικά στοιχεία και εξηγήσεις πάνω στο θέμα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την εξαιρετική συνεργασία.

«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	7
ABSTRACT	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
1.1. Αιθέρια έλαια	11
1.1.1. Γενικά	11
1.1.2. Αιθέριο έλαιο ρίγανης	12
1.1.3. Μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης	13
1.1.4. Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων.....	14
1.1.5. Εγκλεισμός αιθέριων ελαίων.....	14
1.1.5.1. Γενικά	14
1.1.5.2. Κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CD)	15
1.1.5.3. β-κυκλοδεξτρίνες	16
1.1.5.4. Ιδιότητες	17
1.1.5.5. Μέθοδος παρασκευής συστημάτων ενθυλάκωσης	19
1.1.5.6. Εφαρμογή στα τρόφιμα	19
1.1.6. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εγκλεισμένων αιθέριων ελαίων σε β-CDs.....	20
1.1.6.1. Ζήτα δυναμικό (ζ-potential)	20
1.1.6.2. Μέγεθος σωματιδίων	20
1.1.6.3. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων	20
1.2. Ο μικροοργανισμός <i>Salmonella</i> spp.....	21
1.2.1. Ιστορικά στοιχεία	22
1.2.2. Ταξινόμηση και ονοματολογία.....	22
1.2.3. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά.....	23
1.2.4. Βιοχημικά χαρακτηριστικά.....	24
1.2.5. Πηγές μίανσης	24
1.2.6. Επιδημιολογικά στοιχεία	25
1.2.7. Παράγοντες μικροβιακής ανάπτυξης και επιβίωσης.....	25
1.3. Κατίκι Δομοκού και Γαλοτύρι	26
1.4. Κιμάς.....	26
1.5. Παρουσία της <i>Salmonella</i> spp. σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης	27
1.5.1. Σε γάλα και τυριά	27
1.5.2. Σε κρέας και κιμά	28

1.6. Στόχος μελέτης.....	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....	30
2.2. Στελέχη <i>Salmonella</i> spp.	30
2.3. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος	31
2.4. Παρασκευή β-CDs με εγκλεισμό αιθέριου ελαίου ρίγανης.....	32
2.5. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) του ΟΕΟ.....	33
2.5.1. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ελεύθερου αιθέριου ελαίου.....	33
2.5.2. Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου.	35
2.6. Χαρακτηρισμός β-CDs με εγκλεισμό αιθέριου ελαίου ρίγανης	36
2.6.1. Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (% Encapsulation Efficiency).....	36
2.6.2. Προσδιορισμός του ποσοστού του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην εξωτερική επιφάνεια των β-CDs (%EO)	37
2.6.3. Προσδιορισμός μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς PDI και ζ-potential.	37
2.7. Προετοιμασία και ενοφθαλμισμός δειγμάτων	38
2.7.1. <i>In vitro</i> σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.....	38
2.7.2. <i>In vitro</i> σε ζωμό τυριών (υγρό model food)	39
2.7.3. <i>In situ</i> σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης.....	40
2.7.3.1. Κατίκι	40
2.7.3.2. Κιμά	40
2.8. Μικροβιολογική ανάλυση.....	41
2.8.1. Καταμέτρηση πληθυσμών.....	43
2.9. Μέτρηση pH των δειγμάτων	43
2.10. Μέτρηση ενεργότητας ύδατος (a_w) των δειγμάτων	44

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
3.1. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration- MBC) του αιθέριου ελαίου ρίγανης.....	45
3.2. Χαρακτηρισμός β-CDs με εγκλεισμό αιθέριου ελαίου ρίγανης	48
3.2.1. Απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (% Encapsulation efficiency – EE).....	48
3.2.2. Προσδιορισμός μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς PDI και ζ-potential.	49
3.3. Μικροβιολογική ανάλυση.....	51
3.3.1. Επίδραση της ενθυλάκωσης αιθέριου ελαίου ρίγανης σε β-κυκλοδεξτρίνη στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Salmonella</i> spp.	51
3.3.1.1. <i>In vitro</i> εφαρμογή σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα	51
3.3.1.2. <i>In vitro</i> εφαρμογή σε ζωμό τυριών	53
3.3.1.3. <i>In situ</i> εφαρμογή σε κατίκι	55
3.3.1.4. <i>In situ</i> εφαρμογή σε κιμά	56
3.3.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια.....	58
3.3.3. Ζύμες και μύκητες.....	62
3.4. Τιμές pH των δειγμάτων	67
3.5. Ενεργότητα ύδατος (a_w) των δειγμάτων	70
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων έναντι μικροοργανισμών είναι ευρέως διαδεδομένη, ωστόσο η υδροφοβικότητα, η έντονη γεύση και η υψηλή πτητικότητα τους εμποδίζουν την εμπορική εφαρμογή τους στα τρόφιμα. Ως εκ τούτου, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η ενθυλάκωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης (OEO) σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) ως μέσο ενίσχυσης της διασποράς για την ελεγχόμενη απελευθέρωση του και η αξιολόγηση της επίδρασης της ενθυλάκωσης στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp., σε υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα (TSB, Tryptic Soya Broth), model food (κατικιού και γαλοτυριού) και σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (κατίκι και βόειος κιμάς).

Για την *in vitro* εφαρμογή ελεύθερου και εγκλεισμένου EO σε εργαστηριακό υπόστρωμα, χρησιμοποιήθηκε TSB σε pH=7.0 και pH=4.3, σε αναλογία σκονών EO- β-CDs 1:99 σε συγκεντρώσεις ίσες με το MIC και το ½ MIC (0.44% και 0.88%, αντίστοιχα). Για την *in vitro* εφαρμογή ελεύθερου και εγκλεισμένου EO σε ζωμό τυριού (κατίκι και γαλοτύρι) χρησιμοποιήθηκε η σκόνη εγκλεισμένου EO ρίγανης σε β-κυκλοδεξτρίνη σε αναλογία 1:99, και εφαρμόστηκαν δύο συγκεντρώσεις EO ρίγανης, μία ίση με το MIC (0.88 %) και μία ίση με το μισό του MIC (0.44 %). Για την *in situ* εφαρμογή σε κατίκι και σε γαλοτύρι εφαρμόστηκε ελεύθερο και εγκλεισμένο EO σε β-CDs σε αναλογία 1:99, σε συγκέντρωση ίση με το MIC (0.88%). Για τα δείγματα του βόειου κιμά, χρησιμοποιήθηκαν οι σκόνες με αναλογία EO ρίγανης σε β-CDs 1:99 και 8:92, σε συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου, διπλάσιες του MIC, ίσες με 0.18% και 0.10%, αντίστοιχα. Όλα τα δείγματα ενοφθαλμίστηκαν με μίγμα τριών στελεχών του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml ή g. Η συντήρηση του υγρού εργαστηριακού υποστρώματος και των δειγμάτων που περιείχαν τυρί πραγματοποιήθηκε στους 7 °C, ενώ τα δείγματα του βόειου κιμά συντηρήθηκαν στους 10 °C. Επίσης, προετοιμάστηκαν και τα αντίστοιχα δείγματα μάρτυρα με απουσία EO ή/ και μικροοργανισμού.

Κατά την *in vitro* εφαρμογή του ελεύθερου EO, στο θρεπτικό υπόστρωμα TSB και στο model food παρατηρήθηκε άμεση μείωση του παθογόνου (κάτω του επιπέδου ποσοτικοποίησης < 1 log CFU/ml) μέσα στις πρώτες ημέρες συντήρησης του τροφίμου. Μεγαλύτερη επίδραση παρουσίασε το ελεύθερο EO σε συγκέντρωση 0.88%, ενώ το εγκλεισμένο EO και οι μάρτυρες δεν επηρέασαν

τον πληθυσμό του παθογόνου. Η σκόνη με αναλογία ΟΕΟ- β-CDs 1:99, σε συγκέντρωση 0.88%, έδειξε μεγάλη επίδραση στον πληθυσμό της *Salmonella*, στα δείγματα του ζωμού κατικιού. Όσον αφορά τα δείγματα κατικιού και βόειου κιμά υπήρξε μείωση στον πληθυσμό του παθογόνου μικροοργανισμού. Ωστόσο, πιο ισχυρή ήταν η επίδραση του ελεύθερου και εγκλεισμένου ΕΟ στα δείγματα του κατικιού.

Συνολικά, το εγκλεισμένο ΟΕΟ παρουσίασε μεγαλύτερη επίδραση στον πληθυσμό του παθογόνου στα υδατικά συστήματα, από ότι στα προϊόντα του κατικιού και βόειου κιμά. Εξάριση, αποτέλεσε το TSB όπου δεν εμφανίστηκε αντιμικροβιακή δράση του ΟΕΟ.

Λέξεις κλειδιά: *Salmonella* spp., αιθέριο έλαιο ρίγανης, β-κυκλοδεξτρίνες, εγκλεισμός, κατίκι, γαλοτύρι, βόειος κιμάς

ABSTRACT

The antimicrobial effect of essential oils against microorganisms is widespread. However, their hydrophobicity, intense taste and high volatility prevent their commercial application in food. Therefore, the purpose of the present study is the encapsulation of oregano essential oil (OEO) in beta-cyclodextrin (β -CD) as a dispersion enhancer for its controlled release and the evaluation of the effect of encapsulation on the survival of the pathogenic microorganism *Salmonella* spp., in a liquid laboratory medium (TSB, Tryptic Soya Broth), in model food (katiki and galotyri) as well as in foods of animal origin (katiki and minced beef).

For the *in vitro* application of free and encapsulated EO on a laboratory substrate, TSB at pH=7.0 and pH=4.3, was used at a ratio of EO- β -CDs powders of 1:99 in concentrations equal to the MIC and $\frac{1}{2}$ MIC (0.44% and 0.88%, respectively). For the *in vitro* application of free and encapsulated EO in cheese broth (katiki and galotyri) oregano EO powder encapsulated in β -CD was used at a ratio of 1:99; also, two concentrations of oregano EO were used, one equal to the MIC (0.88 %) and the other equal to half of the MIC (0.44 %). For the *in situ* application in katiki and galotyri cheese, free and encapsulated EO to β -CDs was applied in a ratio of 1:99, in concentration equal to MIC (0.88%). Regarding the minced beef samples, the powders were used at a ratio of oregano EO in β -CDs 1:99 and 8:92, at essential oil concentrations ($2 \times$ MIC), equal to 0.18% and 0.10%, respectively.

All samples were inoculated with a mixture of three strains of *Salmonella* spp. at a concentration of 10⁶ CFU/ml or g. TSB samples and samples containing cheese were preserved at 7 °C, while the ground beef samples were kept at 10 °C. Also, the control samples were also prepared without EO and/or microorganism.

During the *in situ* application of free EO to the TSB nutrient medium and to the model food, an immediate reduction of the pathogen was observed (below the level of detection, < 1 log CFU/ml or g) within the first days of food preservation. The free EO at a concentration of 0.88% showed greater effectiveness in the reduction of the *Salmonella* spp. population, while the encapsulated EO and the controls did not effect the population of the pathogen. Regarding the samples of cheese broth (katiki), in the ratio OEO- β -CDs of 1:99, at concentration of 0.88%, showed a great affect

at the population of *Salmonella*. As for the samples of katiki and ground beef, a reduction in the population of the pathogen microorganism was observed. However, the effect of free and encapsulated EO was higher in the samples of katiki.

Overall, the encapsulated OEO showed a greater effect in the population of the pathogen, at aqueous solutions, rather than the samples of katiki and minced beef. There is an exception, at the TSB medium where antimicrobial effect did not occurred.

Key words: *Salmonella* spp., oregano essential oil, betacyclodextrin, encapsulation, katiki, galotyri, minced beef

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Αιθέρια έλαια

1.1.1. Γενικά

Τα αιθέρια έλαια (essential oils, EO) χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια ως θυμιάματα, ως αρώματα, για καλλυντική χρήση, στη μαγειρική και σε ιατρικές εφαρμογές (Lee et al., 2015). Η αντιμικροβιακή τους δράση αναφέρθηκε πρώτη φορά το 1881 (Boyle, 1955). Υπάρχουν περισσότεροι από 3000 τύποι EO, από τους οποίους οι 300 έχουν εμπορικό ενδιαφέρον.

Τα αιθέρια έλαια (EO) είναι μίγματα από πτητικές οργανικές ουσίες που προέρχονται από αρωματικά φυτά. Εκτός από τις αρωματικές τους ιδιότητες, τα αιθέρια έλαια διακατέχονται και από άλλες ιδιότητες, όπως, αντικαρκινικές, αντιμικροβιακές και δρουν κατά της παχυσαρκίας και των φλεγμονών (Costa et al., 2016). Τα EO είναι κυρίως αδιάλυτα στα υδατικά συστήματα, εμφανίζουν υψηλή πτητικότητα και η χρήση τους συνήθως περιορίζεται εξαιτίας των έντονων αρωμάτων και γεύσεων που εμφανίζουν (Burt, 2004). Οι ουσίες αυτές λειτουργούν αναστέλλοντας την ανάπτυξη των παθογόνων και καθυστερώντας την παραγωγή τοξινών από τους μικροοργανισμούς (Djordjevic et al., 2018).

Τα οργανικά εκχυλίσματα και τα φυτικά αιθέρια έλαια προτιμώνται καθώς εμφανίζουν μικρότερη τοξικότητα στους ανθρώπους, έχουν μικρό περιβαλλοντικό κόστος και είναι ευρέως αποδεκτά από το κοινό. Για όλους τους παραπάνω λόγους, δεν βρίσκουν εφαρμογή μόνο για επέκταση της ζωής των τροφίμων αλλά και σε φαρμακευτικές εταιρίες και εναλλακτικές θεραπείες.

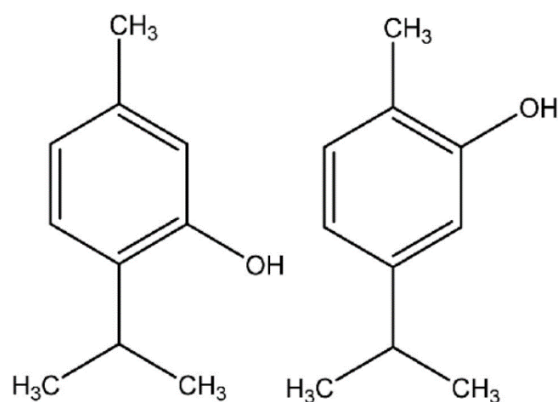
Τα κύρια συστατικά των EO χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα παράγωγα των τεπενίων και τις ενώσεις που προσδίδουν το άρωμα. Τα τεπένια υπάρχουν φυσικώς στα EO και αποτελούν τα κύρια συστατικά στα περισσότερα από αυτά. Για τον σχηματισμό των τεπενίων, χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ένωση ο διφωσφορικός ισοπεντενυλεστέρας. Όλα τα τεπένια περιέχουν έστω μια δομή ισοπρενίου (C_5H_8), όπου επηρεάζει τις δομικές και λειτουργικές του ιδιότητες (Bakkali et al., 2008). Περιέχουν ένα μείγμα από μονοτεπένια ($C_{10}H_{16}$, δύο δομές ισοπρενίου), σεσκιτεπένια ($C_{15}H_{24}$, τρεις δομές ισοπρενίου) και από παράγωγα αυτών. Τα παράγωγα των

μονοτερπενίων και σесκιτερπενίων περιλαμβάνουν κυκλικές και αλειφατικές ομάδες όπως αλκοόλες, εστέρες, φαινόλες, και αλδεΐδες (Kfoury et al., 2019). Το άρωμα των ΕΟ οφείλεται στα παράγωγα του φαινυλοπροπανίου: αλδεΐδες, αλκοόλες, φαινόλες (Bakkali et al., 2008).

Περίπου 160 αιθέρια έλαια θεωρούνται «γενικώς αναγνωρισμένα ως ασφαλή» (“generally recognized as safe”, GRAS) από τον Food and Drug Administration (FDA, Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων, ΗΠΑ) (Prakash et al., 2015). Τα κυριότερα μειονεκτήματα που εμφανίζουν είναι η μικρή διαλυτότητα σε υδατικά συστήματα και η χημική αστάθεια εξαιτίας της πτητικότητάς τους και την οξείδωση που υφίστανται όταν έρχονται σε επαφή με οξυγόνο, αέρα, υγρασία, θέρμανση και επαφή με άλλες ουσίες (Pavela and Benelli, 2016). Όλες οι παραπάνω ιδιότητες, επιφέρουν μειονεκτήματα στη διάρκεια ζωής και στις οργανοληπτικές και βιολογικές ιδιότητες των ΕΟ.

1.1.2. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Η ρίγανη είναι ένα δημοφιλές μπαχαρικό που διανέμεται ευρέως στην Μεσόγειο και στην Ασία (Yi et al., 2016). Προέρχεται από την ποικιλία *Origanum* και τα κύρια συστατικά της είναι οι δύο φαινόλες, η θυμόλη και η καρβακρόλη (Εικόνα 1) που αποτελούν περίπου το 78- 85% του ΟΕΟ και έχουν ισχυρές βιολογικές δράσεις, όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριακές (Gonaris et al., 2010). Πολλές φορές τα μπαχαρικά και ειδικά η ρίγανη χρησιμοποιείται ως αρωματικός παράγοντας στη μαγειρική και κυρίως στα κρέατα. Άλλα συστατικά που περιέχονται στο ΟΕΟ είναι τα μονοτερπένια, οι υδρογονάνθρακες, τα γ-τερπινένια και τα p-κυμένια (Burt, 2004).



Εικόνα 1 Οι δομές της θυμόλης (αριστερά) και της καρβακρόλης (δεξιά) (Hussein A.H. & Said-Al Ahl).

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης έχει χαμηλό μοριακό βάρος και βιοσυντίθεται σε διαφορετικά όργανα του φυτού (Vivek et al., 2012). Το αιθέριο έλαιο ρίγανης (OEO) είναι «γενικώς αναγνωρισμένο ως ασφαλές» (“generally recognized as safe”, GRAS) από τον Food and Drug Administration (FDA, 2012).

Για την απομόνωση του αιθέριου ελαίου, λαμβάνονται αρκετά μέρη του φυτού και εφαρμόζεται ή εκχύλιση με διαλύτες ή απόσταξη με ατμό (Burt, 2004).

1.1.3. Μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης

Η βιολογική δράση των αιθέριων ελαίων έχει αποδοθεί στην παρουσία των χημικών συστατικών τους που βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα, όπως οι φαινολικές ενώσεις και τα τερπένια. Έχει αποδειχτεί ότι τα συστατικά τους που βρίσκονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις δρουν συνεργιστικά στη βιολογική τους δραστηριότητα. Όμως, η συγκέντρωση των χημικών τους συστατικών επηρεάζεται από τον χρόνο συγκομιδής τους, την παρουσία ή την απουσία μεταλλικών στοιχείων, τις συνθήκες του περιβάλλοντος και την περιοχή της καλλιέργειας (Vivek et al., 2012). Επίσης, η αντιμικροβιακή δράση των EO επηρεάζεται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος που βρίσκεται, όπως η θερμοκρασία, το pH και η μικροχλωρίδα που το περιβάλλει (Skandamis, 2000).

Οι έρευνες έχουν αποδείξει ότι η αντιμικροβιακή δράση του OEO οφείλεται στην υδρόφοβη φύση των EO που επιδρά στην λιπιδική μεμβράνη των παθογόνων, με αποτέλεσμα την καταστροφή της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης, τη διαρροή του ενδοκυττάριου περιεχομένου του, τη βλάβη της μορφολογίας των κυττάρων του μικροοργανισμού, τη διαταραχή της ισορροπίας του ATP και την αλλοίωση της σύνθεσης των πρωτεϊνών (Kachur & Suntres, 2020), όπου όλα τα παραπάνω οδηγούν αναπόφευκτα στη θανάτωση του βακτηρίου (Vivek et al., 2012). Γενικά, η παρουσία φαινολών στα EO (υδροξυλομάδα, -OH) είναι αυτή που επιδρά αποτελεσματικά έναντι των παθογόνων βακτηρίων, καθώς αναστέλλει τις λειτουργικές ιδιότητες του κυττάρου και διαρρέουν τα εσωτερικά συστατικά του (Rasooli et al., 2006). Μέσω της διαρροής των συστατικών, απομακρύνονται και τα ιοντικά συστατικά από το κύτταρο, τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πηγή τροφής για το ίδιο (Fisher & Phillips, 2008). Σύμφωνα με τους Skandamis &

Nychas (2001), τα διαφορετικά συστατικά των ΕΟ δεν επιδρούν αντιμικροβιακά μόνο σε μια ορισμένη τοποθεσία αλλά σε διάφορα μέρη του κυττάρου.

Ακόμα, τα πτητικά συστατικά των ΕΟ, έχουν την ικανότητα να συνδέονται με τις πρωτεϊνικές δομές του κυττάρου. Η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων περιέχει ενζυματικές πρωτεΐνες που διατηρούν τις λειτουργικές ιδιότητες του κυττάρου. Η ένωση των πρωτεϊνών με τα πτητικά των ΕΟ, οδηγεί στην διαπερατότητα των κυτταρικών οργανιδίων, στην αναστολή της δράσης των ενζυματικών πρωτεϊνών και συνεπώς στην αναστολή των φυσιολογικών λειτουργιών του κυττάρου (Vivek et al., 2012).

1.1.4. Εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων

Η βιομηχανία των τροφίμων, παρόλο που διαθέτει μεγάλη ποικιλία ουσιών που λειτουργούν ως συντηρητικά, αναζητάει συνεχώς ουσίες που θα είναι ευρέως αποδεκτές από τους καταναλωτές και ταυτόχρονα να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση (Mead et al., 1999). Επίσης, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αποκτούν αντοχή στα ήδη χρησιμοποιούμενα χημικά συντηρητικά, ενώ τα συντηρητικά που παραμένουν αποτελεσματικά έναντι των παθογόνων, ενίοτε δημιουργούν παρενέργειες (Vivek et al., 2012).

Σύμφωνα με τον Burt (2004), περίπου τρεις χιλιάδες αιθέρια έλαια, που έχουν αντιμικροβιακή δράση, χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία που επίσης προσδίδουν στην γεύση και το άρωμα.

1.1.5. Εγκλεισμός αιθέριων ελαίων

1.1.5.1. Γενικά

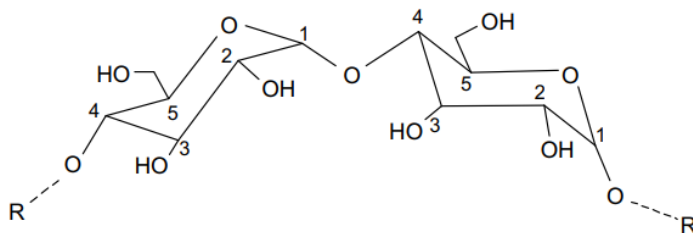
Γενικά τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από υψηλή πτητικότητα και μικρή αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες, για αυτό το λόγο χρειάζονται ένα σύστημα εγκλεισμού (Abarca et al., 2016). Τα συστήματα που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον εγκλεισμό των ΕΟ είναι γαλακτώματα, λιποσώματα, κάψουλες, βιοενεργά φιλμ, νανομεταφορείς και συστήματα εγκλεισμού (Crini G, 2014).

Η ενθυλάκωση είναι μια τεχνική για τον εγκλεισμό βιοενεργών ουσιών σε έναν φορέα και αποτελεί πολύτιμη διαδικασία για την βελτίωση της μεταφοράς των βιοενεργών μορίων και της

ελεγχόμενης απελευθέρωσης τους. Ο φορέας της ενθυλάκωσης, όπως και η μέθοδος της ενθυλάκωσης, είναι σημαντικοί παράγοντες που θα πρέπει να εξεταστούν προσεκτικά, πριν την επιλογή τους (Mahdavi et al., 2022).

1.1.5.2. Κυκλοδεξτρίνες (Cyclodextrins, CD)

Οι κυκλοδεξτρίνες (CDs) είναι κυκλικά ολιγομερή της α -D- γλυκοπυρανόζης και παράγονται από το άμυλο μέσω της επίδρασης του βακτηρίου *Bacillus macerans* (Qi et al., 2007). Ειδικότερα, η κυκλική δομή προκύπτει από τον γλυκοζιτικό δεσμό οξυγόνου μεταξύ των γλυκοπυρανοζών (Εικόνα 2), που αποτελούν την δεξτρίνη.



Εικόνα 2 Ο γλυκοζιτικός δεσμός α - (1,4) μεταξύ δύο μορίων γλυκοπυρανόζης, προς παραγωγή δεξτρίνης (Astray et al., 2009).

Στην αρχή οι CDs θεωρούνταν δηλητηριώδεις ουσίες, αλλά σε εκτενέστερες έρευνες που ακολούθησαν αποδείχτηκε ότι όχι μόνο δεν είναι δηλητηριώδεις αλλά είναι και χρήσιμες για την διατήρηση γεύσεων, φυσικών χρωμάτων και βιταμινών (Astray et al., 2009).

Οι CDs παρουσιάζουν ένα τρισδιάστατο σχήμα με μια κοιλότητα, εμφανίζοντας διαφορετικές πολικότητες στην εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια (Ho et al., 2017). Οι κύριες και οι δευτερεύουσες υδροξυλικές ομάδες είναι τοποθετημένες σε ένα στενό και σε έναν ευρύτερο δακτύλιο, αντίστοιχα (Franzini et al., 2018). Οπότε με αυτή τη δομή, τα κύρια υδροξύλια μπορούν να περιστρέφονται και να μειώνουν το δακτύλιο της κυκλοδεξτρίνης και τα δευτερεύοντα υδροξύλια σχηματίζουν την ακαμπτότητα της CD (Przybyla et al., 2020). Χάρη σε αυτήν την ιδιαίτερη δομή, οι CDs μπορούν να εγκλείσουν μόρια «επισκέπτες», δημιουργώντας ένα σύστημα ενθυλάκωσης (inclusion complex) (Cid-Samamed et al., 2022).

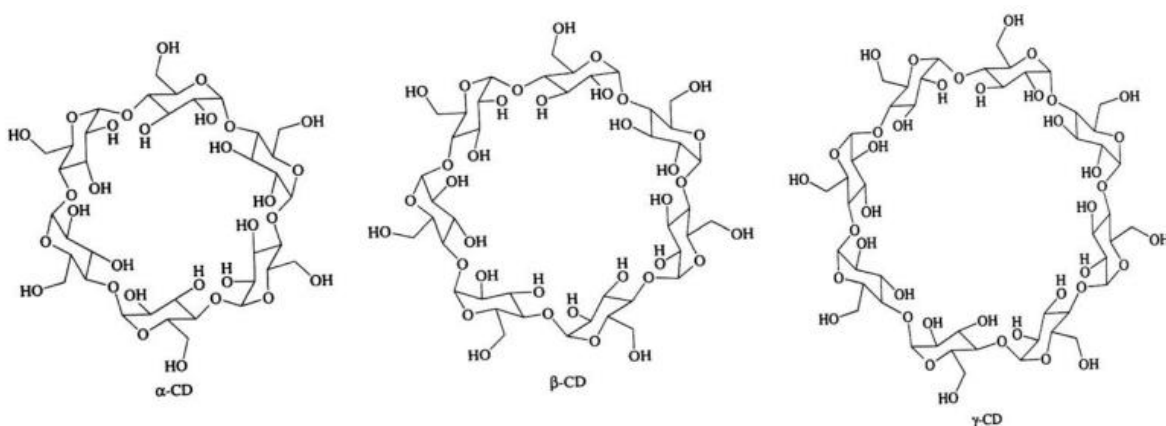
Τα μόρια που μπορούν να εγκλείσουν είναι είτε πολικά, όπως αλκοόλες, οξέα, αμίνες και μικρές ανόργανες ενώσεις είτε μη πολικά όπως αρωματικοί και αλειφατικοί υδρογονάνθρακες (Harriot, Tilloy, & Monflier, 2006), όπως είναι το αιθέριο έλαιο ρίγανης.

Όπως αναφέρεται από τους Cheirsilp & Rakmai (2016), το σύστημα ενθυλάκωσης παρατηρείται εξαιτίας των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του τοιχώματος της κοιλότητας των CDs και των μορίων «επισκεπτών». Ταυτόχρονα, μεταξύ τους δημιουργούνται και δυνάμεις διπόλου-διπόλου και αλληλεπιδράσεις Van der Waals.

1.1.5.3. β-κυκλοδεξτρίνες

Οι ιδιότητες των CDs βελτιώνονται μέσω της σύνθεσης των παραγώγων τους, καθώς αυξάνεται η διαλυτότητα τους σε νερό, ενισχύεται η δυνατότητα ενθυλάκωσης και μειώνεται η τοξικότητα που μπορεί να εμφανίσουν (da Silva Júnior, de Oliveira Pinheiro et al., 2017).

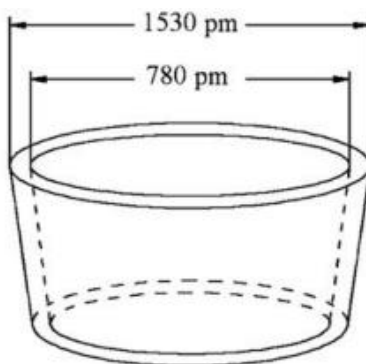
Τα συνήθη παράγωγα των κυκλοδεξτρινών που χρησιμοποιούνται είναι οι α-CDs, β-CDs, γ-CDs, που αποτελούνται από έξι, επτά και οχτώ δακτυλίους γλυκοπυρανόζης, αντίστοιχα (Εικόνα 3). Η απομόνωση των α- και γ-CDs, εξαιτίας του μεγάλου χρόνου και δυσκολίας παραγωγής τους, έχουν αυξημένο κόστος παραγωγής και για αυτό το λόγο κυρίως χρησιμοποιούνται οι β-CDs (Astray et al., 2009). Επίσης, οι β-CDs εμφανίζουν μεγαλύτερη συμβατότητα με το ανθρώπινο σώμα και συμμετέχουν σε απλούστερες αντιδράσεις (dos Santos et al., 2017).



Εικόνα 3 Οι δομές των α-CDs, β-CDs, γ-CDs (Astray et al., 2009).

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, οι α -, β -, και γ -CDs είναι «γενικώς αναγνωρισμένες ως ασφαλείς» (“generally recognized as safe”, GRAS) από τον Food and Drug Administration (FDA, USA) από το 1998 (Braga et al., 2021).

Οι β -CDs (Εικόνα 4) είναι μόρια σε σχήμα κώνου που αποτελούνται από ολιγοσακχαρίτες και είναι υδρόφιλα στην εξωτερική επιφάνεια (εξαιτίας των πολλών υδροξυλομάδων) και υδρόφοβα στην κοιλότητα (Kfoury et al., 2019).



Εικόνα 4 Οι γεωμετρικές διαστάσεις των β -CDs.

Οι β -CDs έχουν την απόλυτη συμμετρία, ενώ οι α - και γ -CDs έχουν μια πιο διαστρεβλωμένη δομή. Επίσης, οι β -CDs έχουν μια πιο άκαμπτη δομή, καθώς σχηματίζουν περισσότερους δεσμούς υδρογόνου, γεγονός όμως που τις καθιστά τις λιγότερο υδατοδιαλυτές από όλες τις CDs (Astray et al., 2009).

1.1.5.4. Ιδιότητες

Μέσω των συστημάτων ενθυλάκωσης, επιτυγχάνεται η τροποποίηση των ιδιοτήτων των ενθυλακωμένων μορίων. Η δομή των β -CDs, τις καθιστούν εξαιρετικούς μεταφορείς υδρόφοβων ουσιών, όπως είναι τα αιθέρια έλαια, καθώς μέσω της ενθυλάκωσής τους, το σύστημα ενθυλάκωσης καθίσταται πλέον υδατοδιαλυτό. Το συγκεκριμένο οφείλεται στην υδρόφιλη εξωτερική επιφάνεια των β -CDs (Ghorbanzade et al., 2022). Επίσης, επιτυγχάνεται σταθερότητα των εγκλεισμένων μορίων έναντι επικίνδυνων παραγόντων του περιβάλλοντος, όπως: οξείδωση, επαφή με τον αέρα και τη θερμότητα (Astray et al., 2009). Επιπλέον, αναστέλλεται η παραγωγή τοξικών ισομερών των ΕΟ, μειώνοντας της επαφή τους με τον αέρα, με ιόντα και με απευθείας

επαφή με το φως (Szejtli & Szente, 2005). Οι παραπάνω ιδιότητες είναι χρήσιμες, ειδικά για το ΕΟ ρίγανης το οποίο εμφανίζει μεγάλη πτητικότητα και θερμοευαισθησία (Abarca et al., 2016).

Σύμφωνα με έρευνα των Matencio et al. (2020), οι CDs μπορούν να εμφανίσουν πολλά πλεονεκτήματα, όπως σταθερότητα σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες, να ελαχιστοποιήσουν τις ανεπιθύμητες οσμές και γεύσεις, να επικαλύψουν το χρώμα των ενθυλακωμένων ουσιών, να ελέγξουν τις χημικές αντιδράσεις και την απελευθέρωση των μορίων.

Τα συστήματα εγκλεισμού σε CDs, δεν επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων καθώς δεν διαπερνούν τις υδροφοβικές μεμβράνες μέσω παθητικής διάχυσης, δεδομένου ότι οι CDs είναι μεγάλοι ολιγοσακχαρίτες και διαθέτουν πολλούς δεσμούς υδρογόνου, δέκτες και δότες (Kurkov & Loftsson, 2013). Επίσης, τα ενθυλακωμένα συστήματα με CDs βελτιώνουν την πρόσβαση των ενεργών συστατικών (ΕΟ) στην περιοχή δράσης τους (Kurkov & Loftsson, 2013). Συνεπώς, απαιτείται μικρότερη ποσότητα της ενεργής ουσίας για να επιτευχθεί η επιθυμητή δράση. Πολλές μελέτες έχουν προσπαθήσει να αξιολογήσουν την επίδραση του εγκλεισμού στις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων (Hill et al., 2013, Kurkov & Loftsson, 2013).

Από έρευνες των Kfoury et al. (2019) για την ενθυλάκωση ΕΟ σε CDs, προέκυψε ότι βελτιώθηκε η αντιμικροβιακή δράση των ΕΟ μειώνοντας την απαιτούμενη συγκέντρωση τους και αυξήθηκε η αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων, καθώς μέσω της αύξησης της διαλυτότητας, αυξάνεται η επιφάνεια επαφής μεταξύ του ΕΟ και του μικροοργανισμού. Τα αιθέρια έλαια μπορούν επίσης να συνδεθούν με τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες και με αυτό το τρόπο μειώνεται η διαθεσιμότητά τους (Tao et al., 2014), όμως οι CDs μπορούν να μειώσουν αυτές τις αλληλεπιδράσεις και να διατηρήσουν τις ανασταλτικές ιδιότητες των ΕΟ. Υπάρχει η πιθανότητα όμως, το σύστημα ενθυλάκωσης να δράσει υπέρ της αύξησης των παθογόνων καθώς μπορεί οι κυκλοδεξτρίνες να δράσουν ως πηγή υδρογονανθράκων για τα παθογόνα βακτήρια (Ayala-Zavala et al., 2008).

1.1.5.5. Μέθοδος παρασκευής συστημάτων ενθυλάκωσης

Για την επιλογή της μεθόδου παρασκευής συστημάτων ενθυλάκωσης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν τρεις παράγοντες: η σταθερότητα και η διαλυτότητα του συστήματος και η απελευθέρωση του ΕΟ (Kfoury et al., 2019).

Συστήματα κυκλοδεξτρίνης-ΕΟ μπορούν να αποκτηθούν με πολλές τεχνικές, όπως συν-κατακρήμιση (co-precipitation), λυοφιλίωση (freeze-drying), ξήρανση με ψεκασμό (spray-drying), συν-άλεσμα (co-grinding), συν-εξάτμιση (co-evaporation), σφράγιση με θέρμανση (sealed-heating) και ενθυλάκωση με μικροκύματα (microwave-assisted encapsulation) (Kfoury et al., 2019). Τα συστήματα ενθυλάκωσης μπορούν να παρασκευαστούν είτε σε εργαστηριακή είτε σε βιομηχανική κλίμακα. Κατά την παρασκευή, παράμετροι όπως η θερμοκρασία, ο χρόνος και η ταχύτητα ανάμιξης, η φύση της β-CD και των διαλυτών και η μέθοδος ξήρανσης πρέπει να βελτιστοποιηθούν για την επίτευξη του καλύτερου αποτελέσματος. Συνεπώς, η μέθοδος που θα επιλεγεί πρέπει να ικανοποιεί τις παραπάνω παραμέτρους και ταυτόχρονα να είναι απλή, γρήγορη, με χαμηλό κόστος και να παρέχει το επιθυμητό τελικό αποτέλεσμα (Hernández-Sánchez et al., 2017).

Μια από τις πιο συχνά εφαρμοσμένες μεθόδους για την ενθυλάκωση μορίων σε κυκλοδεξτρίνες είναι η μέθοδος της συν-κατακρήμισης (co-precipitation), όπου είναι κατάλληλη για τον εγκλεισμό μη υδατοδιαλυτών ουσιών (Cheirsilp and Rakmai, 2016). Σύμφωνα με τους Jiang et al. (2019), συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης για να παραληφθεί το σύστημα ενθυλάκωσης, παρόλα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι οργανικοί διαλύτες (διαιθλαιθέρας ή βενζόλιο). Εν συνεχεία, το διάλυμα κρυώνει, κρυσταλλώνει και πραγματοποιείται η ενθυλάκωση. Η απλότητα και η μεγάλη αποδοτικότητα της μεθόδου της συν-κατακρήμισης την καθιστά μια από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους που χρησιμοποιείται (Jiang et al., 2019).

1.1.5.6. Εφαρμογή στα τρόφιμα

Στον κλάδο των τροφίμων, η ενθυλάκωση αντιμικροβιακών ουσιών σε κυκλοδεξτρίνες, μπορεί να έχει εφαρμογή στην ανάπτυξη ενεργούς αντιμικροβιακής συσκευασίας (Karpetanakou & Skandamis, 2016, Abarca et al., 2016). Τα ΕΟ μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ενεργή

συσκευασία είτε ως αρωματικά πρόσθετα, είτε ως βιοενεργές ουσίες. Όταν τα ΕΟ εφαρμόζονται σε συστήματα ενθυλάκωσης με β-CDs, μπορούν να απελευθερώνονται σταδιακά μέσα στο προϊόν (Martina et al., 2013). Η απελευθέρωση μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες αλλά κυρίως από τη σχετική υγρασία και τη θερμοκρασία (Yang et al., 2015).

1.1.6. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά εγκλεισμένων αιθέριων ελαίων σε β-κυκλοδεξτρίνες

Το μέγεθος, η κατανομή του μεγέθους και το ζ-potential των εγκλεισμένων σωματιδίων της β-κυκλοδεξτρίνης ορίζουν την ικανότητά τους να χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές εφαρμογές, καθώς επίσης, αποτελούν τις βασικές παραμέτρους για το χαρακτηρισμό των εγκλεισμένων σε β-κυκλοδεξτρίνη σωματιδίων (Kotronia et al., 2017).

1.1.6.1. Ζήτα δυναμικό (ζ-potential)

Το ζ-potential είναι μια φυσική παράμετρος που εμφανίζεται σε κάθε σωματίδιο που βρίσκεται σε εναιώρημα, μακρομόριο ή σε επιφάνεια υλικού. Χρησιμοποιείται για να βελτιστοποιήσει τον σχηματισμό των εναιωρημάτων, των γαλακτωμάτων και των πρωτεϊνικών διαλυμάτων. Η απόλυτη τιμή του καθορίζεται από τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων. Όσο πιο πολλές είναι οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των σωματιδίων, τόσο μικρότερη είναι η πιθανότητα να σχηματιστούν συσσωματώματα, άρα το διάλυμα εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα (Danaei et al., 2018).

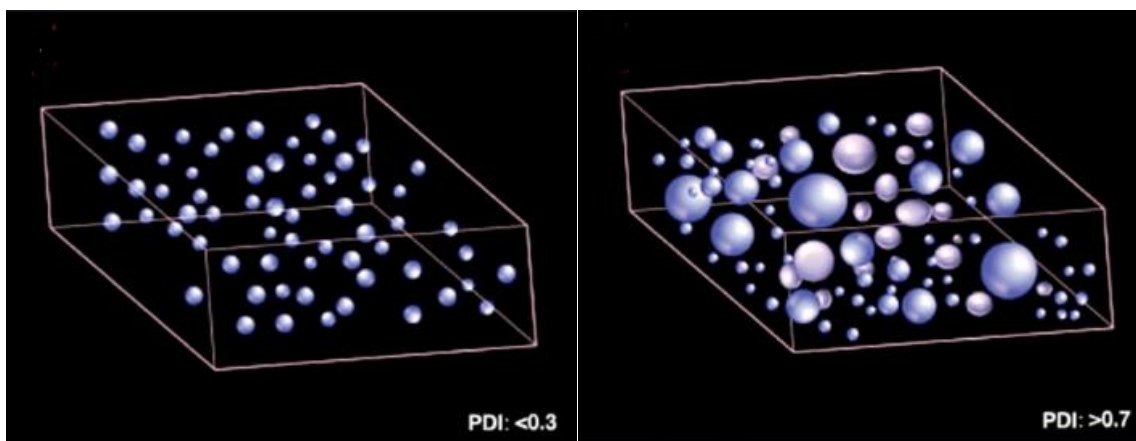
1.1.6.2. Μέγεθος σωματιδίων

Το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζει τη φύση και τις ιδιότητές τους, όπως είναι τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και τη βιονεργή τους δράση κατά τη μεταφορά τους και την απελευθέρωσή τους (Kohane, 2007).

1.1.6.3. Κατανομή μεγέθους σωματιδίων

Το μέγεθος των σωματιδίων δεν αποτελεί τον κύριο παράγοντα που ορίζει τις εφαρμογές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα σωματίδια. Η κατανομή των σωματιδίων αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα. Η κατανομή των σωματιδίων (polydispersity index, PDI) είναι ένα μέτρο της ομοιόμορφης κατανομής του μεγέθους των σωματιδίων που εμφανίζουν σε ένα διάλυμα. Για

τα συστήματα μονοδιασποράς, ο δείκτης κατανομής σωματιδίων παίρνει τιμές από μηδέν έως ένα (0-1), ενώ τα συστήματα πολυδιασποράς εμφανίζουν τιμές μεγαλύτερες του ένα (1). Οι τιμές προς το μηδέν προσδιορίζουν τις ομοιόμορφες κατανομές, ενώ οι τιμές προς το ένα, προσδιορίζουν την ανομοιόμορφη κατανομή και το διαφορετικό μέγεθος των επιμέρους σωματιδίων (Εικόνα 5). Συνεπώς, οι επιθυμητές τιμές κυμαίνονται πλησίον του μηδέν (Danaei et al., 2018).



Εικόνα 5 Απεικόνιση ομοιόμορφης (δεξιά) και ανομοιόμορφης (αριστερά) κατανομής σωματιδίων (Danaei et al., 2018)

1.2. Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp.

Ο μικροοργανισμός *Salmonella* spp. ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηρίων (Enterobacteriaceae) (Εικόνα 6). Η κατανάλωση ωμού κρέατος ενέχει μεγάλο κίνδυνο για μόλυνση από τροφιμογενείς παθογόνους, ένας εκ των οποίων είναι η *Salmonella* spp. (Djordjevic et al., 2018).

Τα εντεροβακτήρια βρίσκονται στο περιβάλλον (έδαφος και νερό) και αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροβιολογικής χλωρίδας του εντέρου των ανθρώπων και των ζώων. Ορισμένα μέλη της οικογένειας, όπως τα είδη που ανήκουν στα γένη *Shigella*, *Salmonella* και *Yersinia pestis*, είναι πάντοτε παθογόνα για τον άνθρωπο. Άλλα είδη όπως τα *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, ενώ αποτελούν μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας του ανθρώπου, μπορούν να προκαλέσουν ευκαιριακές λοιμώξεις (Matsagkos, 2007).



Εικόνα 6 Απεικόνιση των βακτηρίων της *Salmonella* spp.

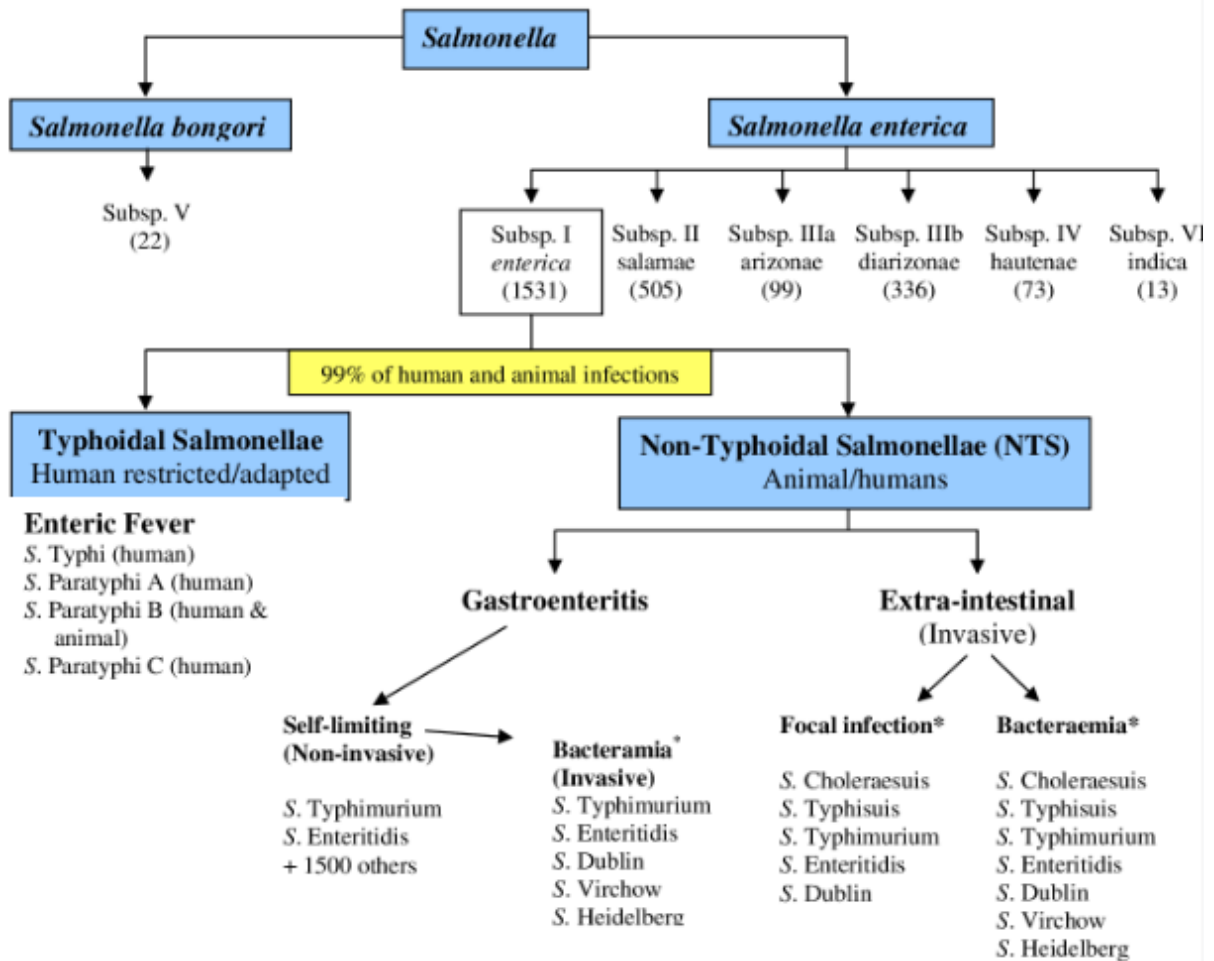
1.2.1. Ιστορικά στοιχεία

Το βακτήριο *Salmonella* spp. απομονώθηκε πρώτη φορά από τον χειρουργό κτηνίατρο Daniel E. Salmon το 1884 από έντερα χοιρινού, από τον οποίο έλαβε αργότερα και το όνομα του (Salmon & Smith, 1885). Την εποχή που απομονώθηκε πρώτη φορά ονομαζόταν “*Bacillus choleraesuis*” και το 1900, το όνομα άλλαξε σε “*Salmonella choleraesuis*”.

Στην Ευρώπη, ένα πολυεθνικό ξέσπασμα σαλμονέλας συνέβη το 2008, το οποίο συνδέεται με προϊόντα κρέατος, συμπεριλαμβανομένων των πουλερικών. Από αυτήν την επιδημία καταγράφηκαν τουλάχιστον 119 περιπτώσεις νόσησης, οι οποίες σημειώθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο, την Ιρλανδία και τη Φινλανδία (Keklik et al., 2010).

1.2.2. Ταξινόμηση και ονοματολογία

Στις μέρες μας, το γένος της *Salmonella*, χωρίζεται σε δύο είδη: *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*. Το πρώτο είδος χωρίζεται με τη σειρά του σε έξι υποείδη: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hautenae*, *indica* και τα περισσότερα στελέχη που ανιχνεύονται ανήκουν στο είδος *S. enterica*, υποείδος *enterica* (Εικόνα 7). Το υποείδος *enterica* οφείλεται για το 99% των τροφιμογενών νοσημάτων από *Salmonella* (Morasi et al., 2022). Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί περισσότεροι από 2400 ορότυποι ζωονοσογόνου και η συχνότητα εμφάνισής τους ποικίλει σημαντικά (Δ/ση Υγείας των Ζώων, Τμήμα Ζωοανθρωπονόσων, 2010).



Εικόνα 7 Η ταξινόμηση του γένους της *Salmonella* spp. (Beyene, 2008)

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες για την ανθρώπινη σαλμονέλωση, η *S. Enteritis*, φαίνεται να είναι ο κυρίαρχος επικίνδυνος ορότυπος στην Ευρώπη, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας (WHO, 2002, EFSA, 2007).

1.2.3. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

Η οικογένεια των Εντεροβακτηρίων (*Enterobacteriaceae*) αφορά αρνητικά κατά Gram βακτήρια, άσπορα, κινητά ή ακίνητα βακτηρίδια, διαστάσεων 0,6 x 2μm. Κινούνται με περίτριχες βλεφαρίδες, χωρίς έλυτρο. Εξάιρεση αποτελούν οι *S. typhi*, *S. paratyphi* και *S. dublin* που παράγουν ειδικό περίβλημα σαν έλυτρο, καθώς και οι *S. gallinarum*, *S. pullorum*, που είναι βακτήρια ακίνητα και δύσκολα διαφοροποιούνται από το *E. coli*, τόσο στο μικροσκόπιο, όσο και σε καλλιέργεια (Matsagkos, 2007).

1.2.4. Βιοχημικά χαρακτηριστικά

Η οικογένεια των βακτηρίων *Salmonella* χαρακτηρίζονται από μεγάλη ομοιογένεια όσον αφορά στις βιοχημικές ιδιότητες. Βασικά χαρακτηριστικά με τα οποία η *Salmonella* διαχωρίζεται από τα άλλα μέλη της οικογένειας των εντεροβακτηρίων είναι η κινητικότητα, η παραγωγή H₂S, η διάσπαση της γλυκόζης με παραγωγή αερίου (εξαιρείται η *S. typhi*), η μη διάσπαση της λακτόζης και η ανάπτυξη σε υλικό που περιέχει ως μόνη πηγή άνθρακα το κιτρικό νάτριο. Αναπτύσσονται αεροβίως και προαιρετικά αναεροβίως. Επίσης, μπορούν να ζυμώσουν τη γλυκόζη με ή χωρίς παραγωγή αερίου και να ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη (Matsagkos, 2007).

Τα βακτήρια μπορούν να παράγουν εξωκυτταρικά πολυμερή, τα οποία τους βοηθάνε να προσκολλώνται το ένα πάνω στο άλλο και στη συνέχεια να προσκολληθούν πάνω στις επιφάνειες των φορέων (βιολογικών ή μη βιολογικών). Αυτές οι παραγόμενες βακτηριακές αποικίες που συνδέονται με τα πολυμερή, ονομάζονται βιοϋμένια (Zhao et al., 2017). Τα βιοϋμένια μειώνουν την ευαισθησία των βακτηρίων έναντι του περιβάλλοντος και δεν αφαιρούνται εύκολα με τις παραδοσιακές μεθόδους αποστείρωσης, το οποίο οδηγεί σε μεγαλύτερη επιμόλυνση και δημιουργεί μεγάλο ρίσκο για την ασφάλεια των τροφίμων (Karamproula et al., 2019). Από τη στιγμή που το βιοϋμένιο σχηματίζεται πάνω στην επιφάνεια με την οποία έρχεται σε επαφή το τρόφιμο, όπως είναι οι επιφάνειες κοπής και οι μεταφορικές ταινίες, τότε μπορούν να σχηματιστούν σημαντικά προβλήματα διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Liu et al., 2022).

1.2.5. Πηγές μίανσης

Η *Salmonella* spp. σχετίζεται κυρίως με τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Όσον αφορά τις *S. typhi* και *S. paratyphi*, πηγή μόλυνσης αποτελούν τα άρρωστα άτομα και το νερό. Όσον αφορά τις ζωνοσογόνους σαλμονέλες, αυτές δηλαδή που μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο, πηγή μόλυνσης αποτελούν τα προϊόντα ζωικής προέλευσης που προέρχονται από μολυσμένα με *Salmonella* ζώα και κυρίως τα αυγά και το κρέας των πουλερικών και κατά δεύτερο λόγο το χοιρινό και βοδινό κρέας, το γάλα και προϊόντα του, καθώς και όλα τα τρόφιμα που επιμολύνονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας ή συντήρησής τους (όταν δεν τηρούνται οι κατάλληλες θερμοκρασίες αποθήκευσης των τροφίμων ή στις περιπτώσεις που τα τρόφιμα δεν έχουν μαγειρευτεί επαρκώς) (Zahariadis, 2009).

1.2.6. Επιδημιολογικά στοιχεία

Η *Salmonella* spp. είναι ένα από τα πιο συνηθισμένα παθογόνα βακτήρια που σχετίζονται με τροφογενείς λοιμώξεις. Η σαλμονέλωση, είναι η λοίμωξη που προκαλείται από αυτό το βακτήριο και έχει καταγραφεί να προσβάλει περίπου 40.000 άτομα στις ΗΠΑ τον χρόνο (CDC, 2005). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, για το 2006 αναφέρθηκαν 160.649 επιβεβαιωμένα κρούσματα με ποσοστό εμφάνισης 34.6 περιπτώσεων ανά 100.000 πληθυσμού. Υπήρξε ωστόσο μείωση κατά 7.6% σε σχέση με το 2005. Οι *S. enteritidis* και *S. typhimurium* αναφέρονται πιο συχνά στις περιπτώσεις αυτές. Άτομα των ηλικιών 0-4 και 5-14 ετών αποτελούν την πλειονότητα των περιστατικών (Zahariadis, 2009).

Η συγκεκριμένη λοίμωξη προκαλεί συμπτώματα όπως πυρετό, κοιλιακό άλγος, διάρροια, ναυτία και έμετο, ενώ τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα παρουσιάζουν ταχεία εξέλιξη σε σηψαιμία που μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο (Nagaraja, & Murugan, 2020). Στα άτομα που νοσούν με σαλμονέλωση, η μόλυνση διασπείρεται σε πολλά σημεία του σώματος και απαιτείται χρήση αντιβιοτικών για την καταπολέμησή της (Humphrey & Jorgensen, 2006).

1.2.7. Παράγοντες μικροβιακής ανάπτυξης και επιβίωσης

Η ευνοϊκότερη θερμοκρασία ανάπτυξης της *Salmonella* είναι οι 37°C, αλλά έχει βρεθεί ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί και να επιβιώσει στο θερμοκρασιακό εύρος από 10- 45°C. Ο παθογόνος θανατώνεται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60°C και για διάρκεια 15-20 min (Ryan et al., 2017).

Το εύρος τιμών pH 6.50-7.50 αποτελεί το ευνοϊκότερο για την ανάπτυξη της *Salmonella*, ενώ επιβιώνει στις τιμές pH 4.00-9.00 (Morasi et al., 2022).

Η ενεργότητα ύδατος (a_w) του τρόφιμου αποτελεί σημαντικό παράγοντα για τη σταθερότητα και την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Η ενεργότητα ύδατος μπορεί να οριστεί ως η αναλογία της πίεσης υδρατμών του τρόφιμου και της πίεσης υδρατμών του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία (FDA, 2014). Η χαμηλότερη τιμή ενεργότητας ύδατος για την ανάπτυξη του παθογόνου έχει καταγραφεί ως η 0.94, αλλά ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει και σε

χαμηλότερες τιμές ενεργότητας ύδατος (Jay et al, 2005), καθώς έχει ανιχνευτεί από τους Morasi et al. (2022).

1.3. Κατίκι Δομοκού και Γαλοτύρι

Το γαλοτύρι και το κατίκι είναι λευκά, απαλά τυριά που ανήκουν στα παραδοσιακά ελληνικά προϊόντα. Η μέγιστη περιεχόμενη υγρασία δεν πρέπει να ξεπερνάει το 75% και το ελάχιστο λίπος επί ξηρού το 40% (Katsiari, 2008).

Το κατίκι είναι ένα κρεμώδες λευκό τυρόπηγμα με απαλή ξινή και αλμυρή γεύση που παρασκευάζεται από κατσικίσιο γάλα ή από συνδυασμό αιγοπρόβειου γάλακτος. Είναι παραδοσιακό προϊόν με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ) και παρασκευάζεται κυρίως στον Δομοκό της Κεντρικής Ελλάδας. Τα τελικά χαρακτηριστικά του προϊόντος είναι: υγρασία 75%, λίπος σε ξηρή ύλη 40%, πρωτεΐνη 8.8%, αλάτι 1.5-2%, pH 4.3-4.5 (Panagou, 2008).

Το γαλοτύρι θεωρείται ένα από τα παλιότερα παραδοσιακά τυριά με ΠΟΠ στην Ελλάδα και έχει γεωγραφική προέλευση από την Ήπειρο και τη Θεσσαλία. Παράγεται από ωμό ή παστεριωμένο γάλα (πρόβειο ή κατσικίσιο ή μείγμα τους σε διάφορες αναλογίες) με ή χωρίς συμπλήρωμα καλλιέργειας εκκίνησης και πυτιά (Rogga et al., 2005).

1.4. Κιμάς

Κιμάς ορίζεται ως το κρέας χωρίς οστά, το οποίο έχει υποστεί άλεσμα σε τεμάχια και περιέχει αλάτι σε ποσοστό μικρότερο του 1.00% (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) Αριθ. 853/2004). Ο χοιρινός και ο μοσχαρίσιος κιμάς καταναλώνονται ευρέως στην Ευρώπη. Η άλεση του κιμά, αποτελεί μια επίφοβη διαδικασία, καθώς επιτρέπει τη μετανάστευση των παθογόνων βακτηρίων σε όλο το προϊόν. Συνεπώς απαιτείται η προσεκτική μεταχείρισή του κατά τη συντήρηση και τη μεταφορά του σε χαμηλές θερμοκρασίες (Djordjevic et al., 2018).

Τα βακτήρια που φυσιολογικά υπάρχουν στον πρόσφατα αλεσμένο κιμά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση είναι τα γένη *Pseudomonadas*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Micrococcus* και *Acinetobacter*. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύονται τα βακτήρια *Enterobacter*,

Citrobacter, *Bacillus*, *Serratia*, *Proteus* and *Flavobacterium* (Narasimha Rao et al., 1988). Ο αριθμός των μικροοργανισμών στον κιμά, συμπεριλαμβανομένων και των βακτηρίων, εξαρτάται από τους ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, όπως το pH, η μορφολογία της επιφάνειας του κρέατος, η διαθεσιμότητα του οξυγόνου, η θερμοκρασία και η παρουσία και ανάπτυξη της υπόλοιπης μικροχλωρίδας. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο του κρέατος, είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που καθορίζουν τη διάρκεια ζωής του κιμά. Η αλλοίωση των προϊόντων γίνεται αντιληπτή είτε μέσω των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του, είτε μέσω μικροβιακής ανάλυσης. Στο προϊόν του κιμά, μικροβιακή αλλοίωση θεωρείται όταν ο πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας υπερβαίνει τους 7 log CFU/g (Blixt and Borch, 2002).

Έρευνες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή του ΟΕΟ στα προϊόντα κρέατος βρέθηκε αποτελεσματική στην αναστολή της μικροχλωρίδας που προκαλεί αλλοιώσεις (Skandamis and Nychas, 2001).

Η βιομηχανία των τροφίμων έχει αρκετούς τρόπους αντιμετώπισης των παθογόνων βακτηρίων. Η συντήρηση του κιμά σε αναερόβιες συνθήκες (Vacuum Packaging, VP) ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified atmosphere, MAP), μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, καθυστερεί την υποβάθμιση του χρώματος του προϊόντος και διατηρεί την οσμή του φρέσκου. Επίσης, καταστέλλεται η ανάπτυξη των ψευδομονάδων και συνεπώς των ανεπιθύμητων παραγόντων τους που όμως ταυτόχρονα οδηγεί στην ανάπτυξη της υπόλοιπης μικροχλωρίδας του κιμά (Djordjevic et al., 2018).

1.5. Παρουσία της *Salmonella* spp. σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

1.5.1. Σε γάλα και τυριά

Η κατανάλωση ωμού γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων, χωρίς την απαραίτητη θερμική κατεργασία, συνδέεται με την εμφάνιση επιδημιών από τρόφιμα, συγκεκριμένα από παθογόνα όπως *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* και *Bacillus cereus* (Bierbaum et al., 2021). Ανήκουν στην κατηγορία των προϊόντων που λαμβάνουν λιγότερη προσοχή, έλλειψη πρακτικών υγιεινής κατά το χειρισμό και την επεξεργασία και επομένως θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως πιθανές πηγές μόλυνσης από *Salmonella* (Elafify et al., 2019).

Η μη τυφοειδής *Salmonella* συμπεριλαμβανομένου και του ορότυπου *Typhimurium* αποτελούν κορυφαίους παράγοντες γαστρεντερικών λοιμώξεων παγκοσμίως και συνεχίζουν να αποτελούν σημαντικό μολυσματικό παράγοντα του γάλακτος και των γαλακτοκομικών προϊόντων (Fusco and Quero, 2014)

1.5.2. Σε κρέας και κιμά

Παρόλα τα μέτρα που έχουν ληφθεί για την καταπολέμηση των τροφιμογενών παθογόνων, ακόμα παραμένουν ένα σημαντικό οικονομικό και υγειονομικό θέμα. Η αντιμετώπιση της *Salmonella* spp. αποτελεί πρόβλημα και για την σύγχρονη κοινωνία, καθώς είναι το δεύτερο σε εμφάνιση τροφογενές παθογόνο. Σύμφωνα με πρόσφατες ευρωπαϊκές αναφορές, τα τρόφιμα που δεν συμμορφώνονται με τα μικροβιολογικά όρια της *Salmonella*, είναι κυρίως ο κιμάς και τα παρασκευάσματα του κιμά (EFSA). Ο κιμάς μπορεί να μολυνθεί με *Salmonella*, κατά τις διαδικασίες σφαγής, αφαίρεσης των οστών ή κατά τη διάρκεια της άλεσης, της μεταφοράς, της αποθήκευσης και κατά την οικιακή χρήση, μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης (Miya et al., 2014).

Τα αυγά και τα πουλερικά αποτελούν τις πιο σημαντικές πηγές μίανσης της *Salmonella*. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι ένα μεγάλο μέρος τροφίμων αποτελούν μεταφορείς του παθογόνου, ειδικότερα τα κρέατα (Greig and Ravel, 2009). Τα παράγωγα τροφίμων από τις βιομηχανίες κρεάτων είναι τα πιο επιρρεπή στην ανάπτυξη της *Salmonella*, ειδικότερα της *S. Enteritis* (AMI, 2004).

Επίσης, ο κιμάς είναι περισσότερο επιρρεπής σε μικροβιακή αλλοίωση, καθώς κατά τη διαδικασία της άλεσης διαρρηγνύεται η δομή της κυτταρικής μεμβράνης και απελευθερώνονται υγρά ιστών και καθιστούν τον κιμά ένα πολύ ενεργό μέσο ανάπτυξης και επιβίωσης βακτηρίων (Motarjemi, 2013).

1.6. Στόχος μελέτης

Ο στόχος της παρούσας μελέτης είναι η ενθυλάκωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης (OEO) σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) ως μέσο ενίσχυσης της διασποράς για την ελεγχόμενη απελευθέρωσή του και η αξιολόγηση της επίδρασης της ενθυλάκωσης στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp., σε υγρό εργαστηριακό υπόστρωμα (TSB), σε ζωμό τυριού, σε κατίκι και σε βόειο κιμά.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη περιλάμβανε τα παρακάτω στάδια. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ο εγκλεισμός του αιθέριου ελαίου ρίγανης (ΟΕΟ) σε β-κυκλοδεξτρίνη (β-CD) με τη μέθοδο της συν-κατακρήμνισης (co-precipitation method). Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η αποτελεσματικότητα ενθυλάκωσης/εγκλεισμού (EE%) του ΟΕΟ μέσω φασματοσκοπίας ορατού – υπεριώδους (UV-Vis) στα 275 nm. Επίσης, προσδιορίστηκε ο εγκλεισμός του εξωτερικού ΟΕΟ. Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος, ο δείκτης πολυδιασποράς (PDI) και το δυναμικό επιφανείας των σωματιδίων (ζ-potential) αξιολογήθηκαν μέσω της μεθόδου Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering-DLS).

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration –MBC) του ΟΕΟ έναντι τριών μικροβιακών στελεχών του παθογόνου *Salmonella* spp., πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των δυαδικών αραιώσεων σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well microplate). Η επίδραση των β-CDs και του ελεύθερου ΟΕΟ σε συγκεντρώσεις ίσες με το MIC και ½ MIC έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp., (κοκτέιλ 3 στελεχών: 10⁶ CFU/ml), προσδιορίστηκε σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid) (pH=7.0, pH=4.3) σε ζωμό τυριού που παρασκευάστηκε από κατίκι, σε ζωμό τυριού που παρασκευάστηκε από γαλοτύρι και τέλος, σε κατίκι. Επίσης, η επίδραση των β-CDs, εξετάστηκε και σε βόειο κιμά, σε δύο αναλογίες αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-CDs (1:99, 8:92) με συγκέντρωση αιθέριου ελαίου 0.10% και 0.18%, αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου που επιλέχθηκαν είναι ίσες με το 2×MIC του εγκλεισμένου β-CDs-EO.

2.2. Στελέχη *Salmonella* spp.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp., (σε μίγμα ή το καθένα μόνο του) (Πίνακας 1) τα οποία διατηρούνται σε συνθήκες κατάψυξης (-20 °C) σε θρεπτικό ζωμό Tryptone Soy Broth (TSB, Oxoid) με 20% γλυκερόλη. Τα

στελέχη ανήκουν στη συλλογή (stock) του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 1 Τα στελέχη των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν και οι πηγές απομόνωσής τους.

Στελέχη μικροοργανισμού	Πηγή απομόνωσης
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Poppof serovar Typhimurium strain 4/74	Έντερα μοσχαριού
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona strain 23	Ζωοτροφές
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis strain 167	Ζωοτροφές

2.3. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος

Τα στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (Πίνακας 1) ανανεώθηκαν πριν την έναρξη κάθε πειράματος προκειμένου να ανακτηθεί η ζωτικότητα τους. Αναλυτικότερα, για κάθε στέλεχος, μεταφέρθηκε ποσότητα 100 μl καλλιέργειας, σε 10 ml υγρού θρεπτικού μέσου TSB σε περιέκτες των 15 ml (falcon) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Οι καλλιέργειες φυλάσσονταν στην κατάψυξη (20°C) με 20% γλυκερόλη. Στη συνέχεια, 100 μl από την πρώτη ανακαλλιέργεια μεταφέρθηκαν εκ νέου σε 10 ml αποστειρωμένου TSB και πραγματοποιήθηκε επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 18 ώρες. Ακολούθησε καθαρισμός των κυττάρων με τρεις διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (Biofuge 22R D-37520 Osterode; Heraeus Instruments, Germany) στα 3600 rpm, στους 4°C για 10 min. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση σε 10 ml υγρού ισοτονικού διαλύματος Ringer (Neogen, NCM0191K). Ο πληθυσμός του κάθε βακτηριακού στελέχους καταμετρήθηκε και η συγκέντρωση του κάθε στελέχους βρέθηκε 10^8 – 10^9 CFU/ml. Στη συνέχεια, τα αιωρήματα των τριών στελεχών του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. είτε χρησιμοποιήθηκαν μόνα τους (μελέτη προσδιορισμού

MIC/ MBC) ή αναμίχθηκαν και αφού υποβλήθηκαν σε κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις, χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων (10^5 – 10^6 CFU/mL ή g).

2.4. Παρασκευή β-CDs με εγκλεισμό αιθέριου ελαίου ρίγανης

Ο εγκλεισμός του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (OEO) σε β-CDs έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Garcia-Sotero et.al. (2019).

Αναλυτικά, αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα αιθανόλης- νερού σε αναλογία 1:2 (Διάλυμα 1). Στην συνέχεια, ζυγίστηκε ποσότητα 10 g β-κυκλοδεξτρινών (β-CDs) που προστέθηκε αργά σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 100 ml του Διαλύματος 1, το οποίο διατηρήθηκε συνεχώς σε ανάδευση και υπό θέρμανση στους 55 °C (± 2 °C).

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν δύο διαφορετικές αναλογίες αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-CDs (1:99, 8:92). Για την αναλογία 1:99, 1 ml OEO προστέθηκε αργά σε 99 ml του εναιωρήματος των β-CDs, το οποίο βρισκόταν σε συνεχή ανάδευση και υπό θέρμανση στους 55 °C. Για την 8:92, 8 ml OEO προστέθηκαν σε 92 ml εναιωρήματος β-CDs.

Για την εκάστοτε αναλογία, συνεχίστηκε η ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα (Velp scientifica) για 4 h χωρίς θέρμανση. Έπειτα, η κάθε αναλογία παρέμεινε σε ηρεμία για 12-18 h στους 4 °C.

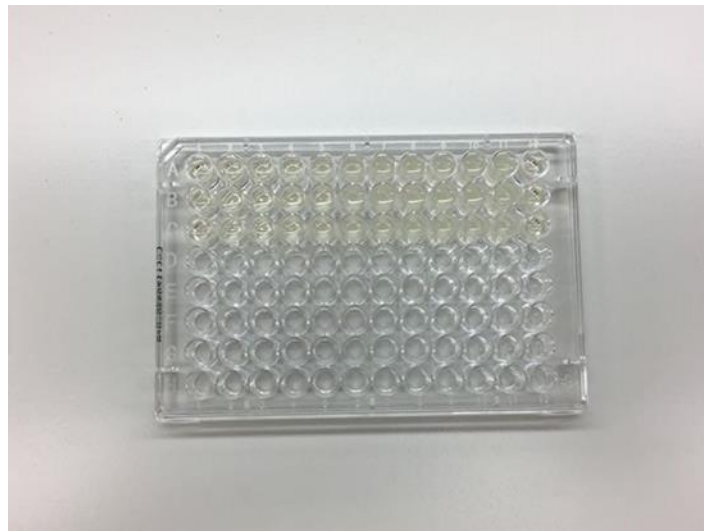
Μετά το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε διήθηση της εκάστοτε αναλογίας (μέσω χωνιού Buchner με διηθητικό χαρτί Whatman No. 1) εντός φιάλης διήθησης, για την παραλαβή του ιζήματος του κάθε εναιωρήματος αιθέριου ελαίου- β-CDs.

Ακολουθήθηκε η ξήρανση του ιζήματος για 20- 22 h στους 50 °C και μετέπειτα μεταφορά σε ξηραντήρα σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) για 2 h.

Τέλος, η ποσότητα της σκόνης ζυγίστηκε και φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου (σε ξηραντήρα) για περαιτέρω χρήση.

2.5. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) του ΟΕΟ

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) του ΟΕΟ έναντι τριών μικροβιακών στελεχών του παθογόνου *Salmonella* spp., πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών δυαδικών αραιώσεων σε πλάκα μικροτιτλοδότησης (96-well microplate) (Εικόνα 8). Η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της οπτικής πυκνότητας.



Εικόνα 8 Πλάκα μικροτιτλοδότησης με 96 πηγαδάκια.

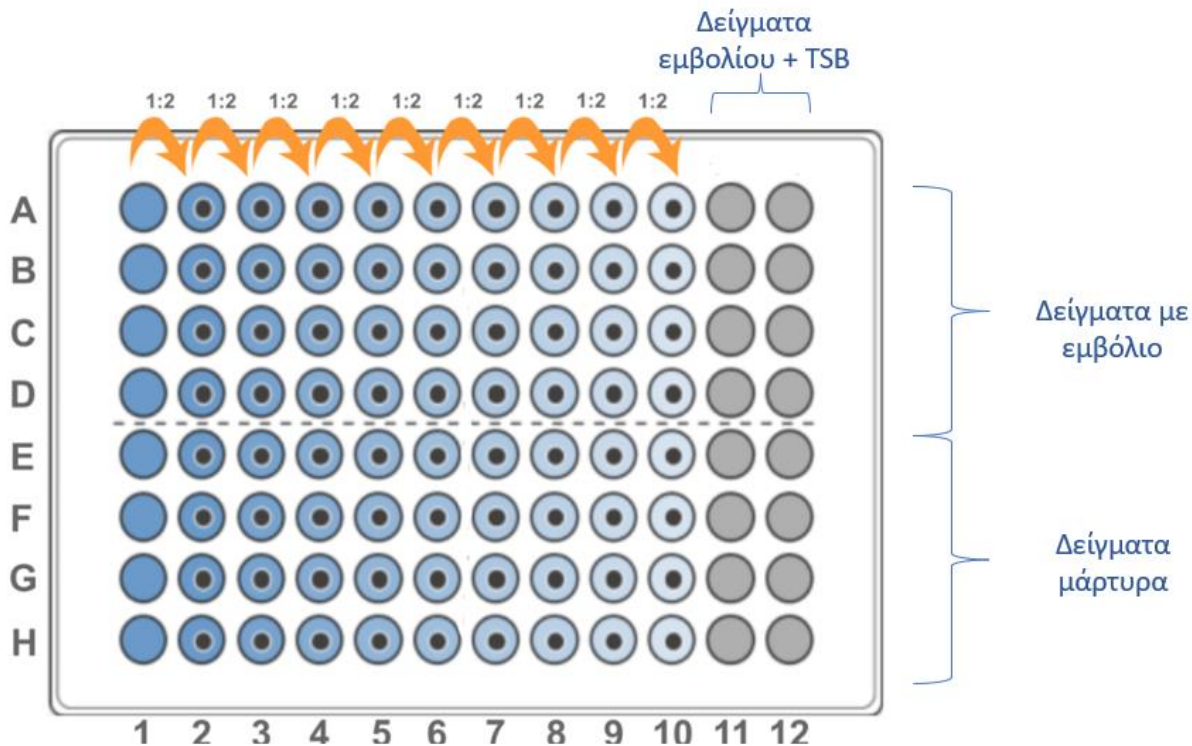
2.5.1. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ελεύθερου αιθέριου ελαίου

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα αιθέριου ελαίου ρίγανης συγκέντρωσης 6.00% v/v σε 20% διάλυμα αιθανόλης/ H₂O. Από το διάλυμα αυτό, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα αιθέριου ελαίου ρίγανης χαμηλότερων συγκεντρώσεων 5.00%, 4.20%, 3.50% και 1.20% v/v σε TSB. Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκαν πλάκες μικροτιτλοδότησης 96-βοθρίων (96-microwell-plates). Ειδικότερα, στα βοθρία των διαφορετικών γραμμών της πρώτης στήλης τοποθετήθηκαν 300 μl

από την κάθε συγκέντρωση των διαλυμάτων ΟΕΟ, ενώ στις υπόλοιπες στήλες (2-12) τοποθετήθηκαν 150 μl TSB. Με τη χρήση πολυπιπέτας, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις της αρχικής συγκέντρωσης του κάθε διαλύματος (από 1η έως 10η στήλη). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ο ενοφθαλμισμός των βοθρίων με 50 μl από κατάλληλη αραιώση του εμβολίου κάθε στελέχους έτσι ώστε να επιτευχθεί μικροβιακό φορτίο 10^5 – 10^6 Log CFU/ml ανά μικροβιακό στέλεχος (Πίνακας 1) (Εικόνα 9). Ακολούθησε επώαση των microplates στους 37°C και τους 10°C για 24 ώρες και 13 ημέρες, αντίστοιχα. Μετά το πέρας της επώασης, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητά τους στα 620 nm με τη χρήση ειδικού οργάνου μέτρησης οπτικής πυκνότητας (OpticalDensity, OD620; Tecan Sunrise™ Absorbance Reader, Tecan Group Ltd, Männedorf, Ελβετία). Η ελάχιστη συγκέντρωση ΟΕΟ στην οποία δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη (μεταβολή της οπτικής πυκνότητας στα 620 nm) του μικροοργανισμού (*Salmonella* spp.) αποτέλεσε το MIC του συγκεκριμένου στελέχους.

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά 100 μl από τα βοθρία του κάθε microplate που δεν παρατηρήθηκε μεταβολή της οπτικής πυκνότητας (από προηγούμενη διαδικασία για MIC) σε τρυβλία. Συγκεκριμένα, τα 100 μl εξαπλώθηκαν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία με TSA και επώαστηκαν στους 37 °C για 48 ώρες. Η συγκέντρωση του ΟΕΟ που αντιστοιχούσε στα τρυβλία όπου παρατηρήθηκε μείωση τουλάχιστον τριών λογαρίθμων του παθογόνου μικροοργανισμού αντιπροσώπευε την ελάχιστη βακτηριοκτόνο συγκέντρωση (MBC) για κάθε στέλεχος.

Η παραπάνω διαδικασία, πραγματοποιήθηκε για καθένα από τα τρία στελέχη του μικροοργανισμού.



Εικόνα 9 Το microplate του ελεύθερου αιθέριου ελαίου.

2.5.2. Προσδιορισμός ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου.

Για τον προσδιορισμό των τιμών MIC και MBC του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου β-CDs, για δύο αναλογίες αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-CDs (1:99 και 8:92) (2.5.1), ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία με κάποιες τροποποιήσεις. Αναλυτικότερα, αρχικά παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα που περιείχαν OEO εγκλεισμένο σε β-CDs συγκεντρώσεων 1.50%, 1.00%, 0.70%, 0.30% v/v σε TSB. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.5.1 με διαφορά ότι οι 6 πρώτες στήλες της πλάκας αφορούσαν στην αναλογία 8:92 και οι στήλες 8 έως 12 αφορούσαν στην αναλογία 1:99. Η 7^η στήλη αποτελούσε τον μάρτυρα. Αντίστοιχα, όπως και στη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για το ελεύθερο OEO, οι τέσσερις πρώτες γραμμές περιλάμβαναν το εμβόλιο, ενώ οι τέσσερις τελευταίες αφορούσαν στο μάρτυρα.

Ακολούθησε επώαση των microplates στους 37°C και τους 10°C για 24 ώρες και 13 ημέρες, αντίστοιχα, και μέτρηση της οπτικής πυκνότητάς στα 620 nm. Μετά τον προσδιορισμό των τιμών MIC, ο προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε και πραγματοποιήθηκε για τη μέτρηση του ελεύθερου ΟΕΟ όπως περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω (2.5.1).

Η ίδια διαδικασία, πραγματοποιήθηκε για καθένα από τα τρία στελέχη του μικροοργανισμού και για κάθε μια από τις θερμοκρασίες.

2.6. Χαρακτηρισμός β-CDs με εγκλεισμό αιθέριου ελαίου ρίγανης

2.6.1. Προσδιορισμός του ποσοστού εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (% Encapsulation Efficiency)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του εγκλεισμένου ΕΟ ρίγανης (Encapsulation efficiency, EE%) στην κοιλότητα της β-CD ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του Huang et al. (2020). Αρχικά, ζυγίστηκαν 50 mg της σκόνης ΟΕΟ- β-CD και διαλύθηκαν σε 5 ml αιθανόλης 100%. Στη συνέχεια η φιάλη μεταφέρθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 min στους 50 °C.

Τα δείγματα αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και συμπληρώθηκε μέχρι τα 50 ml με αιθανόλη. Τα 10 ml από το τελευταίο αραιωμένο διάλυμα φυγοκεντρήθηκαν στις 5000 στροφές για 15 min στους 4 °C.

Τέλος, συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό και φωτομετρήθηκε μέσω φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (Ultraviolet-Visible, UV-Vis) στα 275nm. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις (Wang et al., 2019). Ο προσδιορισμός του εγκλεισμένου ΕΟ ρίγανης, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπύλης αναφοράς ΕΟ ρίγανης, γνωστών συγκεντρώσεων. Η επί τοις εκατό απόδοση της ενθυλάκωσης/εγκλεισμού (Encapsulation efficiency – EE%) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την ακόλουθη εξίσωση, όπως περιγράφεται από τους Huang et al.,(2020):

$$EE\% = \frac{\text{Weight oregano of essential in oil microcapsules(mg)}}{\text{initial oregano essential oil weight (mg)}} \times 100$$

2.6.2. Προσδιορισμός του ποσοστού του αιθέριου ελαίου ρίγανης στην εξωτερική επιφάνεια των β-CDs (%EO)

Για τον υπολογισμό του ποσοστού του αιθέριου ελαίου στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης, ζυγίστηκε ποσότητα 50 mg σκόνης β-CDs- EO από την κάθε αναλογία και τοποθετήθηκε σε εσφυρισμένη φιάλη. Προστέθηκαν 5 mL ισοοκτανίου και ακολουθήθηκε μαγνητική ανάδευση για 10 min. Στη συνέχεια, η ποσότητα μεταφέρθηκε σε ογκομετρικό κύλινδρο και τοποθετήθηκε ισοοκτάνιο έως ότου φτάσει τον τελικό όγκο των 50 ml.

Μεταφέρθηκαν 10 ml από το παραπάνω διάλυμα σε περιέκτη των 10 ml και φυγοκεντρήθηκαν για 15 min στις 5000 στροφές. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση του υπερκείμενου υγρού μέσω φασματοφωτόμετρου ορατού-υπεριώδους στα 275 nm. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε όπως στην έρευνα των Al-Nasiri et al. (2017). Ο προσδιορισμός του ποσοστού του ΟΕΟ στην εξωτερική επιφάνεια, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης αναφοράς ΟΕΟ, γνωστών συγκεντρώσεων.

2.6.3. Προσδιορισμός μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς PDI και ζ-potential.

Ο προσδιορισμός του μεγέθους των σωματιδίων, του δείκτη πολυδιασποράς (PDI) και του ζ-δυναμικού (z- potential) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Δυναμικής Σκέδασης Φωτός (Dynamic Light Scattering-DLS) χρησιμοποιώντας το μηχάνημα Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Hellamco, UK) (Εργαστήριο Μηχανικής και Επεξεργασίας Τροφίμων, Γ.Π.Α.). Εφαρμόστηκε η μέθοδος που αναφέρεται από τους Kotronia et al. (2017). Για την προετοιμασία του δείγματος, ποσότητα (1 mg) σκόνης EO- β-CDs μεταφέρθηκε σε 4 ml διπλά απιονισμένο νερό και τέθηκε σε ανάδευση για 48 h σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ειδικές κυψελίδες DTS1070 και πραγματοποιήθηκε μέτρηση του μεγέθους των σωματιδίων, του δείκτη διασποράς PDI και του ζ-potential στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις δύο αναλογίες ΟΕΟ- β-CDs και επαναλήφθηκε τρεις φορές.

2.7. Προετοιμασία και ενοφθαλμισμός δειγμάτων

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε *in vitro* και *in situ* συνθήκες. Για την *in vitro* μελέτη χρησιμοποιήθηκαν το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB σε pH=7.0 και pH=4.3 (ρυθμισμένο με HCl) και ζωμοί τυριών από κατίκι Δομοκού ΠΟΠ (Ορεινές πλαγιές) και από γαλοτύρι (Ηπειρος) (model food-cheese broth). Η *in situ* μελέτη, εφαρμόστηκε σε επιλεγμένα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (κατίκι Δομοκού ΠΟΠ (Ορεινές πλαγιές), βόειος κιμάς). Τα προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν διάρκεια λήξης μεγαλύτερη από δύο εβδομάδες.

Όλα τα δείγματα ετοιμάστηκαν σε ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar) (Nuair), ζυγίστηκαν σε ηλεκτρονικό ζυγό (Phoenix instruments, BTG-2002).

2.7.1. *In vitro* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος, σε περιέκτες, τύπου falcon, που περιείχαν 10 ml θρεπτικό ζωμό TSB σε pH= 7.0 ή TSB pH= 4.3, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα είτε σκόνης EO- β-CDs (σε αναλογία 1:99), είτε ελεύθερου EO ρίγανης ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση EO ίση με 0.44% και 0.88%. Προκειμένου να επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή pH, χρησιμοποιήθηκε υδροχλωρίο (HCl). Μετά από σύντομη ανάδευση του κάθε περιέκτη, ακολούθησε ενοφθαλμισμός με κατάλληλη ποσότητα του μίγματος των τριών στελεχών *Salmonella* spp. ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση πληθυσμού περίπου 10^6 CFU/ ml. Ακολούθησε συντήρηση των δειγμάτων στους 7 °C, για 19 ημέρες. Όλες οι μεταχειρίσεις (όπως αναφέρονται παρακάτω) πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και σε δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις και περιείχαν τους κατάλληλους μάρτυρες.

Τα δείγματα που εξετάστηκαν για καθεμία από τις τιμές pH:

- TSB + 0.88% σκόνη EO- β-CDs + εμβόλιο (β-CDs-OR 0.88% (+))
- TSB + 0.44% σκόνη EO- β-CDs + εμβόλιο (β-CDs-OR 0.44% (+))
- TSB + ελεύθερο EO 0.88% + εμβόλιο (free OR 0.88% (+))
- TSB + ελεύθερο EO 0.44% + εμβόλιο (free OR 0.44% (+))
- TSB + σκόνη μάρτυρα β-CDs + εμβόλιο (control β-CDs (+))
- TSB + εμβόλιο (control(+))

2.7.2. *In vitro* σε ζωμό τυριών (υγρό model food)

Για την παρασκευή των ζωμών τυριού (από κατίκι ή/ και γαλοτύρι), αναμείχθηκαν κατάλληλα g τυριού σε κατάλληλα ml αποστειρωμένου νερού, σε αναλογία 1:4 και 1:5, για το ζωμό κατικιού και το ζωμό γαλοτυριού, αντίστοιχα. Το γαλοτύρι και το κατίκι παραλήφθηκαν από supermarket και μεταφέρθηκαν εντός 30 min στο χώρο του εργαστηρίου. Στη συνέχεια, σε περιέκτες, τύπου falcon, που περιείχαν 10 ml ζωμό τυριού, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα είτε σκόνης EO- β-CDs (σε αναλογία 1:99), είτε ελεύθερου EO ρίγανης ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση EO ίση με 0.44% και 0.88% για το ζωμό κατικιού και συγκέντρωση EO ίση με 0.88% για το ζωμό γαλοτυριού. Μετά από σύντομη ανάδευση του κάθε περιέκτη, ακολούθησε ενοφθαλμισμός με κατάλληλη ποσότητα του μίγματος των τριών στελεχών *Salmonella* spp. ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση πληθυσμού περίπου 10^6 CFU/ ml. Ακολούθησε συντήρηση των δειγμάτων στους 7 °C, για 19 ημέρες για το ζωμό κατικιού και 9 ημέρες για το ζωμό γαλοτυριού. Όλες οι μεταχειρίσεις (όπως αναφέρονται παρακάτω) για το ζωμό κατικιού πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και σε δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις και περιείχαν τους κατάλληλους μάρτυρες. Για το ζωμό γαλοτυριού πραγματοποιήθηκε εις διπλούν μια βιολογική επανάληψη.

Για το ζωμό τυριού από κατίκι:

- Ζωμός κατικιού + 0.88% σκόνη EO- β-CDs + εμβόλιο (β-CDs-OR 0.88%(+))
- Ζωμός κατικιού + 0.44% σκόνη EO- β-CDs + εμβόλιο (β-CDs-OR 0.44%(+))
- Ζωμός κατικιού + ελεύθερο EO 0.88% + εμβόλιο (free OR 0.88% (+))
- Ζωμός κατικιού + ελεύθερο EO 0.44% + εμβόλιο (free OR 0.44% (+))
- Ζωμός κατικιού + σκόνη μάρτυρα β-CDs + εμβόλιο (control β-CDs (+))
- Ζωμός κατικιού + εμβόλιο (control(+))

Για το ζωμό τυριού από γαλοτύρι:

- Ζωμός γαλοτυριού + 0.88% σκόνη EO- β-CDs + εμβόλιο (β-CDs-OR 0.88%(+))
- Ζωμός γαλοτυριού + ελεύθερο EO 0.88% + εμβόλιο (free OR 0.88% (+))
- Ζωμός γαλοτυριού + σκόνη μάρτυρα β-CDs + εμβόλιο (control β-CDs (+))
- Ζωμός γαλοτυριού + εμβόλιο (control(+))

2.7.3. *In situ* σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

2.7.3.1. Κατίκι

Ποσότητα 80 g από κατίκι, της ίδιας παρτίδας με την *in vitro* μελέτη, μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένους περιέκτες των 100 ml. Ακολούθησε η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας είτε σκόνης EO- β -CDs (σε αναλογία 1:99) είτε ελεύθερου EO ρίγανης ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση EO ίση με 0,88% και ακολουθήθηκε καλή ομογενοποίηση (ανάδευση των δειγμάτων με σπάτουλα) του κάθε περιέκτη. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός με κατάλληλη ποσότητα του μίγματος των τριών στελεχών *Salmonella* spp. ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση πληθυσμού 10^7 CFU/ g. Ακολούθησε συντήρηση των δειγμάτων στους 7°C, για 17 ημέρες. Όλες οι μεταχειρίσεις (όπως αναφέρονται παρακάτω) πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και σε δύο ανεξάρτητες βιολογικές επαναλήψεις και περιείχαν τους κατάλληλους μάρτυρες.

Τα δείγματα που εξετάστηκαν:

- Κατίκι + 0.88% σκόνη EO- β -CDs + εμβόλιο (β -CDs-OR 0.88%(+))
- Κατίκι + 0.88% σκόνη EO- β -CDs + εμβόλιο και επεξεργασία με υπέρηχους
- Κατίκι + σκόνη μάρτυρα β -CDs + εμβόλιο (control β -CDs (+))
- Κατίκι + σκόνη μάρτυρα β -CDs + εμβόλιο και επεξεργασία με υπέρηχους
- Κατίκι + ελεύθερο EO + εμβόλιο (free OR (+))
- Κατίκι + σκόνη μάρτυρα β -CDs (control β -CDs (-))
- Κατίκι + σκόνη μάρτυρα β -CDs και επεξεργασία με υπέρηχους
- Κατίκι + εμβόλιο (control(+))
- Κατίκι (control (-))

2.7.3.2. Κιμά

Για τον κιμά, ζυγίστηκε κατάλληλη ποσότητα (20 g), που παραλήφθηκε από κρεοπωλείο (Αθήνα) και μεταφέρθηκε στο χώρο του εργαστηρίου εντός 30 min. Μεταφέρθηκε, υπό ασηπτικές συνθήκες, σε αποστειρωμένο περιέκτη, όπου προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα είτε σκόνης EO- β -CDs σε αναλογία 1:99 ή/και 8:92 ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση EO ίση με 0.18% και 0.10%, αντίστοιχα. Ακολούθησε καλή ομογενοποίηση των δειγμάτων και ενοφθαλμισμός με κατάλληλη

ποσότητα του μίγματος των τριών στελεχών *Salmonella* spp. ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση πληθυσμού 10^5 CFU/ g. Στη συνέχεια, η ποσότητα (20 g) των δειγμάτων τοποθετούνταν σε κατάλληλους πλαστικούς περιέκτες (σακούλες συσκευασίας) συντηρούνταν στους 10 °C, για 16 ημέρες, υπό κενό (C312, Leric, Italy). Για όλες τις μεταχειρίσεις (όπως αναφέρονται παρακάτω) πραγματοποιήθηκαν δύο τεχνικές επαναλήψεις και περιείχαν τους κατάλληλους μάρτυρες.

Τα δείγματα που εξετάστηκαν:

- Κιμάς + 0.10% σκόνη EO- β-CDs 8:92 + εμβόλιο (β-CDs-OR 0.1% (8:92))
- Κιμάς + 0.18% σκόνη EO- β-CDs 1:99 + εμβόλιο (β-CDs-OR 0.18% (1:99))
- Κιμάς + σκόνη μάρτυρα β-CDs 8:92 + εμβόλιο (control β-CDs 0.1% (8:92))
- Κιμάς + σκόνη μάρτυρα β-CDs 1:99 + εμβόλιο (control β-CDs 0.18% (1:99))
- Κιμάς + ελεύθερο EO 8:92 + εμβόλιο (free OR 0.1% (8:92))
- Κιμάς + ελεύθερο EO 1:99 + εμβόλιο (free OR 0.18% (1:99))
- Κιμάς + εμβόλιο (control(+))
- Κιμάς (control (-))

2.8. Μικροβιολογική ανάλυση

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων TSB και ζωμού τυριών (model food) έγινε με απευθείας δειγματοληψία από τα δείγματα που είχαν προετοιμαστεί. Για τη διευκόλυνση της δειγματοληψίας των δειγμάτων των τροφίμων (κατίκι και βόειο κιμά), ζυγίζονταν ασηπτικά με λύχνο Bunsen, 10 g δείγμα από το κάθε προϊόν και μεταφέρονταν σε αποστειρωμένη σακούλα stomacher (bag-light, Interscience) και προστέθηκαν 90 ml αποστειρωμένου αραιωτικού υγρού Ringer. Ακολουθούσε ομογενοποίηση (Stomacher – bag mixer; Interscience, France) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 λεπτό. Το ομογενοποιημένο δείγμα αποτελεί την πρώτη αραιώση. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις όλων των δειγμάτων σε διάλυμα Ringer και εν συνεχεία, 0.1 ml ή/και 1 ml εμβολιάζονταν σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και επωάζονταν στις κατάλληλες ανά μικροοργανισμό στόχο συνθήκες επώασης (Πίνακας 2). Κάθε φορά γινόταν η επίστρωση τριών τρυβλίων σε διαφορετικές αραιώσεις.

Πίνακας 2 Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, οι μικροοργανισμοί- στόχοι, οι συνθήκες επώασης, και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν.

Θρεπτικό υπόστρωμα	Ομάδες μ/ων	Θερμοκρασία επώασης	Χρόνος επώασης	Τεχνική
XLD (Xylose Lysine Deoxycholate, Neogen, NCM0021A)	<i>Salmonella</i> spp.	37°C	24h	Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης
TSA (Tryptic Soy Agar, Condalab, 1068)	γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για την καταμέτρηση <i>Salmonella</i> spp.	37°C	24h	Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης
PCA (Plate Count Agar, Oxoid, CM0325)	γενικό θρεπτικό υπόστρωμα για την καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας	30°C	72h	Τεχνική ενσωμάτωσης
RBC (Rose bengal chloramphenicol, LAB, LAB036)	ζύμες και μύκητες	37°C	72h	Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης
MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, Neogen, NCM0190A)	Οξυγαλακτικά βακτήρια	30°C	72h	Τεχνική ενσωμάτωσης
STAA (Streptomycin-thallos acetate-actidione, Oxoid, CM0881)	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	25°C	72h	Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης
VRBGA (Violet Red Bile Glucose Agar, Oxoid, CM0485)	<i>Enterobacteriaceae</i>	37°C	24h	Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης

2.8.1. Καταμέτρηση πληθυσμών

Οι πληθυσμοί παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp., καθώς και υπόλοιπων μικροοργανισμών- στόχων που επιβίωσαν κατά τη συντήρηση των δειγμάτων, καταμετρήθηκαν με απαρίθμηση των αποικιών (τρυβλία με 30 έως 300 μετρήσιμες, μεμονωμένες και ευκρινείς αποικίες) με τη χρήση ηλεκτρονικού μετρητή (Colony counter; Stuart Scientific CO. LTD, UK). Ο αριθμός των αποικιών εκφράστηκε σε Μονάδες Σχηματιζόμενων Αποικιών (Colony Forming Units – CFU)/g ή ml δείγματος και υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{CFU/g ή ml} = (C_1 + C_2) / (n_1 + (n_2/10)) \times 1/V_1 \times 1/d_1$$

όπου:

C_1 : το συνολικό άθροισμα των αποικιών n_1 στα τρυβλία της αραίωσης d_1

C_2 : το συνολικό άθροισμα των αποικιών n_2 στα τρυβλία της επόμενης αραίωσης

V : ο όγκος του εμβολίου (ml)

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέσος όρος των αποικιών από κάθε επανάληψη, η τυπική απόκλιση και τα δεδομένα που ελήφθησαν εκφράστηκαν ως δεκαδικός λογάριθμος [Log (CFU/g ή mL)] και παραστάθηκε γραφικά σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης (ημέρες).

2.9. Μέτρηση pH των δειγμάτων

Οι τιμές pH των δειγμάτων καταγράφονταν μέσω του ψηφιακού pHμετρου του εργαστηρίου (WTW pH 526). Πριν την καταμέτρηση προηγούταν η βαθμονόμηση του pHμετρου με ρυθμιστικά διαλύματα, που βρισκόντουσαν σε pH =4 και pH =7. Στη συνέχεια, το ηλεκτρόδιο εμβαπτιζόταν στο ομογενοποιημένο δείγμα, μετά το πέρας της μικροβιολογικής ανάλυσης. Οι τιμές του pH του υγρού θρεπτικού υποστρώματος, των ζωμών τυριών και του κατικιού καταμετρήθηκαν στην αρχή, τη μέση και το τέλος του πειράματος. Ενώ, στον κιμά λαμβάνονταν μετρήσεις, κάθε μέρα που γινόταν δειγματοληψία.

2.10. Μέτρηση ενεργότητας ύδατος (a_w) των δειγμάτων

Η τιμές ενεργότητας ύδατος (a_w) των δειγμάτων καταμετρήθηκαν μέσω του ενεργόμετρου (LabTouch- a_w , water activity, Novasina, Switzerland). Η καταμέτρηση της ενεργότητας ύδατος του υγρού θρεπτικού υποστρώματος και των ζωμών τυριών πραγματοποιήθηκε στην αρχή, τη μέση και το τέλος του πειράματος, ενώ για τα δείγματα του κατικιού και του κιμά πραγματοποιήθηκαν στην αρχή και το τέλος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) και της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (Minimum Bactericidal Concentration- MBC) του αιθέριου ελαίου ρίγανης

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) και η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) του αιθέριου ελαίου ρίγανης μελετήθηκε σε δύο θερμοκρασίες. Συνήθως, ο προσδιορισμός του MIC και του MBC λαμβάνει χώρα στην ευνοϊκότερη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού, συγκεκριμένα για την *Salmonella* spp. είναι οι 37 °C. Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πιθανή μεταβολή των τιμών των MIC και MBC σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και ειδικά σε θερμοκρασίες που μπορεί να απαντηθούν στην ψυκτική αλυσίδα των τροφίμων. Όπως προκύπτει και από έρευνα των Dumitrașcu et al. (2020), σε ορισμένα οικιακά ψυγεία στην Ευρώπη η θερμοκρασία συντήρησης υπερβαίνει το ανώτατο όριο των 5 °C, που έχει προταθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) (EFSA, 2018). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η *Salmonella* spp. είναι ευαίσθητη σε βαθμούς κάτω των 5 °C (Skandamis et al., 2002), συνεπώς επιλέχθηκαν οι 10 °C ως η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία εμφανίζεται ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Πίνακας 3 Οι τιμές των MIC και MBC του ελεύθερου αιθέριου ελαίου των τριών στελεχών του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. στους 10°C και στους 37°C.

Στέλεχος	10°C		37°C	
	MIC (%)	MBC (%)	MIC (%)	MBC (%)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain 4/74	0.22	0.88	0.57	0.60
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona strain 23	0.33	0.44	0.71	0.88
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis strain 167	0.33	0.44	0.66	0.88

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3, προκύπτει ότι για τους 10 °C, ως τιμή του MIC είναι 0.33 % και το MBC είναι 0.88 %. Για τους 37 °C, ως τιμή του MIC είναι 0.71 % και το MBC είναι 0.88 %. Το στέλεχος *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona strain 23 εμφανίζει τις μεγαλύτερες τιμές MIC στους 10 °C και 37°C και το *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain 4/74 εμφανίζει τις μικρότερες τιμές.

Πίνακας 4 Οι τιμές των MIC και MBC του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου (1:99, 8:92) των τριών στελεχών του μικροοργανισμού *Salmonella* spp. στους 10°C.

Στέλεχος	10°C			
	Αναλογία ΟΕΟ σε β-CDs 1:99		Αναλογία ΟΕΟ σε β-CDs 8:92	
	MIC (%)	MBC (%)	MIC (%)	MBC (%)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain 4/74	0.09	>1.5	0.05	0.06
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona strain 23	0.09	>1.5	0.05	0.06
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis strain 167	0.06	>1.5	0.05	0.08

Στους 10 °C (Πίνακας 4), για την αναλογία αιθέριου ελαίου- β-κυκλοδεξτρίνης 1:99, ως MIC λαμβάνεται το 0.09 % και το MBC είναι μεγαλύτερο του 1.5 % και για την αναλογία 8:92, ως MIC λαμβάνεται το 0.05 % και το MBC ως 0.08 %. Όλα τα στελέχη έχουν ίδιες τιμές MIC και MBC, στους 10 °C, εκτός από το *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis strain 167 όπου στην αναλογία εγκλεισμένου ΟΕΟ σε β-κυκλοδεξτρίνη 1:99, έχει μικρότερο MIC.

Πίνακας 5 Οι τιμές των MIC και MBC του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου (1:99, 8:92) των τριών στελεχών του μικροοργανισμού *Salmonella spp.* στους 37°C.

Στέλεχος	37°C					
	Αναλογία ΟΕΟ σε β-CDs 1:99			Αναλογία ΟΕΟ σε β-CDs 8:92		
	MIC(%)	SD	MBC(%)	MIC(%)	SD	MBC(%)
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium strain 4/74	0.12	0.03	>1.5	0.08	0	0.08
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Agona strain 23	0.20	0.11	>1.5	0.08	0	0.13
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis strain 167	0.11	0.02	>1.5	0.08	0	0.13

Στους 37 °C (Πίνακας 5), για την αναλογία αιθέριου ελαίου- β-κυκλοδεξτρίνης 1:99, ως MIC λαμβάνεται το 0.2 % και το MBC είναι μεγαλύτερο του 1.5 % και για την αναλογία 8:92, ως MIC λαμβάνεται το 0.08 % και το MBC ως 0.13 %. Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη το *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium strain 4/74 έχει το μικρότερο MBC στην αναλογία ΟΕΟ- β-CDs 8:92 και το *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona strain 23 έχει το μεγαλύτερο MIC στην αναλογία ΟΕΟ- β-CDs 1:99.

Παρατηρείται ότι το MIC και το MBC, είναι μεγαλύτερο στη σκόνη με τη χαμηλή αναλογία αιθέριου ελαίου- β-κυκλοδεξτρίνη (1:99), από ότι στη σκόνη με την υψηλή αναλογία αιθέριου ελαίου- β-κυκλοδεξτρίνη (8:92). Αυτό, πιθανόν να οφείλεται σε διαφορές στην ποσόστωση του αιθέριου ελαίου στην επιφάνεια και το εσωτερικό της β-κυκλοδεξτρίνης εξαιτίας της ενθυλάκωσης. Η μεγαλύτερη ποσόστωση του ΕΟ στην επιφάνεια της β-CD της αναλογίας 8:92, επιδρά αρνητικά στον πληθυσμό του παθογόνου, σε σύγκριση με την αναλογία 1:99 που πιθανόν απελευθερώνει σταδιακά την αντιμικροβιακή ουσία για να καταπολεμήσει το μικροοργανισμό.

Σε όλα τα αποτελέσματα, φαίνεται ότι στην μικρότερη θερμοκρασία (10 °C) εμφανίζεται μικρότερη παραλλακτικότητα στις τιμές του MIC και του MBC, από ότι στους 37 °C. Επίσης, στους 10 °C παρατηρείται μικρότερη απαιτούμενη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου από ότι στους

37 °C, το οποίο είναι εύλογο καθώς στους 37 °C, είναι η ευνοϊκότερη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Γενικά, οι τιμές MIC του εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου εμφανίζονται μικρότερες από τις αντίστοιχες του ελεύθερου ελαίου, το οποίο εξηγείται και από τους Wang et al. (2019). Πιο συγκεκριμένα, οι συγγραφείς αναφέρουν ότι οι μικρότερες τιμές οφείλονται στην αυξημένη διαλυτότητα του αιθέριου ελαίου. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής μεταξύ του μικροοργανισμού και του αιθέριου ελαίου που συνεισφέρει στην αυξημένη αντιμικροβιακή δράση.

3.2. Χαρακτηρισμός β-CDs με εγκλεισμό αιθέριου ελαίου ρίγανης

3.2.1. Απόδοση εγκλεισμού του αιθέριου ελαίου ρίγανης (% Encapsulation efficiency – EE)

Πίνακας 6 Ποσοστό εγκλεισμού αιθέριου ελαίου ρίγανης συναρτήσει των αναλογιών EO- β-CDs.

Αναλογία ΟΕΟ σε β-CDs	% απόδοση εγκλεισμού	SD (±)
1:99	74.9	2.5
8:92	35.6	2.3

Η σκόνη με τη χαμηλή αναλογία αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-κυκλοδεξτρίνης (1:99), εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό εγκλεισμού ίσο με 74.9 ± 2.5 %, ενώ η υψηλότερη αναλογία αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-κυκλοδεξτρίνης (8:92) εμφανίζει ποσοστό εγκλεισμού ίσο με 35.6 ± 2.3 % (Πίνακας 6), καθώς η μεγαλύτερη ποσότητα αιθέριου ελαίου βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης (Πίνακας 7).

Σε άλλες μελέτες, η απόδοση εγκλεισμού συστατικών πτητικών ελαίων και β-κυκλοδεξτρίνης έφτασε τόσο υψηλά όσο το 80.6 % (έλαια ρίγανης, δενδρολίβανου) (Baranauskaitė et al., 2019) και τόσο χαμηλά όσο το 34.8 % (2- νονανόνη) (Abarca et al., 2016). Οι διαφορές στην απόδοση εγκλεισμού, οφείλονται στον διαφορετικό χρόνο και τη θερμοκρασία ξήρανσης της σκόνης κατά την παρασκευή της (Huang et al., 2020).

Πίνακας 7 Ποσοστό (%) εγκλεισμού αιθέριου ελαίου στην εξωτερική επιφάνεια της β-CDs συναρτήσει των αναλογιών EO- β-CDs.

Αναλογία ΟΕΟ σε β-CDs	% ΕΟ στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης	SD (±)
1:99	5.5	0.6
8:92	69.1	5.9

Η σκόνη με τη χαμηλή αναλογία αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-κυκλοδεξτρίνης (1:99), εμφανίζει μικρότερο ποσοστό εγκλεισμού ίσο με 5.5 ± 0.6 %, ενώ η υψηλότερη αναλογία αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-κυκλοδεξτρίνης (8:92) εμφανίζει ποσοστό εγκλεισμού ίσο με 69.1 ± 5.9 % (Πίνακας 7).

Συνεπώς, στη χαμηλή αναλογία αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-CDs (1:99), η μεγαλύτερη ποσότητα του ΕΟ περιβάλλεται από την κοιλότητα της β-CDs, ενώ στην υψηλή αναλογία ΟΕΟ- β-CDs (8:92) η πλειονότητα του ΕΟ βρίσκεται στην εξωτερική της επιφάνεια.

3.2.2. Προσδιορισμός μεγέθους σωματιδίων, δείκτη πολυδιασποράς PDI και ζ-potential.

Πίνακας 8 Το μέγεθος των σωματιδίων (nm), ο δείκτης πολυδιασποράς και το ζ- δυναμικό (mV) των αναλογιών ΟΕΟ σε β-CDs.

Αναλογία ΟΕΟ σε β-CDs	Μέγεθος σωματιδίων Size (nm)	Δείκτης πολυδιασποράς Polydispersity Index (PDI)	ζ- δυναμικό ζ-potential (mV)
1:99	197.3 ±49.9	0.442 ±0.076	-25.4 ±2.5
8:92	210.9 ±55.1	0.433 ±0.126	-21.1 ±4.3
Μάρτυρας	262.1 ±43.0	0.470 ±0.053	-26.8 ±2.9

Το μέγεθος σωματιδίων του μάρτυρα ($262,1 \pm 43,0$ nm) είναι μεγαλύτερο, σε σχέση με τις αναλογίες των σκονών που περιέχουν αιθέριο έλαιο ρίγανης (Πίνακας 8). Ωστόσο, οι παρατηρούμενες τιμές όλων των αναλογιών και του μάρτυρα είναι αρκετά μικρότερες από αυτές που αναφέρουν οι Kotronia et al. (2017). Σε σύγκριση με τη μελέτη των Hill et al. (2012), τα

μεγέθη της συγκεκριμένης έρευνας είναι μικρότερα, γεγονός που οφείλεται στον εγκλεισμό διαφορετικών αιθέριων ελαίων (εκχύλισμα trans-κινναμαλδεΰδης, ευγενόλης, κανέλας και γαρύφαλλου). Το μέγεθος των σωματιδίων εμφανίζει μεγάλες τυπικές αποκλίσεις, το οποίο θα εξηγηθεί παρακάτω.

Όσον αφορά στο δείκτη πολυδιασποράς (Πίνακας 8), από τις τιμές των δύο αναλογιών αιθέριου ελαίου ρίγανης- β -CDs και του μάρτυρα, παρατηρείται ότι δεν εμφανίζουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους και εμφανίζουν μια μετρίως ομοιόμορφη κατανομή. Οι τιμές κατανομής διαφοράς που είναι μικρότερες του 0.7, υποδεικνύουν μεγαλύτερη σταθερότητα για συστήματα νανοδιανομής (Danaei et al., 2018). Για τα συστήματα μονοδιασποράς, ο δείκτης κατανομής σωματιδίων παίρνει τιμές από μηδέν έως 0.1 (0- 0.1), ενώ τα συστήματα πολυδιασποράς εμφανίζουν τιμές μεγαλύτερες του 0.1 (Danaei et al., 2018). Συνεπώς, από τα αποτελέσματα μας (Πίνακας 8) μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα συστήματα που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη αφορούν σε συστήματα πολυδιασποράς.

Σύμφωνα με έρευνα των Hill et al. (2012) που μελέτησαν τον εγκλεισμό αιθέριων ελαίων σε β -κυκλοδεξτρίνη, η μεγάλη τάση των σωματιδίων της β -CDs να συσσωματωθούν οφείλεται στην έλλειψη καθαρού φορτίου των σύμπλοκων σωματιδίων, γεγονός που οδηγεί στις μειωμένες απωστικές δυνάμεις. Επιπλέον, η β -κυκλοδεξτρίνη όταν βρίσκεται σε υδατικά διαλύματα εμφανίζει μεγάλη τάση για συσσωμάτωση (Tao et al., 2014). Τέλος, η συσσωμάτωση δεν δημιουργείται ομοιόμορφα, γεγονός που οδηγεί σε μεγάλες αποκλίσεις στα μεγέθη των σωματιδίων (Πίνακας 8) και εξηγεί τις τιμές του δείκτη πολυδιασποράς.

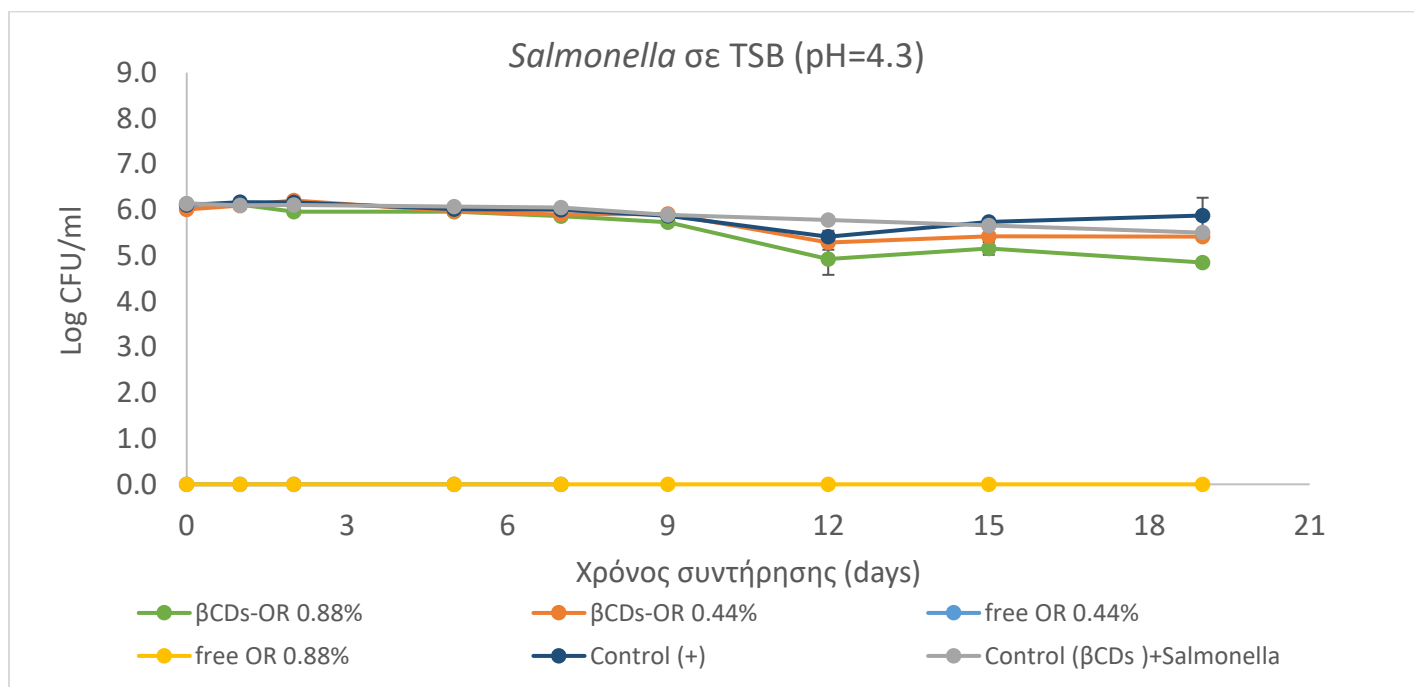
Στο χαρακτηρισμό ενός συστήματος εγκλεισμού η τιμή του ζ - δυναμικού λαμβάνεται υπόψιν κατά απόλυτη τιμή. Το πρόσημο (+/-) της αριθμητικής τιμής, προσδιορίζει το φορτίο του συστήματος εγκλεισμού και είναι ανάλογο του αριθμού των πρωτονίων και των νετρονίων που υπάρχουν στο σύστημα (Danaei et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη, τα διαλύματα του αιθέριου ελαίου- β -CDs εμφανίζουν υψηλές τιμές ζ - δυναμικού (Πίνακας 8) στα εγκλεισμένα σωματίδια, γεγονός που υποδεικνύει την μεγάλη τους σταθερότητα. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία που αναφέρουν τιμές ζ - δυναμικού ίσες με -21.5 ± 1.2 mV και -30.7 ± 1.8 mV (Kotronia et al., 2017).

3.3. Μικροβιολογική ανάλυση

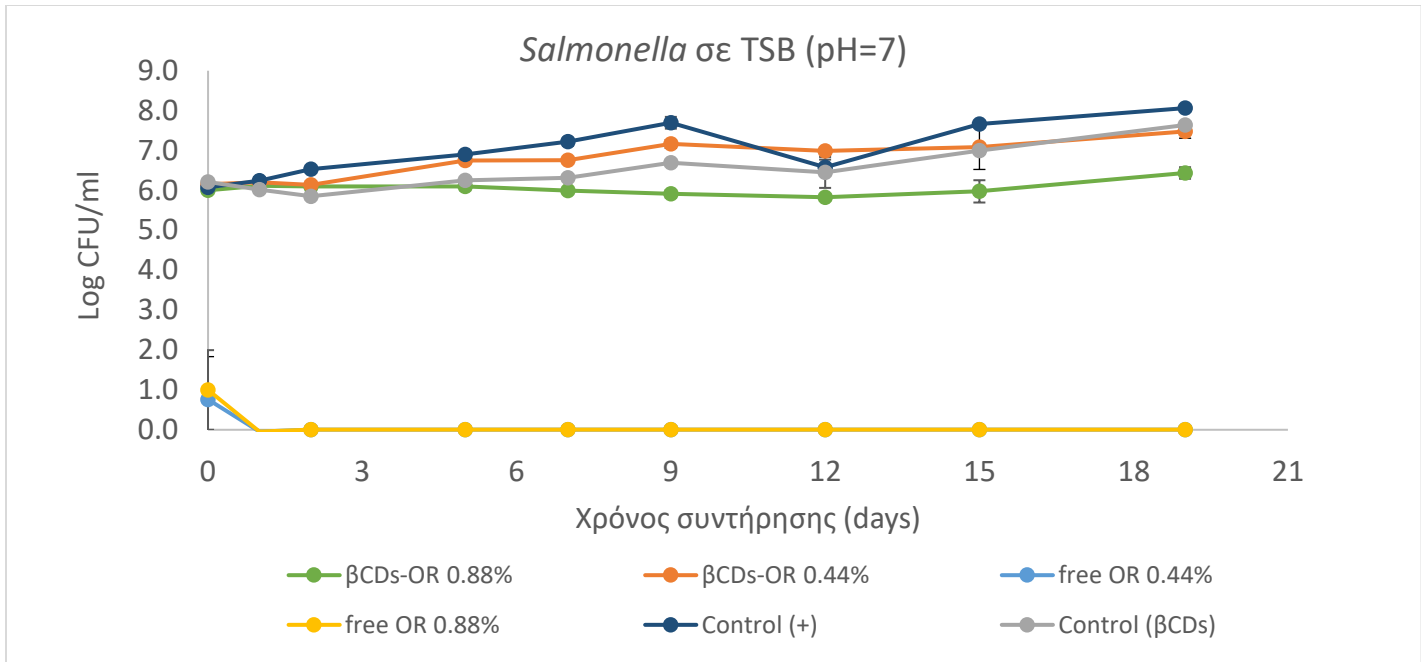
3.3.1. Επίδραση της ενθυλάκωσης αιθέριου ελαίου ρίγανης σε β-κυκλοδεξτρίνη στην επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp.

3.3.1.1. *In vitro* εφαρμογή σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Στα δείγματα του υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (pH=4.3 και pH=7.0), χρησιμοποιήθηκε η σκόνη εγκλεισμένου ΕΟ ρίγανης σε β-κυκλοδεξτρίνη σε αναλογία 1:99 καθώς και συγκεντρώσεις ΕΟ ρίγανης, μία ίση με το MIC (0.88 %) και μία ίση με το μισό του MIC (0.44 %). Η αναλογία αιθέριου ελαίου ρίγανης- β-CDs 1:99, επιλέχθηκε καθώς εμφανίζει μεγαλύτερο ποσοστό εγκλεισμού. Επιλέχθηκε η ουδέτερη τιμή του pH ίση με 7.0 και η τιμή pH= 4.3 που αντιστοιχεί στην τιμή pH του προϊόντος, του κατικιού.



Γράφημα 1 Η επιβίωση του πληθυσμού της *Salmonella* spp. έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (pH=4.3) συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

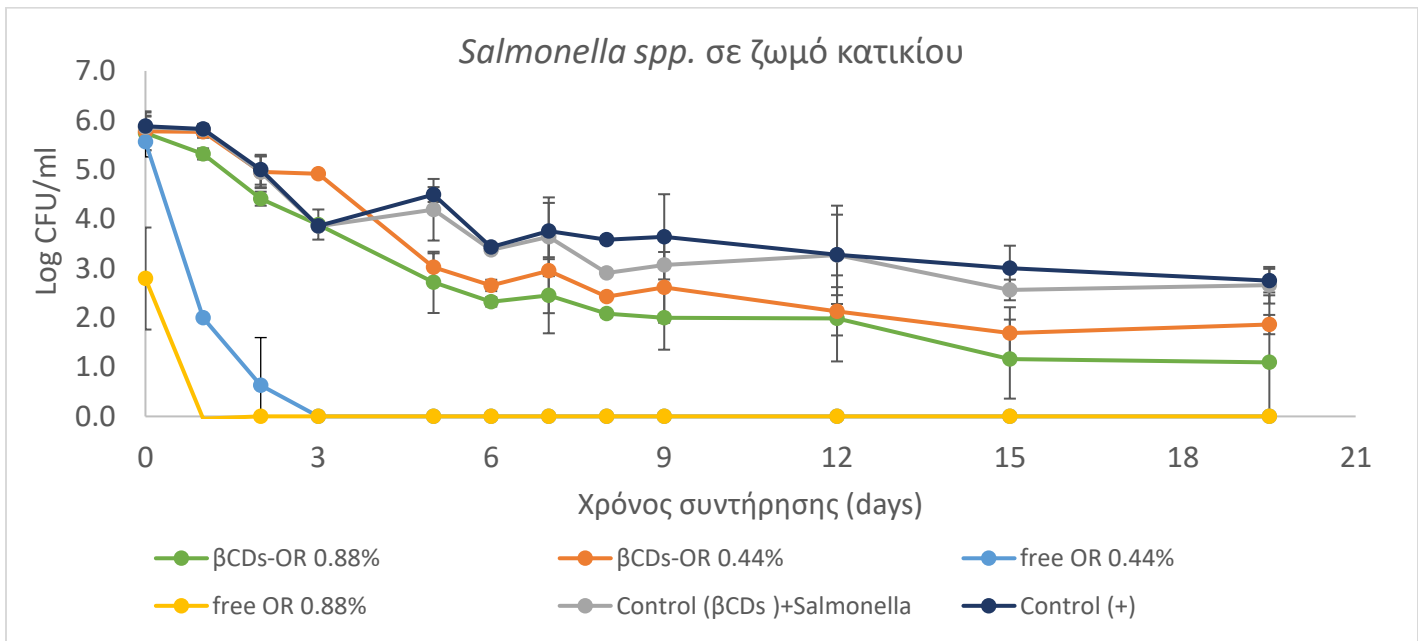


Γράφημα 2 Η επιβίωση του πληθυσμού της *Salmonella* spp. έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (pH=7.0) συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

Το αρχικό επίπεδο του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. κατά την *in vitro* εφαρμογή του ελεύθερου και εγκλεισμένου ΟΕΟ σε β-CDs σε θρεπτικό ζωμό TSB με pH=4.3 & pH= 7.0 (Γράφημα 1, Γράφημα 2, αντίστοιχα), ήταν 6.0 log CFU/ml. Η προσθήκη ελεύθερου ΕΟ (free), ανεξαρτήτως συγκέντρωσης 0.44% ή 0.88%, στον θρεπτικό ζωμό TSB pH=4.3 επέφερε άμεση μείωση (~ 6 log λογαριθμική μείωση) του παθογόνου μικροοργανισμού σε επίπεδα κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης (μικρότερο του 1 CFU/ml) (Γράφημα 1). Η προσθήκη του εγκλεισμένου σε β-CD ΕΟ σε συγκέντρωση 0.44%, στο ίδιο θρεπτικό μέσο (TSB pH=4.3), δεν επέφερε κάποια σημαντική μεταβολή στα επίπεδα του παθογόνου τα οποία και παρέμειναν σταθερά και αντίστοιχα με αυτά των μαρτύρων, καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 7 °C (Γράφημα 1). Η εφαρμογή εγκλεισμένου σε β-CD ΕΟ 0.88 % σε TSB pH=4.3 επέφερε συνολική μείωση 1.2 log CFU/ml στον πληθυσμό του παθογόνου καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης στους 7°C (Γράφημα 1). Ωστόσο, η προσθήκη της σκόνης της αναλογίας ΕΟ- β-CDs, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης 0.44% ή 0.88%, σε θρεπτικό ζωμό pH=7.0 δεν προκάλεσε μείωση του παθογόνου. Παρόμοιο αποτέλεσμα με αυτό του εγκλεισμένου ΕΟ παρουσίασαν οι δύο μάρτυρες της β-CDs (control(+), control β-CDs) σε pH=7.0.

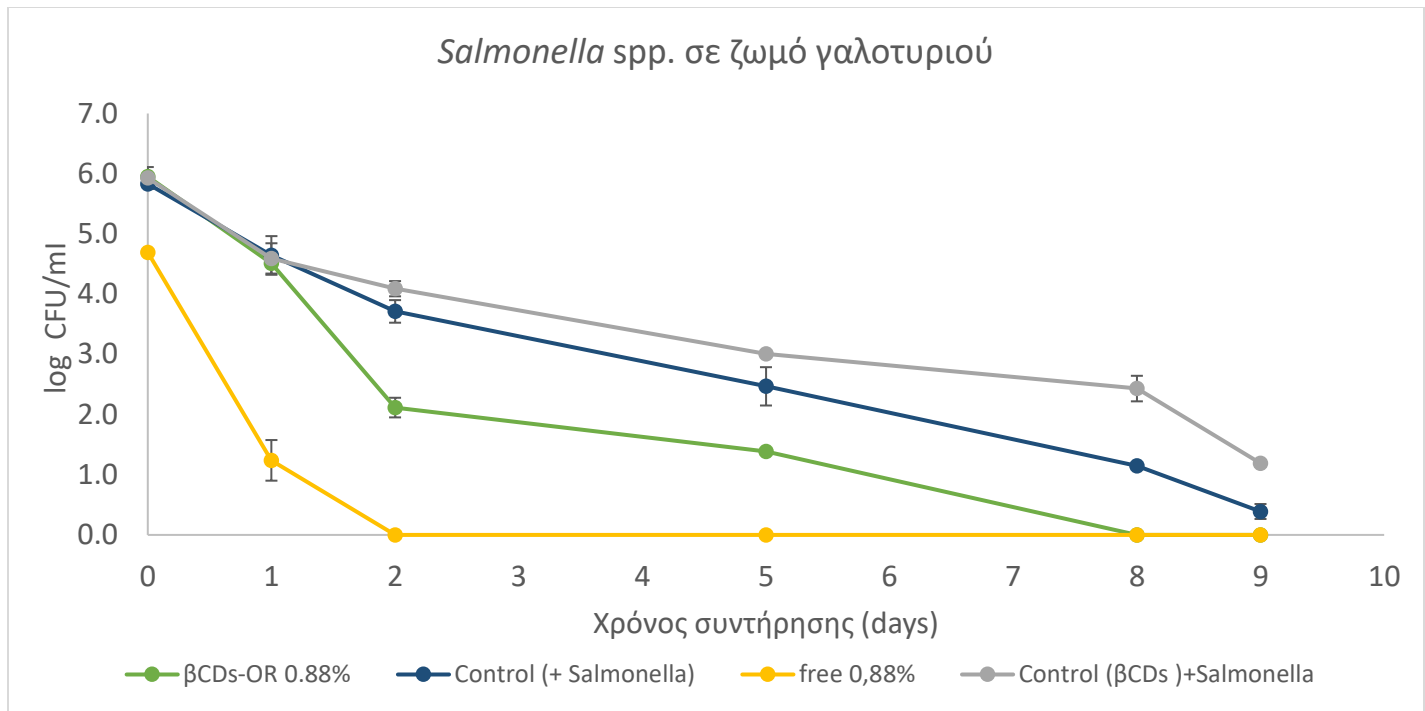
3.3.1.2. *In vitro* εφαρμογή σε ζωμό τυριών (υγρό model food)

Στα δείγματα του ζωμού κατικιού και του ζωμού γαλοτυριού, χρησιμοποιήθηκε η σκόνη εγκλεισμένου ΕΟ ρίγανης σε β-κυκλοδεξτρίνη σε αναλογία 1:99. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις ΕΟ ρίγανης, μία ίση με το MIC (0.88 %) και μία ίση με το μισό του MIC (0.44 %).



Γράφημα 3 Η επιβίωση του πληθυσμού της *Salmonella* spp. έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ζωμό κατικιού συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

Ο αρχικός πληθυσμός της *Salmonella* spp. στο ζωμό τυριού ήταν 6 log CFU/ml. Ωστόσο, με την προσθήκη του ελεύθερου ΕΟ ρίγανης, ο πληθυσμός έφτασε κάτω από τα όρια ποσοτικοποίησης. Πιο συγκεκριμένα με την συγκέντρωση 0.88 % αυτό πραγματοποιήθηκε την πρώτη μέρα και με την συγκέντρωση 0.44 % πραγματοποιήθηκε την δεύτερη μέρα (Γράφημα 3). Για τα δείγματα β-CDs OR 0.88 % και β-CDs OR 0.44 %, υπήρχε σταδιακή μείωση του πληθυσμού του παθογόνου. Για τη συγκέντρωση β-CDs OR 0.44 %, στο διάστημα δεκαεννέα ημερών που πραγματοποιήθηκε το πείραμα, υπήρχε μείωση 4 log CFU/ml, ενώ για τη συγκέντρωση 0.88 %, εμφανίστηκε μείωση 5 log CFU/ml. Επίσης, οι δύο μάρτυρες (control (+), control β-CDs) εμφανίζουν την ίδια συμπεριφορά και στο διάστημα του πειράματος παρατηρείται μείωση περίπου 3.2 log CFU/ml.

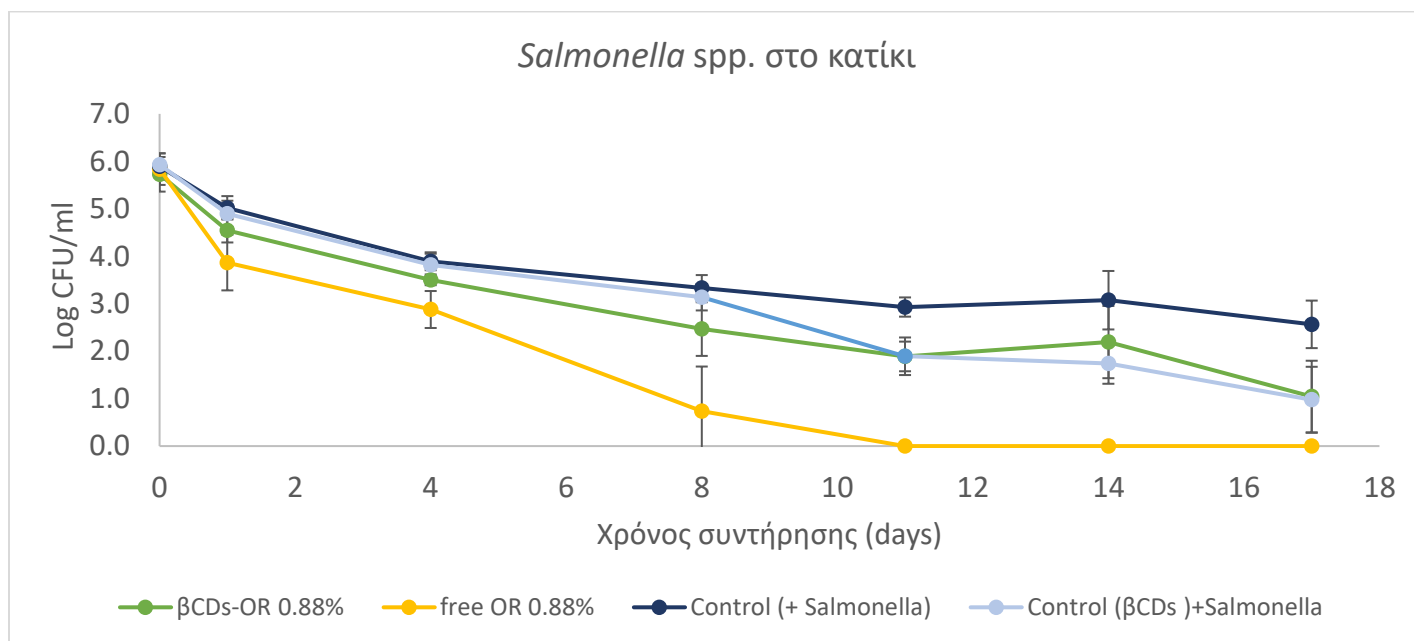


Γράφημα 4 Η επιβίωση του πληθυσμού της *Salmonella* spp. έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ζωμό γαλοτυριού συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

Η εφαρμογή του εγκλεισμένου ΕΟ ρίγανης, του μάρτυρα β-CDs και του control (+), σε ζωμό γαλοτυριού, έδωσε αρχικό πληθυσμό της *Salmonella* 6.0 log CFU/ml. Αντιθέτως, το free 0.88% έδρασε από την πρώτη δειγματοληψία και μείωσε τον πληθυσμό κατά 1.3 log CFU/ml (Γράφημα 4). Επίσης το free 0.88% παρουσίασε τη μεγαλύτερη μείωση του παθογόνου, καθώς σε διάστημα μίας μέρας, έφτασε σε επίπεδα, μικρότερα του ορίου ποσοτικοποίησης. Το δείγμα β-CDs OR 0.88%, έδειξε τη δεύτερη μεγαλύτερη μείωση, φτάνοντας τα όρια ποσοτικοποίησης σε διάστημα έξι ημερών, καθώς μειώθηκε 5 log CFU/ml. Το δείγμα control β-CDs, μειώθηκε 5 log CFU/ml σε διάστημα εννέα ημερών ενώ το control (+), έδειξε ελάττωση 5 log CFU/ml σε διάστημα οχτώ ημερών. Παραδόξως, το control β-CDs έδειξε μικρότερη μείωση από ότι το control (+), ενώ η β-κυκλοδεξτρίνη είναι γνωστό ότι εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση.

3.3.1.3. *In situ* εφαρμογή σε κατίκι

Για την εφαρμογή των επεμβάσεων στο κατίκι, χρησιμοποιήθηκε η σκόνη εγκλεισμένου ΕΟ ρίγανης σε β-κυκλοδεξτρίνη σε αναλογία 1:99. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση ΕΟ ρίγανης ίση με το MIC (0.88 %).



Γράφημα 5 Η επιβίωση του πληθυσμού της *Salmonella* spp. έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κατίκι συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

Κατά την εφαρμογή του ΕΟ ρίγανης σε προϊόν κατικιού, ο αρχικός πληθυσμός ήταν 6 log CFU/ml. Σε όλες τις επεμβάσεις παρατηρήθηκε μείωση του παθογόνου μικροοργανισμού (Γράφημα 5). Το δείγμα που παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση ήταν το free OR 0.88%, όπου σε διάστημα οχτώ ημερών έφτασε κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, δηλαδή μικρότερο του ενός λογαρίθμου. Τα δείγματα control β-CDs και β-CDs OR 0.88 % εμφάνισαν την ίδια συμπεριφορά με συνολική μείωση 5 λογαρίθμων. Ενώ και το control (+), εμφανίζει μείωση, μικρότερη από τις προηγούμενες, ίση με 3.5 log CFU/ml.

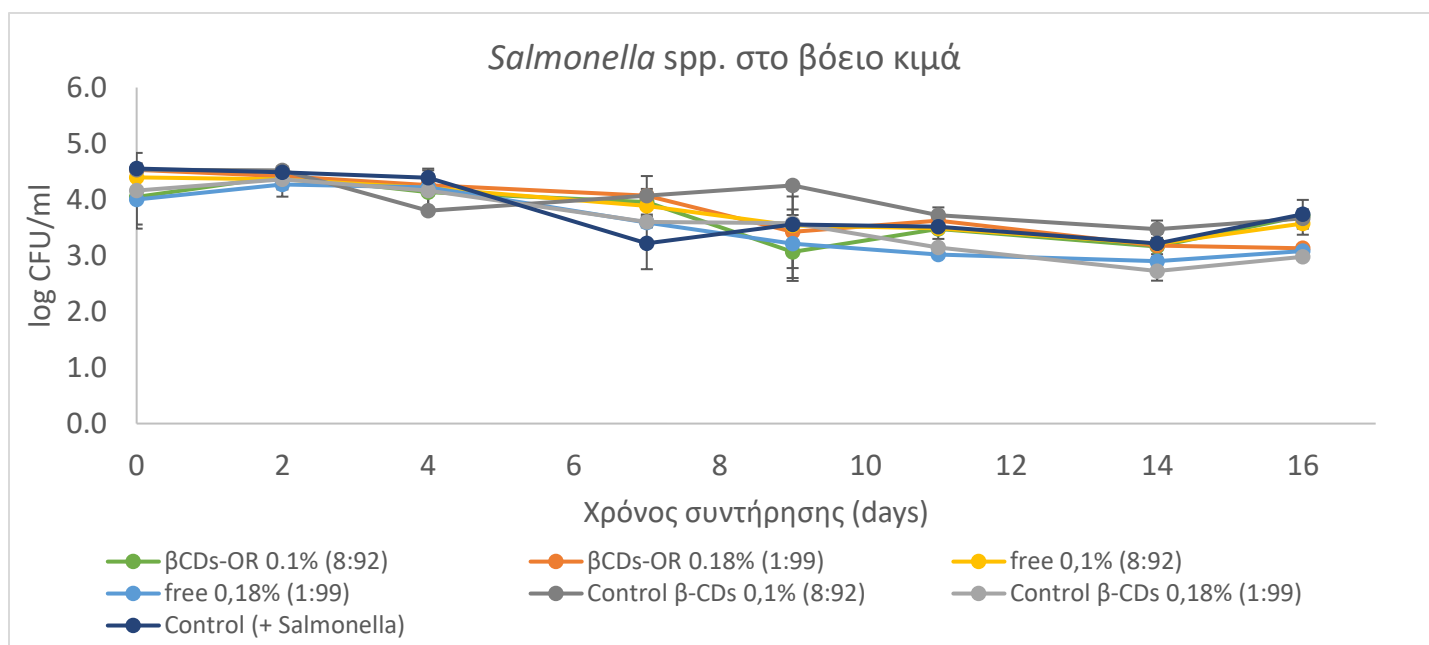
Επίσης, σε ορισμένα δείγματα (β-CDs OR 0.88%, control β-CDs (+)), πραγματοποιήθηκε επέμβαση με λουτρό υπερήχων προκειμένου να εξεταστεί η πιθανή απελευθέρωση του

εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαφορά σε σχέση με τα δείγματα που δεν είχαν υποστεί την επέμβαση σε λουτρό υπερήχων.

Ακόμα, εξετάστηκαν οι ίδιες επεμβάσεις σε προϊόν γαλοτυριού, όπου παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα δείγματα σε διάστημα μίας ημέρας, ο πληθυσμός της *Salmonella* μειώθηκε κάτω από τα επίπεδα του ορίου ποσοτικοποίησης.

3.3.1.4. *In situ* εφαρμογή σε κιμά

Για το προϊόν του κιμά, χρησιμοποιήθηκαν οι σκόνες με αναλογία ΕΟ ρίγανης σε β -CDs 1:99 και 8:92, σε συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ίσες με 0.18 % και 0.10 %, αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις είναι οι διπλάσιες από το MIC της εκάστοτε αναλογίας σκονών ΕΟ- β -CDs.



Γράφημα 6 Η επιβίωση του πληθυσμού της *Salmonella* spp. έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε βόειο κιμά συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 10 °C.

Στην Day 0, παρατηρείται η άμεση επίδραση, του ελεύθερου αιθέριου ελαίου, στον πληθυσμό του παθογόνου (Γράφημα 6). Ο αρχικός πληθυσμός είναι στους 4.6 log CFU/g και με την επίδραση του ελεύθερου αιθέριου ελαίου στην συγκέντρωση 0.10% (free 0.10% (8:92)) μειώνεται στους 4.4

log CFU/g και με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση 0.18% (free 0.18% (1:99)) μειώνεται ακόμα περισσότερο στους 4.0 log CFU/g. Η ίδια άμεση επίδραση που προκύπτει από το δείγμα free 0.18% (1:99), εμφανίζεται και στο β-CDs OR 0.10% (8:92), γεγονός το οποίο οφείλεται στη μεγάλη ποσόστωση αιθέριου ελαίου στην εξωτερική επιφάνεια της β-κυκλοδεξτρίνης. Αντιθέτως, στη σκόνη με αναλογία 1:99, ο πληθυσμός δεν υπέστη μεγάλη μείωση (4.5 log CFU/g), καθώς ο εγκλεισμός σε αυτή την αναλογία είναι μεγάλος και πιθανόν να μην έχει πραγματοποιηθεί ακόμα η απελευθέρωση του ΕΟ. Όσον αφορά τους μάρτυρες της β-CDs, προκύπτει και η δική τους επίδραση στον πληθυσμό του παθογόνου, καθώς η β-CD αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα, και στο δείγμα με μεγαλύτερη ποσότητα β-CD (control β-CDs 0,18% (1:99)) υπάρχει μεγαλύτερη μείωση.

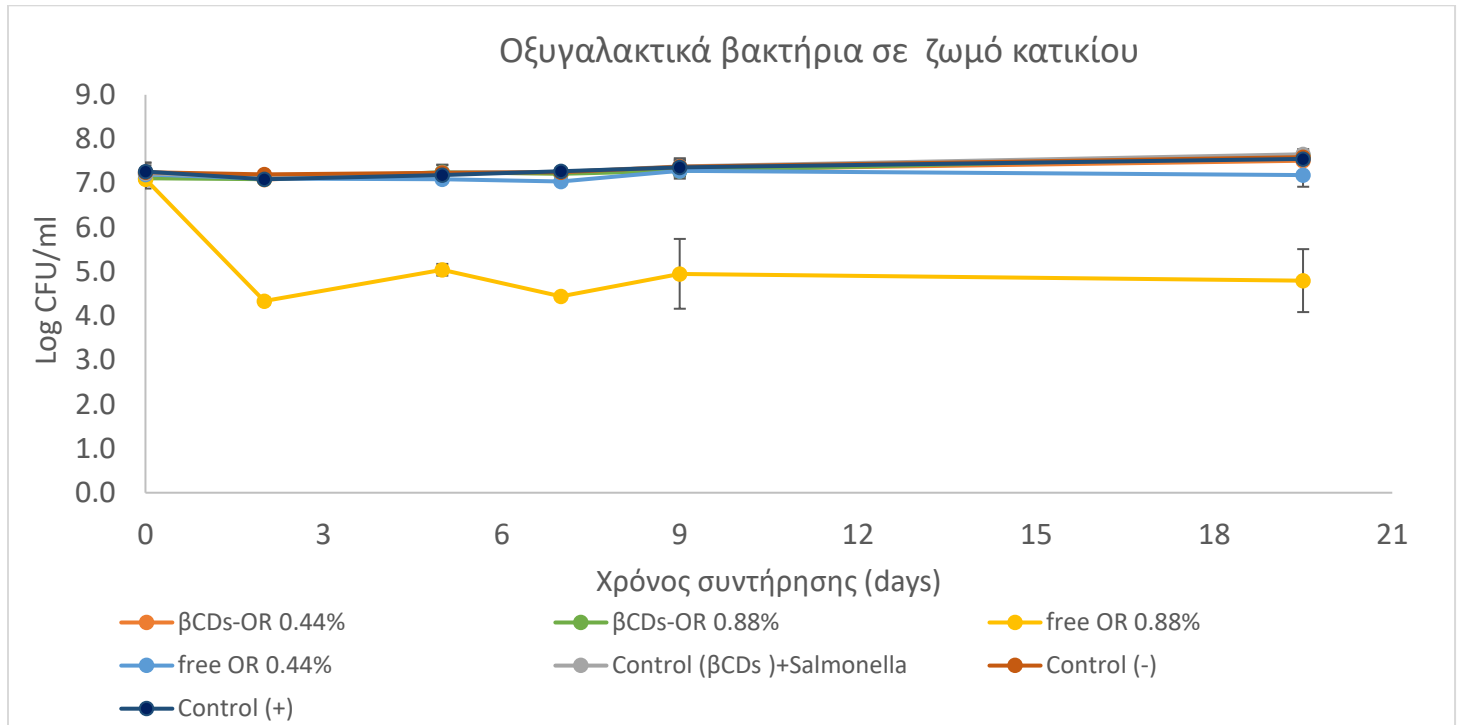
Τις πρώτες εννέα μέρες, μεγαλύτερη δράση εμφανίζουν το free 0.18% (1:99) και το β-CDs OR 0.1% (8:92) με συνολικά λογαριθμική μείωση πληθυσμού ίση με 1.5 log CFU/g, την ίδια στιγμή που ο μάρτυρας που περιέχει αποκλειστικά το εμβόλιο, εμφανίζει μείωση ενός λογαρίθμου. Από την μέρα εννέα έως το τέλος του πειράματος (Day 16), το δείγμα με την σκόνη με αναλογία 8:92 εμφανίζει μια μικρή αύξηση στον πληθυσμό της τάξεως του μισού λογαρίθμου, ενώ για την σκόνη 1:99, συνεχίζει η μείωση του πληθυσμού, καθώς σκόνη 1:99 έχει μεγαλύτερο εγκλεισμό και μετά από τη μέρα εννέα συνεχίζει η απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου.

Στους 10 °C, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η *Salmonella* spp., θα έπρεπε να εμφανίζει αύξηση του πληθυσμού της. Επειδή όμως τα δείγματα μας βρίσκονται σε αναερόβιες συνθήκες, παρατηρούνται σε όλα τα δείγματα μείωση του παθογόνου.

Σημαντικό για τη διεξαγωγή του πειράματος είναι ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων που βρίσκεται στην μικροχλωρίδα του κιμά να είναι μικρότερος από τον πληθυσμό της *Salmonella* spp. για να εμφανίζονται στο θρεπτικό υλικό XLD μόνο οι αποικίες της *Salmonella* spp. Για αυτό το λόγο, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός με αρχικό πληθυσμό 10^5 CFU/g, το οποίο επιβεβαιώθηκε και από τον πληθυσμό του μάρτυρα χωρίς το αιθέριο έλαιο, που την πρώτη μέρα της δειγματοληψίας ήταν 4.6 log CFU/g, ενώ ο πληθυσμός των εντεροβακτηρίων ήταν 1.6 log CFU/g.

Είναι εμφανές ότι το προϊόν παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών καθώς οι ενδογενείς παράγοντες του τρόφιμου, που επηρεάζονται από τα συστατικά του και οι εξωγενείς παράγοντες (πχ. θερμοκρασία συντήρησης, διαθεσιμότητα οξυγόνου) επιδρούν στη συμπεριφορά της μικροχλωρίδας, δρώντας συνεργιστικά ή κατασταλτικά. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αντιδρούν με τους φαινολικούς δακτυλίους των συστατικών του ΕΟ της ρίγανης και συνεπώς μειώνεται η διαθεσιμότητά τους για αντιμικροβιακή δράση (Careaga et al., 2003).

3.3.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια

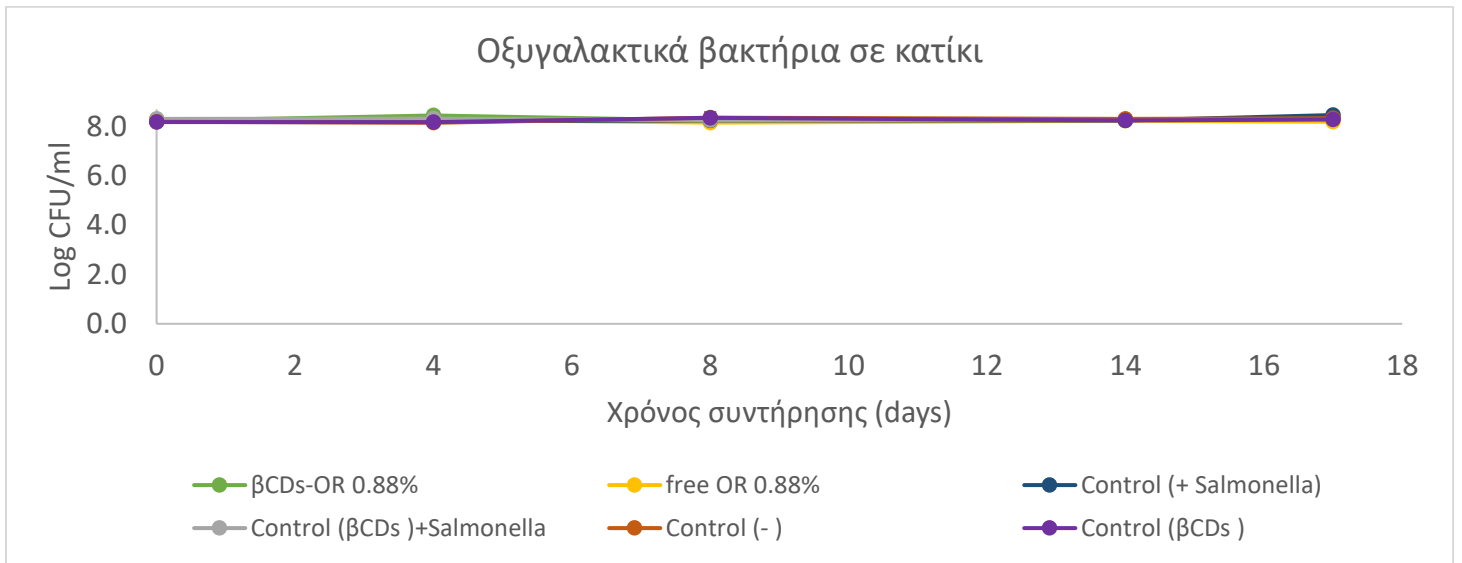


Γράφημα 7 Η επιβίωση του πληθυσμού της των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ζυμό κατικιού συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

Ο αρχικός πληθυσμός οξυγαλακτικών βακτηρίων όλων των δειγμάτων, ήταν στους 7 log CFU/ml. Όπως προκύπτει και από το Γράφημα 7 τα περισσότερα δείγματα, κατά την διάρκεια των ημερών συντήρησης, παρέμειναν στις ίδιες συγκεντρώσεις. Εξαιρέση αποτέλεσε το δείγμα free 0.88 %, το

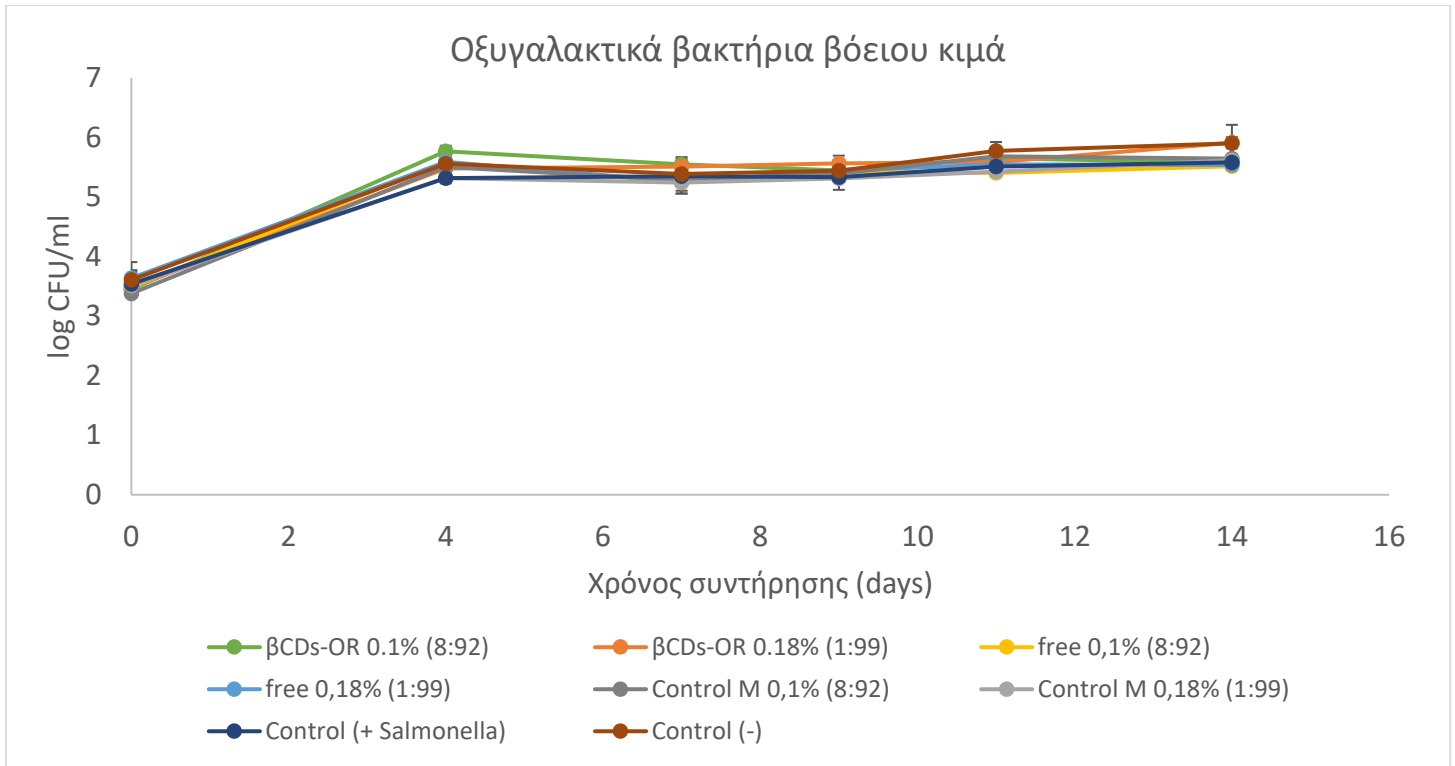
οποίο εμφάνισε μείωση 2.3 log CFU/ml. Το ενδιαφέρον είναι ότι το δείγμα free 0.44 %, δεν εμφάνισε καμία επίδραση στον πληθυσμό του παθογόνου.

Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση του ΕΟ ρίγανης στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών, σε ζωμό γαλοτυριού όπου από την Day 0, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών, ήταν κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης (μικρότερο του ενός log CFU/ml).



Γράφημα 8 Η επιβίωση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κατίκι συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

Ο αρχικός πληθυσμός της εφαρμογής του ελεύθερου και εγκλεισμένου αιθέριου ελαίου και των μαρτύρων σε κατίκι (Γράφημα 8), σε όλες τις επεμβάσεις ήταν 8 log CFU/ml. Κατά τη διάρκεια όλων των ημερών συντήρησης (δεκαεφτά ημέρες), ο πληθυσμός παρέμεινε σταθερός.



Γράφημα 9 Η επιβίωση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε βόειο κιμά συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 10 °C.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια του βόειου κιμά σε όλα τα δείγματα την πρώτη μέρα της δειγματοληψίας (Day 0), είχαν αρχικό πληθυσμό 3.5 log CFU/g (Γράφημα 9). Το συγκεκριμένο υποδεικνύει ότι το αιθέριο έλαιο της ρίγανης δεν επιδρά άμεσα στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως συμβαίνει στον πληθυσμό της *Salmonella* spp. Επίσης, σε όλα τα δείγματα, την τέταρτη μέρα, εμφανίζεται ανάπτυξη των οξυγαλακτικών, όπως είναι αναμενόμενο, ίση με 2 log CFU/g. Στη συνέχεια της δειγματοληψίας, ο πληθυσμός παραμένει σταθερός, σε όλα τα δείγματα. Στο τέλος της δειγματοληψίας, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών είναι κάτω από τους 6 log CFU/g που θεωρείται το ανώτατο επιτρεπτό όριο.

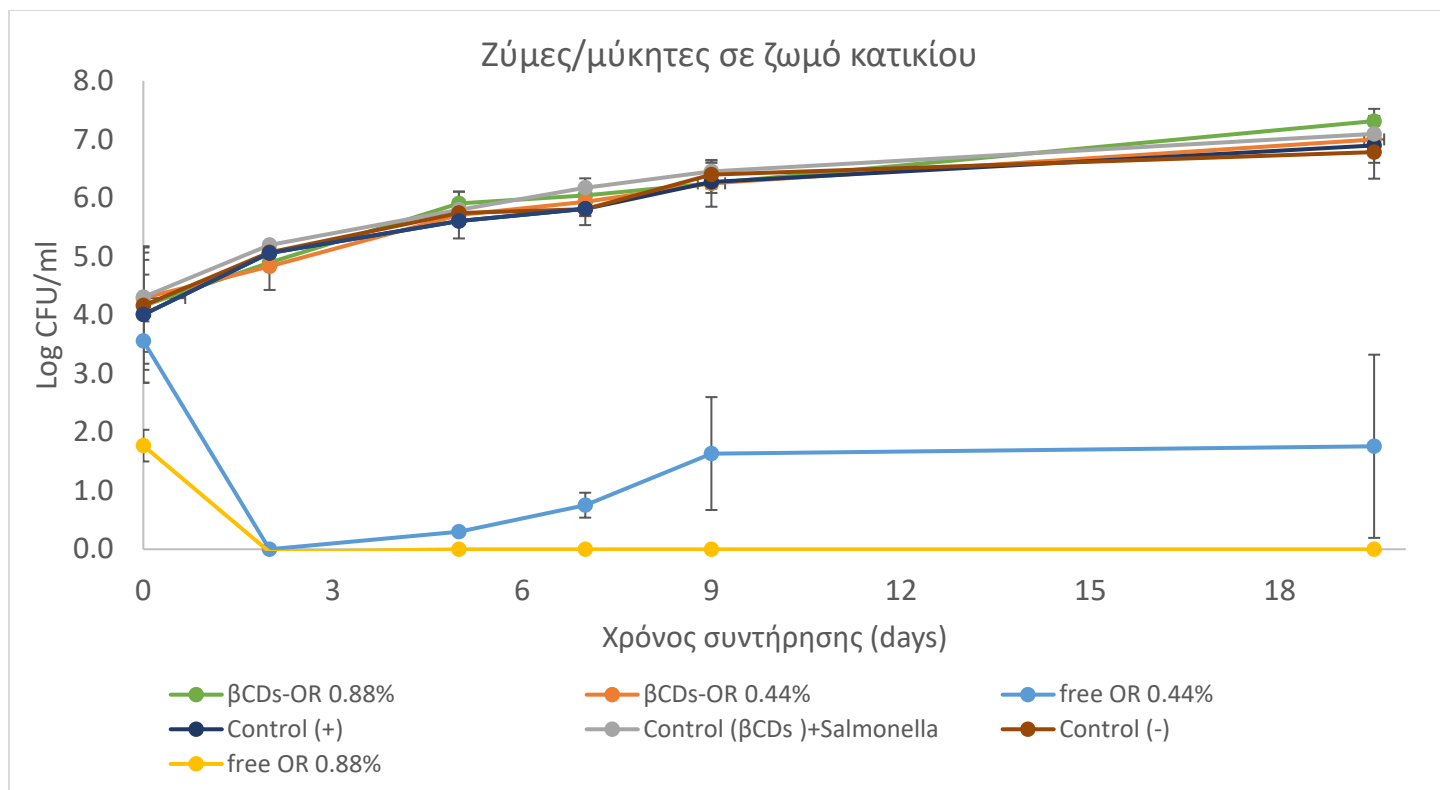
Η αύξηση των οξυγαλακτικών, πιθανόν οφείλεται στις συνθήκες συντήρησης των δειγμάτων (χαμηλή θερμοκρασία και αναερόβιες συνθήκες) καθώς τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ψυχρότροπα και αναερόβια (Pothakos et al., 2015).

Από την παρούσα μελέτη φαίνεται ότι το ΕΟ ρίγανης είναι δραστικό εναντίον της *Salmonella* spp. (Γράφημα 6) που είναι αρνητικό κατά Gram βακτήριο, ενώ δεν επηρεάζει τα οξυγαλακτικά βακτήρια που είναι θετικά κατά Gram. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και από τον Zhang et al. (2016) σε χοιρινό με την προσθήκη ΕΟ μαύρου πιπεριού. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά οφείλεται στην πυκνότερη κυτταρική μεμβράνη και τη μεγαλύτερη συγκέντρωση πεπτιδογλυκάνης των Gram – θετικών βακτηρίων, σε σύγκριση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Hsouna et al., 2011).

Η αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την μείωση του pH (Miya et al., 2014).

Από ότι φαίνεται, η συμπεριφορά του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν θα άλλαζε σε θερμοκρασία συντήρησης ενός οικιακού ψυγείου, καθώς και σε συντήρηση στους 3 °C, τα οξυγαλακτικά αυξάνονται κατά 1.5 log CFU/g σε διάστημα δώδεκα ημερών (Djordjevic et al., 2018) σε αναερόβιες συνθήκες, όπως παρατηρείται και στη παρούσα μελέτη (day 11).

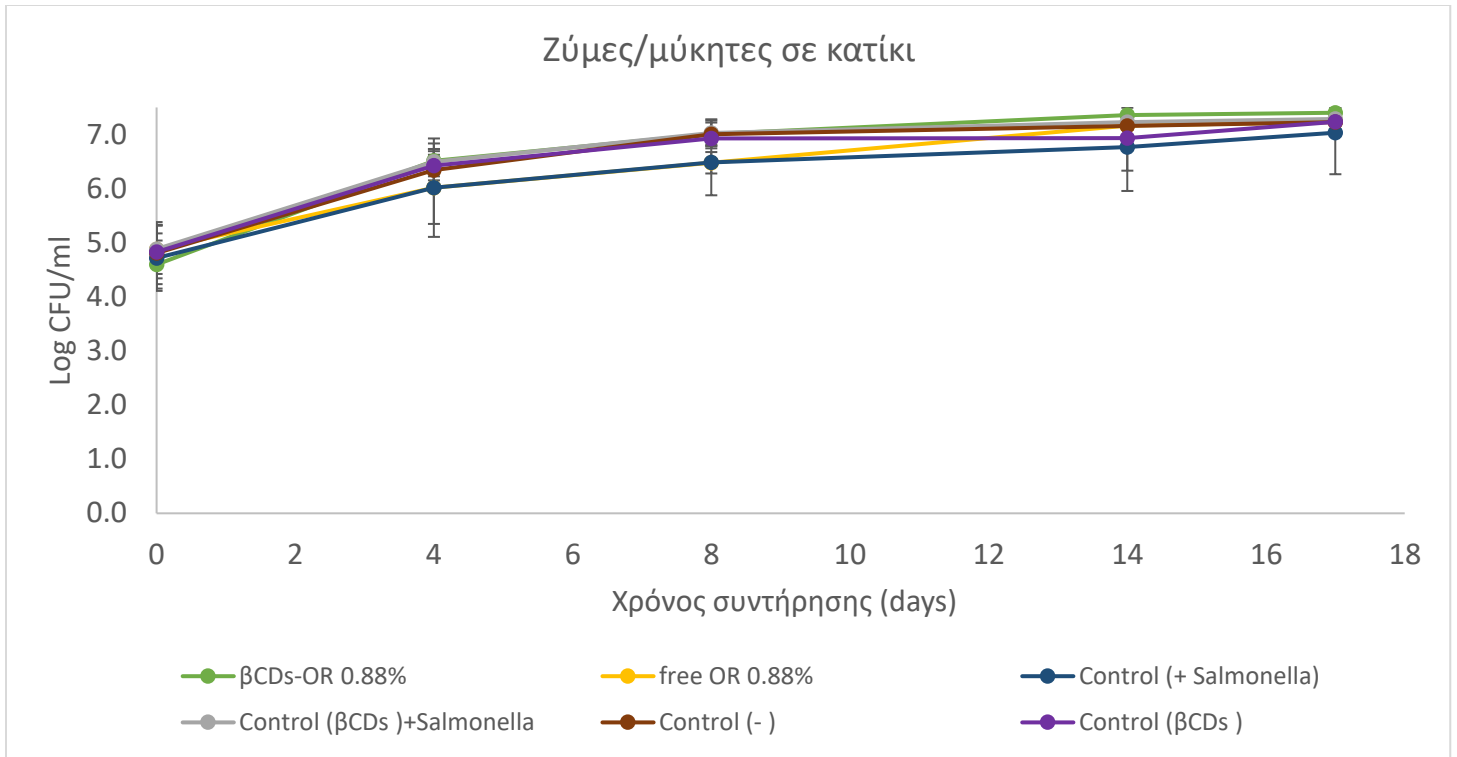
3.3.3. Ζύμες και μύκητες



Γράφημα 10 Η επιβίωση του πληθυσμού των ζυμών/μυκήτων έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ζωμό κατικιού συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

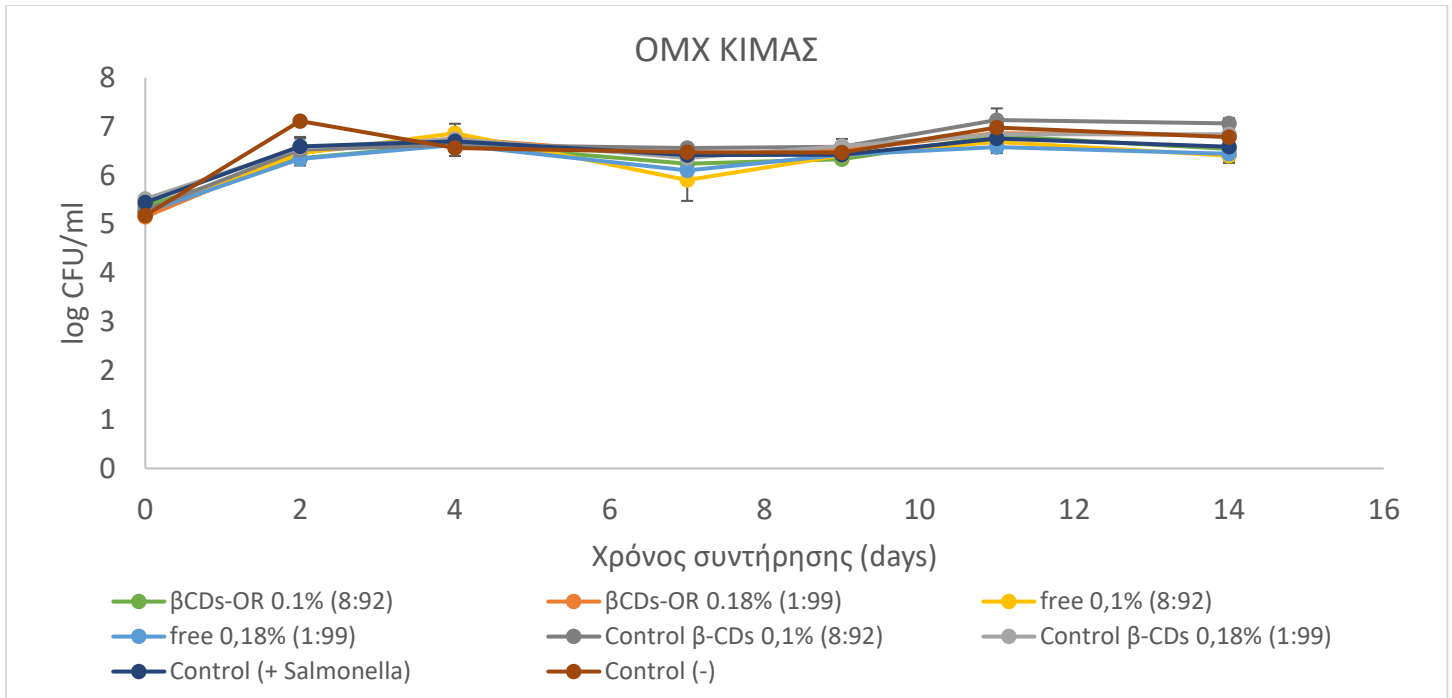
Ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών/μυκήτων σε ζωμό κατικιού ήταν κοντά στους 4 log CFU/ml. Αντιθέτως, το δείγμα free OR 0.88 %, είχε αρχικό πληθυσμό 2 log CFU/ml και έφτασε κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης σε διάστημα μίας ημέρας. Επίσης και το δείγμα free OR 0.44 %, ξεκίνησε με πληθυσμό 3.5 log CFU/ml και έφτασε στο όριο ποσοτικοποίησης σε διάστημα δύο ημερών (Γράφημα 10). Όλα τα υπόλοιπα δείγματα, εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά και μέχρι το τέλος του πειράματος ο πληθυσμός τους αυξήθηκε κατά 3 log CFU/ml.

Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση του ΕΟ ρίγανης στον πληθυσμό των ζυμών/μυκήτων, σε ζωμό γαλοτυριού όπου από την Day 0, ο πληθυσμός των τους, ήταν κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης (μικρότερο του ενός log CFU/ml).



Γράφημα 11 Η επιβίωση του πληθυσμού των ζυμών/μυκήτων έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε κατίκι συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 7 °C.

Οι ζύμες/μύκητες στο κατίκι ξεκίνησαν με αρχικό πληθυσμό 5 log CFU/ml (Γράφημα 11). Όλες οι επεμβάσεις εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά, πιο συγκεκριμένα παρουσίασαν αύξηση κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Τις πρώτες οχτώ μέρες, αυξήθηκαν κατά 2 log CFU/ml και από την μέρα οχτώ έως την δεκαεπτά, δηλαδή στο τέλος του πειράματος, παρέμειναν στους 7 log CFU/ml. Την δέκατη έβδομη μέρα, το δείγμα control (+) είχε το χαμηλότερο πληθυσμό (7.0 log CFU/ml) και το δείγμα β-CDs OR 0.88 % έχει τον υψηλότερο πληθυσμό (7.5 log CFU/ml).

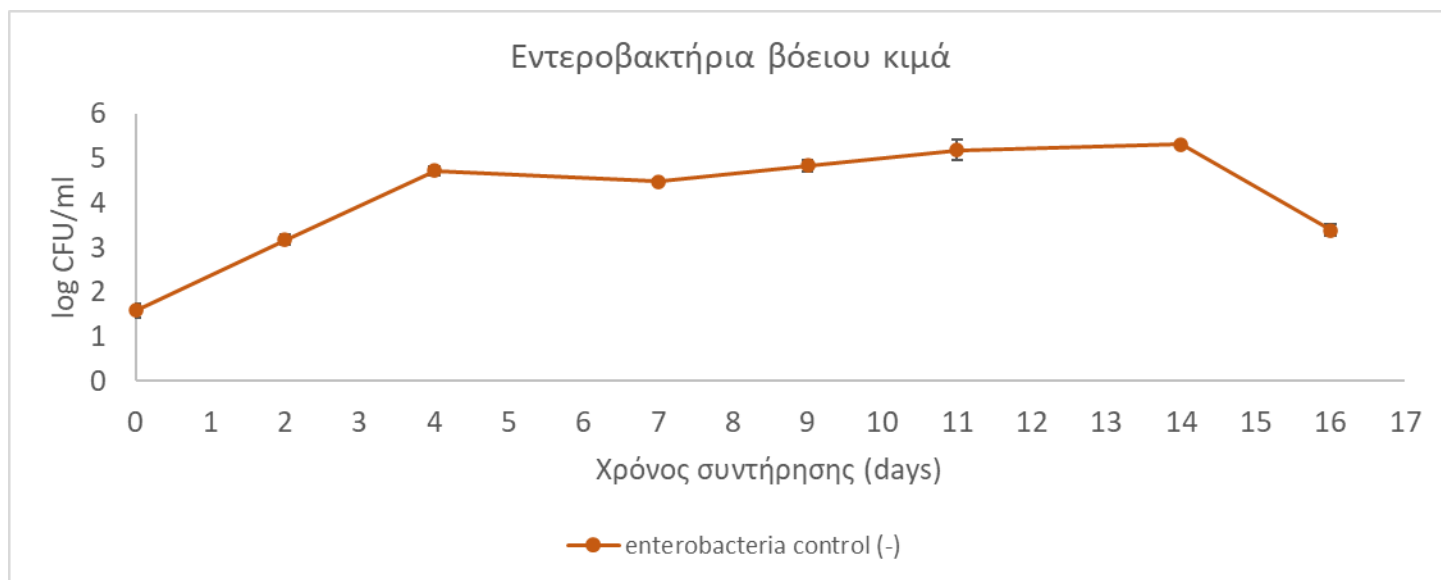


Γράφημα 12 Η επιβίωση του πληθυσμού της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε βόειο κιά συναρτήσσει του χρόνου συντήρησης στους 10 °C.

Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός της OMX στον κιά, είναι ίσος με 5.5 log CFU/g και επηρεάζεται από τις διαδικασίες μεταχείρισής του. Σε όλα τα δείγματα, την πρώτη μέρα της δειγματοληψίας (day 0), δεν εμφανίζεται διαφορά στους αρχικούς μικροβιακούς πληθυσμούς (Γράφημα 12), οπότε το ελεύθερο ΕΟ ρίγανης δεν επιδρά άμεσα στον πληθυσμό της OMX. Αυτό οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση του ΕΟ που επιλέχτηκε (0.10%, 0.18%), καθώς σε παρόμοιες μελέτες, εμφανίστηκε διαφορά έως και 0.5 log CFU/g ανάμεσα στο δείγμα χωρίς αιθέριο έλαιο και το δείγμα με συγκέντρωση 1% ΕΟ ρίγανης (Skandamis et al., 2001). Κατά την διάρκεια της διεξαγωγής του πειράματος παρατηρήθηκε μια αύξηση της OMX, όπου στο τέλος του, σημειώθηκε αύξηση κατά 2 log CFU/g.

Για τον κιά, οι τιμές της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας αποτελούν δείκτη της μικροβιακής αλλοιώσής του. Σύμφωνα με τον κανονισμό (EC) 2073/ 2005, η OMX στον κιά κάτω από 5×10^5 /g (5.7 log CFU/g), θεωρείται ικανοποιητικό όριο από άποψη υγιεινής. Όταν υπερβαίνουν τους 7 log CFU/g, θεωρείται αλλοιωμένο το προϊόν και μη ιδανικό προς κατανάλωση (Boskovic et al., 2017).

Επίσης, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τον πληθυσμό των μη παθογόνων βακτηρίων του κιμά καθώς όπως αναφέρεται από τον Jay (1996), ο υψηλός πληθυσμός της ενδογενούς χλωρίδας του κιμά, τον προστατεύει, λειτουργώντας ανταγωνιστικά έναντι των παθογόνων. Σε μελέτες που χρειάστηκε η μείωση της OMX του κιμά στην αρχή του πειράματος, τα δείγματα προετοιμάστηκαν με βράσιμο, προκειμένου να μειωθούν οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην επιφάνεια (Hayouni et al., 2008).



Γράφημα 13 Η επιβίωση του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων έναντι του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε βόειο κιμά συναρτήσει του χρόνου συντήρησης στους 10 °C.

Ο αρχικός πληθυσμός των εντεροβακτηρίων στο δείγμα control (-) ήταν 1.6 log CFU/ml (Γράφημα 13). Συνολικά, όπως είναι εύλογο, παρουσιάζεται αύξηση του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων του βόειου κιμά από την Day 0 έως την Day 16 ίση με 2 log CFU/ml. Ο αρχικός πληθυσμός των εντεροβακτηρίων στον κιμά του πειράματος, είναι αρκετά χαμηλός σε σχέση με άλλες μελέτες (Boskovic et al., 2017), γεγονός που υποδεικνύει την καλή μεταχείριση του συγκεκριμένου κιμά.

Η οικογένεια των εντεροβακτηρίων δεν περιλαμβάνει μόνο τους παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και τα βακτήρια που έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και

όταν βρίσκονται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10^7 CFU/g, οδηγούν σε μικροβιακή αλλοίωση που επηρεάζει την ασφάλεια και την υγιεινή των τροφίμων. (Säde et al., 2013). Από το Γράφημα 6 φαίνεται ότι ο πληθυσμός της *Salmonella* spp. μειώνεται, ενώ στο γράφημα των συνολικών εντεροβακτηρίων παρουσιάζεται ανάπτυξη, που αυτό επάγεται ότι αναπτύσσονται οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί της οικογένειας των εντεροβακτηρίων.

3.4. Τιμές pH των δειγμάτων

Πίνακας 9 Οι τιμές pH όλων των επεμβάσεων του υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (pH=4.3) την πρώτη και την τελευταία ημέρα συντήρησης.

TSB pH 4.3						
DAYS	β-CDs OR 0.44%	β-CDs OR 0.88%	free OR 0.44%	free OR 0.88%	control (+)	control β-CDs
0	4.4 ±0.0	4.4±0.0	4.4±0.0	4.4±0.0	4.3±0.0	4.4±0.0
19	4.4±0.0	4.4±0.0	4.4±0.0	4.4±0.0	4.4±0.0	4.4±0.0

Πίνακας 10 Οι τιμές pH όλων των επεμβάσεων του υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (pH=7.0) την πρώτη και την τελευταία ημέρα συντήρησης.

TSB pH 7.0						
DAYS	β-CDs OR 0.44%	β-CDs OR 0.88%	free OR 0.44%	free OR 0.88%	control (+)	control β-CDs
0	7.0±0.0	7.1±0.0	7.0±0.0	7.1±0.0	7.0±0.0	7.1±0.0
19	6.9±0.0	7.0±0.0	7.0±0.0	7.1±0.0	6.9±0.0	7.1±0.0

Οι τιμές pH κατά την *in vitro* εφαρμογή του ελεύθερου και εγκλεισμένου ΟΕΟ σε β-CDs σε θρεπτικό ζωμό TSB με pH=4.3 & pH 7, ήταν σταθερές στις τιμές 4.4 (Πίνακας 9) και 7.0 (Πίνακας 10) αντίστοιχα, για όλο το διάστημα των δεκαεννέα ημερών που διεξήχθη το πείραμα.

Πίνακας 11 Οι τιμές pH όλων των επεμβάσεων του ζωμού τυριού κατικιού την πρώτη και την τελευταία ημέρα συντήρησης.

Cheese Broth							
DAYS	β-CDs OR 0.44%	β-CDs OR 0.88%	free OR 0.44%	free OR 0.88%	control (+)	control β-CDs	control (-)
0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.4 ±0.0	4.3 ±0.0
19	4.4 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0

Το pH σε όλες τις επεμβάσεις καθ' όλη τη διάρκεια συντήρησης του ζωμού κατικιού (δεκαεννέα ημέρες), παρέμεινε σταθερό και ίσο με 4.3 (Πίνακας 11), το οποίο ισοδυναμεί με την τιμή pH του κατικιού.

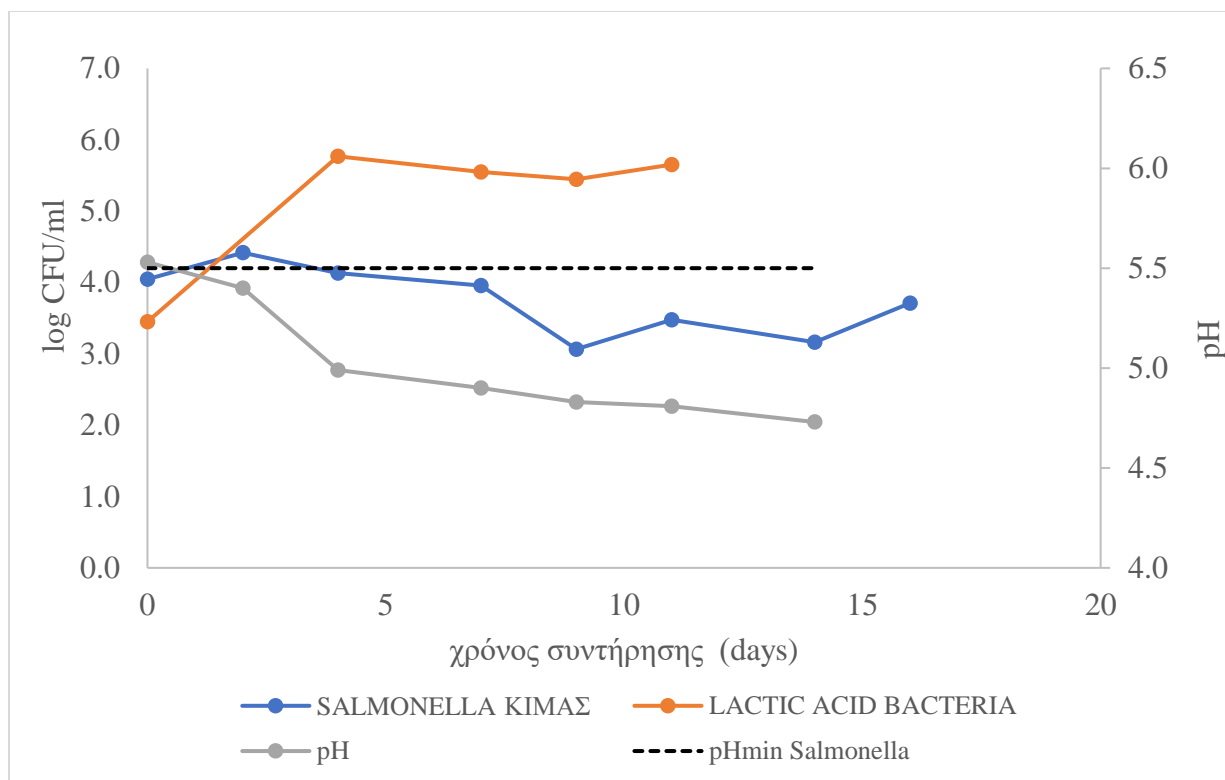
Πίνακας 12 Οι τιμές pH όλων των δειγμάτων του κατικιού την πρώτη και την τελευταία ημέρα συντήρησης.

Κατίκι					
DAYS	β-CDs OR 0.88%	free OR 0.88%	control (+)	control β- CDs (+)	control (-)
0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0	4.3 ±0.0
19	4.5 ±0.3	4.4 ±0.1	4.5 ±0.2	4.3 ±0.1	4.3 ±0.1

Κατά την *in situ* εφαρμογή εγκλεισμένου και ελεύθερου ΕΟ σε κατίκι, οι τιμές pH σε όλες τις επεμβάσεις καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων (Πίνακας 12) παρέμεινε σταθερό και ίσο με 4.3.

Πίνακας 13 Οι τιμές pH όλων των δειγμάτων βόειου κινιά τις ημέρες δειγματοληψίας.

Βόειος κινιάς								
DAYS	β-CDs 0.10% (8:92)	β-CDs 0.18% (1:99)	free 0.1% (8:92)	free 0.18% (1:99)	control M 0.1% (8:92)	control M 0.18% (1:99)	control (+)	control (-)
0	5.5 ±0.0	5.5 ±0.0	5.5 ±0.0	5.5 ±0.0	5.5 ±0.0	5.5 ±0.0	5.5 ±0.0	5.5 ±0.0
2	5.4 ±0.0	5.5 ±0.0	5.4 ±0.0	5.4 ±0.0	5.4 ±0.0	5.4 ±0.0	5.4 ±0.0	5.4 ±0.0
4	5.0 ±0.0	4.9 ±0.0	5.0 ±0.0	5.2 ±0.0	4.8 ±0.0	4.9 ±0.0	4.8 ±0.0	4.9 ±0.0
7	4.9 ±0.0	5.0 ±0.0	4.9 ±0.0	5.9 ±0.0	4.8 ±0.0	4.9 ±0.0	4.9 ±0.0	4.8 ±0.0
9	4.8 ±0.0	4.8 ±0.0	4.8 ±0.0	4.8 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.8 ±0.0	4.7 ±0.0
11	4.8 ±0.0	4.7 ±0.0	4.8 ±0.0	4.8 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0
14	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.8 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0
16	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.8 ±0.0	4.7 ±0.0	4.7 ±0.0	4.8 ±0.0	4.7 ±0.0



Γράφημα 14 Ο χρόνος συντήρησης συναρτίζει των εντεροβακτηρίων, της συγκέντρωσης της *Salmonella* και του pH.

Στο παραπάνω γράφημα (Γράφημα 14), η καμπύλη των εντεροβακτηρίων αφορά το δείγμα control (-), η καμπύλη της *Salmonella* spp. και η καμπύλη του pH αφορούν το δείγμα β-CDs 0.10 % (1:99).

Η μεγαλύτερη μείωση του pH, παρατηρήθηκε την τέταρτη μέρα, όπου η τιμή μειώθηκε κατά 0.8 μονάδες. Ταυτόχρονα με τη μείωση του pH, παρατηρήθηκε αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά 2.5 log CFU/ml, στο ίδιο διάστημα (Γράφημα 14). Επίσης, παρατηρείται ότι όταν το pH φτάσει τη χαμηλότερη τιμή pH που αναπτύσσεται η *Salmonella* spp. (5.5), δηλαδή την τέταρτη ημέρα, ο πληθυσμός του παθογόνου μειώνεται συνεχώς.

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το pH του συσκευασμένου κρέατος, αλλά θεωρείται ότι ο κύριος παράγοντας μείωσής του είναι η αύξηση των οξυγαλακτικών που παράγουν CO₂ και γαλακτικό οξύ (Fernández-López et al., 2008).

3.5. Ενεργότητα ύδατος (a_w) των δειγμάτων

Πίνακας 14 Οι τιμές a_w των δειγμάτων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH= 4.3) την πρώτη και τελευταία ημέρα συντήρησης.

TSB pH 4.3						
DAYS	β -CDs OR 0.44%	β -CDs OR 0.88%	free OR 0.44%	free OR 0.88%	control (+)	control β -CDs
0	0.987±0.000	0.985±0.000	0.987±0.000	0.985±0.000	0.986±0.000	0.986±0.000
19	0.989±0.000	0.992±0.000	0.987±0.000	0.985±0.000	0.987±0.000	0.986±0.000

Στην *in vitro* εφαρμογή εγκλεισμένου και ελεύθερου ΕΟ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH= 4.3) (Πίνακας 14), όλα τα δείγματα ξεκινάνε από τιμές a_w περίπου 0.986. Όμως, σε διάστημα δεκαεννέα ημερών, στα δείγματα β -CDs OR 0.44 %, β -CDs OR 0.88 % και control (+), παρουσιάστηκε μια μικρή αύξηση.

Πίνακας 15 Οι τιμές a_w των δειγμάτων σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH= 7.0) την πρώτη και τελευταία ημέρα συντήρησης.

TSB pH 7.0						
DAYS	β -CDs OR 0.44%	β -CDs OR 0.88%	free OR 0.44%	free OR 0.88%	control (+)	control β -CDs
0	0.986±0.000	0.988±0.000	0.986±0.000	0.988±0.000	0.982±0.000	0.983±0.000
19	0.987±0.000	0.988±0.000	0.986±0.000	0.988±0.000	0.985±0.000	0.985±0.000

Κατά την εφαρμογή εγκλεισμένου και ελεύθερου ΕΟ σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH= 7.0) (Πίνακας 15) την πρώτη μέρα, τα δείγματα που είχαν υποστεί επέμβαση με ελεύθερο και εγκλεισμένο αιθέριο έλαιο έχουν μεγαλύτερη ενεργότητα νερού (0.986- 0.988), από ότι τα δείγμα του μάρτυρα (0.982- 0.983). Την τελευταία μέρα, στα δείγματα μάρτυρα, παρατηρήθηκε αύξηση στην τιμή a_w (0.985), ενώ στα υπόλοιπα δείγματα, παρέμεινε σταθερή.

Πίνακας 16 Οι τιμές a_w των δειγμάτων σε ζωμό κατικιού την πρώτη και τελευταία ημέρα συντήρησης.

Cheese Broth							
DAYS	β -CDs OR 0.44%	β -CDs OR 0.88%	free OR 0.44%	free OR 0.88%	control (+)	control β -CDs	control (-)
0	0.991±0.001	0.991±0.001	0.990±0.000	0.989±0.001	0.990±0.001	0.988±0.003	0.988±0.001
19	0.982±0.004	0.983±0.004	0.982±0.005	0.983±0.006	0.983±0.005	0.983±0.003	0.983±0.005

Στην εφαρμογή ΕΟ σε ζωμό κατικιού (Πίνακας 16), η ενεργότητα του νερού εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή στα δείγματα που περιέχουν ΕΟ ρίγανης (ελεύθερο και εγκλεισμένο), από ότι τα δείγματα του μάρτυρα. Σε όλες τις επεμβάσεις, στο τέλος του πειράματος, παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας όπου έφτασε σε τιμές 0.982- 0.983.

Πίνακας 17 Οι τιμές a_w των δειγμάτων της *in situ* εφαρμογής σε κατίκι την πρώτη και τελευταία ημέρα συντήρησης.

Κατίκι					
DAYS	β -CDs OR 0.88%	free OR 0.88%	control (+)	control β -CDs (+)	control (-)
0	0.972 \pm 0.006	0.975 \pm 0.004	0.973 \pm 0.004	0.973 \pm 0.003	0.974 \pm 0.008
19	0.974 \pm 0.003	0.970 \pm 0.002	0.971 \pm 0.001	0.969 \pm 0.001	0.971 \pm 0.002

Οι τιμές a_w στην *in situ* εφαρμογή ΕΟ σε προϊόν κατικιού (Πίνακας 17), την πρώτη μέρα του πειράματος, κυμαίνονται από 0.972 έως 0.975, ενώ υπάρχει μείωση στο τέλος του πειράματος (0.968- 0.971). Τα δείγματα του κατικιού εμφάνισαν μικρότερες τιμές a_w , από ότι τα δείγματα του υγρού θρεπτικού υποστρώματος (TSB pH= 4.3 & pH= 7.0) (Πίνακας 14, Πίνακας 15) και τα δείγματα του ζωμού κατικιού (Πίνακας 16), το οποίο είναι απόλυτα λογικό, καθώς τα τελευταία αφορούν υδατικά διαλύματα.

Πίνακας 18 Οι τιμές a_w των δειγμάτων της *in situ* εφαρμογής σε βόειο κινιά την πρώτη και τελευταία ημέρα συντήρησης.

Βόειος κινιάς								
DAYS	β -CDs 0.1% (8:92)	β -CDs 0.18% (1:99)	free 0.1% (8:92)	free 0.18% (1:99)	control M 0.1% (8:92)	control M 0.18% (1:99)	control (+)	control (-)
0	0.982 \pm 0.000	0.984 \pm 0.000	0.982 \pm 0.000	0.984 \pm 0.000	0.982 \pm 0.000	0.979 \pm 0.000	0.982 \pm 0.000	0.981 \pm 0.000
14	0.985 \pm 0.000	0.986 \pm 0.000	0.986 \pm 0.000	0.984 \pm 0.000	0.984 \pm 0.000	0.984 \pm 0.000	0.986 \pm 0.000	0.989 \pm 0.000

Οι αρχικές τιμές ενεργότητας ύδατος στην *in situ* εφαρμογή ελεύθερου και εγκλεισμένου ΕΟ σε β -CDs σε βόειο κινιά, κυμαίνονται από 0.981 έως 0.984 (Πίνακας 18). Οι τιμές a_w αυξήθηκαν στο τέλος του πειράματος (δεκατέσσερις ημέρες), εκτός από το δείγμα ελεύθερου ΕΟ σε συγκέντρωση

0.18%. Η ενεργότητα νερού του προϊόντος βόειου κιμά είναι υψηλότερη από το προϊόν του κατρκιού.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το αιθέριο έλαιο ρίγανης εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella* spp. Η μεγάλη δράση του, οφείλεται κυρίως στην υψηλή συγκέντρωση των φαινολικών του (Boskovic et al., 2017)

Η επίδραση του ελεύθερου ΕΟ σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB (pH 4.3, 7.0) και ζωμό κατικιού και γαλοτυριού έδρασε άμεσα στη μείωση του πληθυσμού του παθογόνου *Salmonella* spp., όπου τη μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση την παρουσίασε η μεγαλύτερη συγκέντρωση ΕΟ (0.88%), ενώ το εγκλεισμένο δεν εμφάνισε μείωση. Στα δείγματα του κατικιού, το ελεύθερο ΕΟ εμφάνισε μεγαλύτερη δράση, στη συνέχεια ακολούθησε το εγκλεισμένο, έπειτα ο μάρτυρας που περιέχει μόνο την β-κυκλοδεξτρίνη και τέλος ο μάρτυρας που περιείχε μόνο το εμβόλιο. Στα δείγματα του βόειου κιμά, η εφαρμογή ελεύθερου και εγκλεισμένου ΕΟ και οι μάρτυρες δεν εμφάνισαν μεγάλη διαφορά στον πληθυσμό του παθογόνου.

Η απουσία της *Salmonella* spp. σε 25 g ωμού κρέατος είναι νομικό κριτήριο του ασφαλούς τρόφιμου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, εφόσον το ΕΟ ρίγανης ήταν αποτελεσματικό στην τόσο υψηλή συγκέντρωση του παθογόνου *Salmonella* spp. που εμβολιάσαμε (10^4 - 10^6 log CFU/ml), τότε πιθανόν θα είναι αποτελεσματικό ενάντια στα χαμηλότερα επίπεδα *Salmonella* που υπάρχουν φυσικώς στα τρόφιμα.

Όσον αφορά τη διαφορά στις αναλογίες ΟΕΟ- β-CDs (1:99, 8:92), η μεγάλη ποσότητα του αιθέριου ελαίου της ρίγανης στην εξωτερική κοιλότητα της β-κυκλοδεξτρίνης στην αναλογία 8:92 (69.1 ± 5.9 %) (χαμηλός εγκλεισμός) (Πίνακας 7), την καθιστά να δρα παρόμοια με τα δείγματα του ελεύθερου αιθέριου ελαίου (free) και να οδηγεί στην πιο γρήγορη θανάτωση των μικροοργανισμών. Αντίθετα, η σκόνη με την αναλογία 1:99, πιθανόν απελευθερώνει σταδιακά την αντιμικροβιακή ουσία και περιέχει μικρή ποσότητα του αιθέριου ελαίου στην εξωτερική επιφάνεια (5.5 ± 0.6 %) (Πίνακας 7), καθώς έχει υψηλό εγκλεισμό και δεν ασκεί μεγάλη επίδραση στους μικροοργανισμούς. Ακόμα, η μεγαλύτερη ποσότητα του αιθέριου ελαίου εξωτερικά προσδίδει μεγαλύτερη οσμή στη σκόνη με αναλογία 8:92, αλλά ταυτόχρονα εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι απαιτείται μικρότερη συγκέντρωση σκόνης ΟΕΟ σε β-CDs για να αποκτήσουμε την επιθυμητή συγκέντρωση αιθέριου ελαίου.

BIBΛIOΓPAΦIA

- Abarca RL, Rodriguez FJ, Guarda A, Galotto MJ and Bruna JE, 2016, Characterization of betacyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component, *Food Chemistry*, 196, 968-975
- Al-Nasiri G., Cran J. M., Smallridge J. A. & Bigger W. S., 2018, Optimisation of β -cyclodextrin inclusion complexes with natural antimicrobial agents: thymol, carvacrol and linalool, *Journal of Microencapsulation*, 35, 26-35
- Ayala-Zavala J.F., Soto-Valdez H., Gonzalez-Leon A., Alvarez-Parrilla E., Martin-Belloso O., Gonzalez-Aguilar G.A., 2008, Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 60, 359–368
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., & Idaomar M., 2008, Biological effects of essential oils - A review, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475
- Balasubramani G., Suganya K., Geethanjali S., Nagaraja S., Murugan M., 2020, A review on the origin of multidrug-resistant *Salmonella* and perspective of tailored *phoP* gene towards avirulence, *Microbial Pathogenesis*, 147, Article 104352
- Baranauskaite J, Kopustinskiene DM and Bernatoniene J, 2019, Impact of Gelatin Supplemented with Gum Arabic, Tween 20, and β -Cyclodextrin on the Microencapsulation of Turkish Oregano Extract. *Molecules*, 24(1), 176
- Beyene G., 2008, Phenotypic and Molecular Characterizations of *Salmonella* Species in Ethiopia, *Biology*
- Biernbaum E.K., Gnezda A., Akbar S., Franklin R., Venturelli P.A., McKillip J.L., 2021, Lactoferrin as an antimicrobial against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk, *Int. J. Dairy Sci.*, 2
- Blixt Y., Borch E., 2002, Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef, *Meat Sci.*, 60, 371–378
- Boskovic M., Djordjevic J., et al., 2017, Inhibition of *Salmonella* by thyme essential oil and its effect on microbiological and sensory properties of minced pork meat packaged under vacuum and modified atmosphere, *International Journal of Food Microbiology*, 258, 58-67
- Boyle W., 1955, Spices and essential oils as preservatives, *The American Perfumer and Essential Oil Review*, 66, 25–28

Braga S.S., Lysenko K., El-Saleh F., & Paz, F.A.A., 2021, Cyclodextrin-Efavirenz Complexes Investigated by Solid State and Solubility Studies, *Proceedings*, 78(1), 15

Burt S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *Int J Food Microbiol*, 94, 223– 253

Careaga M., Fernandez E., Dorantes L., Mota L., Jaramillo M.E., Hernandez-Sanchez H., 2003, Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat, *International Journal of Food Microbiology*, 83, 331–335

Cheirsilp B., Rakmai J., 2016, Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications, *Biology, Engineering and Medicine*, 2 (1), 1-6

Cid-Samamed A., Rakmaib J., Mejutoa J.C., Simal-Gandarac J., Astray G., 2022, Cyclodextrins inclusion complex: Preparation methods, analytical techniques and food industry applications, *Food Chemistry*, 384, 132467

Costa G., Gidaro M.C., Vulla D., Supuran C.T., Alcaro S., 2016, Active components of essential Oils as anti-obesity potential drugs investigated by in silico techniques, *J Agric Food Chem*, 64(26), 5295–5300

Crini G., 2014, Review: a history of cyclodextrins, *Chem Rev*, 114(21), 10940–10975

Da Silva Júnior W.F., De Oliveira Pinheiro J.G., Moreira C.D.L.F.A., De Souza F.J.J., De Lima A.A.N., 2017, Alternative Technologies to Improve Solubility and Stability of Poorly Water-Soluble Drugs A.M. Grumezescu (Ed.), *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*, Elsevier, 281-305

Danaei M., Dehghankhold M., 2018, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics*

Devine C.E., Hopkins D.L., Hwang I.H., Ferguson D.M., Richards I., 2004, Electrical stimulation. In: Jensen W., Devine C., Dikeman M. (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences*, 413–423

Dumitraşcu L., Nicolau A.I. et al., 2020, Time-temperature profiles and *Listeria monocytogenes* presence in refrigerators from households with vulnerable consumers, *Food Control*, 111, 107078

Djordjevic J., Boskovi M., Starcevi M., et al., 2018, Survival of *Salmonella* spp. in minced meat packaged under vacuum and modified atmosphere, *Brazilian journal of microbiology*, 49, 607–613

Dos Santos C., Buera P., Mazzobre, F., 2017, Novel trends in cyclodextrins encapsulation. Applications in food science, *Current Opinion in Food Science*, 16, 106-113

FDA, 2014, Water activity (aw) in foods

Fernández-López J., Sendra E., Sayas-Barberá E., Navarro C., Pérez-Alvarez J.A., 2008, Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber, *Meat Sci.*, 80, 410–417

Fisher K., & Phillips C., 2008, Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer?, *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156–164

Franzini R., Ciogli A., Gasparri F., Ismail O.H., Villani C., 2018, Recent developments in chiral separations by supercritical fluid chromatography *Chiral Analysis: Advances in Spectroscopy, Chromatography and Emerging Methods*, Second Edi., Elsevier B.V

Fusco V., Quero G.M., 2014, Culture-dependent and culture-independent nucleic-acid-based methods used in the microbial safety assessment of milk and dairy products, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 493-537

García-Sotelo D., Silva-Espinoza B., Perez-Tello M., Olivás I., Alvarez-Parrilla E., González-Aguilar A. G., Ayala-Zavala J.F., 2019, Antimicrobial activity and thermal stability of rosemary essential oil: β -cyclodextrin capsules applied in tomato juice, *LWT*, 111, 837-845

Ghorbanzade T., Akhavan -Mahdavi S., Kharazmi M.S., Ibrahim A.S., Jafari S.M., 2022, Loading of fish oil into β -cyclodextrin nanocomplexes for the production of a functional yogurt, *Food Chemistry: X*, 15, 100406

Govaris A., Solomakos N., Pexara A., Chatzopoulou P.S., 2010, The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella enteritidis* in minced sheep meat during refrigerated storage, *Int. J. Food Microbiol.*, 137 (2–3), 175–180

Greig, J.D., Ravel, A., 2009, Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution, *International Journal of Food Microbiology*, 130, 77–87

Hapiot F., Tilloy S., and Monflier E., 2006, Cyclodextrins as Supramolecular Hosts for Organometallic Complexes, *Chemical Reviews*, 106, 3, 767–781

Hayouni et al., 2008, Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat, *International Journal of Food Microbiology*, 125, 242–251

Hernández-Sánchez P., López-Miranda S., Guardiola L., Serrano-Martínez A., Gabaldón J.A., Nuñez-Delicado E., 2017, Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with β -cyclodextrins, *J Sci Food Agric*, 97(2), 420–426

Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, T.M., 2013, Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications, *LWT Food Sci. Technol.*, 51, 86–93

Ho S., Thoo Y.Y., Young D.J., Siow L.F., 2017, Cyclodextrin encapsulated catechin: Effect of pH, relative humidity, and various food models on antioxidant stability, *LWT – Food Science and Technology*, 85, 232-239

Hsouna A.B., Trigui M., Mansour R.B., Jarraya R.M. Damak M., Jaoua S., 2011, Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat, *Int. J. Food Microbiol.*, 148, 66–72

Huang H., Huang C., Yin C., RU Khan M., Zhao H., Xu Y., Huang L., Zheng D., Qi M., 2020, Preparation and characterization of β -cyclodextrin–oregano essential oil microcapsule and its effect on storage behavior of purple yam, *Journal of science and food agriculture*, 100, 4849-4857

Humphrey T., & Jorgensen F., 2006, Review. Pathogens on meat infection in animals establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples, *Meat Science*, 74, 89–97

Jay, J.M., 1996, Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers, *Meat Science*, 43, S59–S66

Jay J.M., Loessner M.J., and Golden D.A., 2005, *Modern Food Microbiology*, Springer

Jiang L., Yang J., Wang Q., Ren L., Zhou J., 2019, Physicochemical properties of catechin/ β -cyclodextrin inclusion complex obtained via co-precipitation, *CYTA – Journal of Food*, 17 (1), 544-551

Kachur K., Suntres Z., 2020, The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60 (18), 3042-3053

Kapetanakou A.E., Skandamis P.N., 2016, Applications of active packaging for increasing microbial stability in foods: natural volatile antimicrobial compounds, *Curr Opin Food Sci.*, 12, 1–12

Karampoula F., Doulgeraki A.I., Fotiadis C., Tampakaki A., Nychas G.E., 2019, Monitoring biofilm formation and microbial interactions that may occur during a *Salmonella* contamination incident across the network of a water bottling plant, *Microorganisms*, 7 (8), 236

Katsiari M.C., Kondyli E., Voutsinas L.P., 2008, The quality of Galotyri-type cheese made with different starter cultures, *Food Control*, 20, 113-116

Keklik M.N., Demirci A., Puri M.V., 2010, Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light, *Poult Sci.*, 89, 570-581.

Kfoury M., Auezova L., Greige-Gerges H., Fourmentin S., 2019, Encapsulation in cyclodextrins to widen the applications of essential oils, *Environmental Chemistry Letters*, 17 (1), 129-143

Kohane, D.S., 2007, Microparticles and Nanoparticles for Drug Deliver, *Biotechnol. Bioeng.*, 96, 203–209

Kotronia M., Kavetsou E., Loupassaki S., Kikionis S. ID, Vouyiouka S. and Detsi A., 2017, Encapsulation of Oregano (*Origanum onites* L.) Essential Oil in β -Cyclodextrin (β -CD): Synthesis and Characterization of the Inclusion Complexes, *Bioengineering*

Koutsoumanis K., Lambropoulou K. and Nychas G. J. E., 1999, A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial, *Int. J. Food Microbiol.*, 49, 67-74

Kurkov S.V., Loftsson T., 2013, Cyclodextrins, *Int J Pharm*, 453(1), 167– 180

Lee J.H., Lee J., Song K.B., 2015, Development of a chicken feet protein film containing essential oils, *Food Hydrocoll*, 46, 208–215

Liu Y., Yan Y., 2022, Inhibitory effects of clove and oregano essential oils on biofilm formation of *Salmonella* Derby isolated from beef processing plant, *LWT*, 162, 113486

Mahdavi A., Sadeghi R., Faridi A., Hedayati S., Shaddel R., Dima C., Jafari S.M., 2022, Nanodelivery systems for d-limonene; techniques and applications, *Food Chemistry*, 132479

Martina K., Binello A., Lawson D., Jicsinszky L., Cravotto G., 2013, Recent applications of cyclodextrins as food additives and in food processing, *Curr Nutr Food Sci.*, 9(3), 167–179

Matencio A., Navarro-Orcajada S., García-Carmona F., López-Nicolás J.M., 2020, Applications of cyclodextrins in food science. A review, *Trends in Food Science & Technology*, 104, 132-143

Matsagkos S.K., 2007, *Salmonella*, what causes it?, *Food Technology*, 3

Mead P.S., Slutsker L., Detz, V., McCaig L.F., Breese J.S., Shapiro C., et al., 1999, Food related illness and dead in the United States, *Emerging Infectious Diseases*, 5, 607–625

Miya S., Takahashi H., Hashimoto M., et al., 2014, Development of a controlling method for *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp. in fresh market beef by using polylysine and modified atmosphere packaging, *Food Control*, 37, 62–67

Morasi R.M., Rall V.L.M., Dantas S.T.A., Alonso V.P.P., Silva N.C.C., 2022, Salmonella spp. in low water activity food: Occurrence, survival mechanisms, and thermoresistance, *Food Science*, 87, 6, 2310-2323

Motarjemi Y., 2013, *Encyclopedia of Food Safety*, Academic Press

Panagou E.Z., 2008, A radial basis function neural network approach to determine the survival of *Listeria monocytogenes* in Katiki, a traditional Greek soft cheese, *Journal of Food Protection*, 71, 750-759

Pavela R., Benelli G., 2016, Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints, *Trends Plant Sci.*, 21(12), 1000–1007

Pothakos V., Devlieghere F., Villani F., Björkroth J., Ercolini D., 2015, Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage, *Meat Sci.*, 109, 66–74

Prakash B., Kedia A., Mishra P.K., Dubey N.K., 2015, Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities-potentials and challenges, *Food Control*, 47, 381–391

Przybyla M.A., Yilmaz G., Remzi Becer C., 2020, Natural cyclodextrins and their derivatives for polymer synthesis, *Polymer Chemistry*, 11 (48), 7582-7602

Qi Q., Mokhtar M.N., & Zimmermann W., 2007, Effect of ethanol on the synthesis of large-ring cyclodextrins by cyclodextrin glucanotransferases, *Journal of Inclusion Phenomena on Macrocyclic Chemistry*, 57, 95–99

Rasooli I., Rezaei M.B., & Allameh A., 2006, Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 236–241

Rogga K.J., Samelis J., Kakouri A., Katsiari M.C., Savvaidis I.N., Kontominas M.G., 2005, Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C, *International Dairy Journal*, 15, 59-67

Ryan M P., Dwyer J., & Adley C.C., 2017, Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen Salmonella, *BioMed Research International*, 6

Säde E., Murros A., Björkroth J., 2013, Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry, *Food Microbiol.*, 34, 252–258

Salmon D. and Smith T., 1885, “Report on swine plague,” US Bureau of Animal Industries. 2nd Annual Report 184

Skandamis P.N., & Nychas, G.J.E., 2000, Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations, *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1646–1653

Skandamis P.N. and Nychas E. G.-J., 2001, Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1011-1022

Skandamis, P., Tsigarida, E., Nychas, G.E., 2002, The effect of oregano essential oil on survival/death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5 C under aerobic, VP/ MAP conditions, *Food Microbiol.*, 19, 97–103

Szejtli J., Szenté L., 2005, Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins, *Eur J Pharm Biopharm*, 61(3), 115–125

Tao F., Hill E. L., Peng Y., Gomes L.C., 2014, Synthesis and characterization of β -cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications, *LWT - Food Science and Technology*, 59, 247-255

Tsigarida E., Skandamis P. and Nychas G.J. E., 2000, Behavior of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 51C, *J. Appl. Microbiol.*, 89, 901-909

Vivek K.B., Kwang-Hyun B., Sun Chul K., 2012, Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review, *Food Research International*, 45, 722- 734

Wang J., Zhang H.-H., Liu F., Zhang Y.-P., Zhao Y.-M., 2019, Preparation, characterization, and antimicrobial activity of inclusion complexes of *Myristica fragrans* Hott. essential oil in β -cyclodextrins, *Pharmazie*, 74, 590-594

Yang Z., Xiao Z., Ji H., 2015, Solid inclusion complex of terpinen-4-ol/ β -cyclodextrin: kinetic release, mechanism and its antibacterial activity, *Flavour Frag J.*, 30(2), 179–187

Yi, Z., Quan, H., Jun, W., Jian, P., Wei, H., 2016, Oregano essential oil improves intestinal morphology and expression of tight junction proteins associated with modulation of selected intestinal bacteria and immune status in a pig model, *Biomed Res. Int.*, 1–11

Zhang J., Wang Y., Pan D.D., Cao J.X., Shao X.F., Chen Y.J., Ou C.R., 2016, Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage, *Meat Sci.*, 117, 130–136

Zhao X.H., Zhao F.H., Wang J., Zhong N., 2017, Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: Food safety perspectives, RSC Advances, 7 (58), 36670-36683

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MIC_PLATE.jpg

<https://www.integra-biosciences.com/china/en/applications/automated-minimum-inhibitory-concentration-testing>