



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση της καρβακρόλης εγκλεισμένης ή μη σε β κυκλοδεξτρίνες  
στην επιβίωση και τη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου  
μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόεια μπιφτέκια

**Γεωργία Ν. Αγγελοπούλου**

Επιβλέπων καθηγητής:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

**ΑΘΗΝΑ  
2023**

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

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

Επίδραση της καρβακρόλης εγκλεισμένης ή μη σε β κυκλοδεξτρίνες  
στην επιβίωση και τη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου  
μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόεια μπιφτέκια

Effect of carvacrol entrapped or not in β-cyclodextrins  
on the survival and thermostability of the pathogen microorganism  
*Escherichia coli* O157:H7 in beef patties

**Γεωργία Ν. Αγγελοπούλου**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής Γ.Π.Α (επιβλέπων)

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Τσιρώνη Θεοφανία, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α

## Επίδραση της καρβακρόλης εγκλεισμένης ή μη σε β κυκλοδεξτρίνες στην επιβίωση και τη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόεια μπιφτέκια

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης & Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων & Ποτών

### Περίληψη

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία μελετήθηκε η επίδραση της εγκλεισμένης σε β-κυκλοδεξτρίνη καρβακρόλης στην θερμοανθεκτικότητα και επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόεια μπιφτέκια. Παρασκευάστηκαν σύμπλοκα β-κυκλοδεξτρίνης καρβακρόλης σε αναλογία 92:8 για την χρήση τους στα μπιφτέκια. Επίσης μελετήθηκε η παρουσία της ελεύθερης καρβακρόλης αλλά και του μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης συγκριτικά με το σύμπλοκο. Η επίδραση όλων των παραπάνω μεταχειρίσεων ελέγχθηκε σε εμβολιασμένα με 7 log CFU/gr *E. coli* μπιφτέκια αλλά και σε μη εμβολιασμένα μπιφτέκια. Τα μπιφτέκια καταψύχθηκαν αμέσως μετά την προετοιμασία τους στους -18 °C για 7 ημέρες. Η θερμική επεξεργασία τους έγινε χωρίς απόψυξη με ψήσιμο σε οικιακό τηγάνι σε δύο θερμοκρασίες κάτω και πάνω από τους 65 °C. Η θερμοκρασία κάτω από τους 65 °C (περίπου 61-62 °C) συμβόλιζε ένα ανεπαρκές ψήσιμο που συμβαίνει εσκεμμένα ή μη. Πάνω από τους 65 °C το μπιφτέκι ψήθηκε μέχρι τους 71 °C όπως προτείνεται από τον USDA ως ασφαλές ψήσιμο. Η καταγραφή των θερμοκρασιών έγινε με την τοποθέτηση θερμοζευγους K στο κέντρο του μπιφτεκιού και την χρήση του καταγραφικού τιμών PicoLog. Έγινε μικροβιολογική ανάλυση στον νωπό, τον κατεψυγμένο και τον ψημένο εμβολιασμένο και μη κιμά. Κάθε μεταχείριση και κατάσταση του κιμά είχε τρία δείγματα και το πείραμα διεξάχθηκε δύο φορές. Στο εμβολιασμένο κιμά καταμετρήθηκε το *Escherichia coli* O157:H7 σε επιλεκτικό υπόστρωμα CT-SMAC και σε γενικό υπόστρωμα TSA ενώ στο μη εμβολιασμένο υπολογίστηκε η OMX σε TSA, τα *Enterobacteriaceae* σε VRBGA και το *E. coli* στο TBX. Η διαφορά των καταμετρήσεων σε CT-SMAC και TSA υποδηλώνει τον τραυματισμό των κυττάρων *Escherichia coli* O157:H7 λόγω της αδυναμίας τους να αναπτυχθούν στο επιλεκτικό υπόστρωμα. Σε όλες τις μεταχειρίσεις του εμβολιασμένου και μη κιμά μετρήθηκε το pH με την χρήση πεχαμέτρου. Τέλος προσδιορίστηκε η χημική σύσταση του νωπού κιμά (μη εμβολιασμένου) σε όλες τις μεταχειρίσεις μέσω του FoodScan και λήφθηκαν πολυφασματικές φωτογραφίες με την χρήση Videometerlab.

**Επιστημονική περιοχή:** Μικροβιολογία Τροφίμων

**Λέξεις κλειδιά:** καρβακρόλη, β-κυκλοδεξτρίνη, βόειος κιμάς, θερμική αδρανοποίηση, *Escherichia coli* O157:H7

## Effect of carvacrol entrapped or not in $\beta$ -cyclodextrins on the survival and thermostability of the pathogen microorganism *Escherichia coli* O157:H7 in beef patties

MSc Food Science & Technology  
Department of Food Science & Human Nutrition  
Laboratory of Food Quality Control & Hygiene

### Abstract

In the present thesis, the effect of carvacrol encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin on the thermal resistance and survival of the pathogenic microorganism *Escherichia coli* O157:H7 in beef burgers was studied.  $\beta$ -cyclodextrin-carvacrol complexes were prepared in a 92:8 ratio for use in the burgers. The presence of both free carvacrol and the  $\beta$ -cyclodextrin control was also studied in comparison with the complex. The effect of all the above treatments was tested on burgers inoculated with 7 log CFU/g *E. coli* and on uninoculated burgers. The burgers were frozen immediately after preparation at  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 7 days. They were heat treated without thawing by cooking in a household pan at temperatures below and above  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The temperature below  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  (approximately  $61\text{--}62\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) symbolized an inadequate cooking occurring intentionally or not. Above  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  the burger was cooked to  $71\text{ }^{\circ}\text{C}$  as recommended by the USDA as safe cooking. Temperatures were recorded by placing a K thermocouple in the center of the burger and using the PicoLog temperature data logger. Microbiological analysis was performed on fresh, frozen, and cooked inoculated and uninoculated ground beef. Each treatment and condition of minced meat had three samples and the experiment was conducted twice. *Escherichia coli* O157:H7 was enumerated in the inoculated minced meat on CT-SMAC selective substrate and TSA general substrate, while in the uninoculated minced meat, OMX was counted on TSA, Enterobacteriaceae on VRBGA and *E. coli* on TBX. The difference in counts on CT-SMAC and TSA suggests the injury of *Escherichia coli* O157:H7 cells due to their inability to grow on the selective substrate. In all treatments of inoculated and uninoculated minced meat, pH was measured using a pH meter. Finally, the chemical composition of fresh minced meat (non-inoculated) in all treatments was determined using FoodScan and multispectral photographs were taken using Videometerlab.

**Scientific Field:** Food Microbiology

**Keywords:** carvacrol,  $\beta$ -cyclodextrin, ground beef, thermal inactivation, *Escherichia coli* O157:H7

*Η παρούσα εργασία αφιερώνεται  
στους γονείς μου*

## Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική διατριβή με θέμα: «Επίδραση της καρβακρόλης εγκλεισμένης ή μη σε β κυκλοδεξτρίνες στην επιβίωση και τη θερμοανθεκτικότητα του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόεια μπιφτέκια.», εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα αυτής της μελέτης και Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, για τη συνεχή καθοδήγηση και τις ουσιώδεις συμβουλές, που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα της εκπόνησης της πτυχιακής. Η βοήθεια της κυρίας Γουναδάκη Αντωνία υπήρξε καθοριστική στην επιτυχή ολοκλήρωση της πειραματικής πορείας.

Η πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης δε θα μπορούσε να γίνει χωρίς την τεράστια βοήθεια που μου προσέφεραν τα μέλη του εργαστηρίου Μποζινάκη Δήμητρα και Μεσημέρη Ειρήνη τόσο στη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και στην επεξεργασία των δεδομένων. Τ

έλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου και τους φίλους μου, που με στηρίζουν καθημερινά όλα αυτά τα χρόνια για την εκπλήρωση των στόχων μου.

Αγγελοπούλου Γεωργία

Αθήνα, 2023

---

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

1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	10
1.1 Μοσχαρίσιο κρέας.....	10
1.2 Επιμόλυνση κρέατος.....	10
1.2.1 Βιολογικοί κίνδυνοι .....	10
1.3 Παράγοντες ανάπτυξης μικροοργανισμών .....	11
1.3.1 Συνθήκες ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών στο κρέας.....	11
1.4 <i>Escherichia coli</i> .....	13
1.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	14
1.5 Ασφάλεια κρέατος.....	15
1.6 Κατάψυξη κρέατος .....	16
1.6.1 Επίδραση της κατάψυξης στο <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	16
1.7 Θερμική επεξεργασία κρέατος.....	17
1.7.1 Θερμική αδρανοποίηση του <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	18
Σκοπός .....	22
2.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	24
2.1 Αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός .....	24
2.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια .....	24
2.1.2 Όργανα, συσκευές και αναλώσιμα .....	24
2.2 Πειραματικός σχεδιασμός .....	25
2.3 Μικροοργανισμός <i>Echerichia coli</i> O157:H7.....	26
2.3 Εμβόλιο μικροοργανισμών.....	26
2.3.1 Παρασκευή εμβολίου μικροοργανισμών.....	26
2.3.2 Καταμέτρηση εμβολίου.....	27
2.4 Σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνη-καρβακρόλη.....	28
2.4.1 Παρασκευή συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνη-καρβακρόλη .....	28
2.4.2 Παρασκευή μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης .....	28
2.4.3 Ποσοστό ενθυλάκωσης της καρβακρόλης στο σύμπλοκο .....	28
2.5 Εύρεση του MIC και του MBC.....	30
2.6 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καρβακρόλης .....	31
2.7 Παρασκευή δειγμάτων κιμά.....	31
2.8 Προεργασίες για τη θερμική επεξεργασία δειγμάτων .....	33
2.9 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων.....	33
2.10 Δειγματοληψία δειγμάτων.....	34

2.10.1 Δειγματοληψία νωπού κιμά.....	34
2.10.2 Δειγματοληψία κατεψυγμένου κιμά.....	35
2.10.3 Δειγματοληψία ψημένου κιμά.....	35
2.11 Μέτρηση του pH των δειγμάτων.....	35
2.12 Χρήση Food Scan στα δείγματα νωπού κιμά .....	36
2.13 Ανάλυση δειγμάτων νωπού κιμά με VideometerLab .....	36
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	37
3.1 Παρασκευές συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β-CARV) .....	37
3.2 Προπειραματικά αποτελέσματα για την επιλογή της συγκέντρωσης της καρβακρόλης .....	37
3.3 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων στους κάτω από 65 °C .....	38
3.3.1 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control - στους κάτω από 65 °C .....	38
3.3.2 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV - στους κάτω από 65 °C.....	39
3.3.3 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON - στους κάτω από 65 °C.....	40
3.3.4 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CARV - στους κάτω από 65 °C.....	41
3.3.5 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control + στους κάτω από 65 °C.....	41
3.3.6 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV + στους κάτω από 65 °C.....	42
3.3.7 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON + στους κάτω από 65 °C .....	43
3.3.8 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CARV + στους κάτω από 65 °C.....	44
3.3.9 Σύγκριση νωπών εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για κάτω από τους 65 °C .....	45
3.3.10 Σύγκριση κατεψυγμένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για κάτω από τους 65 °C .....	47
3.3.11 Σύγκριση ψημένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για κάτω από τους 65 °C.....	49
3.4 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων στους πάνω από 65 °C.....	50
3.4.1 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control - στους πάνω από 65 °C.....	50
3.4.2 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV - στους πάνω από 65 °C.....	51
3.4.3 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON - στους πάνω από 65 °C .....	52
3.4.4 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CARV - στους πάνω από 65 °C.....	53
3.4.5 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control + στους πάνω από 65 °C.....	53
3.4.6 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV + στους πάνω από 65 °C .....	54
3.4.7 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON + στους πάνω από 65 °C.....	55
3.4.8 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CARV + στους πάνω από 65 °C.....	56
3.4.9 Σύγκριση νωπών εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για πάνω από τους 65 °C .....	57



3.4.10 Σύγκριση κατεψυγμένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για πάνω από τους 65 °C .....	59
3.4.11 Σύγκριση ψημένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για πάνω από τους 65 °C.....	61
3.5 Σύγκριση της συνολικής επίδρασης όλων των μεταχειρίσεων στο κιμά από την προετοιμασία του ως νωπού μέχρι το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C.....	63
3.6 Σύγκριση του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας κατά το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C .....	65
3.7 Απώλειες βάρους του κιμά κατά το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C για όλες τις μεταχειρίσεις.....	66
3.8 Μετρήσεις pH των δειγμάτων νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά.....	68
3.9 Χημική σύσταση νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις .....	71
3.10 Ανάλυση νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις μέσω VideometerLab .....	74
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	76
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

## 1.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1.1 Μοσχαρίσιο κρέας

Ένα σημαντικό ποσοστό του πληθυσμού καταναλώνει κρέας εβδομαδιαίως. Το μοσχαρίσιο κρέας ιδιαίτερα υπό μορφή μπιφτεκιών φαίνεται να είναι ψηλά στις προτιμήσεις τους λόγω της ευκολίας του να παρασκευαστεί αλλά και λόγω της ευχάριστης γεύσης του. Το μοσχαρίσιο κρέας περιέχει 70-75% νερό, 20-22% πρωτεΐνη, 3-45% λίπος (το ποσοστό διαφέρει ανάλογα το κομμάτι και την ανατροφή του ζώου) και 0-6% υδατάνθρακες. Επίσης αποτελεί πηγή των βιταμινών Β3,Β6,Β12 και των ιχνοστοιχείων καλίου, σιδήρου, φωσφόρου και σεληνίου (Wood, 2017). Ωστόσο το κρέας είναι ένα ευνοϊκό υπόστρωμα για να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί λόγω της χημικής του σύστασης και μορφολογίας. Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορεί να προέρχονται είτε από την μικροβιακή χλωρίδα του ζώου είτε από επιμόλυνση από εξωτερικούς παράγοντες.

### 1.2 Επιμόλυνση κρέατος

Πολλές τροφιμογενείς ασθένειες οφείλονται στην κατανάλωση μολυσμένου κρέατος. Το κρέας και τα παράγωγα του είναι επιρρεπή σε μολύνσεις εάν δε υποβληθούν στην κατάλληλη υγειονομική επεξεργασία και χειρισμό στα στάδια παραγωγής, επεξεργασίας, μεταφοράς, αποθήκευσης, διάθεσης λιανικής πώλησης αλλά και κατά την προετοιμασία του για κατανάλωση είτε στο σπίτι είτε σε χώρους εστίασης. Οι κίνδυνοι επιμόλυνσης χωρίζονται σε φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς (Das et al., 2019). Οι φυσικοί κίνδυνοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους: ξένα αντικείμενα που εισέρχονται καταλάθως στα τρόφιμα και αντικείμενα που προκύπτουν φυσικά στα τρόφιμα (Cavalheiro et al., 2020). Υπολλείματα φαρμάκων για τα ζώα, αυξητικών ορμονών, εντομοκτόνων, αντιμικροβιακών ουσιών, πρόσθετα ζωοτροφών, επιμολυντών από το περιβάλλον (πχ. λίπασμα, βιομηχανική ζώνη, φωτιά) αποτελούν τους πιθανούς χημικούς κινδύνους που μπορεί να προκύψουν στο κρέας (Trevisani et al., 2018). Η κατανάλωση κρέατος ενέχει βιολογικούς κινδύνους λόγω της παρουσίας παθογόνων βακτηρίων, ιών, ριζοι και παράσιτων (Stoica et al., 2014). Όλοι παραπάνω κίνδυνοι έχουν την πιθανότητα να προκαλέσουν στους ανθρώπους ασθένεια με ήπια η σοβαρά συμπτώματα, τραυματισμό ακόμα και θάνατο.

#### 1.2.1 Βιολογικοί κίνδυνοι

Το κρέας και τα προϊόντα του διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως πιθανές αιτίες ανθρώπινων λοιμώξεων. Οι μικροοργανισμοί που κρύβονται πίσω από αυτές είναι συνήθως οι *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, verotoxin-producing *E. coli* (VTEC), *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas*, *Brucella* και *Shigella* (Nørrung & Buncic, 2008; Stoica et al., 2014). Η επιμόλυνση του κρέατος μπορεί να συμβεί πριν τη σφαγή του ζώου, κατά την σφαγή του ζώου ή στα στάδια επεξεργασίας του κρέατος μετά την σφαγή του ζώου. Το περιβάλλον εκτροφής του ζώου (π.χ. καθαριότητα στάβλου, νερό), η ζωοτροφή καθώς και οι συνθήκες εκτροφής (μεγάλος πληθυσμός ζώων σε μικρό χώρο) είναι μερικοί από τους λόγους που συμβάλλουν

στην μόλυνση του ζώου από ένα παθογόνο μικροοργανισμό (Das et al., 2019). Συνήθως όμως οι μύες των ζώων δεν περιέχουν μικροβιακό φορτίο, γιατί οι παραπάνω παθογόνοι βρίσκονται κυρίως στο έντερο και τα περιττώματα του ζώου (Stoica et al., 2014). Κατά την σφαγή, η μη προσεκτική αφαίρεση του εντέρου μολύνει το δέρμα του ζώου με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, το οποίο θα μολύνει μετά τις καθαρές επιφάνειες τους σφαγείου. Έτσι είναι πολύ πιθανό κατά την αφαίρεση του δέρματος να περάσουν οι μικροοργανισμοί στο κρέας. Άρα μετά γίνονται εστίες επιμόλυνσης για τα υπόλοιπα κρέατα, οι επιφάνειες του σφαγείου, τα μαχαίρια που χρησιμοποιήθηκαν για την σφαγή καθώς και οι ίδιοι οι εργαζόμενοι που ήρθαν σε επαφή με το μολυσμένο κρέας (Das et al., 2019; Nørrung & Buncic, 2008). Υπάρχουν όμως και παράγοντες που επηρεάζουν την ασφάλεια του κρέατος, μετά την σφαγή του. Η μεταφορά του κρέατος, η οποία επηρεάζεται από την θερμοκρασία και την απόσταση, ο τύπος της συσκευασίας που χρησιμοποιείται και οι συνθήκες αποθήκευσης (ψύξη ή κατάψυξη) είναι μερικοί από αυτούς. Σημαντικό ρόλο παίζουν και οι τρόποι έκθεσης του κρέατος αλλά και οι πρακτικές που ακολουθούνται για την προετοιμασία του κρέατος προς κατανάλωση του (Rani et al., 2017).

### 1.3 Παράγοντες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Η αύξηση των βακτηρίων που συμβάλλουν στην μικροβιακή αλλοίωση κατηγοριοποιούνται σε 4 τύπους (Bruckner et al., 2012; Kameník, 2013):

- Εσωτερικοί παράγοντες οι οποίοι αναφέρονται στα εγγενή φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά των τροφίμων (η ενεργότητα  $a_w$  του νερού, η δομή του τρόφιμου και η περιεκτικότητα του σε θρεπτικά συστατικά)
- Εξωτερικοί παράγοντες όπως συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία και ατμοσφαιρική σύσταση του περιβάλλοντος)
- Παράγοντες επεξεργασίας που αναφέρονται στις φυσικές ή χημικές διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την διεργασία του τροφίμου (π.χ. μαγείρεμα)
- Έμμεσοι παράγοντες που οφείλονται στην συνεργιστική ή ανταγωνιστική αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών

#### 1.3.1 Συνθήκες ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών στο κρέας

Ο πολλαπλασιασμός των παθογόνων βακτηρίων διευκολύνεται από παράγοντες όπως η κατάλληλη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, η ενεργότητα  $a_w$  του νερού, τα επίπεδα οξυγόνου, τα επίπεδα pH καθώς και η σχετική υγρασία του περιβάλλοντος (Adzitey, 2016).

Είναι ευρέως διαδεδομένο ότι το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη της πλειονότητας των μικροοργανισμών είναι γύρω στο 7,0 (με εύρος από 6,6 έως 7,5), ενώ μόνο ένας μικρός αριθμός μπορεί να αναπτυχθεί σε pH κάτω από 4. Τα βακτήρια και ιδιαίτερα τα παθογόνα έχουν μικρότερο εύρος pH σε σχέση με τους άλλους μικροοργανισμούς (Jay et al., 2005). Το pH που αποκτούν τα κρέατα μετά την σφαγή είναι περίπου 5,5 λόγω της μεταθανάτιας μετατροπής του γλυκογόνου σε γαλακτικού οξέος που υπάρχει στους μύες του ζώου (Olaoye, 2011).

Η ενεργότητα  $a_w$  του φρέσκου κρέατος είναι μεγαλύτερη από 0,95 η οποία εκφράζει την διαθεσιμότητα του νερού στο τρόφιμο και παίρνει τιμές από 0,00-1,00. Η ελάχιστη ενεργότητα νερού που χρειάζονται τα βακτήρια για να αναπτυχθούν στο κρέας είναι 0,9 (Leo M.L. Nollet & Fidel Toldrá, 2008). Πιο συγκεκριμένα τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια χρειάζονται ενεργότητα νερού 0,93-0,96 (π.χ. *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.), ενώ τα θετικά κατά Gram αναπτύσσονται σε μικρότερη ενεργότητα νερού 0,90-0,94 (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) (Cutter et al., 2012).

Τα παθογενή βακτήρια του κρέατος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες ανάλογα με την ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους (Koutsoumanis & Taoukis, 2005):

- Παθογόνα βακτήρια με ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης κάτω από τους 5 °C
- Παθογόνα βακτήρια με ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ανάμεσα στους 5 και 10 °C
- Παθογόνα βακτήρια με ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης πάνω από τους 10 °C

Επομένως η θερμοκρασία συντήρησης του κρέατος παίζει μεγάλο ρόλο στην ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών

Meat pathogen	Minimum temperature for growth	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1.3	} Group I
<i>Listeria monocytogenes</i>	-0.4	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0-4.0	
<i>Clostridium botulinum non-proteolytic</i>	3.3	
<i>Bacillus cereus</i>	4.0	} Group II
<i>Salmonella</i>	5.2-7.0	
<i>Shigella</i>	6.1-7.9	
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.0	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	7.0-8.0	} Group III
<i>Clostridium botulinum proteolytic</i>	10-12	
<i>Clostridium perfringens</i>	12	
<i>Campylobacter</i>	32	

**Εικόνα 1:** Πίνακας με τις ελάχιστες θερμοκρασίες ανάπτυξης βακτηρίων που σχετίζονται με το κρέας (Koutsoumanis & Taoukis, 2005)

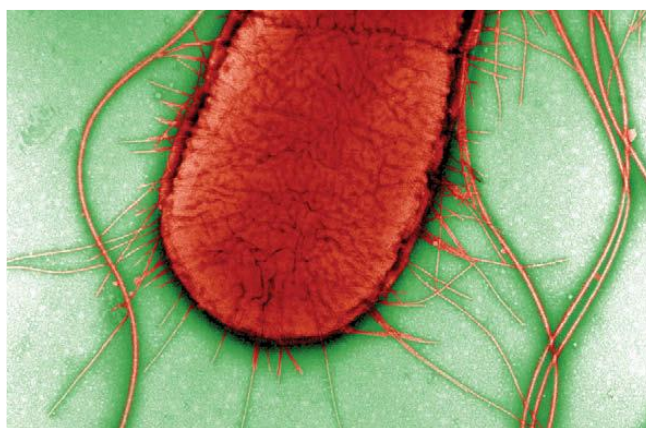
Η ατμόσφαιρα στην οποία αποθηκεύεται το κρέας μπορεί να έχει επίδραση και στα παθογόνα βακτήρια. Τα πιο κοινώς διαδεδομένα αέρια που χρησιμοποιούνται για την συσκευασία των κρεάτων είναι το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το άζωτο. Το

οξυγόνο προάγει τον πολλαπλασιασμό των αερόβιων μικροοργανισμών ενώ αντίθετα το άζωτο προκαλεί αύξηση στους μη αερόβιους μικροοργανισμούς. Η έλλειψη οξυγόνου στα συσκευασμένα σε κενό τρόφιμα μπορεί να προσφέρει ένα περιβάλλον που ευνοεί τον πολλαπλασιασμό του αναερόβιου *Clostridium botulinum* αλλά και των αερόβιων βακτηρίων *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* και *Aeromonas hydrophila* λόγω της καταστολής των υπόλοιπων αερόβιων μικροοργανισμών (μειώνεται ο ανταγωνισμός). Το διοξείδιο του άνθρακα εμφανίζει βακτηριοστατικές ιδιότητες σε μερικά είδη, δηλαδή επεκτείνει την αρχική ανάπτυξη των βακτηρίων και μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης τους κατά την εκθετική φάση (Adzitey, 2016; Cutter et al., 2012; Davies, 2003).

Η ανάπτυξη και η λειτουργικότητα των μικροοργανισμών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την χημική σύσταση του τροφίμου. Χρειάζονται νερό, μία πηγή ενέργειας, μία πηγή αζώτου, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία (Jay et al., 2005). Το κρέας με την μεγάλη διαθεσιμότητα του σε νερό, την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (πηγή ενέργειας και αζώτου από τα αμινοξέα των πρωτεϊνών) και την παρουσία βιταμινών Β αποτελεί ένα ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων.

#### 1.4 *Escherichia coli*

Το *Escherichia coli* είναι ευρέως αναγνωρισμένο ως ένας από τους πιο εκτενώς διερευνημένους μικροοργανισμούς. Αποτελεί φυσιολογική χλωρίδα του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου αλλά ταυτόχρονα μπορεί να γίνει και εξαιρετικά παθογόνος για αυτόν. Είναι ένα κατά Gram αρνητικό βακτήριο και ανήκει στα Enterobacteriaceae. Έχει μήκος περίπου 0,1 μm και πλάτος 0,35 μm και το σχήμα του παρομοιάζει με ράβδο. Μπορεί να διαθέτει μαστίγιο ώστε να μπορεί να κινηθεί στο περιβάλλον του ή τριχοειδής απολήξεις που του δίνουν την δυνατότητα να προσκολλάται σε επιφάνειες ή σε άλλα κύτταρα (Blount, 2015).



**Εικόνα 2:** Η ηλεκτρονική μικρογραφία ενός κυττάρου *Escherichia coli* O157:H7 από έξαρση του στην Κεντρική Σκωτία το 1996, μεγέθυνση 50000 (Pennington, 2010)

Η ευκολία του να αναπτύσσεται και σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, το καθιστούν ένα προαιρετικά αναερόβιο μικροοργανισμό (Allocati et al., 2013). Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο το *Escherichia coli*

πολλαπλασιάζεται σε pH 4,5 μέχρι 9, η θερμοκρασία ανάπτυξης του κυμαίνεται από 7-8 °C μέχρι 44-45 °C με την βέλτιστη να θεωρείται οι 37 °C και η ελάχιστη ενεργότητα που απαιτείται είναι 0,93 (Jay et al., 2005; Sofos, 2013). Επί του παρόντος έχουν ανακαλυφθεί 8 παθογόνοι τύποι του *E. coli*, οι οποίοι χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα διαρροιογόνα *E. coli* και τα εξωτερικά *E. coli* (ExPEC). Υπάρχουν έξι παθογόνα που προκαλούν διάρροια: τα εντεροπαθογόνα *E. coli* (EPEC), τα εντεροαιμοραγικά *E. coli* (EHEC), τα εντεροτοξινογόνα *E. coli* (ETEC), τα εντεροδιδυμικά *E. coli* (EIEC, συμπεριλαμβανομένου του *Shigella*), εντεροσυσσωρευόμενα *E. coli* (EAEC) και τα εντεροδιαχεόμενα *E. coli* (DAEC). Τα ουροπαθογόνα *E. coli* (UPEC) και τα παθογόνα *E. coli* που προκαλούν μηνιγγίτιδα στα νεογνά (NMEC) ανήκουν στα εξωτερικά *E. coli* (ExPEC) (Croxen & Finlay, 2010). Στην **Εικόνα 3** περιγράφονται η ασθένεια και τα συμπτώματα που προκαλεί κάθε παθογόνο στέλεχος στον άνθρωπο.

Pathotype (acronym)	Diseases	Symptoms	Virulence factors	Ref.
<i>Enteric E. coli</i>				
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	Diarrhoea in children	Watery diarrhoea and vomiting	Bfp, Intimin, LEE	[1]
Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)	Haemorrhagic colitis, HUS	Bloody diarrhoea	Shiga toxins, Intimin, Bfp	[1,3]
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	Traveler's diarrhoea	Watery diarrhoea and vomiting	Heat-labile and sheat-stable toxins, CFAs	[4,5]
Enteraggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	Diarrhoea in children	Diarrhoea with mucus and vomiting	AAFs, cytotoxins	[6,7]
Diffusely Adherent <i>E. coli</i> (DAEC)	Acute diarrhoea in children	Watery diarrhoea, recurring UTI	Daa, AIDA	[8]
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Shigellosis-like	Watery diarrhoea; dysentery	Shiga toxin, hemolysin, Cellular invasion, Ipa	[1,7]
Adherent Invasive <i>E. coli</i> (AIEC)	Associated with Crohn disease	Persistent intestinal inflammation	Type 1 fimbriae, Cellular invasion	[9,10]
<i>Extraintestinal E. coli (ExPEC)</i>				
Uropathogenic <i>E. coli</i> (UPEC)	Lower UTI and systemic infections	Cystitis, pyelonephritis	Type 1 and P fimbriae; AAFs, hemolysin	[1,11]
Neonatal Meningitis <i>E. coli</i> (NMEC)	Neonatal meningitis	Acute meningitis, sepsi	S fimbriae; K1 capsule	[12,13]
Avian Pathogenic <i>E. coli</i> (APEC)	Probable source of food-borne disease	-	Type 1 and P fimbriae; K1 capsule	[14,15]

Bfp: Bundle-forming pili; LEE: Locus for enterocyte effacement; HUS: haemolytic-uraemic syndrome; CFA: colonization factor antigen; AAF: aggregative adherence fimbria; Daa: diffuse adhesin; AIDA: adhesin involved in diffuse adherence; Ipa: Invasion plasmid antigen.

**Εικόνα 3:** Πίνακας με τους παθογόνους τύπους του *E. coli* (Allocati et al., 2013)

#### 1.4 Escherichia coli O157:H7

Το *Escherichia coli* O157:H7 είναι ένα από τα πιο ευρέως διαδεδομένα παθογόνα βακτήρια που ανήκει στα εντεροαιμοραγικά *E. coli* (EHEC). Τα πρώτα κρούσματα του *E. coli* O157:H7 καταγράφηκαν στην Αμερική το 1982. Εντοπίστηκε σε άτομα που εμφάνισαν συμπτώματα αιματηρής διάρροιας και έντονων πόνων στο στομάχι, μετά από κατανάλωση μπιφτεκιών σε εστιατόριο γνωστής αλυσίδας (Pennington, 2010). Στην σημερινή εποχή το *E. coli* O157:H7 αποτελεί το πιο συχνό σερότυπο EHEC που προκαλεί τα περισσότερα κρούσματα σε βόρεια Αμερική, Ιαπωνία και σε πολλά μέρη της Ευρώπης (Croxen & Finlay, 2010). Το κύριο παθογόνο χαρακτηριστικό των EHEC βακτηρίων είναι η ικανότητα τους να παράγουν Shiga τοξίνες (ονομάζονται και βεροκυτοτοξίνες) (Pennington, 2010). Οι Shiga τοξίνες (STx) μπορούν να χωριστούν σε δύο υποκατηγορίες, συγκεκριμένα την STx1 και STx2 οι οποίες μοιράζονται τα ίδια αμινοξέα κατά 55%. Η STx συντίθεται στο εσωτερικό του παχέος εντέρου και στην συνέχεια μεταφέρεται στο νεφρό μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Μόλις φτάσει στο νεφρό προκαλεί βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αποφράσσει το μικροαγγειακό σύστημα. Αυτό συμβαίνει μέσω ενός διπλού μηχανισμού που περιλαμβάνει την άμεση πρόκληση τοξικότητας αλλά και την επαγωγή απελευθέρωσης κυταροκινών και χημοκινών τοπικά. Κατά συνέπεια, αυτές οι διαδικασίες οδηγούν στην ανάπτυξη νεφρικής φλεγμονής. Επίσης η STx θανατώνει τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Kaper et al., 2004). Τα EHEC έχουν εντοπιστεί στην κοπρανώδη μικροχλωρίδα πολλών ζώων με το πιο διαδεδομένο από αυτά να είναι τα βοοειδή (Welinder-Olsson & Kaijser, 2005). Όμως τα βοοειδή δεν έχουν τους αντίστοιχους υποδοχείς για την STx όπως οι άνθρωποι, για αυτό ίσως δεν παρουσιάζουν συμπτώματα (Croxen & Finlay, 2010). Η δόση για να αρρωστήσει ένας υγιής άνθρωπος θεωρείται ότι είναι κάτω από 100 κύτταρα, καθιστώντας τα EHEC εξαιρετικά ιογενή (Kaper et al., 2004). Τα EHEC προκαλούν αιματηρή διάρροια σε ενήλικες και παιδιά και σε ακραίες περιπτώσεις το δυνητικά θανατηφόρο αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο (HUS) (Croxen & Finlay, 2010).

#### 1.5 Ασφάλεια κρέατος

Η διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων είναι ύψιστης σημασίας τόσο για τους ρυθμιστικούς φορείς όσο και για τους καταναλωτές. Έχουν βρεθεί διάφορες τεχνικές που μπορούν να επιφέρουν αναστολή, μείωση ή ακόμα και θανάτωση στην ανάπτυξη παθογόνων ή μη μικροοργανισμών. Σκοπός είναι η εύρεση των κατάλληλων εμποδίων που θα βοηθούν στην συντήρηση του κρέατος αλλά δεν θα επηρεάζουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του. Τα κύρια εμπόδια που μπορούν να εφαρμοστούν στο κρέας είναι τα παρακάτω (Adzitey, 2016; Leistner L., 1994; Meneses & Teixeira, 2022; Rostami et al., 2016):

- Θερμικές επεξεργασίες (π.χ. ψήσιμο, ψύξη και κατάψυξη, κάπνισμα, χρήση ατμού)
- Μείωση ή αύξηση του pH
- Μείωση ή αύξηση της ενεργότητας νερού (π.χ. ξήρανση, αλάτινση)
- Χρήση ακτινοβολίας (π.χ. UV, μικροκύματα, ιοντίζουσα ακτινοβολία)
- Μείωση ή αύξηση της πίεσης (υψηλή υδροστατική πίεση)
- Εφαρμογή υπερήχων

- Συσκευασία με τροποποίηση της ατμόσφαιρας (MAP, VP)
- Εφαρμογή ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας (Οξυγαλακτικά βακτήρια)
- Μείωση ή αύξηση της τάσης του οξυγόνου
- Χρήση χημικών συντηρητικών (π.χ. οργανικά οξέα, αντιοξειδωτικές ουσίες, αιθανόλη)
- Χρήση φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών (μαρινάδα, μπαχαρικά, αιθέρια έλαια)
- Εφαρμογή ενθυλάκωσης αντιμικροβιακών ουσιών σε διάφορους φορείς είτε σε υλικά συσκευασίας (π.χ. χιτοζάνη, κυκλοδεξτρίνη)

Συνήθως τα παραπάνω εμπόδια χρησιμοποιούνται συνδυαστικά και όχι μεμονωμένα. Αυτό αποσκοπεί στην εύρεση συνεργιστικής δράσης μεταξύ τους (Karbowiak et al., 2023).

### 1.6 Κατάψυξη κρέατος

Η συντήρηση του κρέατος μέσω της κατάψυξης είναι μία ευρέως διαδεδομένη πρακτική. Ωστόσο η διαδικασία της κατάψυξης έχει αρνητικές επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και την συνολική ποιότητα του κρέατος. Αυτό αποδίδεται κυρίως στην ανάπτυξη κρυστάλλων πάγου, στην οξείδωση λιπιδίων, στην διάσπαση των πρωτεϊνών, στην μειωμένη τρυφερότητα και στην μειωμένη ικανότητα συγκράτησης νερού (Grunert et al., 2016). Η διαδικασία της κατάψυξης του κρέατος ξεκινάει μόνο όταν η επιφανειακή θερμοκρασία της σάρκας πέσει κάτω από το σημείο κατάψυξης. Κατά την διαδικασία αυτή, το κρέας θα ξεκινήσει να ψύχεται από το εξωτερικό προχωρώντας προς το εσωτερικό. Η αρχική κατάψυξη λαμβάνει χώρα στο επιφανειακό στρώμα, ακολουθούμενη από σταδιακή αύξηση του πάχους του παγωμένου στρώματος κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου. Το όριο που διαχωρίζει το παγωμένο στρώμα από την μη παγωμένη περιοχή αναφέρεται συνήθως ως σημείο κατάψυξης. Το σημείο κατάψυξης παρουσιάζει μια σταθερή κίνηση προς προς την κεντρική περιοχή του κρέατος, με αποτέλεσμα την κατανομή όπου τα εξωτερικά στρώματα είναι παγωμένα αλλά τα εσωτερικά στρώματα παραμένουν μη παγωμένα (κοντά στους 0 °C). Όταν παγώσει όλο κομμάτι κρέατος, τότε η θερμοκρασία στο κέντρο του πέφτει απότομα μέχρι το σημείο που θα φτάσει να έχει ίδια θερμοκρασία με τον περιβάλλοντα χώρο (Castro-Giráldez et al., 2014; Hui Y. H., 2012).

#### 1.6.1 Επίδραση της κατάψυξης στο *Escherichia coli* O157:H7

Ο βόειος κιμάς και τα προϊόντα του υποβάλλονται σε επεξεργασία και αποθηκεύονται σε ψυχόμενους χώρους. Επίσης μεταφέρονται και αποθηκεύονται σε χαμηλές θερμοκρασίες, είτε κρύα είτε κατεψυγμένα προκειμένου να παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων αλλοίωσης (Fratamico & Bagi, 2007). Όμως τα παθογόνα βακτήρια έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε υποθανάτια κατάσταση όταν υποβάλλονται σε θερμοκρασίες κατάψυξης για μεγάλο χρονικό διαστημα (Zhang et al., 2021). Ορισμένες κυτταρικές τροποποιήσεις μπορούν ενδεχομένως να συμβούν όταν τα βακτήρια υφίστανται υποθανάτιους τραυματισμούς. Τόσο τα δομικά συστατικά, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, η κυτταροπλασματική μεμβράνη, το ριβόσωμα, το DNA, το RNA όσο και τα λειτουργικά συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες και



τα ένζυμα, είναι πιθανό θα επηρεαστούν (Shao et al., 2023). Έχει αποδειχτεί ότι τα εντεροαιμοραγικά *E. coli* έχουν μεγάλη ικανότητα επιβίωσης από υποθανάτιους τραυματισμούς ειδικά σε τρόφιμα όπως το κρέας που είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (Ro et al., 2015; Shao et al., 2023). Οι πρωτεΐνες του κρέατος δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τις μικροβιακές πρωτεΐνες, παρέχοντας τους σταθερότητα και προστασία από την μετουσίωση που συμβαίνει κατά την κατάψυξη (Bollman et al., 2001). Η κατάψυξη του *Escherichia coli* O157:H7 για μεγάλο διάστημα σε βόεια μπιφτέκια είναι πιθανό να τον καθιστά πιο ανθεκτικό σε περαιτέρω θερμικές μεταχειρίσεις, είτε λόγω της ανάπτυξης μηχανισμών αντιμετώπισης της παρατεταμένης ψύξης είτε λόγω της δομικών χαρακτηριστικών των μακροπρόθεσμα αποθηκευμένων μπιφτεκιών (Manios & Skandamis, 2015). Τα τρόφιμα όταν καταψύχονται σε γρήγορους ρυθμούς, σχηματίζονται ενδοκυτταρικοί κρύσταλλοι πάγου, ενώ όταν καταψύχονται σε αργούς ρυθμούς, το ενδοκυτταρικό νερό φεύγει από το κύτταρο για να δημιουργήσει εξοκυτταρικούς κρυστάλλους οδηγώντας σε ξήρανση του κυττάρου (Li et al., 2018). Τα υποθανάτια τραυματισμένα από την κατάψυξη κύτταρα των παθογόνων μικροοργανισμών δεν μπορούν να αναπτυχθούν στα επιλεκτικά για αυτούς υποστρώματα λόγω του τραυματισμού τους. Οπότε γίνεται καταμέτρηση τους σε μη επιλεκτικά υποστρώματα και η διαφορά τους υποδηλώνει τον τραυματισμό. Όμως στα μη επιλεκτικά υποστρώματα μπορεί να υπάρχει ανταγωνισμός ανάμεσα στα παθογόνα βακτήρια και τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε αυτά οδηγώντας σε υποεκτίμηση του τραυματισμού (Lionberg et al., 2003).

### 1.7 Θερμική επεξεργασία κρέατος

Το μαγείρεμα είναι μία διαδικασία που προηγείται της κατανάλωσης κρέατος. Το μαγείρεμα του μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους όπως το τηγάνισμα, το ψήσιμο στον φούρνο και ψήσιμο σε σχάρα. Το μαγείρεμα έχει αποδειχθεί ότι μετουσιώνει τις πρωτεΐνες του κρέατος, βελτιώνει την γευστικότητα του κρέατος, καταστρέφει σημαντικό αριθμό μικροοργανισμών (παθογόνων και μη), παρατείνει την διάρκεια ζωής των προϊόντων και αλλάζει την υφή και την τρυφερότητα του κρέατος (Oz et al., 2017). Η μυογλοβίνη του κρέατος είναι η κύρια πρωτεΐνη που ευθύνεται για το κόκκινο χρώμα του. Κατά το μαγείρεμα μετατρέπεται σε αιμογλοβίνη η οποία προσδίδει αυτό το χαρακτηριστικό καφέ χρώμα (King & Whyte, 2006). Κατά την διάρκεια του μαγειρέματος σημειώνεται σημαντική απώλεια νερού στο κρέας. Το νερό πιθανότατα χάνεται λόγω της προκαλούμενης από τη θερμότητα μετουσίωσης των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να εγκλωβίζεται λιγότερο νερό μέσα στις πρωτεϊνικές δομές που συγκρατούνται από τριχοειδείς δυνάμεις. Επιπλέον, η απώλεια λόγω μαγειρέματος καθορίζεται από τον μηχανισμό μεταφοράς μάζας κατά τη θερμική επεξεργασία, επομένως διαφορετικές διαδικασίες μαγειρέματος θα οδηγήσουν σε διαφορετική απώλεια νερού (Juárez et al., 2010). Το μαγείρεμα αυξάνει το pH και την οξείδωση λιπιδίων του κρέατος (Oz et al., 2017). Για τους περισσότερους καταναλωτές η μετατροπή του χρώματος του κρέατος από κόκκινο σε ροζ και από ροζ σε σκούρο καφέ δηλώνει και το πόσο καλά ψημένο είναι το κρέας. Όμως έχει αποδειχθεί ότι πολλές φορές η δημιουργία καφέ

χρώματος στο κρέας του είναι παραπλανητική γιατί στο κέντρο του μπορεί να είναι ακόμα ροζ δηλαδή άψητο (Lyon et al., 2000).

#### 1.7.1 Θερμική αδρανοποίηση του *Escherichia coli* O157:H7

Ο κύριος στόχος του μαγειρέματος του κρέατος είναι η αδρανοποίηση των παθογόνων που μπορεί να περιέχει ώστε να είναι ασφαλές προς κατανάλωση. Για να θανατωθούν τα βακτήρια, θα πρέπει κέντρο του κρέατος να φτάσει τους 71,1 °C και να μετρείται με ειδικό θερμόμετρο (United States Department of Agriculture—Food Safety & Inspection Service, 2013a). Η παρουσία λοιπόν του *Escherichia coli* O157:H7 στο μαγειρεμένο κρέας, οφείλεται σε κακές πρακτικές. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων το κρέας είχε καταλάθως ψηθεί ανεπαρκώς δηλαδή το κέντρο του είχε ροζ ή κόκκινο χρώμα (θερμοκρασία ψήσιματος < 65 °C), ή είχε εσκεμμένα μείνει άψητο ή είχε ψηθεί κατευθείαν από την κατάψυξη χωρίς να αποψυχθεί (Mukherjee et al., 2008; Shen et al., 2011). Η προσθήκη γαλακτικού καλίου και γαλακτικού ασβεστίου σε εμβολιασμένα με *Escherichia coli* O157:H7 βόεια μπιφτέκια αύξησε την θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* με την προστασία των κυττάρων του (αύξηση σταθερότητας της κυτταρικής μεμβράνης). Το αντίθετο συνέβη με την προσθήκη οξικού οξέος (Mukherjee et al., 2008). Οι διαφορές στην θνησιμότητα του *E. coli* κατά το μαγείρεμα βόειου κιμά οφείλονται στις διαφοροποιήσεις που υπάρχουν ανάμεσα στα στελέχη, το ιστορικό των κυττάρων πριν το εμβολιασμό, στην περιεκτικότητα του κρέατος σε λίπος, την πυκνότητα των βόειων μπιφτεκιών, τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την μικροβιακή δειγματοληψία, καθώς και τα διαφορετικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για το ψήσιμο (Luchansky et al., 2013). Η θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* αυξάνεται με την μείωση της ενεργότητας (πχ με την προσθήκη NaCl) (De & Blackburn, 1997). Επίσης τα κύτταρα του *E. coli* γίνονται πιο ανθεκτικά στην θερμική καταπόνηση όταν προηγουμένως έχουν υποβληθεί σε στρες λόγω όξινου περιβάλλοντος (Haberbeck et al., 2017). Τα κύτταρα του *E. coli* που εγκληματιστεί σε στρες από κρύο ή από ξήρανση εμφανίζουν μειωμένη αντίσταση στην θερμότητα. Η αυξημένη ευαισθησία στη θερμότητα θα μπορούσε να αποδοθεί στην ενσωμάτωση μεγαλύτερου ποσοστού ακόρεστων λιπαρών οξέων στις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων που προσαρμόστηκαν στο ψυχρό στρες. Αυτή η μεταβολή στη σύνθεση των λιπαρών οξέων θα μπορούσε να μειώσει αποτελεσματικά το σημείο τήξης των μεμβρανών. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε καταπονήσεις ξήρανσης και θερμότητας, μπορεί να απαιτείται η ενεργοβόρα σύνθεση πρωτεϊνών κλωνισμού του στρες, οδηγώντας σε μεταβολική εξάντληση των κυττάρων (Shen et al., 2011).

#### 1.8 Αιθέρια έλαια

Τα αιθέρια έλαια είναι οι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τα φυτά ως μέσο ενίσχυσης των αμυντικών τους μηχανισμών κατά των μικροβίων (Degala et al., 2018). Αιθέριο έλαιο καλείται τον προϊόν που λαμβάνεται από φυτικές πρώτες ύλες με είτε με απόσταξη με νερό ή ατμό, είτε από το επικάρπιο των εσπεριδοειδών με μηχανική διαδικασία, είτε με ξηρή απόσταξη (ISO 9235, 1997). Τα αιθέρια έλαια θεωρούνται ασφαλή προς κατανάλωση (GRAS) από τον USDA (Turek & Stintzing, 2013). Επίσης χαρακτηρίζονται από το έντονο άρωμα τους και την πτητική φύση τους (Vergis

et al., 2015). Επί του παρόντος, έχουν αναγνωρισθεί συνολικά πάνω από 3000 αιθέρια έλαια, με περίπου 300 από αυτά να έχουν σημαντική οικονομική αξία, ιδίως στους τομείς της φαρμακευτικής, της γεωργίας, της παραγωγής τροφίμων, της υγιεινής, των καλλυντικών και της αρωματοποιίας (Bakkali et al., 2008). Μερικά από τα πιο γνωστά αιθέρια έλαια είναι αυτό της ρίγανης, της κανέλας, του γαρύφαλλου και αυτά τα οποία προέρχονται από εσπεριδοειδή.

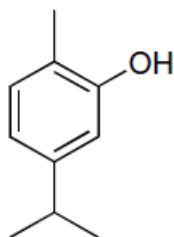
#### 1.8.1 Αντιμικροβιακή ιδιότητα των αιθέριων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν αντιβακτηριακή, αντιμυκητιασική, εντομοκτόνο και αντιοξειδωτική δράση και έχουν θεραπευτικές ιδιότητες (Turek & Stintzing, 2013). Έχει εκδηλωθεί σημαντικό ενδιαφέρον από τους τομείς των τροφίμων, των φαρμάκων και των καλλυντικών για τη διερεύνηση των αντιβακτηριακών χαρακτηριστικών των αιθέριων ελαίων (ΕΟ). Το ενδιαφέρον αυτό απορρέει από την αυξανόμενη αναγνώριση της σημασίας των φυσικών πρόσθετων ως κυρίαρχη τάση για την αντικατάσταση των συνθετικών συντηρητικών (Murbach Teles Andrade et al., 2014). Η εγγενής υδρόφοβη φύση των αιθέριων ελαίων επιτρέπει την αποτελεσματική αλληλεπίδρασή τους με τη λιπιδική διπλοστοιβάδα των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών και των μιτοχονδρίων, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας αυτών των δομών. Το περιγραφόμενο φαινόμενο έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ιόντων και κυτταρικών συστατικών. Όταν αυτό ξεπεράσει ένα ορισμένο όριο, οδηγεί τελικά στην κυτταρική λύση και τον επακόλουθο κυτταρικό θάνατο (Vergis et al., 2015). Η αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων οφείλεται στα οξυγονωμένα τερπενοειδή, συγκεκριμένα τα φαινολικά τερπένια, τα φαινυλοπροπανοειδή και τις αλκοόλες που περιέχουν (Murbach Teles Andrade et al., 2014).

#### 1.9 Καρβακρόλη

Η καρβακρόλη (5-ισοπροπυλ-2-μεθυλενόλη) είναι ένα μονοτερπενοειδές που προέρχεται από το αιθέριο έλαιο *Origanum vulgare*, το έλαιο του θυμαριού και το έλαιο που λαμβάνεται από την πιπερόριζα και το άγριο περγαμόντο (Vergis et al., 2015). Αποτελείται από έναν φαινολικό δακτύλιο με μεθύλιο και υποκαταστάτες ισοπροπυλίου που παράγεται μετά από τη βιοσυνθετική οδό που περιλαμβάνει πυροφωσφορική γερανύλη (GPP) ως πρόδρομη ουσία και γ-τερπινένιο και π-κυμένιο ως ενδιάμεσα προϊόντα (Marinelli et al., 2018). Η καρβακρόλη εμφανίζει αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει διάφορες επιδράσεις στους παθογόνους μικροοργανισμούς όπως: η διάσπαση των βακτηριακών κυτταρικών μεμβρανών, η μείωση του σχηματισμού βιοφίλμ, η καταστολή της μικροβιακής κινητικότητας, η αναστολή των μικροβιακών ATP-ασών και η αναστολή των βακτηριακών αντλιών εκροής (Rathod et al., 2021). Επίσης η καρβακρόλη αναστέλλει την οξειδωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων του κρέατος (Lahmar et al., 2018a). Η χρήση της ως φυσικό συντηρητικό στα τρόφιμα περιορίζεται λόγω της κακής διαλυτότητας στο νερό, της χαμηλής σταθερότητας της και της πιθανής αλληλεπίδρασης με άλλα συστατικά του τροφίμου. Επίσης λόγω της έντονου αρώματος της μπορεί να αλλοιώσει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Motta Felício et al., 2021).

Carvacrol



**Εικόνα 4:** Χημική δομή της καρβακρόλης (Bakkali et al., 2008)

### 1.10 Ενθυλάκωση αιθέριων ελαίων

Η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των αιθέριων ελαίων ή των απομονώσεών τους μπορεί να ενισχυθεί από την ενθυλάκωση τους σε διάφορους φορείς. Η ενίσχυση αυτή αποδίδεται στη διευκόλυνση των αλληλεπιδράσεων με τις μεμβράνες των μικροβιακών κυττάρων, η οποία μπορεί να συμβεί μέσω διαφόρων μηχανισμών. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αύξηση της επιφάνειας, την επίδραση των γαλακτωματοποιητών στα φωσφολιπίδια που υπάρχουν στις μεμβράνες των μικροοργανισμών, την ελεγχόμενη απελευθέρωση του φυσικού ελαίου από το νανοσύστημα και τη βελτιωμένη διαλυτότητα των αιθέριων ελαίων σε υδατικά μέσα (Motta Felício et al., 2021). Η ενθυλάκωση μπορεί επίσης να καλύψει την έντονη οσμή και την γεύση τους (Antonia Nostro & Teresa Papalia, 2012). Έχει μελετηθεί η ενσωμάτωση τους σε σωματίδια πολυμερών μέσω της νανοκαθίζησης, της συνένωσης (απλής και σύνθετης), μέσω της ξήρανσης με ψεκασμό και μέσω της ταχείας διόγκωσης υπερκρίσιμων διαλυμάτων αλλά και η ενθυλάκωση τους σε λιποσώματα (Asbahani et al., 2015).

### 1.11 β-κυκλοδεξτρίνες

Οι κυκλοδεξτρίνες είναι φυσικοί κυκλικοί ολιγοσακχαρίτες που συντίθενται από την ένωση μονομερών γλυκόζης (γλυκοπυρανόζης) που συνδέονται με α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε α, β και κυκλοδεξτρίνες, ανάλογα με τον αριθμό των γλυκοπυρανοζών που διαθέτουν, οι οποίες αποτελούνται από 6,7 ή 8 μονάδες γλυκόζης αντίστοιχα (Agora et al., 2018). Απεικονίζεται ως δαχτύλιος, ως κύλινδρος ή ως κολοβός κύλινδρος με υδρόφιλο εξωτερικό (Kurkon & Loftsson, 2013). Οι κυκλοδεξτρίνες μπορούν να εγκλωβίσουν υδρόφοβες βιοδραστικές ενώσεις και μόρια, λόγω της υδρόφοβης εσωτερικής κοιλότητας και της υδρόφιλης εξωτερικής επιφάνειας που διαθέτουν (Kotronia et al., 2017). Οι κινητήριοι παράγοντες που ευθύνονται για την ανάπτυξη συμπλόκων περιλαμβάνουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, συνεισφορές από δυνάμεις van der Waals, δεσμούς υδρογόνου, μείωση της τάσης διαμόρφωσης και αλληλεπιδράσεις μεταφοράς φορτίου (Kurkon & Loftsson, 2013). Έτσι οι κυκλοδεξτρίνες καθίστανται ως ιδανικό μέσο ενθυλάκωσης δυσδιάλυτων, θερμοευαίσθητων, χημικά ευπαθών ενώσεων προσφέροντας τους προστασία από διάφορες περιβαλλοντικές

συνθήκες, βελτίωση στη φυσική και χημική τους σταθερότητα, διατήρηση ή και ενίσχυση των βιολογικών ιδιοτήτων τους, καθώς και βελτίωση ή επέκταση τις φυσικών και χημικών τους ιδιοτήτων (Kotronia et al., 2017). Ο αριθμός των γλυκοπυρανοζών που διαθέτουν καθορίζει την διάμετρο της εσωτερικής κοιλότητας και άρα το μέγεθος του μορίου που μπορεί να ενθυλακωθεί (Kfoury et al., 2015). Τα τελευταία χρόνια, οι κυκλοδεξτρίνες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων διότι: προστατεύουν τις λιπόφιλες διατροφικές φωτοχημικές ουσίες που είναι ευαίσθητες σε αποικοδόμηση λόγω οξυγόνου, φωτός ή θερμότητας, αυξάνουν την διαλυτότητα των χρωστικών ουσιών και των βιταμινών των τροφίμων, σταθεροποιούν τα αρώματα, τις γεύσεις, τις βιταμίνες και τα αιθέρια έλαια από ανεπιθύμητες αλλαγές, καλύπτουν τις δυσάρεστες οσμές ή γεύσεις, πετυχαίνουν ελεγχόμενη αποδέσμευση διατροφικών συστατικών και ενισχύουν της βιοδιαθεσιμότητα των διατροφικών μορίων (Agora et al., 2018).

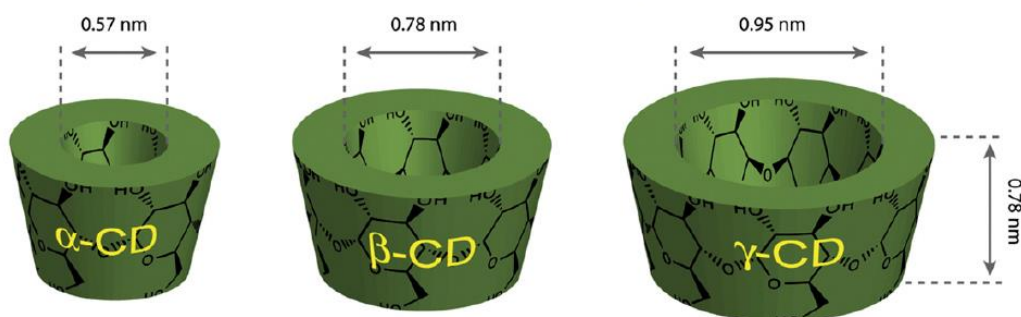


Fig. 1. Dimensions of α-CD, β-CD, and γ-CD.

**Εικόνα 5:** Οι διαστάσεις της α,β,γ-κυκλοδεξτρίνης (Ciobanu et al., 2013)

### 1.12 Συμπλοκο καρβακρόλης-β-κυκλοδεξτρίνης

Η ενθυλάκωση της καρβακρόλης στην β-κυκλοδεξτρίνη ενισχύει την αντιμικροβιακή της δράση. Το σύμπλοκο παρουσιάζει ισχυρότερη ανασταλτική δράση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών *E. coli* και *S. aureus* σε σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με την ελεύθερη καρβακρόλη (Rodríguez-López et al., 2020). Η διάρκεια ζωής της καρβακρόλης, η θερμική της σταθερότητα και η υδατοδιαλυτότητα της ενισχύονται από την ενσωμάτωση της σε HP-β-CD and HP-γ-CD (Zhu et al., 2019). Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παρασκευής του συμπλόκου είναι η συγκαθίζηση. Παρασκευάζεται ένα διάλυμα κυκλοδεξτρινών και προστίθεται σε αυτό η ουσία που θα ενθυλακωθεί ενώ αναδεύεται. Το ίζημα του συμπλόκου που δημιουργείται, διαχωρίζεται με διήθηση υπό κενό. Η καρβακρόλη επειδή είναι αδιάλυτη στο νερό θα χρειαστεί να προστεθεί σε αυτή μία ποσότητα διαλύτη πριν την ενθυλάκωση. Πολλές φορές χρειάζεται να εφαρμοστεί και θερμότητα πριν την προσθήκη της ουσίας ώστε να διαλυθεί η κυκλοδεξτρίνη (Zheng-Yu Jin, 2013; Zhu et al., 2019).

### 1.13 Πολυφασματική απεικόνιση στο κρέας

Η φασματική απεικόνιση ενσωματώνει τις παραδοσιακές τεχνικές απεικόνισης και φασματοσκοπίας, επιτρέποντας την απόκτηση χωρικών και φασματικών δεδομένων από ένα τρόφιμο (Qin et al., 2013). Η πολυφασματική απεικόνιση χρησιμοποιεί πληροφορίες ανάκλασης από διάφορες διακριτές φασματικές ζώνες για την ταξινόμηση των δειγμάτων σύμφωνα με την ποιότητά τους που καθορίζεται με τη χρήση τυποποιημένων παραμέτρων (Bandara et al., 2018). Τα φάσματα αυτά βρίσκονται ανάμεσα στο ορατό και εγγύς υπέρυθρο μήκος κύματος. Το Videometer είναι ένα όργανο ικανό να καταγράφει τις ιδιότητες ανάκλασης του φάσματος σε ορισμένες περιοχές μηκών κύματος. Αυτό επιτρέπει την αξιολόγηση χαρτών επιφανειακής χημείας ή υπερκύβων του υπό εξέταση αντικειμένου (Dissing et al., 2013). Έρευνες έχουν δείξει ότι η πολυφασματική απεικόνιση είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για τον αποτελεσματικό και μη επεμβατικό εντοπισμό διαφόρων συστατικών που σχετίζονται με την ποιότητα, εφόσον αυτά τα συστατικά παρουσιάζουν χωρικά διαφορετικές φασματικές αποκρίσεις (Liu et al., 2016). Όσον αφορά το κρέας η πολυφασματική απεικόνιση έχει χρησιμοποιηθεί για: την αξιολόγηση της μικροβιακής αλλοίωσης του κρέατος, την εύρεση της νοθείας του κρέατος με άλλα κρέατα, την ποιοτική αξιολόγηση του κρέατος, τον καθορισμό του χρώματος φρέσκου κρέατος, τον καθορισμό του διαθέσιμου νερού του κρέατος (Feng et al., 2018; Ropodi et al., 2015).

## Σκοπός

Οι περισσότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις από *Escherichia coli* O157:H7 σε βόειο κιμά οφείλονται στο ανεπαρκές ψήσιμο του. Η θρεπτική σύσταση του κιμά τον καθιστά ένα βέλτιστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη παθογόνων. Η συντήρηση του κιμά σε χαμηλές θερμοκρασίες για την αποφυγή της αλλοίωσης του μπορεί να αυξάνει την θερμοανθεκτικότητα του *E. coli* λόγω του στρες στο οποίο υποβάλλονται τα κύτταρα του. Επίσης η αποφυγή της απόψυξης του μπιφτεκιού παρατείνει την διάρκεια του ψήσιματος και το κέντρο του παραμένει σε χαμηλές θερμοκρασίες για μεγαλύτερο διάστημα. Αυτό ίσως δίνει τη δυνατότητα στον *Escherichia coli* O157:H7 να προσαρμοστεί στην σταδιακή μεταβολή της θερμοκρασίας. Η κατευθείαν κατανάλωση του κρέατος μπορεί επίσης να ενέχει κινδύνους. Το κρέας συνεχίζει να ψήνεται για μικρό χρονικό διάστημα όταν αφαιρεθεί από την πηγή θέρμανσης. Οπότε συνίσταται να «ξεκουράζεται» μετά το ψήσιμο για μικρό χρονικό διάστημα (ειδικά κατά το ψήσιμο σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από τις προτεινόμενες). Με αυτόν το τρόπο εξασφαλίζεται περαιτέρω εξάλειψη των παθογόνων που μπορεί να υπάρχουν σε αυτό. Όμως πολλές ο βόειος κιμάς ψήνεται ανεπαρκώς είτε καταλάθως είτε εσκεμμένα. Σε πολλές κουλούρες ο κιμάς καταναλώνεται σε ψήσιμο από rare μέχρι medium rare λόγω της προτίμησης στην γεύση. Οπότε είναι απαραίτητη η εύρεση ενός αντιμικροβιακού παράγοντα ο οποίος θα προλαμβάνει αυτές τις ηθελημένες και μη κακές πρακτικές μεταχείρισης του βόειου κιμά.

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της εγκλεισμένης σε β-κυκλοδεξτρίνη καρβακρόλης στην θερμοανθεκτικότητα και επιβίωση του παθογόνου μικροοργανισμού *Escherichia coli* O157:H7 σε βόεια μπιφτέκια.

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1 Αντιδραστήρια και εργαστηριακός εξοπλισμός

#### 2.1.1 Υλικά και αντιδραστήρια

Τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε όλη την πειραματική πορεία αναφέρονται παρακάτω:

- H<sub>2</sub>O 1D
- Ringer solution tablets (Oxoid)
- Sorbitol MacConkey Agar (Neogen, Oxoid)
- Tryptone Soya Agar
- Tryptone Soya Broth
- Violet Red Bile Glucose Agar
- Cefixime Tellurite Selective Supplement (Oxoid)
- Μοσχαρίσιος κιμάς, λάπα (Κρεοπωλείο Καρμπαλιώτης)
- β-Cyclodextrin
- Αιθανόλη
- Carvacrol
- Isooctane

#### 2.1.2 Όργανα, συσκευές και αναλώσιμα

Τα όργανα, οι συσκευές και τα αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν σε όλη την πειραματική πορεία αναφέρονται παρακάτω:

- Τρυβλία Petri 92x16 mm
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ουροδοχεία
- Κωνική φιάλη των 1000 mL
- Φιάλες Duran με πλαστικό πώμα των 100 mL, 250 mL, 500 mL και 1000 mL
- Σωληνάκια Falcon των 15 mL
- Cell spreader, stainless steel
- Inoculating loops, πλαστικά
- Αλουμινόχαρτο επαγγελματικό
- Πλαστικά στατό
- Pipette tips μη αποστειρωμένα (100 και 1000 μL)
- Μηχανικές πιπέτες των 200 και 1000 μL
- Ογκομετρικοί σωλήνες των 10, 500 και 1000 mL
- Σιφώνια μέτρησης πλαστικά αποστειρωμένα των 10 και 25 mL
- Λύχνος Bunsen
- VideometerLab
- Meat Analyzer Food Scan (Foss)
- Καταγραφικό θερμοκρασίας θερμοζευγών TC-08 με 8 κανάλια (Pico Technology)
- Θερμοζεύγη τύπου K (Nickel-Chromium/Nickel-Alumel)
- Φίλτρο σύριγγας αποστειρωμένο
- Αναλυτικός ζυγός (ακρίβειας 0,0001 g,



- Φαρμακευτικός ζυγός (ακρίβειας 0,01 g)
- Ψυχόμενη Φυγόκεντρος
- Ψυγείο
- Κλίβανοι
- Αυτόκαυστο
- Μεταλλική λαβίδα
- Πλαστικά δισκάκια
- Καταψύκτης
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ηλεκτρική επιτραπέζια εστία μονή
- Αντικολλητικά τηγάνια διαμέτρου 28 εκ.(XL Force C38506, Tefal)
- Vortex
- Χάρτινο φίλτρο no. 1 (Whatman)
- Μετρητής pH
- Ύαλοι ωρολογίου
- Φιάλη Bucher 1000 mL
- Αντλία κενού
- Πορσελάνινο χωνί
- Ξηραντήρας
- Φασματοφωτόμετρο

## 2.2 Πειραματικός σχεδιασμός

Ο πειραματικός σχεδιασμός που ακολουθήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται παρακάτω. Αρχικά επιλέχθηκαν δύο θερμοκρασίες ψήσιματος στο κέντρο του μπιφτεκιού, μία κάτω από τους 65°C (περίπου 62-63 °C) και μία πάνω από τους 65°C (περίπου 71 °C). Αυτές οι θερμοκρασίες υποδηλώνουν ένα μέτριο ψήσιμο και ένα ψήσιμο με βάση την ισχύουσα νομοθεσία αντίστοιχα. Η θερμοκρασία κάτω των 65°C μελετήθηκε για δύο λόγους. Είτε οφείλεται σε ανεπαρκές ψήσιμο (λόγω διάφορων παραγόντων) το οποίο δεν έγινε σκόπιμα, είτε γίνεται ηθελημένα λόγω της προτίμησης μια μερίδας ανθρώπων σε μη καλοψημένο κρέας. Ως μέσο έψησης των μπιφτεκιών επιλέχθηκε ένα αντικολλητικό τηγάνι διαμέτρου 28 εκ. και ως πηγή θέρμανσης μία ηλεκτρική επιτραπέζια εστία. Το ψήσιμο ενός μπιφτεκιού σε τηγάνι είναι μία κοινή πρακτική που ακολουθείται και ενέχει το μεγαλύτερο κίνδυνο ανεπαρκούς ψήσιματος διότι θερμαίνεται μόνο η πλευρά του κρέατος που έρχεται σε επαφή με το τηγάνι. Έπειτα καθορίστηκε η διάρκεια της ψύξης του κρέατος (πριν ψηθεί) στις 7 ημέρες στους -18°C, ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη ψύξη των μπιφτεκιών μέχρι το κέντρο τους. Επίσης αποτελεί ένα πιθανό σενάριο χρόνου κατάψυξης κιμά για επαγγελματική ή οικιακή χρήση. Η επιλογή των -18°C έγινε με βάση ότι συνήθως μία οικιακή κατάψυξη ρυθμίζεται να λειτουργεί στην συγκεκριμένη θερμοκρασία. Επιλέχθηκαν 3 δειγματοληψίες ανάλογα με την κατάσταση του κιμά, μία για τον νωπό κιμά την ημέρα της παρασκευής των δειγμάτων, μία την έβδομη μέρα του κατεψυγμένου κιμά και μία μετά το ψήσιμο του κιμά. Τα μπιφτέκια ψήνονταν κατευθείαν χωρίς απόψυξη, άρα η δειγματοληψία για τον κατεψυγμένο και το ψημένο κιμά συνέβαινε την ίδια μέρα. Μετά το ψήσιμο τα δείγματα ψύχονταν

άμεσα, ώστε να μην συνεχιστεί περαιτέρω το ψήσιμο τους. Στόχος ήταν η προσομοίωση μιας κακής πρακτικής ψησίματος του κιμά (που μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα εστιατόριο ή μία οικία) δηλαδή η κατευθείαν έψηση από την κατάψυξη και ο μηδενικός χρόνος «ξεκούρασης» του ψημένου κρέατος. Επίσης την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων, στον νωπό κιμά γινόταν ανάλυση της σύστασης του κρέατος με την χρήση Meat Analyser και Videometer. Τα δείγματα κιμά χωρίστηκαν σε 8 διαφορετικές κατηγορίες:

- Δείγματα κιμά χωρίς την προσθήκη κάποιου συστατικού ή μικροοργανισμού (CON-)
- Δείγματα κιμά με την προσθήκη εμβολίου *Echerichia coli* (CON+)
- Δείγματα κιμά την προσθήκη ελεύθερης καρβακρόλης (CARV-)
- Δείγματα κιμά την προσθήκη ελεύθερης καρβακρόλης εμβολίου *Echerichia coli* (CARV+)
- Δείγματα κιμά με την προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης (β-CON-)
- Δείγματα κιμά με την προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης και εμβολίου *Echerichia coli* (β-CON+)
- Δείγματα κιμά με την προσθήκη συμπλόκου καρβακρόλης-β-κυκλοδεξτρίνης (β-CARV-)
- Δείγματα κιμά με την προσθήκη συμπλόκου καρβακρόλης-β-κυκλοδεξτρίνης και εμβολίου *Echerichia coli* (β-CARV+)

Οι παραπάνω κατηγορίες επιλέχθηκαν με στόχο την μελέτη και σύγκριση της παρουσίας ή μη παθογόνου μικροοργανισμού, της επίδρασης της ελεύθερης και ενθυλακωμένης καρβακρόλης, της επίδρασης της συμπλοκοποιημένης ή μη κυκλοδεξτρίνης. Το πείραμα έγινε δύο φορές, όπου η κάθε φορά είχε τρεις επαναλήψεις σε κάθε μεταχείριση κιμά.

### 2.3 Μικροοργανισμός *Echerichia coli* O157:H7

Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ο παθογόνος μικροοργανισμός *Echerichia coli* O157:H7. Συγκεκριμένα αξιοποιήθηκαν τρία στελέχη του *E. coli*: το NCTC 12079 (B15), NCTC 13125 (B16) και το NCTC 13127 (B18). Τα συγκεκριμένα στελέχη ανήκουν στην συλλογή που διατηρεί το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συντηρούνταν σε καταψύκτη στους -20°C σε διάλυμα TSB που περιείχε 20% γλυκερόλη.

### 2.4 Εμβόλιο μικροοργανισμών

#### 2.4.1 Παρασκευή εμβολίου μικροοργανισμών

Για την δημιουργία του εμβολίου πάρθηκαν 100 μL από το stock του κάθε στελέχους *E. coli*, τοποθετήθηκαν σε 10 mL αποστειρωμένου TSB σε falcon tubes ξεχωριστά και αποθηκεύτηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες για επώαση. Μετά την επώαση τα falcon αναδεύτηκαν σε vortex, αφαιρέθηκαν 100 μL από το καθένα, τα οποία τοποθετήθηκαν σε νέα falcon με TSB (10 mL) και επώαστηκαν στους 37°C για 18 ώρες. Επίσης με την χρήση loop πάρθηκε δείγμα από τα αρχικά falcon και έγινε streaking σε τρυβλία με TSA. Τα τρυβλία TSA επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες ώστε να

μελετηθεί η καθαρότητα του κάθε στελέχους. Τα καινούργια falcon μετά τις 18 ώρες φυγοκεντρήθηκαν στις 3600 στροφές, στους 4°C για 15 λεπτά. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκαν 10 mL αποστειρωμένο διάλυμα Ringer. Τα falcon αναδεύθηκαν σε vortex μέχρι να επαναιωρηθεί πλήρως το ίζημα και να δημιουργηθεί ομοιογενές διάλυμα. Έπειτα τοποθετήθηκαν πάλι για φυγοκέντρηση στις 3600 στροφές, στους 4°C για 15 λεπτά και η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, επαναλήφθηκε για ακόμα μία φορά. Εφόσον τα στελέχη είχαν καθαριστεί με Ringer δύο φορές, προστέθηκε σε αυτά για τρίτη φορά Ringer και λήφθηκε δείγμα από το καθένα με την μέθοδο του streaking για την παρασκευή stock στερεής καλλιέργειας σε τρυβλία TSA. Τα τρυβλία αποθηκεύθηκαν στους 4°C και ανανεώνονταν κάθε 30 ημέρες. Αυτό έγινε, ώστε κάθε φορά που θα χρειαζόταν η παρασκευή εμβολίου, να γίνεται λήψη δείγματος από στερεή καλλιέργεια (παραλαβή μίας αποικίας με την χρήση loop) και όχι από το υγρό stock που υπήρχε στην κατάψυξη. Έτσι αποτρέπεται η μόλυνση του υγρού stock.

#### 2.4.2 Καταμέτρηση εμβολίου

Έχει υπολογιστεί από προηγούμενες μελέτες ότι ο πληθυσμός των μικροοργανισμών μετά από 18 ώρες επώασης έχει φτάσει τους 9 log cfu/mL. Η καταμέτρηση του εμβολίου γίνεται για να πιστοποιηθεί κάθε φορά σε τι πληθυσμό έχει φτάσει το εμβόλιο, ώστε να γίνουν και οι κατάλληλοι υπολογισμοί που θα χρειαστούν κατά τον εμβολιασμό του κιμά. Αρχικά λήφθηκαν 1000  $\mu$ L από το πρώτο falcon με την χρήση μηχανικής πιπέτας σε αποστειρωμένες συνθήκες και προστέθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL αποστειρωμένο Ringer. Ο δοκιμαστικός σωλήνας αναδεύτηκε σε vortex ώστε να μην κατακαθίσουν τα κύτταρα των μικροοργανισμών. Με την βοήθεια της μηχανικής πιπέτας αναρροφήθηκαν πάλι 1000  $\mu$ L από τον δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL αποστειρωμένο Ringer. Η διαδικασία επαναλήφθηκε μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή αραιώση. Κάθε φορά που προσθέτονταν 1000  $\mu$ L από το δείγμα σε 9 mL αποστειρωμένο Ringer, το δείγμα αραιωνόταν κατά 10 φορές. Στην συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα αραιώθηκε 7 φορές ώστε να μπορέσει να καταμετρηθεί. Από το έβδομο σωληνάκι Ringer πάρθηκαν 100  $\mu$ L και τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο TSA. Με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου μεταλλικού διασπορέα το υγρό απλώθηκε σε όλη την επιφάνεια με ταυτόχρονη κυκλική περιστροφή του τρυβλίου. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και με το έκτο σωληνάκι. Αφότου ολοκληρώθηκε η λήψη δείγματος και από τα τρία falcon, έγινε η αποθήκευση των τρυβλίων στους 37°C για 24 ώρες. Τα τρία falcon ενώθηκαν σε ένα καινούργιο αποστειρωμένο falcon των 50 mL υπό ασηπτικές συνθήκες, το οποίο τοποθετήθηκε σε κλίβανο στους 4°C ώστε να μην αναπτυχθούν περαιτέρω οι μικροοργανισμοί μέχρι τον εμβολιασμό του κιμά. Αυτό αποτελούσε το τελικό εμβόλιο. Μετά το πέρας των 24 ωρών έγινε η καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία που περιείχαν από 30-300 αποικίες.

## 2.5 Σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνη-καρβακρόλη

### 2.5.1 Παρασκευή συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνη-καρβακρόλη

Η παρασκευή συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνη-καρβακρόλη πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της συγκαθίζησης (coprecipitation method). Αρχικά ζυγίστηκαν 36,8 gr σκόνης β-κυκλοδεξτρίνης σε κωνική φιάλη των 1000mL. Σε αυτήν προστέθηκαν 368 mL διαλύματος αιθανόλης-νερό 1:2. Το διάλυμα αναδεύτηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα στους 200°C μέχρι να ομογενοποιηθεί και διαυγάσει πλήρως. Μετά αφαιρέθηκε αμέσως από την εστία για να ελεγχθεί η θερμοκρασία του. Ο επιθυμητός στόχος είναι οι 55-57°C ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος εγκλεισμός της καρβακρόλης. Όταν το διάλυμα έφτασε την σωστή θερμοκρασία μοιράστηκε γρήγορα σε δυο φιάλες Duran των 500 mL ισόποσα, δηλαδή από 184 mL στην καθεμία, με την βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα. Οι φιάλες τοποθετήθηκαν πάλι σε θερμαινόμενους μαγνητικούς αναδευτήρες και συνεχίστηκε η ανάδευση τους, ώστε να μην αλλάξει η επιθυμητή θερμοκρασία. Από προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριο, έχει βρεθεί ότι η καλύτερη αναλογία, για χρήση σε τρόφιμο, του διαλύματος καρβακρόλη-β-κυκλοδεξτρίνη είναι η 8:92. Επομένως προστέθηκαν στάγδην 16 mL καρβακρόλης με τη χρήση αποστειρωμένου σιφωνιού των 25 mL σε καθεμία φιάλη. Έπειτα οι φιάλες τοποθετήθηκαν σε νέους μαγνητικούς αναδευτήρες (που είχαν θερμοκρασία δωματίου) και συνεχίστηκε η ανάδευση των διαλυμάτων για 4 ώρες χωρίς την χρήση θερμότητας. Μόλις τελείωσε η ανάδευση, οι φιάλες αποθηκεύτηκαν σε κλίβανο στους 4°C για 24 ώρες. Για να ανακτηθούν τα σύμπλοκα που κατακάθισαν, έγινε διήθηση υπό κενό των διαλυμάτων με την χρήση χάρτινου φίλτρου νο. 1. Η πάστα σκόνης που συλλέχθηκε αλλά και τα ίδια τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε ύαλους ωρολογίων και τοποθετήθηκαν σε συμβατικό φούρνο για ξήρανση στους 50°C για 24 ώρες. Έπειτα αφέθηκαν σε ξηραντήρα στους 25°C για μερικές ώρες, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα υγρασίας. Οι τελικές σκόνες μεταφέρθηκαν σε ουροσυλλέκτες, ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό και αποθηκεύτηκαν πάλι στον ξηραντήρα μέχρι να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Στην παρούσα πτυχιακή έγιναν 7 διαφορετικές παρασκευές συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνη-καρβακρόλη.

### 2.5.2 Παρασκευή μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης

Η παραγωγή του μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης έγινε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην παραγραφο 2.4.1 χωρίς όμως την προσθήκη της καρβακρόλης. Στην παρούσα πτυχιακή έγιναν 5 διαφορετικές παρασκευές μάρτυρα γιατί χρειαζόταν μικρότερη ποσότητα σε σχέση με το σύμπλοκο στα πειράματα.

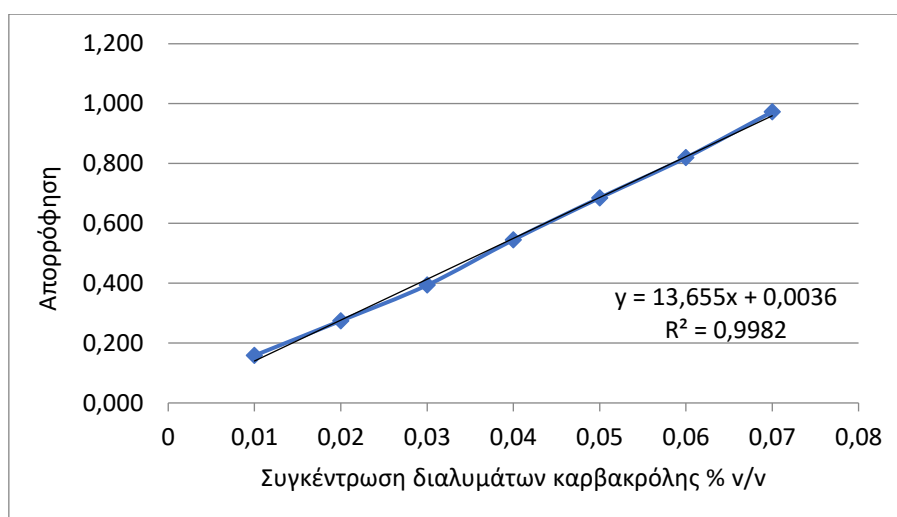
### 2.5.3 Ποσοστό ενθυλάκωσης της καρβακρόλης στο σύμπλοκο

Το ποσοστό εγκλεισμού της καρβακρόλης είναι απαραίτητο να υπολογιστεί ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες ποσότητες που θα χρησιμοποιηθούν περαιτέρω στο πείραμα. Σκοπός είναι να διασπαστεί το σύμπλοκο, να απελευθερωθεί η καρβακρόλη και να μετρηθεί φασματομετρικά. Η καρβακρόλη απορροφά στα 275 nm. Αρχικά παρασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη από την φωτομέτρηση πρότυπων διαλυμάτων καρβακρόλης συγκεντρώσεων 0,01-0,07 % v/v. Παρακάτω

παρουσιάζονται ο πίνακας που περιέχει τις τιμές των απορροφήσεων που αντιστοιχεί σε κάθε συγκέντρωση, καθώς και το διάγραμμα της πρότυπης καμπύλης μέσω της οποίας βγαίνει ο τύπος υπολογισμού των άγνωστων συγκεντρώσεων καρβακρόλης που περιέχεται στα σύμπλοκα που παρασκευάστηκαν.

**Πίνακας 1:** Περιέχει τις τιμές της απορρόφησης σε αντιστοιχία με τις συγκεντρώσεις καρβακρόλης % (v/v)

Συγκέντρωση καρβακρόλης % (v/v)	Απορρόφηση
0,01	0,159
0,02	0,275
0,03	0,394
0,04	0,545
0,05	0,685
0,06	0,820
0,07	0,973



**Σχήμα 1:** Γραφική παράσταση της μετρούμενης απορρόφησης της καρβακρόλης σε σχέση με το ποσοστό της συγκέντρωσης των πρότυπων διαλυμάτων της. Εφαρμόστηκε η μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων για την εύρεση της βέλτιστης ευθείας με την αντίστοιχη εξίσωση της.

Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων για την αποδέσμευση της καρβακρόλης από το σύμπλοκο και η φωτομέτρηση αυτών. Ζυγίστηκαν 50 mg από κάθε παρασκευή συμπλοκου β-κυκλοδεξτρίνη-καρβακρόλη και τοποθετήθηκαν σε σφαιρική φιαλή των 50 mL. Από κάθε παρασκευή πάρθηκαν δύο δείγματα των 50 mg για τον ορθότερο υπολογισμό την εγκλεισμένης καρβακρόλης. Στις σφαιρικές φιάλες με τα δείγματα προστέθηκαν 5 mL αιθανόλης και μεταφέρθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 10 min. Το νερό που περιείχε το λουτρό είχε προηγουμένως θερμανθεί μέχρι τους 50°C με την χρήση οικιακού βραστήρα. Αυτή η θερμοκρασία επιλέχθηκε διότι

σύμφωνα με μελέτες είναι η βέλτιστη για την απελευθέρωση αιθέριων ελαίων από το σύμπλοκο. Τα δείγματα, όταν τελείωσε το λουτρό υπερήχων, αναδεύτηκαν σε μαγνητικό αναδευτήρα για 15 min. Έπειτα μεταφέρθηκε το καθένα σε ογκομετρικό κύλινδρο των 100 mL και συμπληρώθηκε αιθανόλη μέχρι τα 50 mL. Αφαιρέθηκαν 10 mL με σιφώνιο, τοποθετήθηκαν σε falcon και φυγοκεντρήθηκαν για 15 min στους 4°C και στις 5000 στροφές. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέο falcon με προσεκτική απόχυση ώστε να μην παρασυρθεί και ίζημα. Από το υγρό πάρθηκαν 0,5 mL και προστέθηκαν 4,5 mL αιθανόλη με σκοπό την αραιώση του δείγματος κατά 10 φορές. Τα τελικά δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 275 nm σε φασματοφωτόμετρο που είχε μηδενιστεί με αιθανόλη. Οι απορροφήσεις που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν στην εξίσωση που δημιουργήθηκε από την πρότυπη καμπύλη ώστε να υπολογιστούν οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις του κάθε δείγματος. Η συγκέντρωση καρβακρόλης σε κάθε σύμπλοκο τελικώς υπολογίστηκε από τον μέσο όρο των δύο δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν από κάθε παρασκευή.

## 2.6 Εύρεση του MIC και του MBC

Η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) και η ελάχιστη βακτηριοκτόνος δράση (Minimum Bacteriocidal Concentration, MBC) προσδιορίστηκαν για το σύμπλοκο κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης. Έγινε η παρασκευή του εμβολίου όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3.1 για κάθε στέλεχος *E. coli* ξεχωριστά και αραιώθηκε με Ringer ώστε να έχει συγκέντρωση 5 log cfu/mL. Ανάλογη ποσότητα συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης διαλύθηκε σε διάλυμα TSB με Tween-80 ώστε να φτάσει την κατάλληλη συγκέντρωση καρβακρόλης. Σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 βοθρίων προστέθηκε σε όλα τα βοθρία 100 μL TSB με την βοήθεια πολυπιπέτας. Στην πρώτη στήλη βοθρίων προστέθηκαν 100 μL από το διάλυμα του συμπλόκου και αναδεύτηκαν με προσεκτική αναρρόφηση πάνω και κάτω με την μηχανική πιπέτα. Έπειτα αφαιρέθηκαν 100 μL από την πρώτη στήλη και μεταφέρθηκαν στην δεύτερη στήλη. Έτσι η δεύτερη στήλη περιέχει διπλή αραιώση της πρώτης στήλης. Η ίδια διαδικασία συνεχίστηκε μέχρι τη δέκατη στήλη. Τα 100 μL που αναρροφήθηκαν από την δέκατη στήλη απορρίφθηκαν. Από την ενδέκατη στήλη μέχρι την πρώτη στήλη προστέθηκαν 50 μL από το εμβόλιο *E. coli*. Η δωδέκατη στήλη δεν προστέθηκε τίποτα καθώς αποτελούσε το αρνητικό control της διαδικασίας. Σε κάθε πλάκα οι τελευταίες τέσσερις σειρές γεμίζονταν μόνο με 100 μL γιατί αποτελούσαν τα blank βοθρία για το plate scanner. Όλες οι πλάκες μικροτιτλοδότησης επώαστηκαν στους 37°C για μία ημέρα. Έπειτα αναλύθηκαν μέσω της χρήσης microplate scanner, το οποίο μετρούσε την απορρόφηση στα 600 nm. Το κελί που είχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση συμπλόκου και δεν εμφάνισε απορρόφηση, ορίστηκε σαν MIC. Από τα κελιά που δεν είχαν απορρόφηση, λήφθηκε δείγμα και επιστρώθηκε σε τρυβλία TSA που επώαστηκαν στους 37°C για μία ημέρα. Το κελί που είχε την μεγαλύτερη συγκέντρωση συμπλόκου και δεν υπήρχε παρουσία αποικιών *E. coli* στο αντίστοιχο τρυβλίο του, ορίστηκε σαν MBC. Στο συγκεκριμένο πείραμα η MIC και η MBC του συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης βρέθηκε ότι είναι 0,04% και 0,05% αντίστοιχα.

## 2.7 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καρβακρόλης

Έγιναν προπειράματα για να βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση της καρβακρόλης που θα χρησιμοποιούνταν στα κύρια πειράματα με τον κιμά. Αρχικά ελέγχθηκε προπειραματικά η συγκέντρωση 0,2% καρβακρόλης σε ελεύθερη και ενθυλακωμένη μορφή (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη). Αποτελούσε την τετραπλάσια συγκέντρωση MBC αλλά τελικά δεν έδειξε σημαντική μείωση στο εμβολιασμένο με *E. coli* δείγμα μπιφτεκιού. Έπειτα μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις 0,5, 1,0 και 1,5 % καρβακρόλης σε ελεύθερη και ενθυλακωμένη μορφή. Οι συγκεντρώσεις 1,0 % και 1,5 % είχαν μικρές διαφορές στην δράση τους οπότε προτιμήθηκε να μελετηθεί περαιτέρω η δράση της 1,0 % καρβακρόλης ως μικρότερης ποσότητας. Επίσης η συγκέντρωση 1% καρβακρόλης είχε καλύτερη δράση απέναντι στο *E. coli* από την συγκέντρωση 0,5 % καρβακρόλης.

## 2.8 Παρασκευή δειγμάτων κιμά

Μοσχαρίσιος κιμάς από λάπα αγοράστηκε από κρεοπωλείο της Αθήνας την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων μπιφτεκιών και αποθηκεύτηκε κατευθείαν σε κλίβανο στους 4°C. Για καθεμία από τις 8 κατηγορίες δειγμάτων είχαν οριστεί τρία δείγματα των 10 g για τον νωπό κιμά, τρία δείγματα των 10 g για τον κατεψυγμένο κιμά και τρία δείγματα των 90 g για τα δείγματα κιμά που θα ψηθούν. Αρχικά ζυγίστηκε ο κιμάς που αναλογούσε στα δείγματα CON- σε εργαστηριακό ζυγό και μεταφέρθηκε σε πλαστικό δισκάκι, στο οποίο είχε τοποθετηθεί ένα φύλλο αλουμινόχαρτου. Δημιουργήθηκαν τα τρία δείγματα των 10g κιμά που αφορούν τη νωπή μεταχείριση, μεταφέρθηκαν σε σακούλες δειγματοληψίας και αποθηκεύτηκαν στον κλίβανο στους 4°C ώστε να μην υπάρξει μικροβιακή αλλοίωση μέχρι τη δειγματοληψία τους. Με τον ίδιο τρόπο έγιναν και τα τρία δείγματα των 10 g που αφορούν την κατάψυξη του κιμά, με τη μόνη διαφορά ότι αυτά τοποθετήθηκαν στον εργαστηριακό καταψύκτη στους -18°C. Για την παρασκευή των δειγμάτων που αφορούν το ψήσιμο, ζυγίστηκαν τρία δείγματα των 90 g και μεταφέρθηκαν σε τρυβλία Petri διαστάσεων 90x15 mm. Ο κιμάς στρώθηκε ομοιόμορφα και πιέστηκε με το χέρι μέχρι να μην προεξέχει καθόλου από το τρυβλίο και να μην υπάρχουν κενά. Από προηγούμενες μελέτες που είχαν γίνει στο εργαστήριο είχε βρεθεί ότι η συγκεκριμένη ποσότητα χωράει ακριβώς σε ένα τρυβλίο Petri με τις συγκεκριμένες διαστάσεις. Η χρήση του τρυβλίου ως μήτρα σχηματισμού μπιφτεκιών αποσκοπεί στην δημιουργία πανομοιότυπων μπιφτεκιών αλλά και στην εύκολη αποθήκευση τους στην κατάψυξη χωρίς να χάσουν το επιθυμητό τους σχήμα. Τα δείγματα σφραγίστηκαν με το καπάκι από τα τρυβλία και με την χρήση ταινίας ώστε να μην χαλάσει το επιθυμητό τους σχήμα κατά την αποθήκευση τους στους -18°C μέχρι να παγώσουν πλήρως. Όπως και στα κατεψυγμένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε σακούλες δειγματοληψίας και μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό καταψύκτη. Όλη η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων διεξαγόταν υπό ασηπτικές συνθήκες.

Για την δημιουργία των δειγμάτων CON+ εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Η κύρια διαφορά ήταν, ότι πριν την παρασκευή των ξεχωριστών δειγμάτων γινόταν ο εμβολιασμός του κιμά. Η διαδικασία ακολουθούσε ως εξής: το τελικό εμβόλιο αναδευόταν σε vortex, αναρροφούνταν 3,3 mL σε τρεις

δόσεις του 1 mL και μία δόση των 300  $\mu$ L με την χρήση μηχανικής πιπέτας και προσθέτονταν στάγδην και σε διαφορετικά σημεία στον κιμά. Ανάμεσα από κάθε δόση ο κιμάς αναδευόταν με τα χέρια ώστε να διασπαρθεί σε όλη την επιφάνεια του κιμά το εμβόλιο και να ομογενοποιηθεί πλήρως το μείγμα. Ο σκοπός ήταν ο εμβολιασμένος κιμάς να έχει τελική συγκέντρωση 7 log *E. coli*. Επομένως επιλέχθηκαν τα 3,3 mL εμβολίου γιατί με βάση τους υπολογισμούς αντιστοιχούν στα 330g κιμά (3x10g+3x10g+3x90g) που χρειάζεται για την παρασκευή των δειγμάτων κάθε κατηγορίας.

Για τη δημιουργία των δειγμάτων CARV- εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στα CON- δείγματα. Όμως προστέθηκαν στάγδην με τη χρήση μηχανικής 3,3 mL για τα δείγματα 1,0 % ελεύθερης καρβακρόλης πριν το διαχωρισμό του κιμά στα επιμέρους δείγματα. Η προσθήκη της υγρής καρβακρόλης γινόταν σε 3 ή 4 δόσεις αντίστοιχα και ο κιμάς αναδευόταν με τα χέρια μετά από την κάθε δόση.

Η παρασκευή των δειγμάτων  $\beta$ -CON- και  $\beta$ -CARV- έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως στα δείγματα CON-. Πριν το διαμοιρασμό του κιμά έγινε η προσθήκη της σκόνης μάρτυρα κυκλοδεξτρίνης ή της σκόνης συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης αντίστοιχα. Ο υπολογισμός της ποσότητας της σκόνης που θα προστιθόταν, έγινε με βάση το ποσοστό ενθυλάκωσης της καρβακρόλης στην κυκλοδεξτρίνη. Δηλαδή γινόταν υπολογισμός του ποσοστού ενθυλάκωσης κάθε παρασκευής συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.3. Μετά καθοριζόταν η αντίστοιχη ποσότητα του συμπλόκου που αναλογούσε στην συγκέντρωση 1,0% για 330g κιμά. Όσον αφορά τον υπολογισμό των ποσοτήτων σκόνης μάρτυρα κυκλοδεξτρίνης για τα δείγματα  $\beta$ -CON-, αφαιρούνταν από τις αντίστοιχες ποσότητες που είχαν βρεθεί παραπάνω, οι ποσότητες καρβακρόλης 1,0 % (που αντιστοιχούν σε 330g κιμά) που είχαν ενθυλακωθεί στο σύμπλοκο. Επομένως υπήρχε σε όλα τα δείγματα κιμά ή ίδια ποσότητα συμπλοκοποιημένης ή μη κυκλοδεξτρίνης. Κατά τον ίδιο τρόπο με τις προηγούμενες παρασκευές δειγμάτων, η σκόνη μάρτυρα κυκλοδεξτρίνης ή συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης προστέθηκε στα αντίστοιχα δείγματα κιμά σε τέσσερις δόσεις με ανάδευση του κιμά με τα χέρια μετά από κάθε δόση.

Η δημιουργία των υπόλοιπων δειγμάτων CARV+  $\beta$ -CON+ και  $\beta$ -CARV+ αναλύεται παρακάτω. Πρώτα έγινε ο εμβολιασμός των δειγμάτων με *E. coli* όπως περιγράφηκε στην δεύτερη παράγραφο που αφορά τα δείγματα CON+. Έπειτα έγινε η προσθήκη ελεύθερης καρβακρόλης, μάρτυρα κυκλοδεξτρίνης και συμπλόκου κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης στα ανάλογα δείγματα σύμφωνα με την διαδικασία που ακολουθήθηκε στην τρίτη και τέταρτη παράγραφο αντίστοιχα. Ο κιμάς αναδευόταν καλά με τα χέρια μετά από την οποιαδήποτε προσθήκη δόσης εμβολίου ή δόσης συστατικού για να εξασφαλιστεί η ομογενοποίηση των δειγμάτων. Η προσθήκη εμβολίου γινόταν πριν την μεταχείριση με καρβακρόλη ή κυκλοδεξτρίνη ώστε να ερευνηθεί η επίδραση της μεταχείρισης σε ένα ήδη μολυσμένο κρέας.



## 2.9 Προεργασίες για τη θερμική επεξεργασία δειγμάτων

Πριν τη θερμική επεξεργασία των δειγμάτων έγιναν ορισμένες προεργασίες που περιγράφονται παρακάτω. Αρχικά μεταφέρθηκαν 200 ml αποστειρωμένου Ringer υπό ασηπτικές συνθήκες σε κάθε σακούλα δειγματοληψίας με φίλτρο, που προοριζόταν για καθένα από ψημένα δείγματα. Έπειτα η κάθε σακούλα ζυγιζόταν μαζί με το Ringer και το βάρος της αναγραφόταν απέξω. Οι σακούλες αποθηκεύτηκαν σε κλίβανο στους 4°C ώστε να παγώσει το Ringer μέχρι την περαιτέρω χρήση τους στο πείραμα. Τοποθετήθηκε πάγος προμηθευόμενος από την παγομηχανή του εργαστηρίου σε κουτί φελιζόλ ώστε να διατηρηθεί όσο τον δυνατόν περισσότερο σταθερή η θερμοκρασία του χάρις στην ισοθερμική ιδιότητα του φελιζόλ. Επίσης συνδέθηκε το καταγραφικό της θερμοκρασίας με τον υπολογιστή και ρυθμίστηκε μέσω του προγράμματος PicoLog να παίρνει δείγμα θερμοκρασίας ανά ένα δευτερόλεπτο για 20 λεπτά.

## 2.10 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων

Την έβδομη μέρα της κατάψυξης κάθε δείγματος 90g κιμά, γινόταν η θερμική επεξεργασία του. Αρχικά ένα δείγμα μεταφέρθηκε από την κατάψυξη στον εργαστηριακό πάγκο και τοποθετήθηκε αμέσως ένα καθαρό αντικολλητικό τηγάνι στην εστία με ταυτόχρονη ενεργοποίηση της. Μία σακούλα δειγματοληψίας με προζυγισμένο Ringer μεταφέρθηκε από το κλίβανο στο κουτί που περιείχε τον πάγο. Το δείγμα αφαιρέθηκε από το τρυβλίο με την βοήθεια ενός αποστειρωμένου οικιακού μαχαιριού. Με την χρήση βελόνας, η οποία είχε προηγουμένως ζεσταθεί σε φλόγα από λύχνο Bunsen, έγινε μια τρύπα περίπου στην μέση του ύψους του μπιφτεκιού (στα 0,7 cm). Η βελόνα είχε σηματοδοτηθεί από πριν με μαρκαδόρο στα 4,5 cm διότι αποτελούν το μισό της διαμέτρου του μπιφτεκιού. Η βελόνα εισερχόταν στο μπιφτέκι μέχρι το μαρκαρισμένο σημείο ώστε να δημιουργηθεί η κατάλληλη τρύπα μέχρι το γεωμετρικό κέντρο του μπιφτεκιού. Έπειτα η βελόνα αφαιρούνταν και εισερχόταν το θερμοζεύγος τύπου K μέσα στο μπιφτέκι. Το θερμοζεύγος συνδεόταν στο πρώτο κανάλι του καταγραφικού θερμοκρασίας. Μέχρι να γίνει η προετοιμασία του δείγματος, το τηγάνι είχε προθερμαθεί πλήρως. Όλη η μεταχείριση του μπιφτεκιού γινόταν σε γρήγορους ρυθμούς ώστε να αποψυχθεί όσο το δυνατόν λιγότερο μέχρι το ψήσιμο του. Το μπιφτέκι με το θερμοζεύγος τοποθετήθηκε στο κέντρο του τηγανιού και ταυτόχρονα πατήθηκε το κουμπί έναρξης στο PicoLog ώστε να ξεκινήσει να καταγράφει τις θερμοκρασίες στο κέντρο του μπιφτεκιού. Μέσω των προπειραμάτων που είχαν γίνει, καθορίστηκαν τέσσερα γυρίσματα στα μπιφτέκια για κάτω των 65°C και πέντε γυρίσματα για άνω των 65°C. Για το ψήσιμο κάτω των 65°C το πρώτο γύρισμα έγινε στους -2°C, το δεύτερο στους 12°C, το τρίτο στους 31°C και το τέταρτο στους 51°C. Ο χειρισμός του μπιφτεκιού έγινε με την χρήση αποστειρωμένης οικιακής λαβίδας. Το μπιφτέκι αφαιρέθηκε από το τηγάνι μόλις ξεπέρασε τους 61°C. Όσον αφορά το ψήσιμο πάνω από τους 65°C, έγιναν τα ίδια γυρίσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω με ένα επιπλέον γύρισμα στους 61°C. Μόλις το κέντρο του μπιφτεκιού ξεπέρασε τους 71°C, απομακρύνθηκε από το τηγάνι. Μετά το ψήσιμο όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν κατευθείαν στις αντίστοιχες σακούλες με Ringer που υπήρχαν στο κουτί με τον πάγο και αφέθηκαν να κρυώσουν μέχρι να

ακολουθήσει η δειγματοληψία. Σκοπός ήταν να μη αφηθεί να «ξεκουραστεί» το κρέας σε θερμοκρασία δωματίου αλλά και να σταματήσει κατευθείαν το ψήσιμο του με τη απότομη μείωση της θερμοκρασίας.

## 2.11 Δειγματοληψία δειγμάτων

### 2.11.1 Δειγματοληψία νωπού κιμά

Την ημέρα παρασκευής των δειγμάτων πάρθηκαν 3 δείγματα νωπού κιμά των 10g για καθμία από τις οκτώ περιπτώσεις όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 90 mL αποστειρωμένου Ringer υπό ασηπτικές συνθήκες ώστε να αραιωθεί το δείγμα κατά δέκα φορές. Έπειτα τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε stomacher για 60 δευτερόλεπτα, ώστε να ομογενοποιηθούν τα διαλύματα. Ακολούθησε η δεύτερη δεκαδική αραιώση, με την αναρρόφηση 1 mL με μηχανική πιπέτα από το δείγμα και εναπόθεση του σε σωληνάκι που περιείχε 9 mL αποστειρωμένο Ringer. Το σωληνάκι με την δεύτερη αραιώση αναδεύτηκε σε vortex για μικρό χρονικό διάστημα και συνεχίστηκε με τον ίδιο τρόπο η επόμενη αραιώση. Όλες οι αραιώσεις έγιναν υπό ασηπτικές συνθήκες. Κάθε δείγμα αραιώθηκε διαδοχικά όσες φορές είχε υπολογιστεί από πριν κατά προσέγγιση, για να γίνει σωστή καταμέτρηση των μικροοργανισμών που περιείχε. Από τα δύο τελευταία σωληνάκια ξεχωριστά λήφθηκε ποσότητα είτε 1 mL για την εφαρμογή της τεχνική της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα, είτε 100 μL για την εφαρμογή της τεχνικής της επιφανειακής επίστρωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα. Η κάθε τεχνική εφαρμόζεται ανάλογα με τις οδηγίες χρήσης που αναφέρονται σε κάθε θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε. Κατά την ενσωμάτωση σε θρεπτικό υπόστρωμα, το 1 mL που έχει ληφθεί από την κατάλληλη διαδοχική αραιώση του δείγματος απορρίπτεται σε κενό τρυβλίο. Έπειτα περιχύνεται το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (το οποίο έχει μία συγκεκριμένη θερμοκρασία που αναφέρουν οι οδηγίες) και το τρυβλίο αναδεύεται μέχρι να καλυφθεί πλήρως όλη η επιφάνεια του. Το τρυβλίο αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί πλήρως και ανάλογα το θρεπτικό μέσο μπορεί να προστεθεί μία δεύτερη στρώση θρεπτικού υλικού. Κατά την επιφανειακή επίστρωση, τα 100 μL που έχουν αναρροφηθεί, εναποτίθενται σε τρυβλίο που περιέχει ήδη το θρεπτικό υπόστρωμα σε στερεή μορφή. Μετά με την χρήση μεταλλικού μικροβιολογικού τριγώνου, το οποίο έχει αποστειρωθεί υπό την φλόγα του λύχνου Bunsen, το υγρό διασπάρθηκε σε όλο το τρυβλίο με την ταυτόχρονη περιστροφή και του τρυβλίου αλλά και του τριγώνου. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστήριο με την ανάλογη θερμοκρασία και το ανάλογο χρονικό διάστημα που ανέφεραν οι οδηγίες του κάθε υποστρώματος. Στο συγκεκριμένο πείραμα έγιναν μικροβιολογικές αναλύσεις για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ), τα *Enterobacteriaceae* και το *E. coli* όσον αφορά τα - δείγματα (αυτά που δεν είχαν εμβολιαστεί με παθογόνο *E. coli*) και για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ) και για τον παθογόνο *E. coli* όσον αφορά τα + δείγματα. Για τον έλεγχο της ΟΜΧ χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA και τα τρυβλία επώαστηκαν για τρεις ημέρες στους 30°C. Οι αποικίες

που καταμετρήθηκαν στο TSA είχαν χρώματα από αχνό κίτρινο μέχρι έντονο πορτοκαλί και διαφορετικά μεγέθη. Τα *Enterobacteriaceae* μελετήθηκαν σε επιλεκτικό υπόστρωμα VRBGA με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε δύο στρώσεις και έγινε επώαση στους 37°C για μία ημέρα. Η χαρακτηριστική αποικία για τα *Enterobacteriaceae* στο συγκεκριμένο υπόστρωμα έχει μωβ/ροζ χρώμα με ή χωρίς στεφάνι. Στα - δείγματα ελέγχθηκε η παρουσία παθογόνου ή μη *E. coli* με το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TBX με την μέθοδο της ενσωμάτωσης. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία με TBX επώαστηκαν στους 44°C για μία ημέρα. Τα χρώματα των αποικιών που εμφανίζονται στο TBX είναι μπλε/πράσινο για όλα τα στελέχη *E. coli* που περιέχουν β-γλυκουρονιδάση και μπεζ για όλα τα στελέχη *E. coli* που δεν περιέχουν β-γλυκουρονιδάση (μέσα σε αυτά συγκαταλέγεται και το O157:H7). Τα στελέχη *E. coli* που δεν εμφανίζουν το ενζύμο γλυκουρονιδάση μπορεί να αναστέλλονται από το TBX και άρα δεν εμφανίζονται στο τρυβλίο μετά την επώαση. Επομένως αυτό το θρεπτικό υπόστρωμα δεν είναι κατάλληλο για να ανιχνεύσει το *E. coli* O157:H7. Στα + δείγματα η OMX ελέγχθηκε με τον ίδιο τρόπο που έγινε στα - δείγματα μόνο που σε αυτή την περίπτωση υπολογιζόταν και το *E. coli* σαν μέρος της OMX. Το *E. coli* O157:H7 μελετήθηκε με το επιλεκτικό υπόστρωμα CT-SMAC με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για μία ημέρα. Οι χαρακτηριστικές αποικίες είναι διαφανείς με ωχροκίτρινη εμφάνιση και στεφάνι. Στο SMAC έγινε η προσθήκη του Cefixime Tellurite (CT) διότι αυξάνει την επιλεκτικότητα του ως προς το *E. coli* O157:H7 και καταστέλλει την υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα.

#### 2.11.2 Δειγματοληψία κατεψυγμένου κιμά

Η δειγματοληψία του κατεψυγμένου κιμά έλαβε χώρα την έβδομη μέρα της ψύξης του κιμά. Στόχος ήταν να μελετηθεί η επίδραση της κατάψυξης στην μικροβιακή χλωρίδα του κιμά αλλά και στο *E. coli* (σε όσα δείγματα είχαν εμβολιαστεί) στις διαφορετικές περιπτώσεις που εφαρμόστηκαν. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στον νωπό κιμά, με την διαφορά ότι οι σακούλες με τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε stomacher για τουλάχιστον 120 δευτερόλεπτα. Ο χρόνος παραμονής στο stomacher αυξήθηκε διότι χρειαζόταν παραπάνω χρόνος για να ομογενοποιηθεί το δείγμα λόγω της κατεψυγμένης φύσης του κιμά.

#### 2.11.3 Δειγματοληψία ψημένου κιμά

Η δειγματοληψία των ψημένων δειγμάτων κιμά γινόταν την έβδομη μέρα της κατάψυξης των δειγμάτων. Κάθε δείγμα που είχε ψηθεί, μεταφερόταν σε προζυγισμένη παγωμένη σακούλα με Ringer και αφηνόταν να κρυώσει στο κουτί με τον πάγο για τουλάχιστον 5-10 λεπτά. Έπειτα η κάθε σακούλα ζυγιζόταν, ώστε να υπολογιστεί το καθαρό βάρος του μπιφτεκιού μετά το ψήσιμο αλλά και η αραίωση που έχει γίνει σε αυτό λόγω του Ringer. Ακολούθησε η δειγματοληψία όπως περιγράφηκε στο δειγματοληψία του νωπού κιμά.

#### 2.12 Μέτρηση του pH των δειγμάτων

Σε όλα τα δείγματα νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά μετρήθηκε το pH με πεχάμετρο μετά τη δειγματοληψία τους. Η βαθμονόμηση του πεχάμετρου έγινε με

πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα με pH=4,0 και pH=7,0. Σε κάθε σακούλα δειγματοληψίας τοποθετήθηκε το ηλεκτρόδιο υάλου και το ηλεκτρόδιο μέτρησης θερμοκρασίας. Η καταγραφή του pH έγινε εφόσον η αναγραφόμενη τιμή στο πεχάμετρο παρέμενε σταθερή μετά από 30 δευτερόλεπτα. Το ηλεκτρόδιο υάλου και το ηλεκτρόδιο μέτρησης θερμοκρασίας καθαρίστηκαν με απιονισμένο νερό για τα - δείγματα (μη εμβολιασμένα) και με αιθανόλη και απιονισμένο νερό για τα + δείγματα (εμβολιασμένα) πριν και μετά από την μέτρηση pH.

### 2.13 Χρήση Food Scan στα δείγματα νωπού κιμά

Το Food Scan χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της χημικής σύστασης του κιμά. Αναλύθηκαν οι 4 περιπτώσεις των - δειγμάτων του νωπού κιμά ως προς την ποσοστιαία σύσταση τους σε πρωτεΐνη, λίπος, κολλαγόνο και υγρασία. Το Food Scan συνδέεται μέσω υπολογιστή με το αντίστοιχο πρόγραμμα, και επιλέγεται να κάνει ανάλυση σε κρέας. Βαθμονομείται από μόνο του, χάρις την πρόσβαση του σε μία βάση δεδομένων που υπάρχουν χιλιάδες φάσματα κρέατος. Η τεχνολογία του Food Scan βασίζεται στην μετάδοση στο εγγύς υπέρυθρο όπου το φως μεταδίδεται διαμέσου του δείγματος. Για κάθε περίπτωση 200 g νωπού κιμά τοποθετήθηκαν στο ειδικό γυάλινο πιατάκι και απλώθηκαν καλά σε όλη την επιφάνεια του. Το πιατάκι τοποθετήθηκε στον ειδικό θάλαμο και πατώντας το κουμπί Scan, ξεκινούσε αμέσως η ανάλυση του δείγματος. Τα αποτελέσματα εμφανιζόταν υπό μορφή ποσοστού.

### 2.14 Ανάλυση δειγμάτων νωπού κιμά με VideometerLab

Το VideometerLab διαθέτει μία πολυφασματική κάμερα για την εργαστηριακή ανάλυση και μέσω του αντίστοιχου software γίνεται η λήψη των φωτογραφιών. Επίσης η βαθμονόμηση του, γίνεται μέσω του λογισμικού με την χρήση τριών προτύπων δίσκων (ένα λευκό, ένα μαύρο και ένα ασπρόμαυρο πουά). Πριν την ανάλυση των δειγμάτων το VideometerLab ενεργοποιήθηκε, παρέμεινε σε αναμονή για 30 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί η κάμερα του και βαθμονομήθηκε. Τα - δείγματα των 4 περιπτώσεων του νωπού κιμά που αναλύθηκαν στο Food Scan, χωρίστηκαν σε δύο δείγματα των 100 g το καθένα. Οπότε σε κάθε περίπτωση που μελετήθηκε αναλογούσαν δύο δείγματα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο και απλώθηκαν ομοιόμορφα με τα χέρια. Το κάθε τρυβλίο εναποτέθηκε στην ειδική σχισμή κάτω από την κάμερα και λήφθηκε φωτογραφία πατώντας την αντίστοιχη εντολή στο λογισμικό. Κάθε φωτογραφία επεξεργάστηκε μέσω του προγράμματος, καθώς έπρεπε να μαρκαριστούν οι περιοχές ανάλυσης του κρέατος και να αφαιρεθούν οι υπόλοιπες περιοχές (το τρυβλίο και το φόντο). Με βάση τις επιλεγμένες περιοχές στην φωτογραφία, το λογισμικό εμφάνισε τα αποτελέσματα για τις μέσες τιμές αντανάκλασης με την τυπική τους απόκλιση σε καθένα από τα 19 μήκη κύματος που τραβήχτηκε η φωτογραφία.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Παρασκευές συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β-CARV)

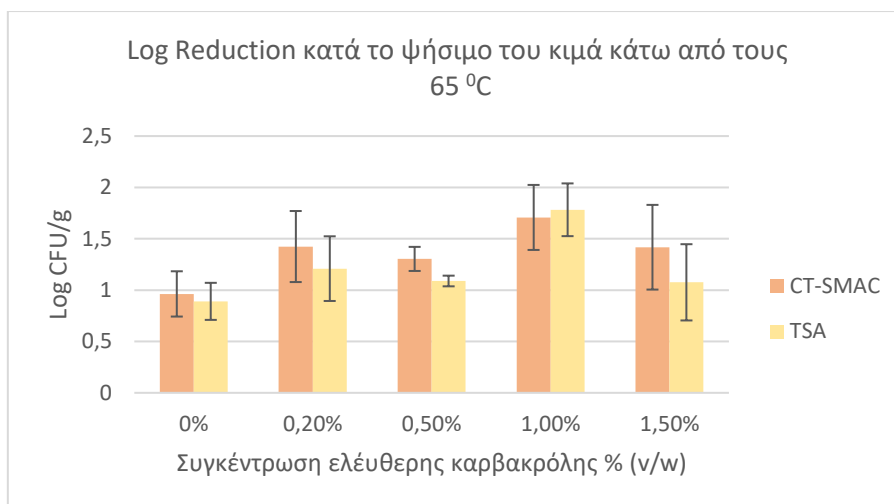
Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη έγιναν 7 διαφορετικές παρασκευές του συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται το τελικό βάρος (g), τον όγκο ενθυλακωμένης καρβακρόλης (mL), ποσοστό ενθυλάκωσης σε β-CD (%) καθώς και τον μέσο όρο αυτών που αφορούν αυτές τις παρασκευές. Παρατηρήθηκε ότι το μέσο ποσοστό ενθυλάκωσης της καρβακρόλης στην β-κυκλοδεξτρίνη είναι 38,47%.

**Πίνακας 2:** Περιέχει το τελικό βάρος (g), τον όγκο ενθυλακωμένης καρβακρόλης (mL), ποσοστό ενθυλάκωσης σε β-CD (%) καθώς και τον μέσο όρο αυτών που αφορούν τις 7 παρασκευές συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης που πραγματοποιήθηκαν.

Παρασκευή	Τελικός βάρος (g)	Όγκος ενθυλακωμένης καρβακρόλης (mL)	Ποσοστό ενθυλάκωσης σε β-CD (%)
1	20,01	6,08	38,01
2	20,82	7,17	44,83
3	19,86	6,34	39,65
4	18,93	6,00	37,53
5	17,37	5,06	31,62
6	17,38	5,36	33,50
7	20,75	7,09	44,31
<b>Μ.Ο.</b>	<b>19,30</b>	<b>6,16</b>	<b>38,49</b>

#### 3.2 Προπειραματικά αποτελέσματα για την επιλογή της συγκέντρωσης της καρβακρόλης

Στο **Σχήμα 2** παρουσιάζονται τα log reduction (Log CFU/g κιμά) που επιφέρει το ψήσιμο του κιμά κάτω από τους 65°C σε συνδυασμό με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις ελεύθερης καρβακρόλης % (v/w) που μελετήθηκαν. Το πείραμα είχε σκοπό να αναδείξει την συγκέντρωση καρβακρόλης που θα επέφερε το μεγαλύτερο log reduction από τον νωπό κιμά κατά το ψήσιμο. Η καλύτερη συγκέντρωση με βάση το διάγραμμα αποδείχθηκε το 1,00% ελεύθερης καρβακρόλης καθώς επιφέρει το μεγαλύτερο log reduction. Επομένως επιλέχθηκε αυτή η συγκέντρωση να μελετηθεί περαιτέρω.

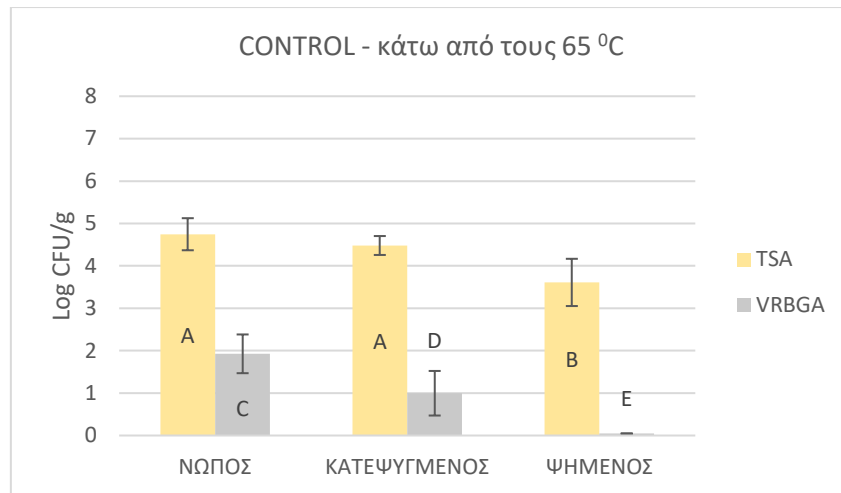


**Σχήμα 2:** Συγκριτικό διάγραμμα των log reduction (Log CFU/g κιμά) που επιφέρει το ψήσιμο του κιμά κάτω από τους 65°C σε συνδυασμό με διάφορες συγκεντρώσεις ελεύθερης καρβακρόλης % (v/w).

### 3.3 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων στους κάτω από 65 °C

#### 3.3.1 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control- στους κάτω από 65 °C

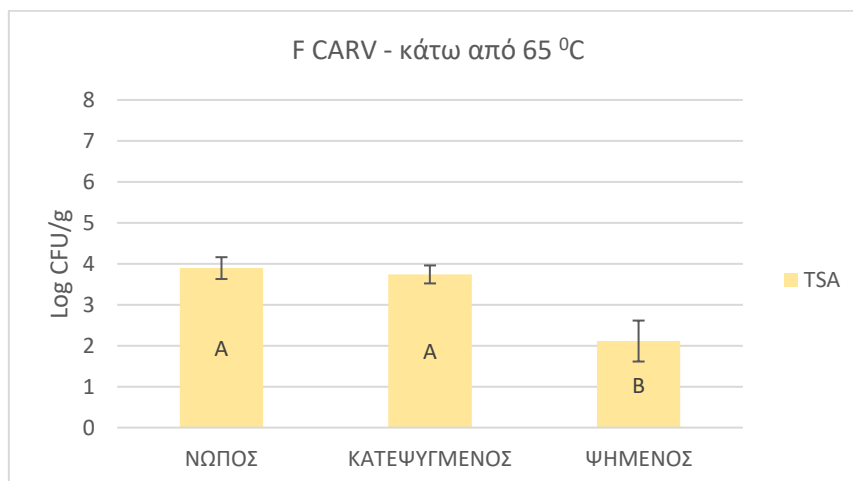
Στο **Σχήμα 3** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά (Control -) εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA παρατηρείται ότι δεν υπάρχει μεταβολή του πληθυσμού στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p > 0,05$ ). Άρα επιβεβαιώνεται ότι η κατάψυξη λειτουργεί ανασταλτικά απέναντι στην μικροβιακή χλωρίδα του κιμά. Αντίθετα ο πληθυσμός των *Enterobacteriaceae* στο υπόστρωμα VRBGA φαίνεται να μειώνεται σημαντικά στην κατάψυξη ( $p < 0,05$ ). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε λάθος υπολογισμό του αρχικού ή του κατεψυγμένου πληθυσμού είτε η κατάψυξη να επιφέρει εκτός από αναστολή και θανάτωση λόγω της θερμικής καταπόνησης των κυττάρων. Το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C επιφέρει σημαντική μείωση και της ΟΜΧ αλλά και του πληθυσμού των *Enterobacteriaceae*. Στα *Enterobacteriaceae* δεν ανιχνεύτηκαν κύτταρα κατά την καταμέτρηση των τρυβλίων μετά το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C. Οπότε η αντίστοιχη μπάρα του VRBGA συμβολίζει το όριο ανίχνευσης της μικροβιακής ανάλυσης κατά το ψήσιμο. Πάνω από τους 0,04 Log CFU/g υπάρχει απουσία των *Enterobacteriaceae*. Το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της ΟΜΧ κατά περίπου 1 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ). Στο TBX δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου αποικίες *E. coli* στον νωπό κιμά οπότε δεν απεικονίζονται στο διάγραμμα.



**Σχήμα 3:** Μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά (CONTROL -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA και VRBGA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.3.2 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV- στους κάτω από 65 °C

Στο **Σχήμα 4** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV -), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού της OMX στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της OMX κατά περίπου 2 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ).

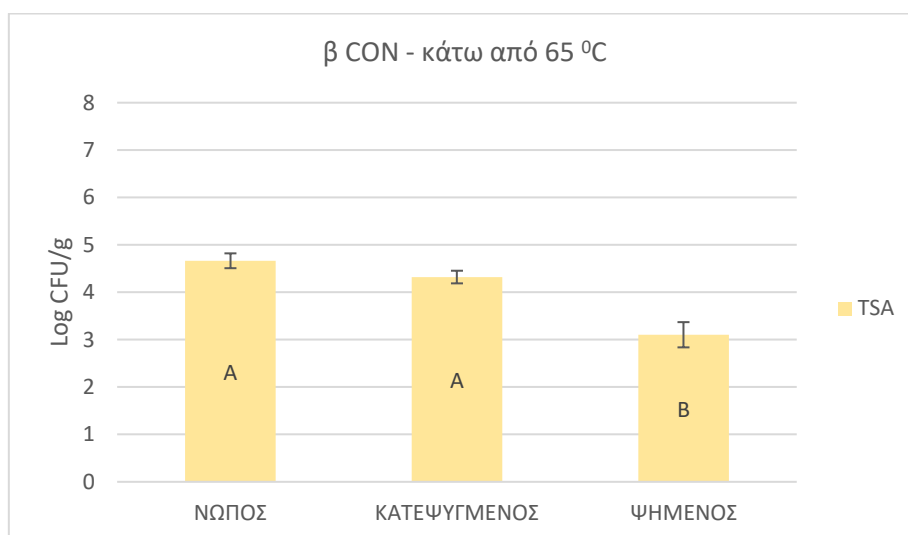


**Σχήμα 4:** Μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς

(νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.3.3 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON - στους κάτω από 65 °C

Στο **Σχήμα 5** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης (β CON -), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού της OMX στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p>0,05$ ). Αντίθετα το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της OMX κατά περίπου 1,3 Log CFU/g κιμά ( $p<0,05$ ).

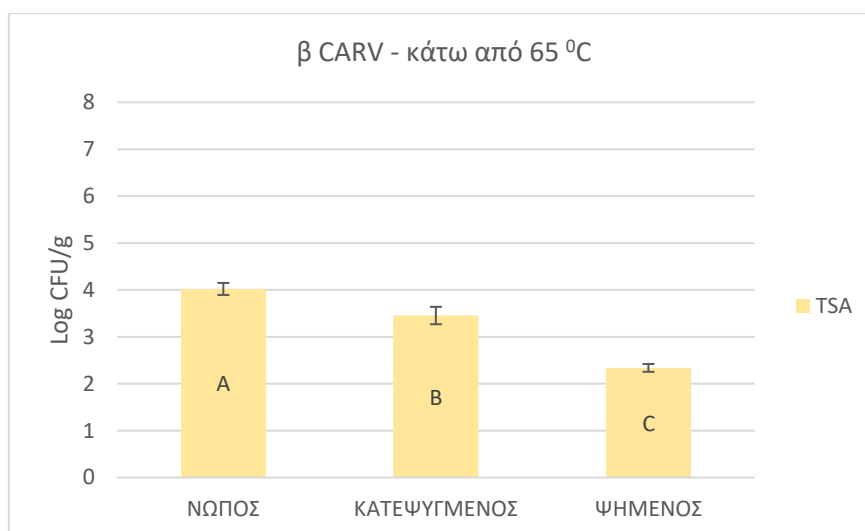


**Σχήμα 5:** Μεταβολή του της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης (β CON -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.



### 3.3.4 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CARV - στους κάτω από 65 °C

Στο **Σχήμα 6** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β CARV -), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA παρατηρείται σημαντική μείωση του πληθυσμού της OMX από τον νωπό στον κατεψυγμένο κιμά ( $p < 0,05$ ). Αυτό μπορεί να οφείλεται σε λάθος μικροβιακή ανάλυση των δειγμάτων, είτε στον τραυματισμό των κυττάρων από την συνδυαστική δράση της ενθυλακωμένης καρβακρόλης και της κατάψυξη. Στην ανάλογη περίπτωση που αντιστοιχεί στους πάνω 65 °C (**Σχήμα 20**) δεν εμφανίζεται σημαντική διαφορά ανάμεσα στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά. Άρα ίσως αποτελεί ένα τυχαίο γεγονός με βάση τους παραπάνω λόγους. Το ψήσιμο όμως επιφέρει σημαντική μείωση της OMX κατά περίπου 1 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ).

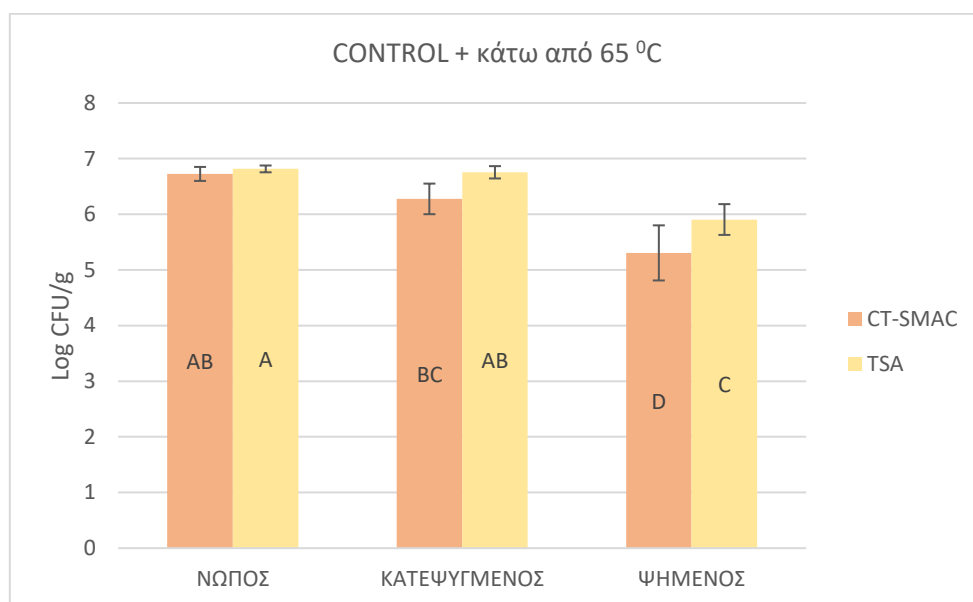


**Σχήμα 6:** Μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β CARV -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.3.5 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control + στους κάτω από 65 °C

Στο **Σχήμα 7** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενούς χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά (CONTROL +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Στα θρεπτικά υποστρώματα CT-SMAC και TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά αντίστοιχα ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα στο

ψημένο κιμά παρατηρείται σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 και στο CT-SMAC και TSA περίπου 1 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ). Επίσης υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA του ψημένου κιμά. Το SMAC είναι ένα επιλεκτικό υπόστρωμα για το *E. coli* O157:H7 και ειδικά με την προσθήκη του Cefixime Tellurite γίνεται ακόμα πιο επιλεκτικό. Όμως λόγω της μεγάλης επιλεκτικότητας του μπορεί να εμποδίζει τα τραυματισμένα κύτταρα του *E. coli* O157:H7 από την θερμική καταπόνηση να ανακάμψουν. Το TSA αποτελεί ένα γενικό θρεπτικό υπόστρωμα. Επομένως λόγω της μη επιλεκτικότητας του μπορεί να επιτρέπει στα τραυματισμένα κύτταρα να αναπτυχθούν. Η παρατηρούμενη σημαντική διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA μπορεί λοιπόν να υποδηλώνει τον τραυματισμό των κυττάρων *E. coli* O157:H7 από την θερμική επεξεργασία κάτω από 65 °C. Στο TSA όμως καταμετράται και η ενδογενής χλωρίδα του κιμά. Άρα η διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA μπορεί να οφείλεται στο άθροισμα των πληθυσμών του *E. coli* O157:H7 με την ενδογενή χλωρίδα.

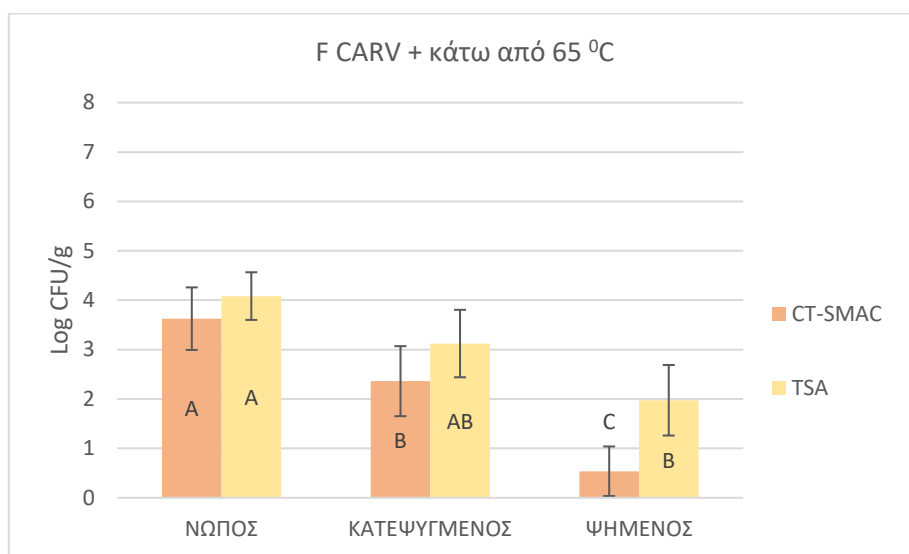


**Σχήμα 7:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά (CONTROL +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.3.6 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV + στους κάτω από 65 °C

Στο **Σχήμα 8** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Παρατηρείται σημαντική μεταβολή του του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 από τον νωπό στον κατεψυγμένο κιμά για το υπόστρωμα CT-SMAC. Η ελεύθερη καρβακρόλη μπορεί να επιφέρει τραυματισμό στα κύτταρα του *E. coli*

O157:H7 μέχρι να καταψυχθεί ο κιμάς πλήρως, αλλά και κατά την παραμονή του κιμά στην κατάψυξη για 7 ημέρες. Επίσης το ψήσιμο σε συνδυασμό με την ελεύθερη καρβακρόλη φαίνεται να επιφέρει σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7, όπως παρουσιάζεται από την σύγκριση του CT-SMAC για τον κατεψυγμένο και ψημένο κιμά, περίπου 2 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ). Όπως και στο CONTROL + δείγμα υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA στον ψημένο κιμά, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε στον τραυματισμό των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 από το ψήσιμο σε συνδυασμό με την παρουσία ελεύθερης καρβακρόλης, είτε στο άθροισμα των πληθυσμών του *E. coli* O157:H7 με την ενδογενή χλωρίδα.

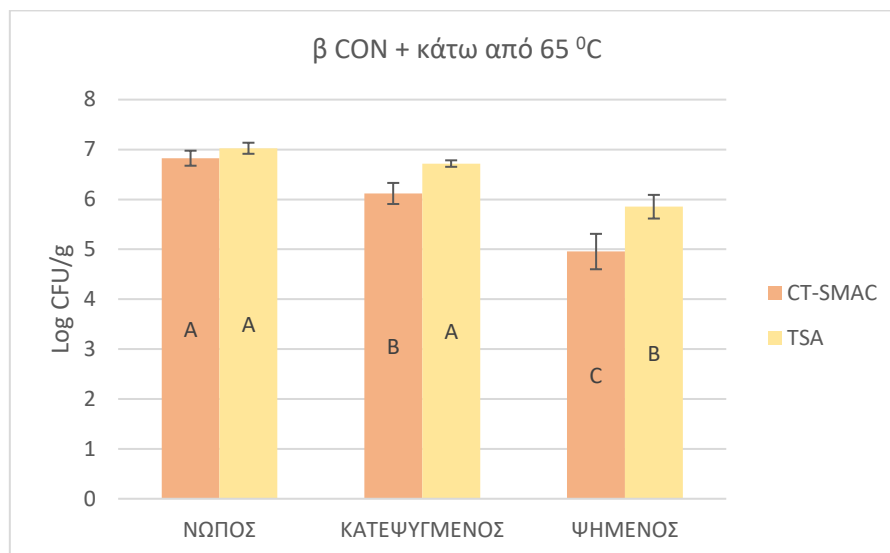


**Σχήμα 8:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.3.7 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON + στους κάτω από 65 °C

Στο **Σχήμα 9** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης (β CON +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά στο CT-SMAC. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι ίσως η β κυκλοδεξτρίνη να έχει και ανασταλτική δράση από μόνη της, ή να δρα συνεργιστικά με την κατάψυξη. Επίσης το ψήσιμο φαίνεται να επιφέρει σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 και στο CT-SMAC και στο TSA σε σχέση με τον κατεψυγμένο κιμά αντίστοιχα ( $p < 0,05$ ). Όπως και στα δείγματα CONTROL + και F CARV + υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA στον ψημένο κιμά, η οποία

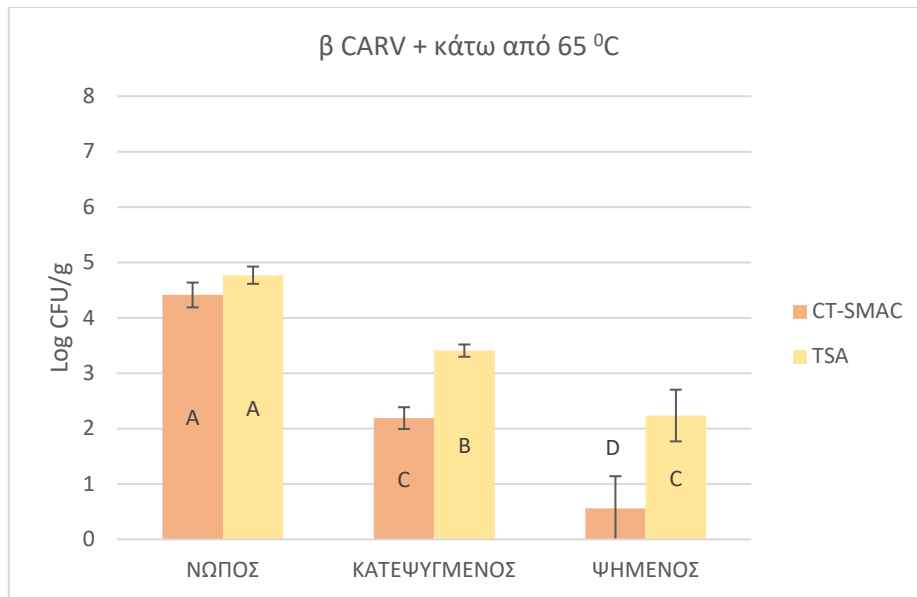
μπορεί να οφείλεται είτε στον τραυματισμό των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 από το ψήσιμο σε συνδυασμό με την παρουσία β-κυκλοδεξτρίνης, είτε στο άθροισμα των πληθυσμών του *E. coli* O157:H7 με την ενδογενή χλωρίδα.



**Σχήμα 9:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης (β CON +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.3.8 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CARV + στους κάτω από 65 °C

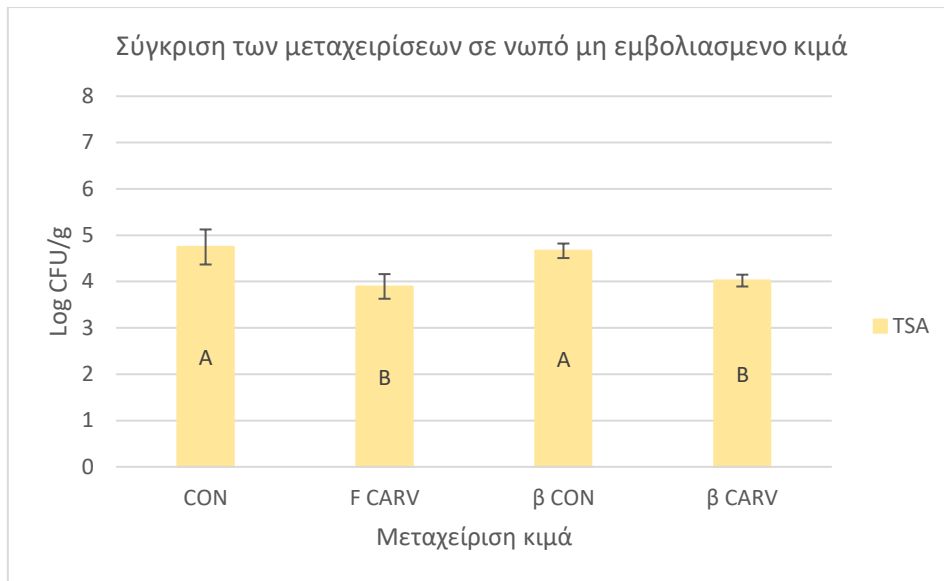
Στο **Σχήμα 10** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β CARV +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα κάτω των 65 °C. Παρατηρείται σημαντική μεταβολή του του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 από τον νωπό στον κατεψυγμένο κιμά και για το υπόστρωμα CT-SMAC και για το υπόστρωμα TSA ( $p < 0,05$ ). Η αποδέσμευση της καρβακρόλης στο κιμά μπορεί να επιφέρει τραυματισμό στα κύτταρα του *E. coli* O157:H7 μέχρι να καταψυχθεί ο κιμάς πλήρως, αλλά και κατά την παραμονή του κιμά στην κατάψυξη για 7 ημέρες. Επίσης το ψήσιμο φαίνεται να επιφέρει σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 και στο CT-SMAC και στο TSA σε σχέση με τον κατεψυγμένο κιμά αντίστοιχα ( $p < 0,05$ ). Όπως και στα προηγούμενα εμβολιασμένα δείγματα υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA στον ψημένο κιμά, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε στον τραυματισμό των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 από το ψήσιμο σε συνδυασμό με την παρουσία της καρβακρόλης που απελευθερώνεται γρήγορα από το σύμπλοκο λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας, είτε στο άθροισμα των πληθυσμών του *E. coli* O157:H7 με την ενδογενή χλωρίδα.



**Σχήμα 10:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενούς χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β CARV +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

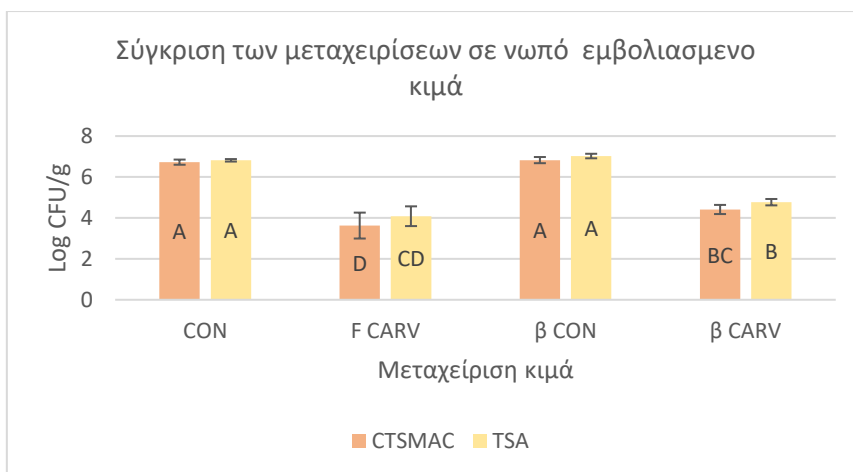
### 3.3.9 Σύγκριση νωπών εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για κάτω από τους 65 °C

Στο **Σχήμα 11** παρουσιάζεται η σύγκριση της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Στα δείγματα F CARV και β CARV μειώνεται σημαντικά η μικροβιακή χλωρίδα του κιμά σε σχέση και με το CONTROL δείγμα αλλά και με το β CON ( $p < 0,05$ ). Η καρβακρόλη φαίνεται να παρουσιάζει παρόμοια αντιμικροβιακή δράση είτε είναι σε ελεύθερη μορφή είτε ενθυλακωμένη σε β-κυκλοδεξτρίνη ( $p > 0,05$ ). Η OMX του κιμά πέφτει περίπου κατά 1 log CFU/g με την προσθήκη καρβακρόλης (ελεύθερης και μη). Επομένως ακόμα και από την προετοιμασία των δειγμάτων κιμά η καρβακρόλη έχει σημαντική δράση απέναντι στην OMX. Η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης σε νωπό κιμά δεν επηρεάζει σημαντικά την ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σύγκριση με το δείγμα CONTROL ( $p > 0,05$ ).



**Σχήμα 11:** Σύγκριση της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

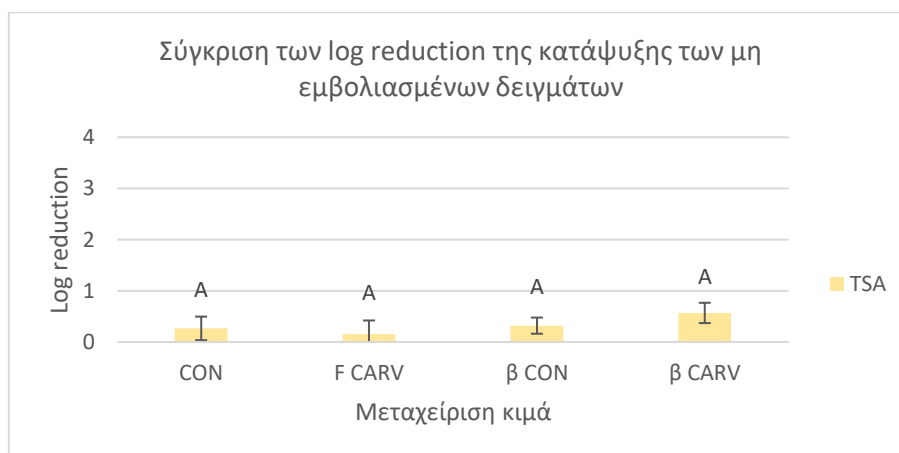
Στο **Σχήμα 12** παρουσιάζεται η σύγκριση του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Το TSA θεωρείται ότι εκφράζει τον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 μαζί με την ενδογενή χλωρίδα. Όμως επειδή ο κιμάς έχει εμβολιαστεί με 7 Log CFU/g *E. coli* O157:H7 και η ενδογενής του χλωρίδα είναι γύρω στους 5 Log CFU/g, είναι πολύ πιθανό το TSA να εκφράζει κυρίως το πληθυσμό του *E. coli*. Όπως και στα μη εμβολιασμένα, στα δείγματα F CARV και β CARV το *E. coli* O157:H7 και η ενδογενής χλωρίδα μειώνονται σημαντικά σε σχέση και με το CONTROL δείγμα αλλά και με το β CON ( $p < 0,05$ ). Στην συγκεκριμένη περίπτωση όμως η ελεύθερη καρβακρόλη εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση του το *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας από την ενθυλακωμένη ( $p < 0,05$ ). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η ελεύθερη καρβακρόλη μπορεί να είναι άμεσα διαθέσιμη στη μήτρα του κιμά σε σχέση με την ενθυλακωμένη. Στα δείγματα F CARV το *E. coli* O157:H7 και η μικροβιακή χλωρίδα μειώνονται κατά περίπου 3 Log CFU/g, ενώ στα δείγματα β CARV κατά περίπου 2 Log CFU/g. Η καρβακρόλη (ενθυλακωμένη και μη) επιφέρει σημαντικές μειώσεις στο *E. coli* O157:H7 κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. Η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης σε νωπό κιμά δεν επηρεάζει σημαντικά το *E. coli* O157:H7 και την ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σύγκριση με το δείγμα CONTROL ( $p > 0,05$ ).



**Σχήμα 12:** Σύγκριση του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.3.10 Σύγκριση κατεψυγμένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για κάτω από τους 65 °C

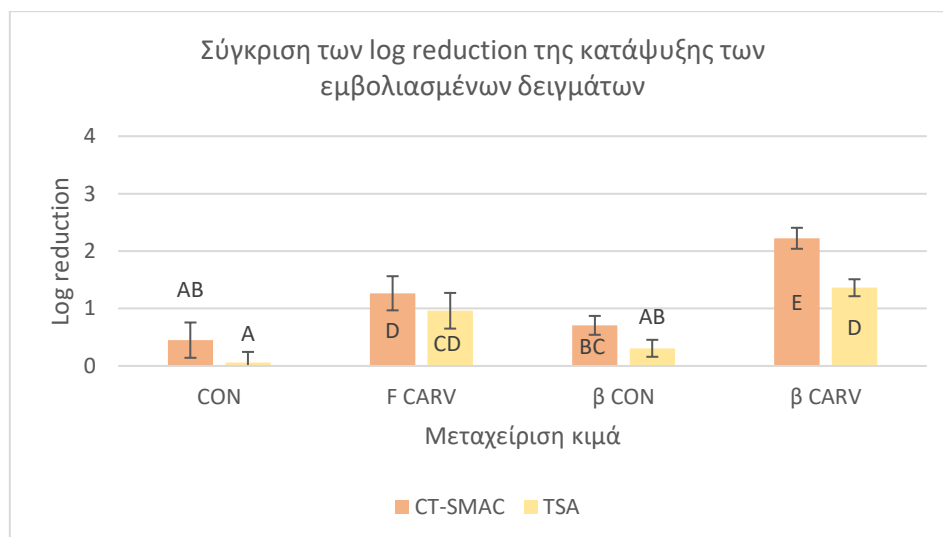
Στο **Σχήμα 13** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα Log reduction υπολογίστηκαν μέσω της αφαίρεσης του πληθυσμού που μετρήθηκε μετά τη κατάψυξη από τον πληθυσμό που μετρήθηκε στο νωπό κιμά για κάθε μεταχείριση. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση της κατάψυξης στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Παρατηρείται ότι όλες οι μεταχειρίσεις του κιμά έχουν παρόμοιο Log reduction της OMX, περίπου 0,5 Log CFU/g. Η μείωση της OMX πιθανόν να οφείλεται μόνο στην ανασταλτική δράση της κατάψυξης.



**Σχήμα 13:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο κάτω από

τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

Στο **Σχήμα 14** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στον πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση της κατάψυξης στο *E. coli* O157:H7 και στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Στα δείγματα F CARV και β CARV το *E. coli* O157:H7 και η ενδογενής χλωρίδα μειώνονται σημαντικά σε σχέση και με το CONTROL δείγμα αλλά και με το β CON ( $p < 0,05$ ). Η καρβακρόλη (ελεύθερη και μη) μπορεί να δρα συνεργιστικά με την κατάψυξη και να επιφέρει μεγαλύτερες μειώσεις στο *E. coli* O157:H7. Μια άλλη θεωρία είναι ότι επειδή το κέντρο του μπιφτεκιού χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να καταψυχθεί σε σχέση με την εξωτερική του επιφάνεια, η καρβακρόλη συνεχίζει να έχει επίδραση μέχρι να καταψυχθεί πλήρως ο κιμάς. Το δείγμα β CARV όμως φαίνεται να μειώνει περισσότερο το *E. coli* O157:H7 στο CT-SMAC σε σχέση με το δείγμα F CARV. Αυτό ίσως οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα αλλά και στην προστασία από οξειδωτικούς παράγοντες που έχει η καρβακρόλη λόγω της ενθυλάκωσης της στην β-κυκλοδεξτρίνη. Η σημαντική διαφορά που φαίνεται ανάμεσα στο CT-SMAC και TSA για το δείγμα β CARV, πιθανόν να εκφράζει τον τραυματισμό των κυττάρων του *E. coli* O157:H7, τα οποία δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο CT-SMAC λόγω της επιλεκτικότητας του. Η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης δεν επηρεάζει σημαντικά το *E. coli* O157:H7 και την ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σύγκριση με το δείγμα CONTROL ( $p > 0,05$ )

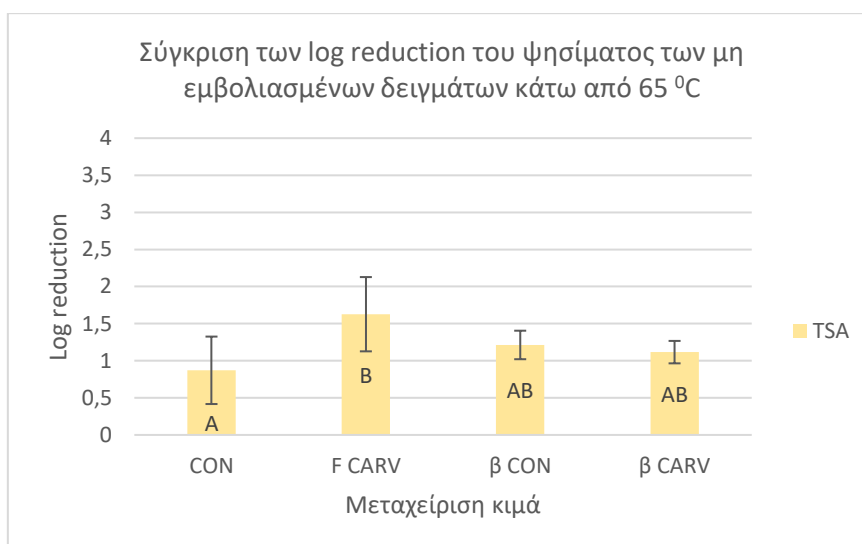


**Σχήμα 14:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στον πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.



### 3.3.11 Σύγκριση ψημένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για κάτω από τους 65 °C

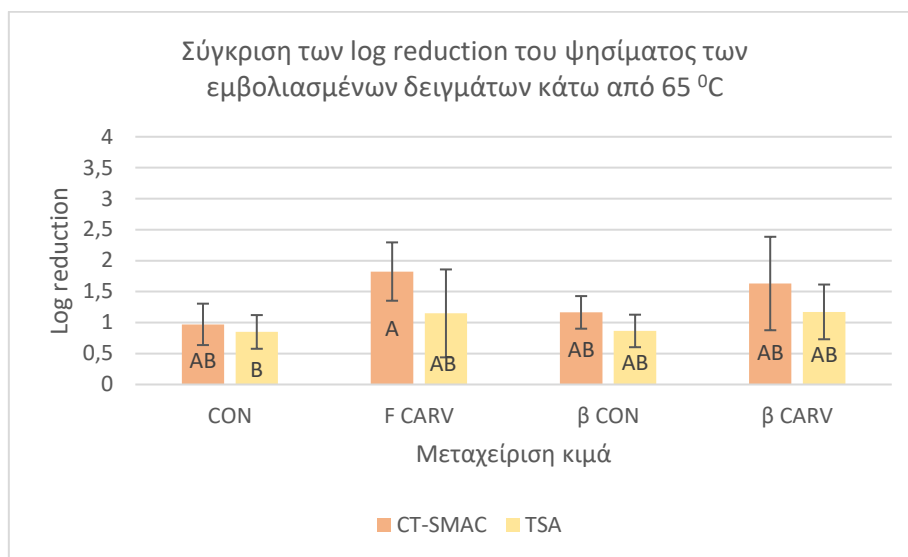
Στο **Σχήμα 15** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα Log reduction υπολογίστηκαν μέσω της αφαίρεσης του πληθυσμού που μετρήθηκε μετά το ψήσιμο από τον πληθυσμό που μετρήθηκε στο κατεψυγμένο κιμά για κάθε μεταχείριση. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση του ψησίματος κάτω από τους 65 °C στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Το δείγμα F CARV έχει σημαντική μείωση της ενδογενούς χλωρίδας του κιμά σε σχέση με το CONTROL δείγμα ( $p < 0,05$ ). Σε σχέση όμως με τα δείγματα β CON και β CARV δεν έχει σημαντική διαφορά στην μείωση της OMX ( $p > 0,05$ ). Τα δείγματα β CON και β CARV δεν εμφανίζουν σημαντική διαφορά με το CONTROL δείγμα ( $p > 0,05$ ). Αρα μόνο το ψήσιμο με ελεύθερη καρβακρόλη επέφερε σημαντικές μειώσεις στην OMX στο CONTROL δείγμα, αλλά δεν διέφερε σημαντικά σε σχέση με το ψήσιμο με β CON ή β CARV.



**Σχήμα 15:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Στο **Σχήμα 16** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση του ψησίματος κάτω από τους 65 °C στο *E. coli* O157:H7 και στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Το ψήσιμο δεν φαίνεται να έχει σημαντική διαφορά σε καμία από τις μεταχειρίσεις ( $p < 0,05$ ). Όλα τα ψησίματα επιφέρουν μείωση 1-1,5 CFU/g. Το μόνο αξιοπερίεργο είναι ότι το ψήσιμο στο δείγμα

F CARV στο CT-SMAC έχει σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 σε σχέση με το ψήσιμο του δείγματος CONTROL στο TSA, αλλά δεν έχει καμία συγκριτική αξία.

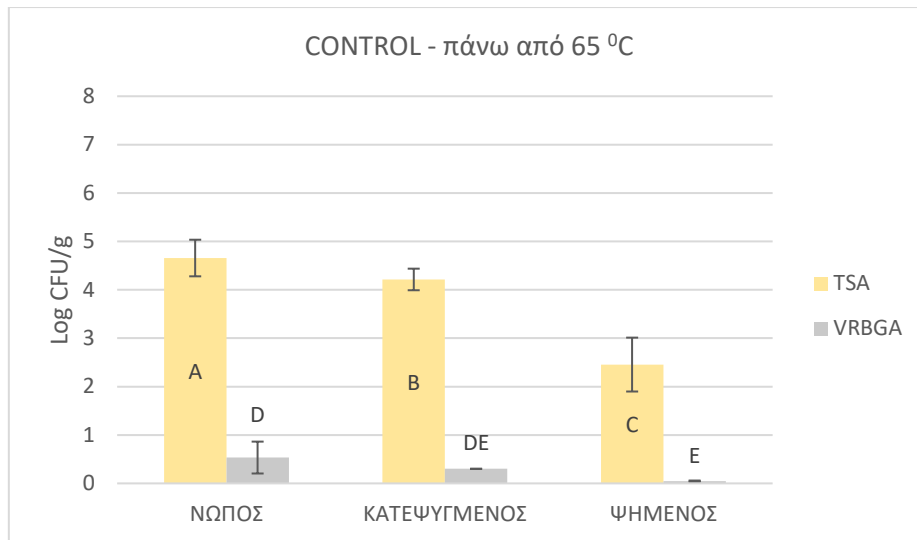


**Σχήμα 16:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C κατάψυξη στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

### 3.4 Θερμική επεξεργασία δειγμάτων στους πάνω από 65 °C

#### 3.4.1 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control- στους πάνω από 65 °C

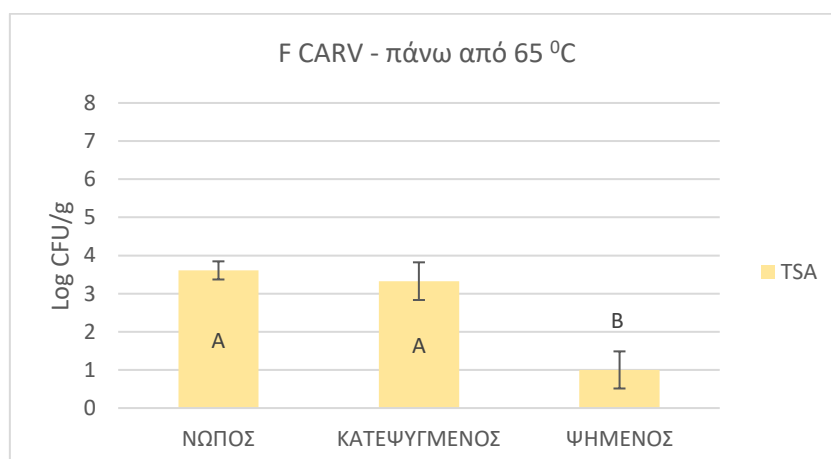
Στο **Σχήμα 17** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά (Control -) εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού από τον νωπό στον κατεψυγμένο κιμά ( $p < 0,05$ ). Η κατάψυξη συνήθως λειτουργεί ανασταλτικά απέναντι στην μικροβιακή χλωρίδα του κιμά οπότε ίσως προκάλεσε τραυματισμό στα κύτταρα της OMX. Το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C επιφέρει σημαντική μείωση και της OMX. Στο VRBGA δεν ανιχνεύτηκαν κύτταρα *Enterobacteriaceae* κατά την καταμέτρηση των τρυβλίων κατά τη κατάψυξη αλλά και μετά το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C. Οπότε η αντίστοιχη μπάρες του VRBGA συμβολίζουν το όριο ανίχνευσης της μικροβιακής ανάλυσης κατά την κατάψυξη και κατά το ψήσιμο. Πάνω από τους 0,30 Log CFU/g και τους 0,05 Log CFU/g υπάρχει απουσία των *Enterobacteriaceae* στην κατάψυξη και το ψήσιμο αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης διαφέρει από την κατάψυξη στο ψήσιμο διότι στο ψήσιμο τα δείγματα αραιώνονταν σε Ringer περίπου 6 φορές και όχι 10 φορές όπως στα κατεψυγμένα δείγματα. Το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της OMX κατά περίπου 2 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ). Στο TBX δεν ανιχνεύτηκαν καθόλου αποικίες *E. coli* στον νωπό κιμά οπότε δεν απεικονίζονται στο διάγραμμα.



**Σχήμα 17:** Μεταβολή του της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά (CONTROL -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA και VRBGA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

#### 3.4.2 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV- στους πάνω από 65 °C

Στο **Σχήμα 18** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV -), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού της OMX στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της OMX κατά περίπου 2,5 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ).

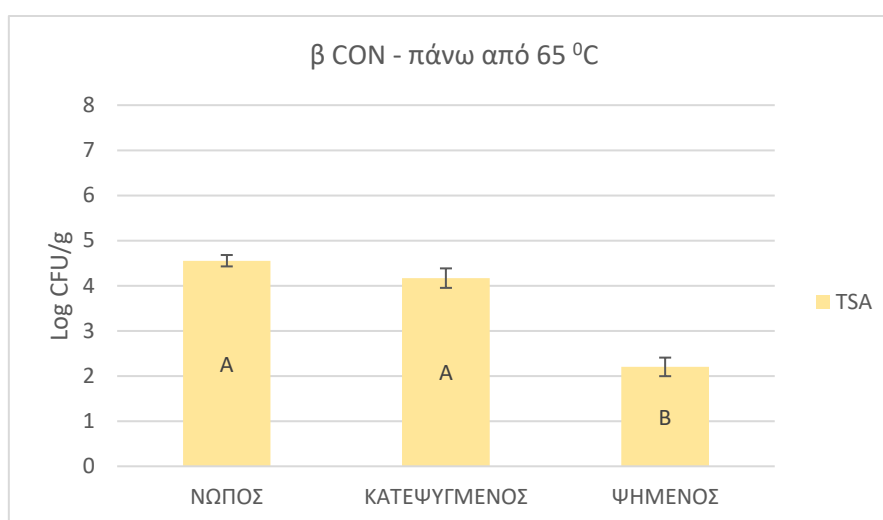


**Σχήμα 18:** Μεταβολή του της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι

μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

#### 3.4.3 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON - στους πάνω από 65 °C

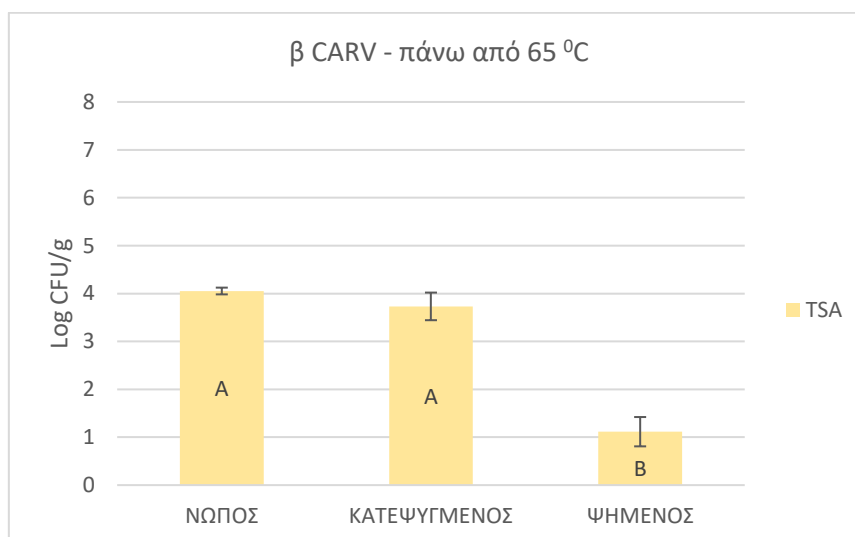
Στο **Σχήμα 19** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης (β CON -), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού της OMX στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της OMX κατά περίπου 2,2 Log CFU/g κιμά ( $p < 0,05$ ).



**Σχήμα 19:** Μεταβολή του της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης (β CON -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

#### 3.4.4 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CARV - στους πάνω από 65 °C

Στο **Σχήμα 20** παρουσιάζεται η μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β CARV -), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Στο θρεπτικό υπόστρωμα TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού της OMX στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p>0,05$ ). Αντίθετα το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της OMX κατά περίπου 3 Log CFU/g κιμά ( $p<0,05$ ).

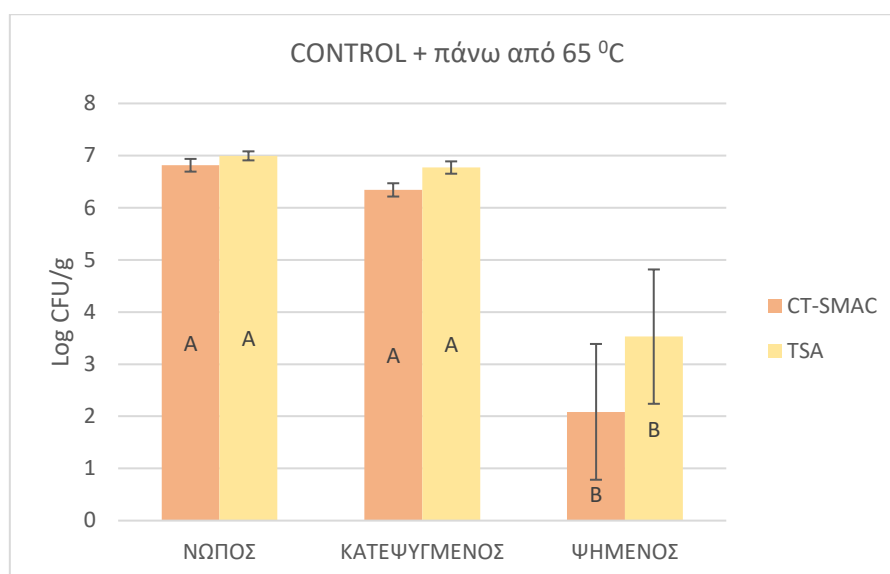


**Σχήμα 20:** Μεταβολή της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β CARV -) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

#### 3.4.5 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων Control + στους πάνω από 65 °C

Στο **Σχήμα 21** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενούς χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά (CONTROL +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Στα θρεπτικά υποστρώματα CT-SMAC και TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά αντίστοιχα ( $p>0,05$ ). Αντίθετα στο ψημένο κιμά παρατηρείται σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 και στο CT-SMAC και TSA περίπου 4 Log CFU/g κιμά και 3 Log CFU/g κιμά αντίστοιχα ( $p<0,05$ ). Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα CT-SMAC και στο TSA του ψημένου κιμά ( $p>0,05$ ). Ίσως η αύξηση της θερμοκρασίας του ψησίματος να προκαλεί μεγαλύτερο στρες στα κύτταρα του *E. coli* O157:H7 και να

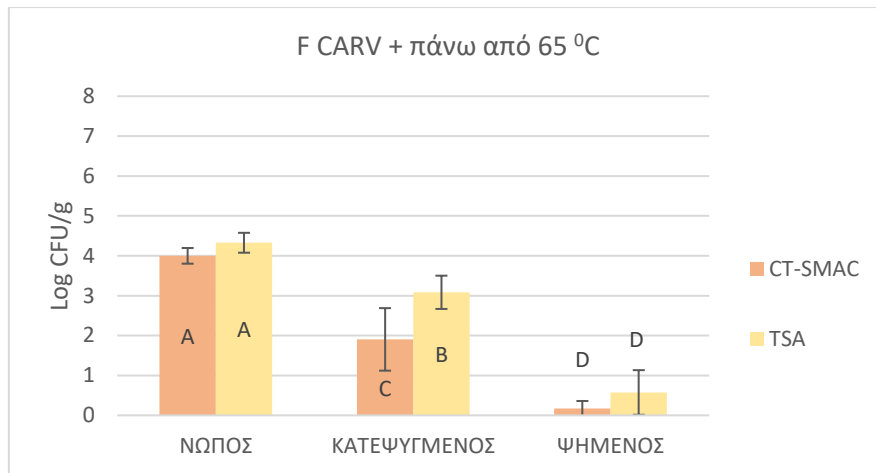
μην μπορούν να ανακάμψουν ούτε στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα του TSA. Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και στην ενδογενή μικροβιακή χλωρίδα του κιμά.



**Σχήμα 21:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά (CONTROL +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

#### 3.4.6 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων F CARV + στους πάνω από 65 °C

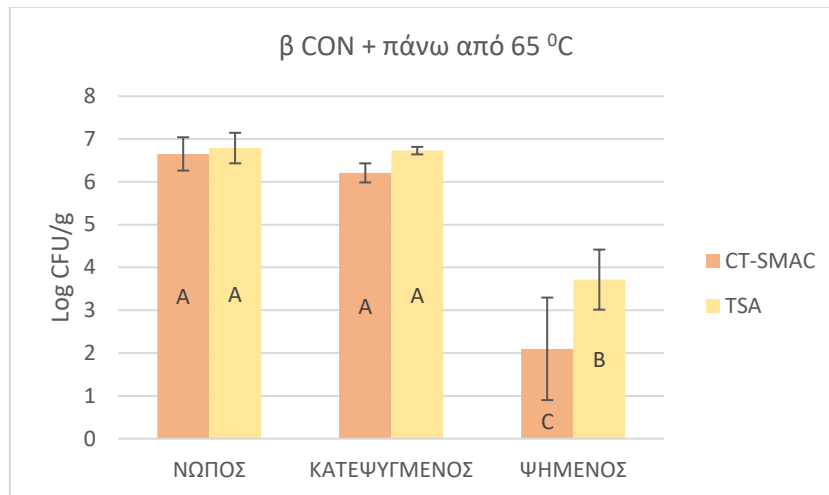
Στο **Σχήμα 22** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Παρατηρείται σημαντική μεταβολή του του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 από τον νωπό στον κατεψυγμένο κιμά και για το υπόστρωμα CT-SMAC και για το υπόστρωμα TSA ( $p < 0,05$ ). Η αποδέσμευση της καρβακρόλης στο κιμά μπορεί να επιφέρει τραυματισμό στα κύτταρα του *E. coli* O157:H7 και στην ενδογενή χλωρίδα μέχρι να καταψυχθεί ο κιμάς πλήρως, αλλά και κατά την παραμονή του κιμά στην κατάψυξη για 7 ημέρες. Επίσης το ψήσιμο φαίνεται να επιφέρει σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 και στο CT-SMAC (περίπου 2 Log CFU/g κιμά) και στο TSA (περίπου 2,5 Log CFU/g κιμά) σε σχέση με τον κατεψυγμένο κιμά αντίστοιχα ( $p < 0,05$ ). Στο CT-SMAC ανιχνεύτηκαν ελάχιστα κύτταρα *E. coli* O157:H7 κατά την καταμέτρηση των τρυβλίων μετά το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C. Το όριο ανίχνευσης της μικροβιακής ανάλυσης κατά το ψήσιμο για το CT-SMAC είναι 0,08 Log CFU/g κιμά και βρέθηκαν 0,17 Log CFU/g κιμά στο ψήσιμο.



**Σχήμα 22:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί ελεύθερη καρβακρόλη (F CARV +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

#### 3.4.7 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων β CON + στους πάνω από 65 °C

Στο **Σχήμα 23** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης (β CON +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Στα θρεπτικά υποστρώματα CT-SMAC και TSA δεν παρατηρείται μεταβολή του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά αντίστοιχα ( $p > 0,05$ ). Αντίθετα στο ψημένο κιμά παρατηρείται σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 και στην ενδογενή χλωρίδα και στο CT-SMAC και στο TSA περίπου 4 Log CFU/g κιμά και 3 Log CFU/g κιμά αντίστοιχα ( $p < 0,05$ ). Στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν φαίνεται να υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα CT-SMAC και στο TSA του ψημένου κιμά ( $p > 0,05$ ). Ίσως η αύξηση της θερμοκρασίας του ψησίματος να προκαλεί μεγαλύτερο στρες στα κύτταρα του *E. coli* O157:H7 και να μην μπορούν να ανακάμψουν ούτε στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα του TSA. Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και στην ενδογενή μικροβιακή χλωρίδα του κιμά. Υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA στο ψημένο κιμά, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε στον τραυματισμό των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 από το ψήσιμο σε συνδυασμό με την παρουσία του μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης, είτε στο άθροισμα των πληθυσμών του *E. coli* O157:H7 με την ενδογενή χλωρίδα.

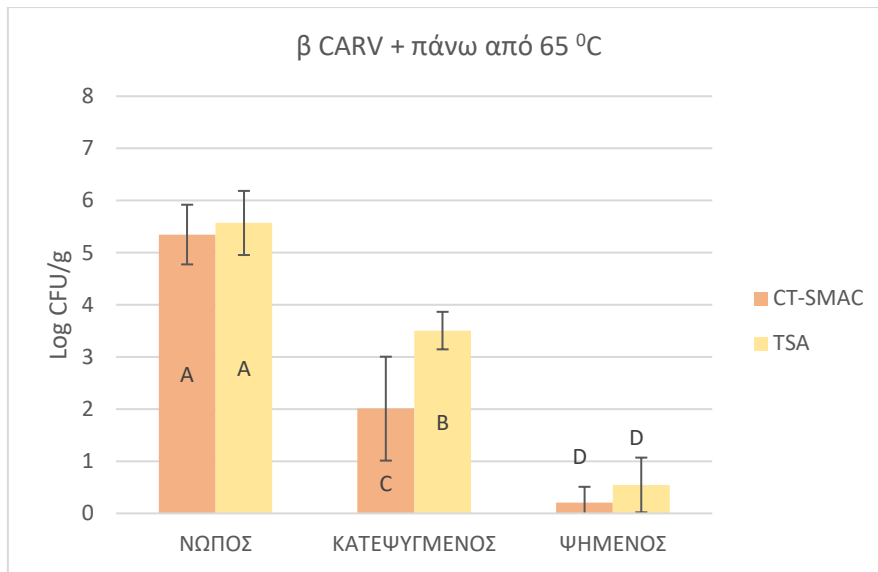


**Σχήμα 23:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί μάρτυρας κυκλοδεξτρίνης ( $\beta$  CON +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

#### 3.4.8 Θερμική επεξεργασία των δειγμάτων $\beta$ CARV + στους πάνω από 65 °C

Στο **Σχήμα 24** παρουσιάζεται η μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο  $\beta$ -κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης ( $\beta$  CARV +), εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά για τα δείγματα άνω των 65 °C. Παρατηρείται σημαντική μεταβολή του του πληθυσμού *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας από τον νωπό στον κατεψυγμένο κιμά και για το υπόστρωμα CT-SMAC και για το υπόστρωμα TSA ( $p < 0,05$ ). Η αποδέσμευση της καρβακρόλης στο κιμά μπορεί να επιφέρει τραυματισμό στα κύτταρα του *E. coli* O157:H7 και στην ενδογενή χλωρίδα μέχρι να καταψυχθεί ο κιμάς πλήρως, αλλά και κατά την παραμονή του κιμά στην κατάψυξη για 7 ημέρες. Επίσης το ψήσιμο φαίνεται να επιφέρει σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας και στο CT-SMAC (περίπου 1,8 Log CFU/g κιμά) και στο TSA (περίπου 3 Log CFU/g κιμά) σε σχέση με τον κατεψυγμένο κιμά αντίστοιχα ( $p < 0,05$ ). Στο CT-SMAC ανιχνεύτηκαν ελάχιστα κύτταρα *E. coli* O157:H7 κατά την καταμέτρηση των τρυβλίων μετά το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C. Το όριο ανίχνευσης της μικροβιακής ανάλυσης κατά το ψήσιμο για το CT-SMAC είναι 0,07 Log CFU/g κιμά και βρέθηκαν 0,20 Log CFU/g κιμά στο ψήσιμο.

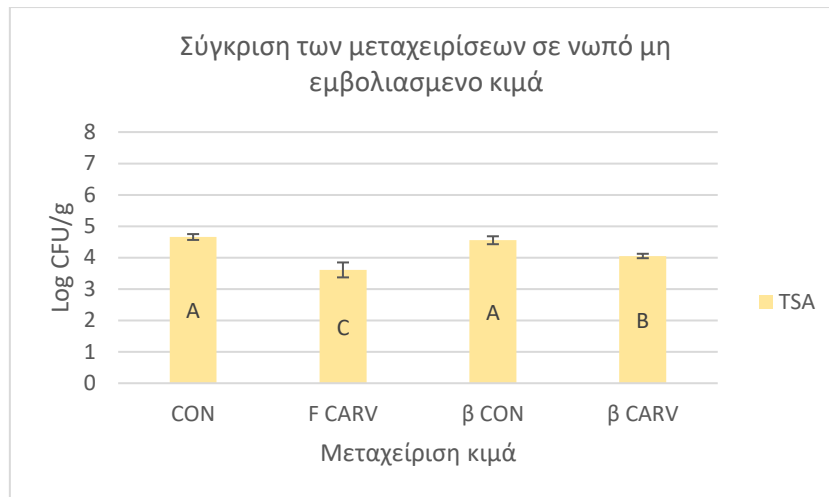




**Σχήμα 24:** Μεταβολή του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά στον οποίο έχει προστεθεί σύμπλοκο β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης (β CARV +) σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με την κατάσταση που βρίσκεται ο κιμάς (νωπός, κατεψυγμένος και ψημένος). Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

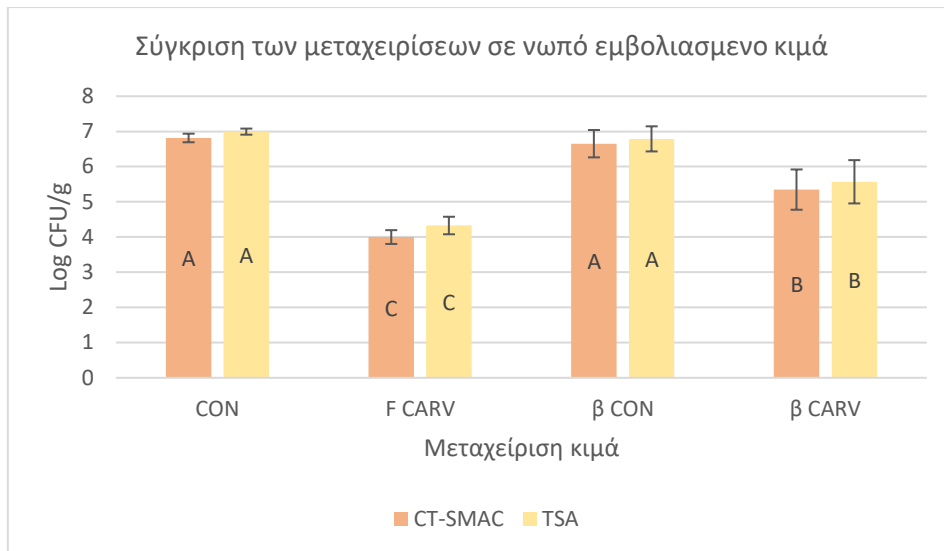
#### 3.4.9 Σύγκριση νωπών εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για πάνω από τους 65 °C

Στο **Σχήμα 25** παρουσιάζεται η σύγκριση της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Στα δείγματα F CARV και β CARV μειώνεται σημαντικά η μικροβιακή χλωρίδα του κιμά σε σχέση και με το CONTROL δείγμα αλλά και με το β CON ( $p < 0,05$ ). Στην συγκεκριμένη περίπτωση όμως η ελεύθερη καρβακρόλη εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση της ενδογενής χλωρίδας από την ενθυλακωμένη ( $p < 0,05$ ). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η ελεύθερη καρβακρόλη μπορεί να είναι άμεσα διαθέσιμη στη μήτρα του κιμά σε σχέση με την ενθυλακωμένη. Η OMX του κιμά πέφτει περίπου κατά 0,5-0,8 log CFU/g με την προσθήκη καρβακρόλης (ελεύθερης και μη). Επομένως ακόμα και από την προετοιμασία των δειγμάτων κιμά η καρβακρόλη έχει σημαντική δράση απέναντι στην OMX. Η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης σε νωπό κιμά δεν επηρεάζει σημαντικά την ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σύγκριση με το δείγμα CONTROL ( $p > 0,05$ ).



**Σχήμα 25:** Σύγκριση της μικροβιακής χλωρίδας του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

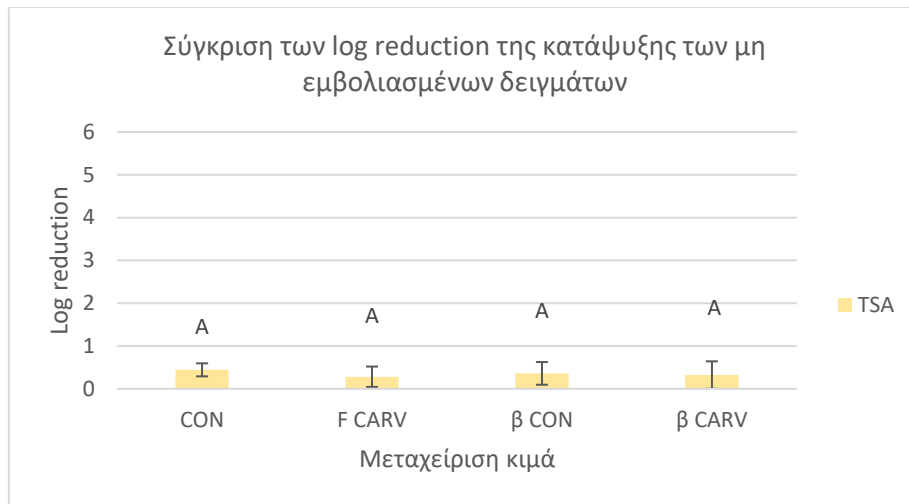
Στο **Σχήμα 26** παρουσιάζεται η σύγκριση του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Το TSA θεωρείται ότι εκφράζει τον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 μαζί με την ενδογενή χλωρίδα. Όμως επειδή ο κιμάς έχει εμβολιαστεί με 7 Log CFU/g *E. coli* O157:H7 και η ενδογενής του χλωρίδα είναι γύρω στους 5 Log CFU/g, είναι πολύ πιθανό το TSA να εκφράζει κυρίως το πληθυσμό του *E. coli*. Όπως και στα μη εμβολιασμένα, στα δείγματα F CARV και β CARV το *E. coli* O157:H7 και η ενδογενής χλωρίδα μειώνονται σημαντικά σε σχέση και με το CONTROL δείγμα αλλά και με το β CON ( $p < 0,05$ ). Η ελεύθερη καρβακρόλη εμφανίζει μεγαλύτερη μείωση του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας από την ενθυλακωμένη ( $p < 0,05$ ). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η ελεύθερη καρβακρόλη μπορεί να είναι άμεσα διαθέσιμη στη μήτρα του κιμά σε σχέση με την ενθυλακωμένη. Στα δείγματα F CARV το *E. coli* O157:H7 και η μικροβιακή χλωρίδα μειώνονται κατά περίπου 3 Log CFU/g, ενώ στα δείγματα β CARV κατά περίπου 1,5 Log CFU/g. Η καρβακρόλη (ενθυλακωμένη και μη) επιφέρει σημαντικές μειώσεις στο *E. coli* O157:H7 κατά την προετοιμασία των δειγμάτων. Η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης σε νωπό κιμά δεν επηρεάζει σημαντικά το *E. coli* O157:H7 και την ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σύγκριση με το δείγμα CONTROL ( $p > 0,05$ ).



**Σχήμα 26:** Σύγκριση του πληθυσμού του *E. coli* O157:H7 και της ενδογενής χλωρίδας του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA εκφρασμένη σε Log CFU/g κιμά σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

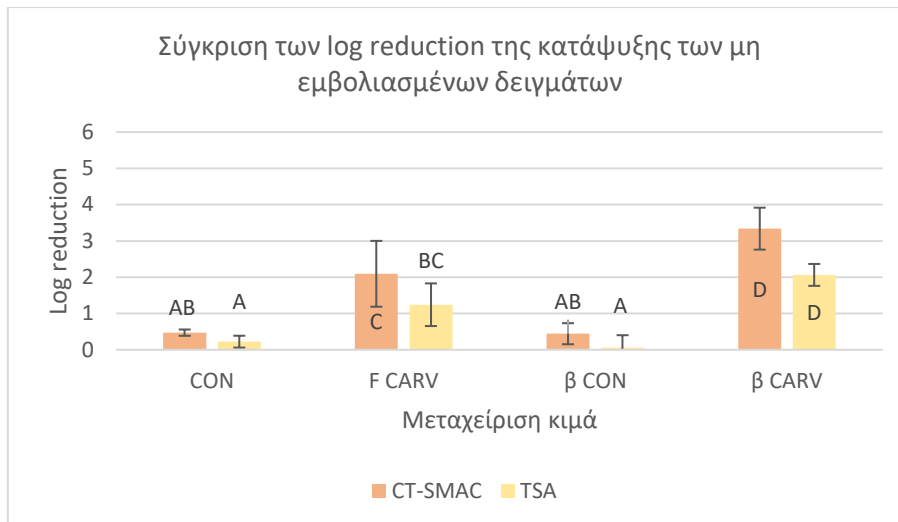
3.4.10 Σύγκριση κατεψυγμένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για πάνω από τους 65 °C

Στο **Σχήμα 27** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα Log reduction υπολογίστηκαν μέσω της αφαίρεσης του πληθυσμού που μετρήθηκε μετά τη κατάψυξη από τον πληθυσμό που μετρήθηκε στο νωπό κιμά για κάθε μεταχείριση. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση της κατάψυξης στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Παρατηρείται ότι όλες οι μεταχειρίσεις του κιμά έχουν παρόμοιο Log reduction της OMX, περίπου 0,5 Log CFU/g. Η μείωση της OMX πιθανόν να οφείλεται μόνο στην ανασταλτική δράση της κατάψυξης.



**Σχήμα 27:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

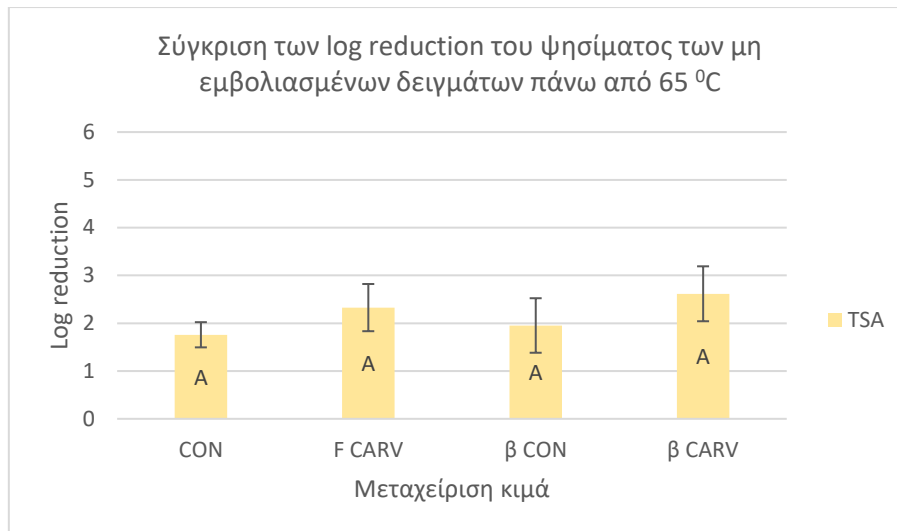
Στο **Σχήμα 28** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση της κατάψυξης στο *E. coli* O157:H7 και στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Στα δείγματα F CARV και β CARV το *E. coli* O157:H7 και η ενδογενής χλωρίδα μειώνονται σημαντικά σε σχέση και με το CONTROL δείγμα αλλά και με το β CON ( $p < 0,05$ ). Η καρβακρόλη (ελεύθερη και μη) μπορεί να δρα συνεργιστικά με την κατάψυξη και να επιφέρει μεγαλύτερες μειώσεις στο *E. coli* O157:H7. Μια άλλη θεωρία είναι ότι επειδή το κέντρο του μπιφτεκιού χρειάζεται περισσότερο χρόνο για να καταψυχθεί σε σχέση με την εξωτερική του επιφάνεια, η καρβακρόλη συνεχίζει να έχει επίδραση μέχρι να καταψυχθεί πλήρως ο κιμάς. Το δείγμα β CARV όμως φαίνεται να μειώνει περισσότερο το *E. coli* O157:H7 στο CT-SMAC σε σχέση με το δείγμα F CARV ( $p < 0,05$ ). Αυτό ίσως οφείλεται στην αυξημένη διαλυτότητα αλλά και στην προστασία από οξειδωτικούς παράγοντες που έχει η καρβακρόλη λόγω της ενθυλάκωσης της στην β-κυκλοδεξτρίνη. Η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης δεν επηρεάζει σημαντικά το *E. coli* O157:H7 και την ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σύγκριση με το δείγμα CONTROL ( $p > 0,05$ )



**Σχήμα 28:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα δείγματα προορίζονται για ψήσιμο πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

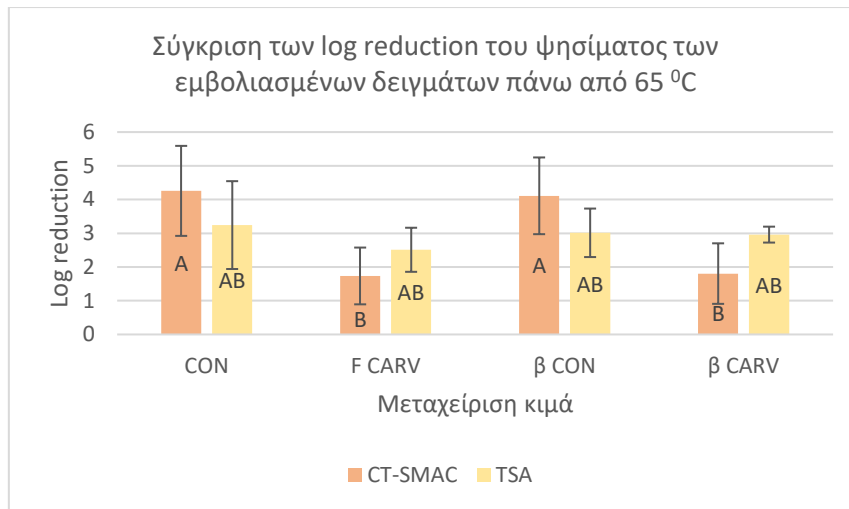
#### 3.4.11 Σύγκριση ψημένων εμβολιασμένων και μη δειγμάτων κιμά για πάνω από τους 65 °C

Στο **Σχήμα 29** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Τα Log reduction υπολογίστηκαν μέσω της αφαίρεσης του πληθυσμού που μετρήθηκε μετά το ψήσιμο από τον πληθυσμό που μετρήθηκε στο κατεψυγμένο κιμά για κάθε μεταχείριση. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση του ψησίματος πάνω από τους 65 °C στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Το ψήσιμο δεν φαίνεται να έχει σημαντική διαφορά σε καμία από τις μεταχειρίσεις ( $p < 0,05$ ). Όλα τα ψησίματα επιφέρουν μείωση 2-2,5 log CFU/g.



**Σχήμα 29:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

Στο **Σχήμα 30** παρουσιάζεται η σύγκριση των Log reduction που επιφέρει η κατάψυξη στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Σκοπός ήταν να μελετηθεί μεμονωμένα η επίδραση του ψήσιματος κάτω από τους 65 °C στο *E. coli* O157:H7 και στην ενδογενή χλωρίδα του κιμά σε σχέση με κάθε μεταχείριση του. Στο CT-SMAC παρατηρείται σημαντική μείωση του *E. coli* O157:H7 στα δείγματα CONTROL και β CONTROL σε σχέση με τα δείγματα F CARV και β CARV ( $p < 0,05$ ). Όμως με βάση το **Σχήμα 21,22,23** και **24** τα δείγματα F CARV και β CARV είχαν σημαντικά μικρότερους πληθυσμούς στη νωπή και στην κατεψυγμένη κατάσταση σε σχέση με τα δείγματα CONTROL και β CON. Στην κατεψυγμένη κατάσταση του κιμά για τα δείγματα F CARV και β CARV έχουν μετρηθεί 2 log CFU/g *E. coli* O157:H7 στο CT-SMAC και περίπου 3-3,5 log CFU/g *E. coli* O157:H7 και ενδογενούς χλωρίδας στο TSA, όσο δηλαδή είναι και τα αντίστοιχα log reduction που επιφέρει το ψήσιμο. Άρα άμα είχε μετρηθεί μεγαλύτερος πληθυσμός σε αυτά τα δείγματα, το ψήσιμο ίσως να επέφερε παραπάνω μείωση των λογαρίθμων. Αυτό στηρίζεται και στο γεγονός ότι το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C στα δείγματα CONTROL και β CON επιφέρει μείωση 4 log CFU/g στο CT-SMAC και 3 log CFU/g στο TSA. Επομένως δεν μπορούν να συγκριθούν σωστά οι log reduction που επιφέρει το ψήσιμο σε όλες τις μεταχειρίσεις. Το μόνο που μπορεί να παρατηρηθεί είναι ότι το ψήσιμο δεν επιφέρει σημαντική διαφορά ανάμεσα στο CT-SMAC και στο TSA σε κάθε μεταχείριση και ότι μάλλον το ψήσιμο σε όλες τις μεταχειρίσεις δεν έχει σημαντική διαφορά στο TSA (περίπου 3 log CFU/g μείωση).



**Σχήμα 30:** Σύγκριση των Log reduction που επιφέρει το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C στον πληθυσμό του *E. coli* O157:H7 και στην μικροβιακή χλωρίδα του μη εμβολιασμένου κιμά σε θρεπτικό υπόστρωμα CT-SMAC και TSA σε σχέση με τις διάφορες μεταχειρίσεις του κιμά. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

### 3.5 Σύγκριση της συνολικής επίδρασης όλων των μεταχειρίσεων στο κιμά από την προετοιμασία του ως νωπού μέχρι το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C

Όπως επεξηγήθηκε στην προηγούμενη παράγραφο δεν είναι δυνατός ο υπολογισμός της μεμονωμένης επίδρασης του ψησίματος πάνω από τους 65 °C ώστε να συγκριθεί με την επίδραση του ψησίματος κάτω από τους 65 °C. Οπότε υπολογίστηκε η συνολική επίδραση του ψησίματος σε συνδυασμό με την κατάψυξη και την προετοιμασία των νωπών δειγμάτων, αφαιρώντας από τον πληθυσμό που βρέθηκε στο νωπό δείγμα CONTROL τον πληθυσμό που βρέθηκε μετά από κάθε ψήσιμο στις δύο θερμοκρασίες για όλες τις μεταχειρίσεις.

Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται τις μέσες τιμές των log reduction της συνολικής επίδρασης όλων των μεταχειρίσεων στο κιμά από την προετοιμασία του ως νωπού μέχρι το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C που αφορούν την ΟΜΧ των μη εμβολιασμένων δειγμάτων. Σε όλες τις μεταχειρίσεις υπάρχει σημαντική αύξηση του log reduction στο ψήσιμο πάνω από 65 °C σε σχέση με το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C ( $p < 0,05$ ) εκτός από το δείγμα β CON. Άρα η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει σημαντικά τον πληθυσμό της ενδογενούς χλωρίδας του κιμά σε οποιαδήποτε μεταχείριση δεν περιέχει τον μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης. Τα δείγματα που περιέχουν ελεύθερη και ενθυλακωμένη καρβακρόλη και στις δύο θερμοκρασίες εμφανίζουν μεγαλύτερα log reduction σε σχέση με τα αντίστοιχα CONTROL δείγματα ( $p < 0,05$ ). Στους κάτω από τους 65 °C τα δείγματα F CARV και β CARV δεν διαφέρουν σημαντικά από το δείγμα β CON. Αντίθετα στους πάνω από 65 °C δείγματα F CARV και β CARV έχουν αυξημένα log reduction σε σχέση με το δείγμα β CON. Ίσως η αύξηση της

θερμοκρασίας κατά το ψήσιμο σε συνδυασμό με την αύξηση του χρόνου ψησίματος να αυξάνει την αντιμικροβιακή δράση της καρβακρόλης είτε είναι ενθυλακωμένη είτε όχι.

**Πίνακας 3:** Περιέχει τις μέσες τιμές των log reduction της συνολικής επίδρασης όλων των μεταχειρίσεων στο κιμά από την προετοιμασία του ως νωπού μέχρι το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C που αφορούν την OMX των μη εμβολιασμένων δειγμάτων. Οι τιμές που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Log reduction Μεταχείριση κιμά	Log reduction TSA <65 °C	Log reduction TSA >65 °C
CON-	1,14 ± 0,37 <sup>A</sup>	2,20 ± 0,28 <sup>B</sup>
F CARV-	2,63 ± 0,86 <sup>BC</sup>	3,66 ± 0,52 <sup>D</sup>
β CON-	1,64 ± 0,43 <sup>AB</sup>	2,46 ± 0,47 <sup>B</sup>
β CARV-	2,41 ± 0,42 <sup>B</sup>	3,54 ± 0,34 <sup>CD</sup>

Στον **Πίνακα 4** παρουσιάζονται τις μέσες τιμές των log reduction της συνολικής επίδρασης όλων των μεταχειρίσεων στο κιμά από την προετοιμασία του ως νωπού μέχρι το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C που αφορούν την OMX των μη εμβολιασμένων δειγμάτων. Τα δείγματα CONTROL και β CON και στο CT-SMAC και στο TSA εμφανίζουν σημαντική αύξηση log reduction από το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C σε σχέση με το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C ( $p < 0,05$ ). Επομένως η αύξηση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με την αύξηση του χρόνου ψησίματος, επιφέρουν μεγαλύτερες μειώσεις στο *E. coli* O157:H7 και στην OMX μαζί με το *E. coli* O157:H7. Αντίθετα τα δείγματα F CARV και β CARV εμφανίζουν σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες ψησίματος μόνο στο TSA. Όπως εξηγήθηκε και στην παράγραφο 3.4.7 δεν μπορεί να υπολογιστεί σωστά το log reduction που επιφέρει το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C στα δείγματα F CARV και β CARV ειδικά στο CT-SMAC, διότι είχαν παραμείνει μόνο περίπου *E. coli* O157:H7 2 log CFU/g *E. coli* O157:H7 μετά την κατάψυξη. Άρα έχει υποεκτιμηθεί η δράση της αύξησης του ψησίματος στα δείγματα F CARV και β CARV. Και στις δύο θερμοκρασίες ψησίματος η συνολική επίδραση της ελεύθερης και ενθυλακωμένης καρβακρόλης και στο CT-SMAC και στο TSA είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα control αλλά και με τα δείγματα που περιέχουν τον μάρτυρα της β-κυκλοδεξτρίνης. Άρα επιβεβαιώνεται η αντιμικροβιακή δράση της καρβακρόλης (ενθυλακωμένης και μη). Δεν φαίνεται όμως να υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ελεύθερη και την ενθυλακωμένη καρβακρόλη σε κανένα από τα δύο θεραπευτικά μέσα και σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες ( $p > 0,05$ ). Τα δείγματα CONTROL και β CON επίσης δεν εμφανίζουν σημαντική διαφορά μεταξύ τους σε κανένα υπόστρωμα και σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες ( $p > 0,05$ ) εκτός από το TSA στους πάνω από 65 °C. Στους κάτω από 65



°C τα δείγματα που περιέχουν καρβακρόλη (ενθυλακωμένη και μη) έχουν σημαντική διαφορά από το CT-SMAC στο TSA. Αυτή η διαφορά ίσως υποδηλώνει τον τραυματισμό των κυττάρων του *E. coli* O157:H7 από την θερμική επεξεργασία και αδυναμία αυτών να αναπτυχθούν στο CT-SMAC λόγω της μεγάλης επιλεκτικότητας του.

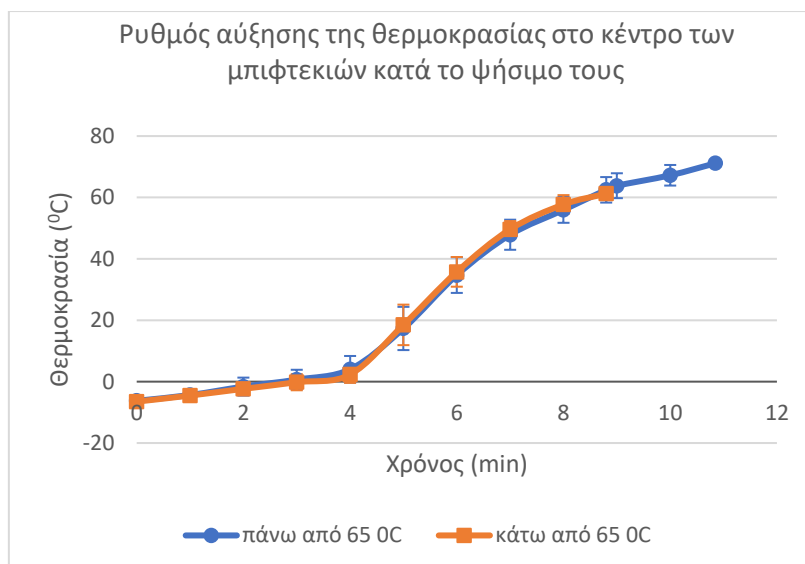
**Πίνακας 4:** Περιέχει τις μέσες τιμές των log reduction της συνολικής επίδρασης όλων των μεταχειρίσεων στο κιμά από την προετοιμασία του ως νωπού μέχρι το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C που αφορούν το *E. coli* O157:H7 και την ΟΜΧ των εμβολιασμένων δειγμάτων. Οι τιμές που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Μεταχείριση κιμά	Log reduction	Log reduction	Log reduction	Log reduction
	CT-SMAC <65 °C	TSA <65 °C	CT-SMAC >65 °C	TSA >65 °C
CON	1,42 ± 0,55 <sup>A</sup>	0,91 ± 0,28 <sup>A</sup>	4,73 ± 1,28 <sup>CDE</sup>	3,47 ± 1,29 <sup>CD</sup>
F CARV	6,19 ± 0,55 <sup>EF</sup>	4,84 ± 0,69 <sup>DE</sup>	6,64 ± 0,19 <sup>F</sup>	6,42 ± 0,57 <sup>F</sup>
β CON	1,77 ± 0,33 <sup>AB</sup>	0,96 ± 0,26 <sup>A</sup>	4,72 ± 0,52 <sup>CDE</sup>	3,28 ± 0,49 <sup>BC</sup>
β CARV	6,17 ± 1,18 <sup>EF</sup>	4,58 ± 0,74 <sup>CD</sup>	6,61 ± 0,25 <sup>F</sup>	6,45 ± 0,50 <sup>F</sup>

Κατά την σύγκριση των εμβολιασμένων δειγμάτων με τα μη εμβολιασμένα παρατηρείται ότι η καρβακρόλη (ενθυλακωμένη και μη) έχει μεγαλύτερα συνολικά log reduction στο *E. coli* O157:H7 σε σχέση με την ΟΜΧ του κιμά. Είναι πιθανό δηλαδή η καρβακρόλη να έχει μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση απέναντι στο παθογόνο βακτήριο σε σχέση με την ενδογενή χλωρίδα του κιμά.

### 3.6 Σύγκριση του ρυθμού αύξησης της θερμοκρασίας κατά το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C

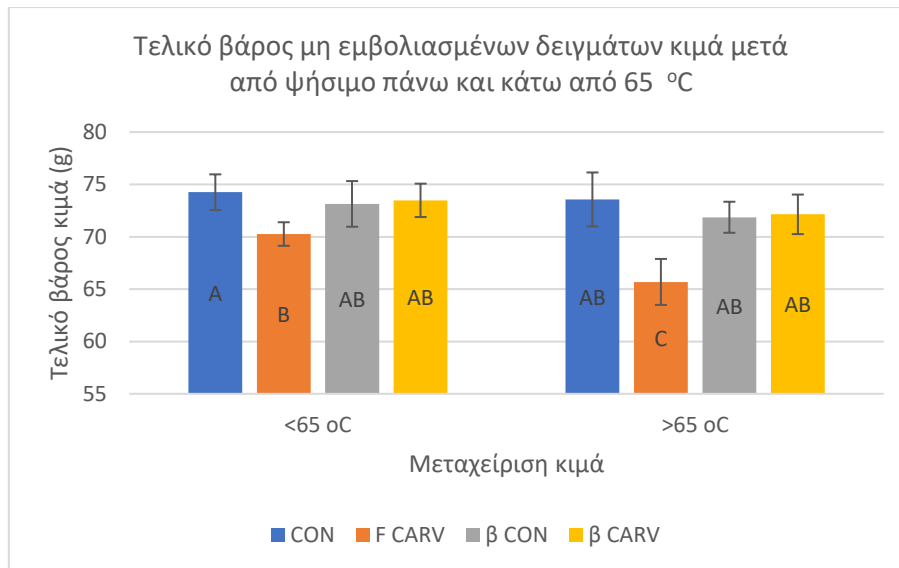
Στο **Σχήμα 31** παρουσιάζεται ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας σε σχέση με τον χρόνο κατά το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C. Η γραμμή που αφορά το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C έχει υπολογιστεί από το μέσο όρο των τιμών 33 μπιφτεκιών. Η γραμμή που αφορά το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C έχει υπολογιστεί από το μέσο όρο των τιμών 43 μπιφτεκιών. Και στις δύο περιπτώσεις δεν λήφθηκαν υπόψη τα δείγματα στα οποία είχε μπει τελείως στραβά το θερμοζεύγος K, η στα δείγματα που βγήκε το θερμοζεύγος K κατά την διάρκεια του ψησίματος. Και στις δύο θερμοκρασίες ψησίματος παρατηρείται ομαλή αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τα 4 min (περίπου 4 °C). Έπειτα από τα 4 min εμφανίζεται απότομη αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι τα 8 min (περίπου 56 °C). Τέλος μετά τα 8 min η θερμοκρασία φαίνεται να ανεβαίνει με μικρότερο ρυθμό στα δείγματα. Το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C διήρκησε κατά μέσο όρο 8,80 ± 0,59 min, ενώ το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C διήρκησε κατά μέσο όρο 10,85 ± 0,73 min.



**Σχήμα 31:** Γραφική απεικόνιση της αύξησης της θερμοκρασίας σε σχέση με τον χρόνο κατά το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C

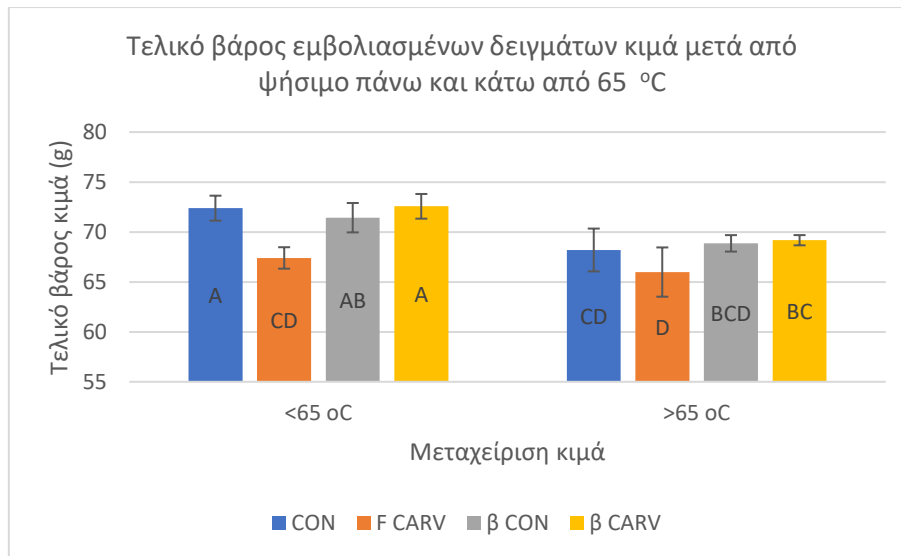
### 3.7 Απώλειες βάρους του κιμά κατά το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C για όλες τις μεταχειρίσεις

Όλα τα δείγματα κιμά που ψήθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν αρχικό βάρος πριν το ψήσιμο 90g. Στο **Σχήμα 32** παρουσιάζονται τα τελικά βάρη (g) που έχουν αποκτήσει τα μη εμβολιασμένα δείγματα κιμά μετά από ψήσιμο πάνω και κάτω από τους 65 °C σε όλες τις μεταχειρίσεις του κιμά. Και στις δύο θερμοκρασίες όλα τα δείγματα μετρήθηκαν κάτω από 75 g μετά το ψήσιμο, άρα έχασαν πάνω από το 17% του αρχικού τους βάρους. Στα δείγματα CONTROL, β CON και β CARV δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο τελικό βάρος του κιμά κατά το ψήσιμο πάνω και κάτω από τους 65 °C και ανά περίπτωση και ανάμεσα στις τρεις περιπτώσεις ( $p > 0,05$ ). Το δείγμα F CARV φαίνεται να έχασε σημαντικά το βάρος του από το ψήσιμο του πάνω και κάτω από τους 65 °C σε σχέση με το CONTROL δείγμα. Επίσης υπάρχει σημαντική μείωση του βάρους του από το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C σε σχέση με το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C ( $p < 0,05$ ). Στο ψήσιμο μάλιστα πάνω τους 65 °C το δείγμα F CARV εμφανίζει σημαντική μείωση βάρους σε σχέση με τις άλλες τρεις μεταχειρίσεις ( $p < 0,05$ ).



**Σχήμα 32:** Σύγκριση του τελικού βάρους (g) που έχουν τα μη εμβολιασμένα δείγματα κιμά μετά από ψήσιμο πάνω και κάτω από τους 65 °C σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Στο **Σχήμα 33** παρουσιάζονται τα τελικά βάρη (g) που έχουν αποκτήσει τα εμβολιασμένα δείγματα κιμά μετά από ψήσιμο πάνω και κάτω από τους 65 °C σε όλες τις μεταχειρίσεις του κιμά. Και στις δύο θερμοκρασίες όλα τα δείγματα μετρήθηκαν κάτω από 73 g μετά το ψήσιμο, άρα όλα έχασαν πάνω από το 19% του αρχικού τους βάρους. Παρατηρείται σημαντική μείωση του τελικού βάρους του κιμά των δειγμάτων CONTROL και β CARV από το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C σε σχέση με το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C ( $p < 0,05$ ). Αντίθετα τα δείγματα F CARV και β CON δεν εμφανίζουν σημαντική διαφορά από το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C σε σχέση με το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C ( $p > 0,05$ ). Κατά το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C, το τελικό βάρος του F CARV δείγματος έχει σημαντική μείωση σε σχέση με τις άλλες τρεις περιπτώσεις. Όμως κατά το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C, το δείγμα F CARV έχει σημαντική διαφορά μόνο με το δείγμα β CARV ( $p < 0,05$ ).

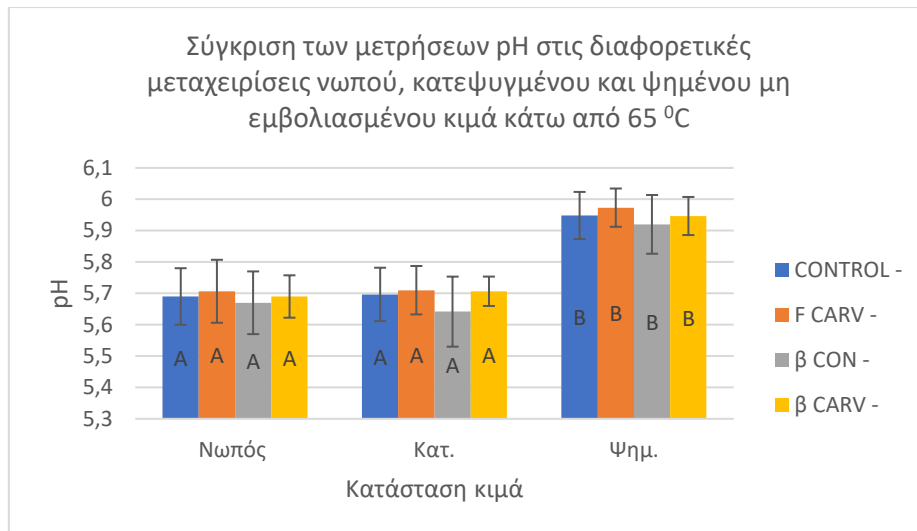


**Σχήμα 33:** Σύγκριση του τελικού βάρους (g) που έχουν τα εμβολιασμένα δείγματα κιμά μετά από ψήσιμο πάνω και κάτω από τους 65 °C σε όλες τις μεταχειρίσεις. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Και στις δύο θερμοκρασίες ψησίματος, τα δείγματα εμβολιασμένου κιμά φαίνεται να χάνουν μεγαλύτερο βάρος από τα μη εμβολιασμένα δείγματα. Όλα τα δείγματα F CARV μετά το ψήσιμο καταλήγουν σε χαμηλότερο τελικό βάρος σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το κρέας κατά το ψήσιμο χάνει μεγάλο μέρος της μάζας του από την απώλεια νερού. Το νερό προέρχεται κυρίως από το χυμό του κρέατος που αποβάλλεται λόγω της μετουσίωσης των πρωτεϊνών και τη συστολή των μυϊκών ινιδίων (Hughes et al., 2014). Ίσως επειδή τα δείγματα που έχουν ελεύθερη καρβακρόλη εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεϊνών (Σχήμα 39) να συνδέονται με την μεγαλύτερη απώλεια βάρους κατά το ψήσιμο.

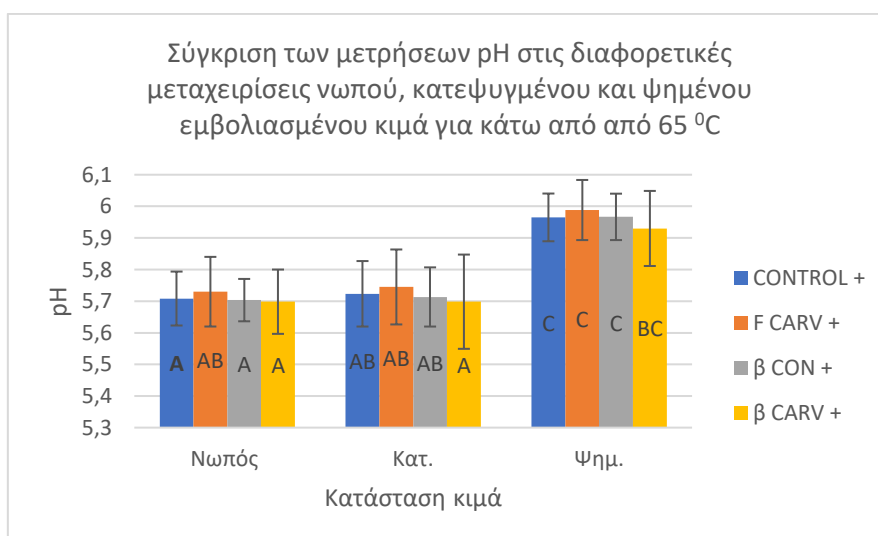
### 3.8 Μετρήσεις pH των δειγμάτων νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου κιμά

Στο Σχήμα 34 παρουσιάζονται οι μετρήσεις pH για όλες τις μεταχειρίσεις και όλες τις καταστάσεις μη εμβολιασμένου κιμά που αφορούν τα δείγματα που ψήθηκαν κάτω από τους 65 °C. Ο ψημένος κιμάς σε όλες τις μεταχειρίσεις εμφανίζει σημαντικά υψηλότερο pH σε σχέση με τον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p < 0,05$ ). Ο νωπός με τον κατεψυγμένο κιμά δεν έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε καμία μεταχείριση ( $p > 0,05$ ).



**Σχήμα 34:** Διάγραμμα της σύγκρισης των μετρήσεων pH στις διαφορετικές μεταχειρίσεις νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου μη εμβολιασμένου κιμά. Το ψήσιμο έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

Στο **Σχήμα 35** παρουσιάζονται οι μετρήσεις pH για όλες τις μεταχειρίσεις και όλες τις καταστάσεις εμβολιασμένου κιμά που αφορούν τα δείγματα που ψήθηκαν κάτω από τους 65 °C. Ο ψημένος κιμάς εμφανίζει σημαντικά υψηλότερο pH σε σχέση με τον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά σε κάθε μεταχείριση αντίστοιχα ( $p < 0,05$ ). Ο νωπός με τον κατεψυγμένο κιμά δεν έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ανά κάθε μεταχείριση ( $p > 0,05$ ). Το αξιοπερίεργο είναι ότι ενώ το pH του ψημένου δείγματος β CARV + εμφανίζει σημαντική διαφορά από το νωπό και το κατεψυγμένο δείγμα ( $p < 0,05$ ), δεν έχει σημαντική διαφορά με τα pH που μετρήθηκαν για κατεψυγμένο κιμά β CON, F CARV και CONTROL και για νωπό κιμά F CARV.

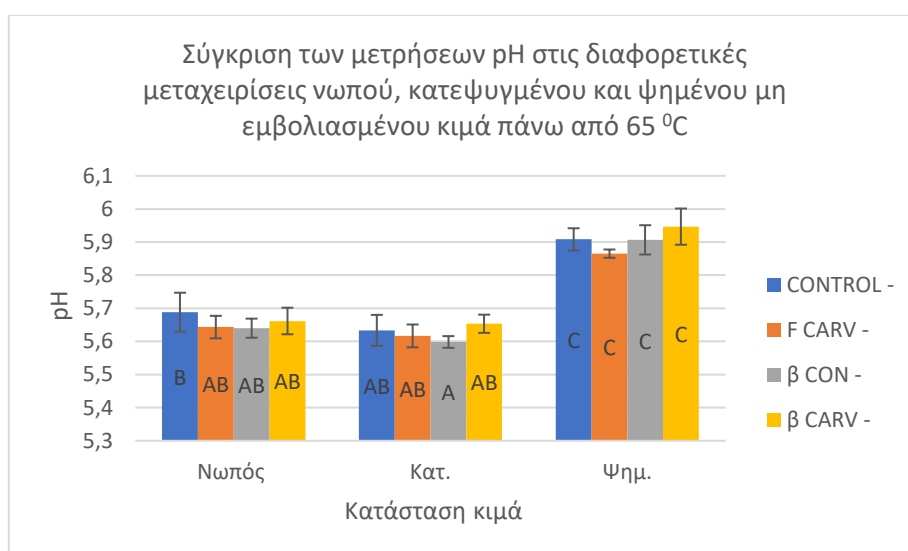


**Σχήμα 35:** Διάγραμμα της σύγκρισης των μετρήσεων pH στις διαφορετικές μεταχειρίσεις νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου εμβολιασμένου κιμά. Το ψήσιμο

έγινε κάτω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

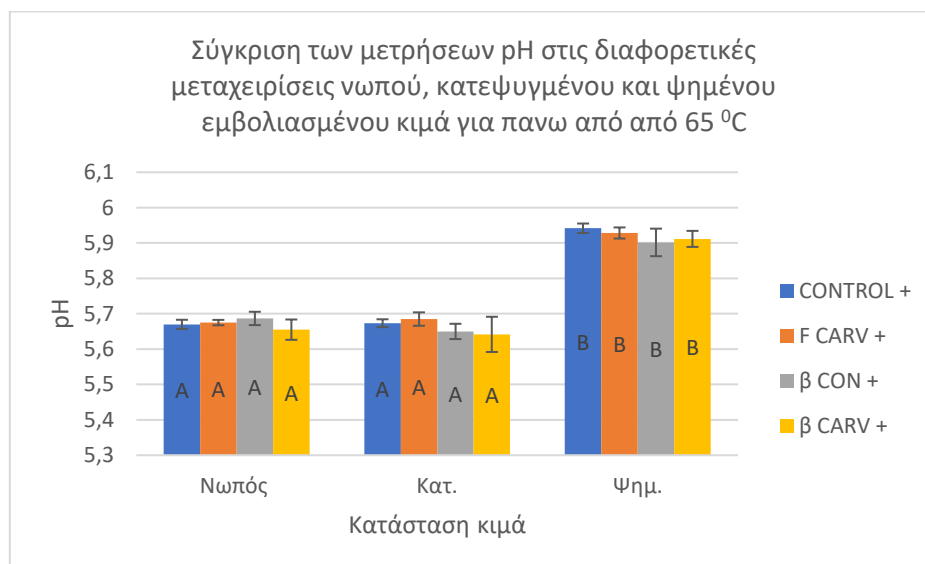
Στα νωπά και κατεψυγμένα δείγματα, εμβολιασμένα και μη, το pH μετρήθηκε γύρω στα 5,7. Το ψήσιμο κάτω από τους 65 °C ανέβασε το pH στο 5,9-6,0 σε όλες τις περιπτώσεις.

Στο **Σχήμα 36** παρουσιάζονται οι μετρήσεις pH για όλες τις μεταχειρίσεις και όλες τις καταστάσεις μη εμβολιασμένου κιμά που αφορούν τα δείγματα που ψήθηκαν πάνω από τους 65 °C. Ο ψημένος κιμάς σε όλες τις μεταχειρίσεις εμφανίζει σημαντικά υψηλότερο pH σε σχέση με τον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p < 0,05$ ). Ο νωπός με τον κατεψυγμένο κιμά δεν έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους ανά κάθε μεταχείριση ( $p > 0,05$ ). Η μόνη στατιστικώς σημαντική διαφορά που παρατηρείται είναι ανάμεσα στο κατεψυγμένο δείγμα β CON το νωπό δείγμα CONTROL. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε λάθος μέτρηση του pH είτε ίσως η προσθήκη μάρτυρα κυκλοδεξτρίνης να μειώνει το pH του κιμά όταν καταψύχεται.



**Σχήμα 36:** Διάγραμμα της σύγκρισης των μετρήσεων pH στις διαφορετικές μεταχειρίσεις νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου μη εμβολιασμένου κιμά. Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

Στο **Σχήμα 37** παρουσιάζονται οι μετρήσεις pH για όλες τις μεταχειρίσεις και όλες τις καταστάσεις εμβολιασμένου κιμά που αφορούν τα δείγματα που ψήθηκαν πάνω από τους 65 °C. Ο ψημένος κιμάς σε όλες τις μεταχειρίσεις εμφανίζει σημαντικά υψηλότερο pH σε σχέση με τον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά ( $p < 0,05$ ). Ο νωπός με τον κατεψυγμένο κιμά δεν έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους σε καμία μεταχείριση ( $p > 0,05$ ).

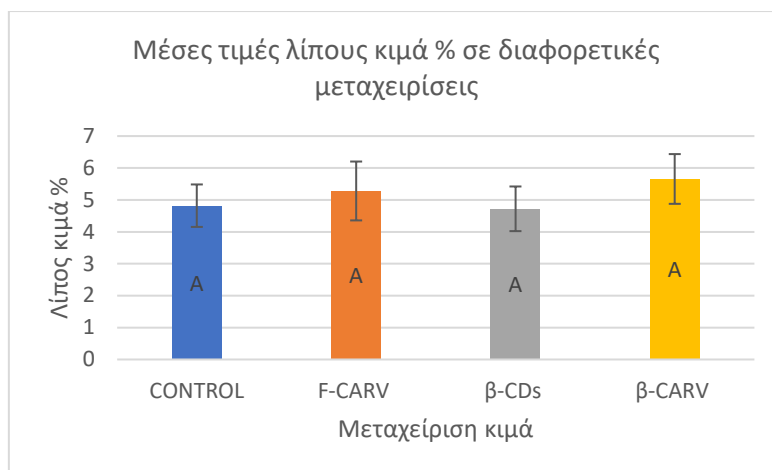


**Σχήμα 37:** Διάγραμμα της σύγκρισης των μετρήσεων pH στις διαφορετικές μεταχειρίσεις νωπού, κατεψυγμένου και ψημένου εμβολιασμένου κιμά. Το ψήσιμο έγινε πάνω από τους 65 °C. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

Στα νωπά και κατεψυγμένα δείγματα, εμβολιασμένα και μη, το pH μετρήθηκε γύρω στα 5,6-5,7. Το ψήσιμο πάνω από τους 65 °C ανέβασε το pH στο 5,9 σε όλες τις περιπτώσεις. Και οι δύο θερμοκρασίες ψησίματος αυξάνουν το pH σε παρόμοιες τιμές, άρα η αύξηση της θερμοκρασίας ψησίματος δεν επηρέασε αντίστοιχα την αύξηση του pH.

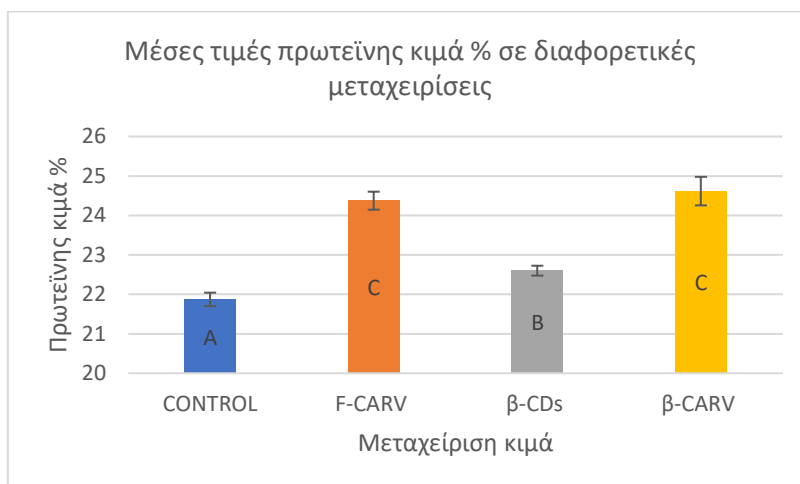
### 3.9 Χημική σύσταση νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις

Στο **Σχήμα 38** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης λίπους για τα δείγματα νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις που μετρήθηκαν με FoodScan. Δεν υπάρχει καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις τέσσερις μεταχειρίσεις του κιμά ( $p > 0,05$ ). Επομένως η προσθήκη ελεύθερης καρβακρόλης, μάρτυρα κυκλοδεξτρίνης και συμπλόκου β-κυκλοδεξτρίνης καρβακρόλης δεν επηρεάζει την σύσταση του λίπους του νωπού κιμά.



**Σχήμα 38:** Διάγραμμα σύγκρισης του λίπους κιμά% σε νωπά δείγματα μη εμβολιασμένου κιμά για όλες τις μεταχειρίσεις. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

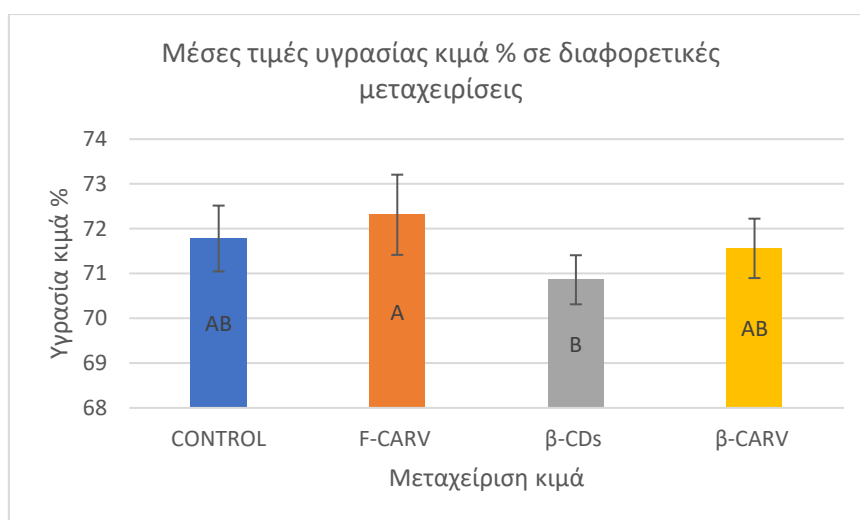
Στο **Σχήμα 39** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης πρωτεΐνης για τα δείγματα νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις που μετρήθηκαν με FoodScan. Η προσθήκη ελεύθερης και ενθυλακωμένης καρβακρόλης φαίνεται να αυξάνει σημαντικά το ποσοστό πρωτεΐνης στο κιμά σε σχέση με το CONTROL δείγμα αλλά και το δείγμα που έχει μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης. Αυτό ίσως οφείλεται στην αντιοξειδωτική δράση που έχει η καρβακρόλη στις πρωτεΐνες του κρέατος (Lahmar et al., 2018).. Επίσης και η προσθήκη κενής β-κυκλοδεξτρίνης αυξάνει σημαντικά το ποσοστό της πρωτεΐνης στον νωπό κιμά σε σχέση με το CONTROL δείγμα.



**Σχήμα 39:** Διάγραμμα σύγκρισης της πρωτεΐνης κιμά% σε νωπά δείγματα μη εμβολιασμένου κιμά για όλες τις μεταχειρίσεις. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

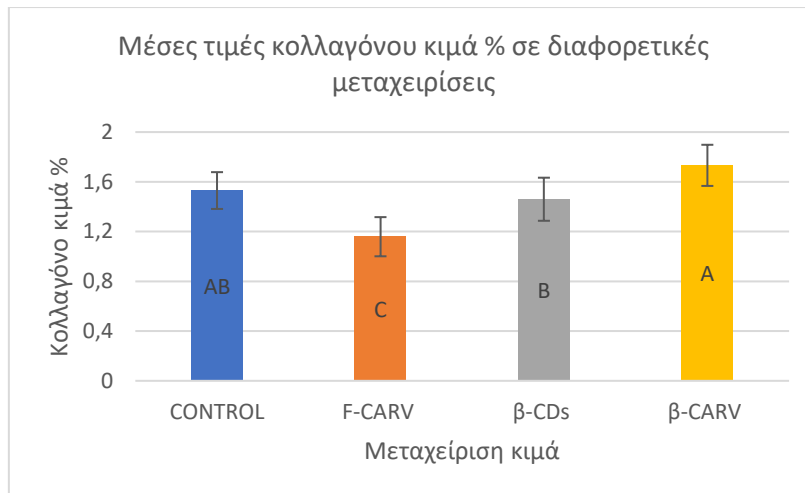


Στο **Σχήμα 40** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης υγρασίας για τα δείγματα νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις που μετρήθηκαν με FoodScan. Παρατηρείται σημαντική μείωση της υγρασίας στην στα δείγματα που έχει προστεθεί μάρτυρας β-κυκλοδεξτρίνης σε σχέση με τα δείγματα που περιέχουν ελεύθερη καρβακρόλη ( $p < 0,05$ ). Μάλλον η κενή κυκλοδεξτρίνη ως σκόνη συγκρατεί μέρος της υγρασίας του νωπού κιμά ενώ η ελεύθερη καρβακρόλη αυξάνει την υγρασία του νωπού κιμά. Το CONTROL δείγμα που αφορά τον νωπό κιμά δεν δείχνει να έχει σημαντική διαφορά με καμία από τις άλλες μεταχειρίσεις ( $p > 0,05$ ). Η προσθήκη της ελεύθερης και ενθυλακωμένης καρβακρόλης αλλά και της κενής β-κυκλοδεξτρίνης στο νωπό κιμά δεν επιφέρουν σημαντική αλλαγή στην υγρασία του.



**Σχήμα 40:** Διάγραμμα σύγκρισης της υγρασίας κιμά% σε νωπά δείγματα μη εμβολιασμένου κιμά για όλες τις μεταχειρίσεις. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

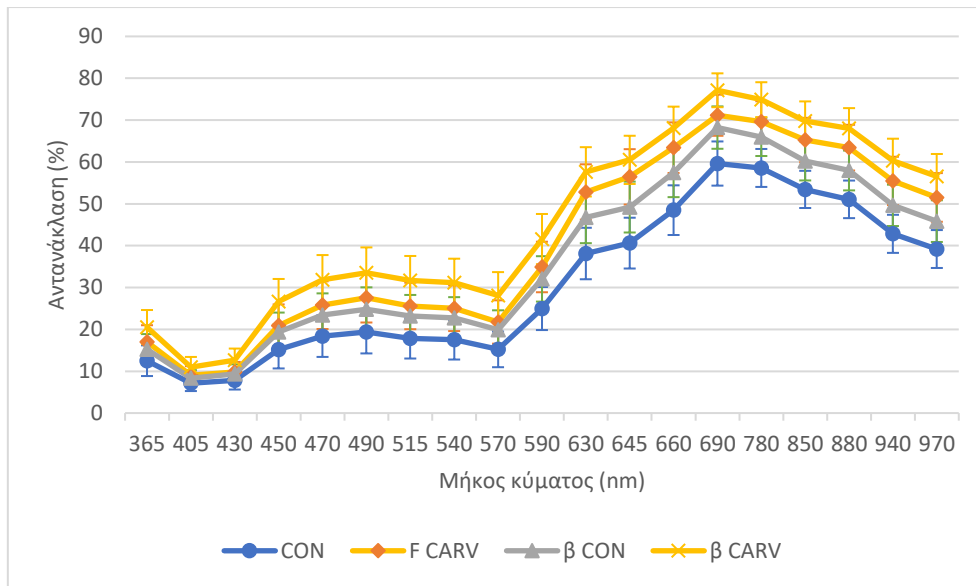
Στο **Σχήμα 41** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης κολλαγόνου για τα δείγματα νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις που μετρήθηκαν με FoodScan. Η προσθήκη ελεύθερης καρβακρόλης σε νωπό κιμά φαίνεται να μειώνει σημαντικά το κολλαγόνο του σε σχέση με το CONTROL δείγμα ( $p < 0,05$ ). Παρατηρείται όμως ότι το δείγμα CONTROL δεν έχει στατιστικώς σημαντική διαφορά με τις άλλες δύο μεταχειρίσεις ( $p < 0,05$ ). Επομένως η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης και συμπλοκου β-κυκλοδεξτρίνης-καρβακρόλης σε νωπό κιμά δεν επηρεάζει το κολλαγόνο του. Το δείγμα β CARV φαίνεται να έχει υψηλότερο κολλαγόνο και από το δείγμα β CON και από το δείγμα F CARV ( $p < 0,05$ ). Αντίστοιχα το δείγμα β CON παρουσιάζει υψηλότερο κολλαγόνο από το δείγμα F CARV ( $p < 0,05$ ). Άρα η ελεύθερη καρβακρόλη μειώνει το κολλαγόνο σε σχέση με την κενή και την συμπλοκοποιημένη με καρβακρόλη β-κυκλοδεξτρίνη.



**Σχήμα 41:** Διάγραμμα σύγκρισης του κολλαγόνου κιμά% σε νωπά δείγματα μη εμβολιασμένου κιμά για όλες τις μεταχειρίσεις. Οι μπάρες που δεν μοιράζονται το ίδιο γράμμα, διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους

### 3.10 Ανάλυση νωπού μη εμβολιασμένου κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις μέσω VideometerLab

Στο **Σχήμα 42** παρουσιάζεται η γραφική απεικόνιση των μέσων τιμών αντανάκλασης σε 19 μήκη κύματος που αφορούν τα δείγματα νωπού κιμά σε όλες τις μεταχειρίσεις. Η αντανάκλαση σε κάθε μεταχείριση φαίνεται να μειώνεται απότομα από τα 365 έως τα 405 nm, έπειτα να ανεβαίνει σταδιακά μέχρι τα 490 nm και να πέφτει πάλι στα 570 nm. Από τα 570 μέχρι τα 630 η καμπύλη ανεβαίνει απότομα, από τα 630 έως τα 690 συνεχίζει να ανεβαίνει αλλά με μικρότερη κλίση όπου και φτάνει το υψηλότερο σημείο και μετά μειώνεται πάλι απότομα μέχρι τα 970 nm. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι δύο εμφανείς κορυφές απορρόφησης γύρω στα 430 nm και στα 570 nm μπορεί να οφείλονται στην απορρόφηση χρωστικών της μυοσφαιρίνης και αιμοσφαιρίνης στο μοσχαρίσιο κρέας (Yang et al., 2018). Τα δείγματα β CARV φαίνεται να έχουν τις μεγαλύτερες τιμές αντανάκλασης σε όλα τα μήκη κύματος, μετά ακολουθούν τα δείγματα F CARV, έπειτα είναι τα δείγματα β CON και τελευταία με τις μικρότερες τιμές αντανάκλασης είναι τα δείγματα CONTROL. Η παρουσία ενθυλακωμένης ή μη καρβακρόλης στον νωπό κιμά αυξάνει την αντανάκλαση του σε όλα τα μήκη κύματος. Ακόμα και ο μαρτυρας β-κυκλοδεξτρίνης αυξάνει σε μικρότερο βαθμό από την καρβακρόλη την αντανάκλαση του νωπού κιμά σε όλα τα μήκη κύματος. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην επίδραση που έχουν και οι τρεις μεταχειρίσεις στο χρώμα, στις πρωτεΐνες, στην υγρασία και στο κολλαγόνο του νωπού κιμά. Η προσθήκη ελεύθερης και μη καρβακρόλης αλλά και η προσθήκη μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης μετέτρεπε το χρώμα του νωπού κιμά από κόκκινο σε ροζ.



**Σχήμα 42:** Απεικόνιση των μέσων τιμών αντανάκλασης σε 19 μήκη κύματος που αφορούν τα δείγματα νωπού κινά σε όλες τις μεταχειρίσεις

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Το ποσοστό της συγκέντρωσης της καρβακρόλης παίζει σημαντικό ρόλο στην θερμική αδρανοποίηση του *Escherichia coli* O157:H7. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση τόσο μειώνεται η ανθεκτικότητα στην θερμική καταπόνηση, αλλά αυτό ισχύει μέχρι το ποσοστό 1,0%. Περαιτέρω αύξηση της καρβακρόλης φαίνεται να μην έχει τόσο μεγάλη επίδραση.
- Το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση της ΟΜΧ μη εμβολιασμένου κιμά είτε κάτω είτε πάνω από τους 65 °C.
- Το ψήσιμο επιφέρει σημαντική μείωση του *Escherichia coli* O157:H7 του εμβολιασμένου κιμά είτε κάτω είτε πάνω από τους 65 °C.
- Ο μάρτυρας β-κυκλοδεξτρίνης φαίνεται να έχει παρόμοια δράση με τα control δείγματα είτε στην κατάψυξη είτε στο ψήσιμο σε εμβολιασμένο και μη κιμά. Άρα δεν έχει επίδραση στην θερμική ανθεκτικότητα του *Escherichia coli* O157:H7
- Η ενθυλακωμένη και μη καρβακρόλη μειώνουν σημαντικά το πληθυσμό του *Escherichia coli* O157:H7 στο νωπό κιμά. Αυτό σημαίνει ότι καρβακρόλη δρα άμεσα απέναντι στο παθογόνο ακόμα και κατά την προετοιμασία του κιμά.
- Η αντιμικροβιακή δράση της ενθυλακωμένης και ελεύθερης καρβακρόλης συνεχίζεται και στην κατάψυξη των εμβολιασμένων δειγμάτων κιμά. Μία υπόθεση είναι ότι ο τραυματισμός των κυττάρων *Escherichia coli* O157:H7 από την κατάψυξη αυξάνεται με την ταυτόχρονη παρουσία της καρβακρόλης. Από την άλλη ίσως ο αργός ρυθμός κατάψυξης του κέντρου σε σχέση με το υπόλοιπο μπιφτέκι να επιτρέπει στην καρβακρόλη να συνεχίζει να δρα μέχρι την πλήρη κατάψυξη του.
- Η ελεύθερη και ενθυλακωμένη καρβακρόλη φαίνεται να μειώνουν την θερμική αντίσταση του *Escherichia coli* O157:H7 κατά το ψήσιμο είτε κάτω είτε πάνω από τους 65 °C.
- Η συνολική επίδραση της καρβακρόλης (ενθυλακωμένης και μη) από τον νωπό μέχρι τον ψημένο κιμά φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στο *Escherichia coli* O157:H7 στα εμβολιασμένα δείγματα σε σχέση με την ενδογενή χλωρίδα των μη εμβολιασμένων δειγμάτων. Μετά το ψήσιμο των μπιφτεκιών είτε κάτω είτε πάνω από τους 65 °C επιβίωνε μεγαλύτερος πληθυσμός της ΟΜΧ από ότι στο *E. coli*.
- Οι διαφορές ανάμεσα στην καταμέτρηση του *Escherichia coli* O157:H7 σε επιλεκτικό υπόστρωμα CT-SMAC και γενικό υπόστρωμα TSA ίσως υποδηλώνουν των τραυματισμό των κυττάρων σε όλες τις μεταχειρίσεις. Βέβαια στις περισσότερες περιπτώσεις, μετά το ψήσιμο επιβίωνε μεγαλύτερος ή ίσος πληθυσμός ΟΜΧ στα μη εμβολιασμένα δείγματα σε σχέση με το πληθυσμό του *E. coli* στα εμβολιασμένα. Επομένως η διαφορά καταμέτρησης ανάμεσα στα δύο υποστρώματα μπορεί να οφείλεται στην ταυτόχρονη παρουσία *E. coli* και ενδογενής χλωρίδας στο TSA.

- Η ελεύθερη καρβακρόλη με την ενθυλακωμένη δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ τους όσον αφορά την θερμοανθεκτικότητα του *Escherichia coli* O157:H7. Παρόλα αυτά η ενθυλάκωση της καρβακρόλης μειώνει το έντονο άρωμα της που παρομοιάζει την ρίγανη. Έτσι βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του βόειου μπιφτεκιού καθιστώντας το πιο ελκυστικό προς κατανάλωση.
- Η επίδραση της καρβακρόλης στην γεύση του κρέατος δεν μελετήθηκε. Είναι πιθανό η ενθυλάκωση της καρβακρόλης στην β κυκλοδεξτρίνη να βελτιώνει και την γεύση της μειώνοντας τον έντονο χαρακτήρα που έχει. Χρειάζονται να γίνουν περαιτέρω μελέτες ως προς την διερεύνηση αυτής της πιθανότητας.
- Η θερμοκρασία αυξήθηκε με τον ίδιο ρυθμό κατά το ψήσιμο κάτω και πάνω από τους 65 °C. Στους 4 °C βαθμούς λογικά συμβαίνει η μετατροπή του πάγου του κρέατος σε νερό. Η απότομη αύξηση μετά τους 4 °C οφείλεται στο βρασμό του διαθέσιμου νερού και του κρέατος. Οι 50 °C μάλλον σηματοδοτούν το σημείο βρασμού του κρέατος γιατί μετά από αυτό η θερμοκρασία ανεβαίνει πιο ομαλά.
- Σε όλες τις μεταχειρίσεις αυξήθηκε το pH του κιμά κατά το ψήσιμο του είτε κάτω είτε πάνω από 65°C. Όμως δε παρατηρήθηκε διαφορά στα καταμετρούμενα pH ανάμεσα στις δυο θερμοκρασίες.
- Σε όλες τις μεταχειρίσεις δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στον νωπό και τον κατεψυγμένο κιμά.
- Η καρβακρόλη αύξησε σημαντικά το ποσοστό των πρωτεϊνών του κιμά είτε στην ελεύθερη μορφή της είτε στην ενθυλακωμένη. Επίσης η ελεύθερη καρβακρόλη φαίνεται να μειώνει το κολλαγόνο.
- Το λίπος του κρέατος δεν επηρεάστηκε από τη προσθήκη καρβακρόλης (ενθυλακωμένης και μη) ούτε από την προσθήκη β-κυκλοδεξτρίνης.
- Η μειωμένη υγρασία των μπιφτεκιών στα οποία είχε προστεθεί μάρτυρα β-κυκλοδεξτρίνης ίσως οφείλεται στην δέσμευση του διαθέσιμου νερού από την σκόνη κυκλοδεξτρίνης.
- Η φασματική απεικόνιση των μετρούμενων αντανάκλασεων των μεταχειρίσεων του κιμά σε 19 μήκη κύματος απέδειξε ότι τα δείγματα που περιείχαν καρβακρόλη (ελεύθερη και μη) εμφάνιζαν υψηλότερες τιμές αντανάκλασης από τα control δείγματα. Ακόμα και η προσθήκη κενής β-κυκλοδεξτρίνης αύξανε σε μικρότερο βαθμό από την καρβακρόλη τις τιμές αντανάκλασης του κρέατος. Αυτό ίσως οφείλεται στις αλλαγές που συμβαίνουν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του βόειου κιμά κατά την προσθήκη των παραπάνω ουσιών.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adzitey, F. (2016). The Prevention and Control of Bacterial Foodborne Hazards in Meats and Meat Products-An Overview. *Journal of Meat Science and Technology*, 1–10. [www.jakraya.com/journal/jmst](http://www.jakraya.com/journal/jmst)
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An overview. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 10, Issue 12, pp. 6235–6254). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Antonia Nostro, & Teresa Papalia. (2012). Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 7(1), 28–35. <https://doi.org/10.2174/157489112799829684>
- Arora, D., Saneja, A., & Jaglan, S. (2018). *Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Dietary Phytochemicals* (pp. 1–17). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-76162-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-76162-6_1)
- Asbahani, A. El, Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. El, Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 483, Issues 1–2, pp. 220–243). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.069>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 46, Issue 2, pp. 446–475). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bandara, W. G. C., Prabhath, G. W. K., Dissanayake, D. W. S. C. B., Herath, H. M. V. R., Godaliyadda, G. M. R. I., Ekanayake, M. P. B., Vithana, S. S. P., Demini, S. M. D., & Madhujith, T. (2018). A Multispectral Imaging System to Assess Meat Quality. *2018 IEEE Region 10 Humanitarian Technology Conference (R10-HTC)*, 1–6. <https://doi.org/10.1109/R10-HTC.2018.8629858>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of E. coli. *ELife*, 2015(4). <https://doi.org/10.7554/eLife.05826.001>
- Bollman, J., Ismond, A., & Blank, G. (2001). Survival of Escherichia coli O157:H7 in frozen foods: impact of the cold shock response. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 64). [www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro)
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., & Kreyenschmidt, J. (2012). Characterization and Comparison of Spoilage Processes in Fresh Pork and Poultry. *Journal of Food Quality*, 35(5), 372–382. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2012.00456.x>
- Castro-Giráldez, M., Balaguer, N., Hinarejos, E., & Fito, P. J. (2014). Thermodynamic approach of meat freezing process. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 23, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.03.007>
- Cavalheiro, C. P., Silva, M. C. A. da, Leite, J. S. F., Felix, S. K. R. da S., Herrero, A. M., & Ruiz-Capillas, C. (2020). Physical hazards in meat products: Consumers' complaints found on a Brazilian website. *Food Control*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106892>
- Ciobanu, A., Landy, D., & Fourmentin, S. (2013). Complexation efficiency of cyclodextrins for volatile flavor compounds. *Food Research International*, 53(1), 110–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.048>

- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 26–38). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Cutter, C. N., Senevirathne, R. N., Chang, V. P., Cutaia, R. B., Fabrizio, K. A., Geiger, A. M., Valadez, A. M., & Yoder, S. F. (2012). Major microbiological hazards associated with packaged fresh and processed meat and poultry. In *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging* (pp. 3–58). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1533/9780857095718.1.1>
- Das, A. K., Nanda, P. K., Das, A., & Biswas, S. (2019). Hazards and safety issues of meat and meat products. In *Food Safety and Human Health* (pp. 145–168). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816333-7.00006-0>
- Davies, A. R. (2003). Modified atmospheres and vacuum packaging. In N. J. Russell & G. W. Gould (Eds.), *Food Preservatives* (pp. 218–239). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_11)
- De, C., & Blackburn, W. (1997). Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 38).
- Degala, H. L., Mahapatra, A. K., Demirci, A., & Kannan, G. (2018). Evaluation of non-thermal hurdle technology for ultraviolet-light to inactivate *Escherichia coli* K12 on goat meat surfaces. *Food Control*, 90, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.042>
- Dissing, B. S., Papadopoulou, O. S., Tassou, C., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2013). Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2268–2279. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0886-6>
- Feng, C. H., Makino, Y., Oshita, S., & García Martín, J. F. (2018). Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. In *Food Control* (Vol. 84, pp. 165–176). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.013>
- Fratamico, P. M., & Bagi, L. K. (2007). Comparison of Methods for Detection and Isolation of Cold- and Freeze-Stressed *Escherichia coli* O157:H7 in Raw Ground Beef†. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1663–1669. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.7.1663>
- Grunert, T., Stephan, R., Ehling-Schulz, M., & Jöhler, S. (2016). Fourier Transform Infrared Spectroscopy enables rapid differentiation of fresh and frozen/thawed chicken. *Food Control*, 60, 361–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.016>
- Haberbeck, L. U., Wang, X., Michiels, C., Devlieghere, F., Uyttendaele, M., & Geeraerd, A. H. (2017). Cross-protection between controlled acid-adaptation and thermal inactivation for 48 *Escherichia coli* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.006>
- Hughes, J. M., Oiseth, S. K., Purslow, P. P., & Warner, R. D. (2014). A structural approach to understanding the interactions between colour, water-holding capacity and tenderness. *Meat Science*, 98(3), 520–532. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.022>

- Hui Y. H. (2012). *Handbook of MEAT AND MEAT PROCESSING* (second).
- James M. Jay, Martin J. Loessner, & David A. Golden. (2005). *Modern Food Microbiology* (Vol. 7). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/b100840>
- Juárez, M., Failla, S., Ficco, A., Peña, F., Avilés, C., & Polvillo, O. (2010). Buffalo meat composition as affected by different cooking methods. *Food and Bioproducts Processing*, *88*(2–3), 145–148. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2009.05.001>
- Kameník, J. (n.d.). *The microbiology of meat spoilage: a review*. [www.maso-international.cz](http://www.maso-international.cz)
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Issue 2, pp. 123–140). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karbowiak, M., Szymański, P., & Zielińska, D. (2023). Synergistic Effect of Combination of Various Microbial Hurdles in the Biopreservation of Meat and Meat Products— Systematic Review. In *Foods* (Vol. 12, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods12071430>
- Kfoury, M., Auezova, L., Greige-Gerges, H., & Fourmentin, S. (2015). Promising applications of cyclodextrins in food: Improvement of essential oils retention, controlled release and antiradical activity. *Carbohydrate Polymers*, *131*, 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.014>
- King, N. J., & Whyte, R. (2006). Does it look cooked? A review of factors that influence cooked meat color. In *Journal of Food Science* (Vol. 71, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00029.x>
- Kotronia, M., Kavetsou, E., Loupassaki, S., Kikionis, S., Vouyiouka, S., & Detsi, A. (2017). Encapsulation of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil in  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD): Synthesis and characterization of the inclusion complexes. *Bioengineering*, *4*(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030074>
- Koutsoumanis, K., & Taoukis, P. S. (2005). 23 - Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (pp. 503–561). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845691028.2.503>
- Kurkov, S. V., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 453, Issue 1, pp. 167–180). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>
- Lahmar, A., Akcan, T., Chekir-Ghedira, L., & Estévez, M. (2018a). Molecular interactions and redox effects of carvacrol and thymol on myofibrillar proteins using a non-destructive and solvent-free methodological approach. *Food Research International*, *106*, 1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.039>
- Lahmar, A., Akcan, T., Chekir-Ghedira, L., & Estévez, M. (2018b). Molecular interactions and redox effects of carvacrol and thymol on myofibrillar proteins using a non-destructive and solvent-free methodological approach. *Food Research International*, *106*, 1042–1048. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.039>



- Leistner L. (1994). *Further Developments in the Utilization of Hurdle Technology for Food Preservation*.
- Leo M.L. Nollet, & Fidel Toldrá. (2008). *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis* (Leo M.L. Nollet & Fidel Toldrá, Eds.; 1st ed.). CRC Press.  
<https://www.routledge.com/Handbook-of-Processed-Meats-and-Poultry-Analysis/Nollet-Toldra/p/book/9781420045314>
- Li, D., Zhu, Z., & Sun, D. W. (2018). Effects of freezing on cell structure of fresh cellular food materials: A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 75, pp. 46–55). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.019>
- Lionberg, W. C., Restaino, L., Frampton, E. W., & Barbour, W. M. (2003). Efficacy of Enrichment Broths in the Recovery of Freeze-Injured *Escherichia coli* O157:H7 in Inoculated Ground Beef by PCR. In *Journal of Food Protection* (Vol. 66, Issue 10).
- Liu, J., Cao, Y., Wang, Q., Pan, W., Ma, F., Liu, C., Chen, W., Yang, J., & Zheng, L. (2016). Rapid and non-destructive identification of water-injected beef samples using multispectral imaging analysis. *Food Chemistry*, *190*, 938–943.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.056>
- Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. C. S., Shoyer, B., Phillips, J., Chen, V., Eblen, D. R., Cook, L. V., Mohr, T. B., Esteban, E., & Bauer, N. (2013). Fate of Shiga Toxin--Producing O157:H7 and Non-O157:H7 *Escherichia coli* Cells within Refrigerated, Frozen, or Frozen Then Thawed Ground Beef Patties Cooked on a Commercial Open-Flame Gas or a Clamshell Electric Grill†. *Journal of Food Protection*, *76*(9), 1500–1512.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-432>
- Lyon, B. G., Berry, B. W., Soderberg, D., & Clinch, N. (2000). Visual Color and Doneness Indicators and the Incidence of Premature Brown Color in Beef Patties Cooked to Four End Point Temperatures. In *Journal of Food Protection* (Vol. 63, Issue 10).
- Manios, S. G., & Skandamis, P. N. (2015). Effect of frozen storage, different thawing methods and cooking processes on the survival of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in commercially shaped beef patties. *Meat Science*, *101*, 25–32.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.031>
- Marinelli, L., Di Stefano, A., & Cacciatore, I. (2018). Carvacrol and its derivatives as antibacterial agents. *Phytochemistry Reviews*, *17*(4), 903–921.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-018-9569-x>
- Meneses, R., & Teixeira, P. (2022). Marination as a Hurdle to Microbial Pathogens and Spoilers in Poultry Meat Products: A Brief Review. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 12, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/app122211774>
- Motta Felício, I., Limongi de Souza, R., de Oliveira Melo, C., Gervázio Lima, K. Y., Vasconcelos, U., Olímpio de Moura, R., & Eleamen Oliveira, E. (2021). Development and characterization of a carvacrol nanoemulsion and evaluation of its antimicrobial activity against selected food-related pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, *72*(3), 299–306. <https://doi.org/10.1111/lam.13411>

- Mukherjee, A., Yoon, Y., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2008). Thermal Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Treated with Marination and Tenderization Ingredients. In *Journal of Food Protection* (Vol. 71, Issue 7).
- Murbach Teles Andrade, B. F., Nunes Barbosa, L., Da Silva Probst, I., & Fernandes Júnior, A. (2014). Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>
- Nørnung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, 78(1–2), 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.032>
- Olaoye, O. A., & Olaoye, O. A. (2011). MiniReview Meat: An overview of its composition, biochemical changes and associated microbial agents. In *International Food Research Journal* (Vol. 18, Issue 3). <https://www.researchgate.net/publication/277018609>
- Oz, F., Aksu, M. I., & Turan, M. (2017). The Effects of Different Cooking Methods on Some Quality Criteria and Mineral Composition of Beef Steaks. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13008>
- Pennington, H. (2010). *Escherichia coli* O157. In *The Lancet* (Vol. 376, Issue 9750, pp. 1428–1435). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60963-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60963-4)
- Qin, J., Chao, K., Kim, M. S., Lu, R., & Burks, T. F. (2013). Hyperspectral and multispectral imaging for evaluating food safety and quality. In *Journal of Food Engineering* (Vol. 118, Issue 2, pp. 157–171). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.04.001>
- Rani, Z. T., Hugo, A., Hugo, C. J., Vimiso, P., & Muchenje, V. (2017). Effect of post-slaughter handling during distribution on microbiological quality and safety of meat in the formal and informal sectors of South Africa: A review. *South African Journal of Animal Science*, 47(3), 255–267. <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i3.2>
- Rathod, N. B., Kulawik, P., Ozogul, F., Regenstein, J. M., & Ozogul, Y. (2021). Biological activity of plant-based carvacrol and thymol and their impact on human health and food quality. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 116, pp. 733–748). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.023>
- Ro, E. Y., Ko, Y. M., & Yoon, K. S. (2015). Survival of pathogenic enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and control with calcium oxide in frozen meat products. *Food Microbiology*, 49, 203–210. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.02.010>
- Rodríguez-López, M. I., Mercader-Ros, M. T., Pellicer, J. A., Gómez-López, V. M., Martínez-Romero, D., Núñez-Delicado, E., & Gabaldón, J. A. (2020). Evaluation of monoterpene-cyclodextrin complexes as bacterial growth effective hurdles. *Food Control*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106814>
- Ropodi, A. I., Pavlidis, D. E., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2015). Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. *Food Research International*, 67, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.032>
- Rostami, Z., Ahmad, M. A., Khan, M. U., Mishra, A. P., Rashidzadeh, S., & Shariati, M. A. (2016). Food preservation by hurdle technology: A review of different hurdle and

- interaction with focus on foodstuffs. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4), 2633–2639. <https://doi.org/10.22207/JPAM.10.4.20>
- Shao, L., Sun, Y., Zou, B., Zhao, Y., Li, X., & Dai, R. (2023). Sublethally injured microorganisms in food processing and preservation: Quantification, formation, detection, resuscitation and adaption. *Food Research International*, 165, 112536. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112536>
- Shen, C., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2011). Thermal inactivation of acid, cold, heat, starvation, and desiccation stress-adapted *Escherichia coli* O157:H7 in moisture-enhanced nonintact beef. *Journal of Food Protection*, 74(4), 531–538. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-430>
- Sofos, J. N. (2013). Meat and Meat Products. In *Food Safety Management: A Practical Guide for the Food Industry* (pp. 119–162). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00006-8>
- Stoica, M., Stoean, S., & Alexe, P. (2014). *Overview of biological hazards associated with the consumption of the meat products* (Vol. 20, Issue 2). <http://>
- Trevisani, M., Fedrizzi, G., & Diegoli, G. (2018). Chemical hazards in meat and associated monitoring activities. In *Chemical hazards in foods of animal origin* (pp. 315–340). Brill | Wageningen Academic. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3\\_13](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3_13)
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 12, Issue 1, pp. 40–53). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R. K., & Kumar, A. (2015). Essential Oils as Natural Food Antimicrobial Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(10), 1320–1323. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.692127>
- Welinder-Olsson, C., & Kaijser, B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). In *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* (Vol. 37, Issues 6–7, pp. 405–416). <https://doi.org/10.1080/00365540510038523>
- Yang, D., Lu, A., Ren, D., & Wang, J. (2018). Detection of total viable count in spiced beef using hyperspectral imaging combined with wavelet transform and multiway partial least squares algorithm. *Journal of Food Safety*, 38(1). <https://doi.org/10.1111/jfs.12390>
- Zhang, R., Lan, L., & Shi, H. (2021). Sublethal injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing. *Food Control*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107488>
- Zheng-Yu Jin. (2013). *Cyclodextrin Chemistry*.
- Zhu, G., Zhu, G., & Xiao, Z. (2019). A review of the production of slow-release flavor by formation inclusion complex with cyclodextrins and their derivatives. In *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* (Vol. 95, Issues 1–2, pp. 17–33). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10847-019-00929-3>