



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ. ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

“ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ”

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

“Μελέτη της επίδρασης του ερυθρού οίνου και του αιθερίου ελαίου του θυμαριού στην μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης”



Βασίλης Ηλιόπουλος

Αθήνα 2010



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ. ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ

“ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ”

ΚΛΑΔΟΣ ΙΙΙ: ΜΕΛΕΤΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακή διατριβή

του

Βασίλη Ηλιόπουλου

“Μελέτη της επίδρασης του ερυθρού οίνου και του αιθερίου ελαίου του θυμαριού στην μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης”

Πενταμελής εξεταστική επιτροπή:

Εισηγητής: Χαρουτουνιάν Σέρκος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μέλη: Νυχάς Γιώργος-Γιάννης, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Κωνσταντίνου Βιολέτα, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Μπεθάνης Κωνσταντίνος, Λέκτορας Γ.Π.Α.

Σκανδάμης Παναγιώτης, Λέκτορας Γ.Π.Α.

Αθήνα 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	3
Στόχοι διατριβής	4
Abstract	6
Εισαγωγή	8
1.1 Γενικά	9
1.2 Συντήρηση τροφίμων	10
1.3 Αντιμικροβιακά συστήματα φυτικής προέλευσης	12
1.3.1 Φαινολικά παράγωγα	13
1.3.1.1 Αντιμικροβιακά φαινολικά παράγωγα	18
1.3.1.2 Φαινολικά παράγωγα με δευτερεύουσα αντιμικροβιακή δράση	19
1.3.1.3 Φαινολικά οξέα και φαινυλοπροπανοειδή	20
1.3.1.4 Φλαβονοειδή	23
1.3.1.5 Πολυμερείς φαινολικά (ταννίνες, λιγνίνες, μελανίνες)	25
1.4 Αιθέρια έλαια	26
1.4.1 Παραλαβή αιθερίων ελαίων από τα φυτά	31
1.4.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου	33
1.4.3 Αντιμικροβιακή δράση αιθερίων ελαίων	34
1.4.4 Αιθέριο έλαιο θυμαριού	40
1.4.5 Νομοθεσία	41
1.5 Κρασί	44
1.5.1 Οινοποίηση	46
1.5.2 Σύσταση των ερυθρών οίνων	48
1.5.2.1 Οργανικά οξέα	49
1.5.2.2 Αλκοόλες	49
1.5.2.3 Φαινολικες ενώσεις	49
1.6 Κρέας	50
1.6.1 Βασικές αρχές μικροβιακής αλλοίωσης κρέατος	53
1.6.2 Μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος	55
1.6.3 Συσκευασία κρέατος σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες	56
1.6.3.1 Συσκευασία σε κενό	57
1.6.3.2 Συσκευασία κρέατος σε μείγματα αερίων	57
1.6.3.2.1 Αέρια συσκευασίας κρέατος	57
1.7 Υγιεινή και ασφάλεια του κρέατος	58
1.8 Μαρινάρισμα	60

Υλικά και μέθοδοι	61
2.1 Στόχοι της εργασίας	62
2.2 Παραλαβή του αιθέριου ελαίου θυμαριού	62
2.3 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου θυμαριού	63
2.3.1 Γραμμικός Δείκτης Κατακράτησης (Linear Retention Index-LRI)	66
2.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών σε ερυθρό οίνο	67
2.5 Μεταχείριση δειγμάτων κρέατος	69
2.6 Παρασκευή εμβολίου	70
2.7 Εμβολιασμός δειγμάτων	70
2.8 Παρασκευή διαλυμάτων μαρινάδας	71
2.9 Διαδικασία μαριναρίσματος	71
2.10 Συσκευασία δειγμάτων	71
2.11 Καταμέτρηση μικροβιακού πληθυσμού	72
2.12 Προσδιορισμός pH	74
Αποτελέσματα	75
3.1 Σύσταση αιθέριου ελαίου θυμαριού	76
3.2 Πολυφαινολικό περιεχόμενο ερυθρού οίνου	78
3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις-φυσικοχημικές αναλύσεις	78
3.3.1 Αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα	78
3.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	81
Συζήτηση-Συμπεράσματα	94
4.1 Γενικά	95
4.2 Αυτόχθονη μικροχλωρίδα	95
4.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	98
4.4 Συμπεράσματα	100
Βιβλιογραφία	102

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών με τίτλο: "Θετικές Επιστήμες στη Γεωπονία", Κλάδος ΙΙΙ: "Μελέτη και Αξιοποίηση Φυσικών Προϊόντων".

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον Καθηγητή Σέρκο Χαρουτουγιάν του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας, επιβλέποντα αυτής της μελέτης, για την σημαντική συμβολή του ιδιαίτερα στη συγγραφή της παρούσας μελέτης.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Καθηγητή Γιώργο-Γιάννη Νυχά διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων για την δυνατότητα που μου έδωσε να εκτελέσω το πειραματικό κομμάτι της μεταπτυχιακής μου διατριβής στο εργαστήριο του οποίου προΐσταται, αλλά και την εν γένει βοήθεια και συνεισφορά επί σειρά ετών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ασπασία Νησιώτου Διδάκτορα Γ.Π.Α, την Όλγα Χονδροδήμου Γεωπόνο Γ.Π.Α, την Χρυσανγή Γαρδέλη Διδάκτορα Γ.Π.Α, και τον Αθανάσιο Μαλούχο Διδάκτορα Γ.Π.Α για την σημαντική συμβολή τους στην διενέργεια της παρούσας μελέτης.

Abstract

Aim of the present thesis was to delineate the effect of wine marination with or without the addition of thyme essential oil on indigenous spoilage microflora of veal meat and the pathogenic micro-organism *Listeria monocytogenes*.

The effect of marination on spoilage and safety of the final product was exploited at two different storage temperatures (5⁰C and 15⁰C) and two packaging conditions (air and modified atmosphere-25% CO₂-75% air).

The performed experiments refer to the measurements of indigenous spoilage microflora (TVC, lactic acid bacteria, pseudomonas, and enterobacteriaceae) and the population of the pathogenic micro-organism *Listeria monocytogenes*. In this context, the microbiological quality of various veal samples treated with red wine and the addition of thyme essential oil was studied and compared to blank samples. The essential oil and red wine content were determined using GC-MS and HPLC instruments respectively.

The following results were obtained:

- Packaging with modified atmosphere (25% CO₂-75% air) affected negatively the *Pseudomonas sp.* growth rate. This effect was enhanced at 5⁰C.
- The storage temperature had no significant effect on the indigenous microflora population. On the contrary, the storage temperature was affected *Listeria monocytogenes* population at 15⁰C.
- The red wine (variety Mandilaria) used in the present study was mainly consisted by gallic acid, catechin, epicatechin, procyanidin and secondarily by caffeic, syrigic and p-coumaric acid.
- Marination with red wine affected negatively the growth rate of both indigenous microflora and *Listeria monocytogenes* at 5⁰C. The effect was enhanced when modified atmosphere packaging was applied.
- The thyme essential oil used was mainly composed by thymol and carvacrol.

- Marination with red wine and 0.3% thyme essential oil resulted in no growth of indigenous microflora and the death of *Listeria monocytogenes* under all temperature and packaging conditions.

In conclusion, wine marination that constitutes a useful method for the meat tenderness improvement and flavoring was also found to increase the shelf life and safety of meat products, especially when is combined with thyme essential oil.

Στόχοι της διατριβής

Σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη της επίδρασης του μαριναρίσματος με τη χρήση κρασιού ή σε συνδυασμό με το αιθέριο έλαιο του θυμαριού, αφενός στην αυτόχθονη μικροχλωρίδα του μοσχαρίσιου κρέατος και αφετέρου στον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*.

Οι μετρήσεις της διατριβής πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας συντήρησης (5⁰C και 15⁰C) και δύο διαφορετικές ατμόσφαιρες (αέρας και τροποποιημένη ατμόσφαιρα με σύσταση 25% CO₂-75% αέρας). Σε όλες τις παραπάνω συνθήκες αξιολογήθηκε κατά πόσο το μαρινάρισμα επιδρά στη μικροβιακή κατάσταση του κρέατος και συνεπώς κατά πόσο επηρεάζεται η διάρκεια συντήρησης ή/και η ασφάλεια του.

Αναλυτικότερα η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε τη μελέτη της συμπεριφοράς αφενός της αυτόχθονης αλλοιογόνου μικροχλωρίδας (OMX, γαλακτικά βακτήρια, ψευδομονάδες, εντεροβακτήρια) και αφετέρου του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* με τον οποίο εμβολιάστηκαν τα δείγματα του κρέατος. Στο πλαίσιο αυτό μελετήθηκε η μικροβιακή κατάσταση δειγμάτων χωρίς μαρινάρισμα (μάρτυρας), δειγμάτων μαριναρισμένων με κόκκινο κρασί και τέλος δειγμάτων μαριναρισμένων με κόκκινο κρασί και αιθέριο έλαιο θυμαριού. Εκτός από τις μικροβιολογικές αναλύσεις έγινε και ανάλυση του αιθερίου ελαίου του θυμαριού και του ερυθρού οίνου για να προσδιοριστεί η ακριβής σύσταση τους.

Συνοπτικά, τα ευρήματα της μελέτης είναι:

- Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (25% CO₂-75% αέρας) έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης του πληθυσμού των ψευδομονάδων (κυρίαρχου αερόβιου μικροοργανισμού), κυρίως στη θερμοκρασία των 5⁰C.
- Η θερμοκρασία συντήρησης δεν έχει σημαντική επίδραση στον τελικό πληθυσμό της ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Αντίθετα επηρεάζει σημα-

ντικά τον πληθυσμό της *Listeria monocytogenes* ο οποίος ήταν πολύ μεγαλύτερος στη θερμοκρασία των 15⁰C.

- Ο ερυθρός οίνος που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη (ποικιλία Μανδηλαριά) προσδιορίστηκε ότι περιέχει κυρίως γαλλικό οξύ, κατεχίνη, επικατεχίνη, προκυανιδίνη και δευτερευόντως καφεϊκό, συριγγικό και π-κουμαρικό οξύ, συστατικά που παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση.
- Το μαρινάρισμα με κόκκινο κρασί έδειξε ότι δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη τόσο της αυτόχθονης μικροχλωρίδας όσο και της *Listeria monocytogenes* κυρίως στους 5⁰C. Η δράση αυτή είναι ιδιαίτερα αυξημένη όταν συνδυαστεί με συντήρηση στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα που χρησιμοποιήθηκε για τους πειραματισμούς.
- Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού της μελέτης βρέθηκε ότι αποτελείται κατά κύριο λόγο από θυμόλη και καρβακρόλη, μόρια με σημαντική σύμφωνα με την βιβλιογραφία αντιμικροβιακή δράση.
- Η προσθήκη αιθερίου ελαίου θυμαριού στο μαρινάρισμα με κόκκινο κρασί είχε αισθητά μεγαλύτερη επίδραση στην αυτόχθονη μικροχλωρίδα σε σύγκριση με τη χρήση μόνο κόκκινου κρασιού. Επιπλέον, στην περίπτωση της *Listeria monocytogenes* οδήγησε στη θανάτωση της (μείωση στο όριο ανίχνευσης) σε όλες τις θερμοκρασίες και ατμόσφαιρες συντήρησης που εφαρμόστηκε.

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το μαρινάρισμα με κόκκινο κρασί ενδείκνυται όχι μόνο για τη βελτιστοποίηση της υφής και της γεύσης του κρέατος, όπως παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως σήμερα, αλλά και για την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης και τη μεγιστοποίηση της ασφάλειας του, ιδίως όταν συνδυάζεται με τη χρήση του αιθερίου ελαίου του θυμαριού.

Κεφάλαιο 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά

Η φύση υπήρξε πάντοτε πλούσια πηγή χημικών ενώσεων με ποικίλες βιολογικές δράσεις, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν και χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο για την επίλυση διαφόρων καθημερινών προβλημάτων και την κάλυψη ποικίλων ζωτικών του αναγκών.

Παρόλο που ετυμολογικά ο όρος φυσικά προϊόντα παραπέμπει σε όλες τις χημικές ενώσεις που απαντούν στη φύση, ανόργανες και οργανικές, έχει καθιερωθεί η έννοια αυτή να προσδιορίζει ενώσεις που αναφέρονται στους ζωντανούς οργανισμού. Για παράδειγμα το πετρέλαιο δεν θεωρείται φυσικό προϊόν παρότι η δημιουργία του οφείλεται στην επίδραση υψηλών θερμοκρασιών και πιέσεων σε ουσίες που προέρχονται από ζωντανούς οργανισμούς (*Ραγκούση 1996*).

Η φύση που περιβάλλει τον άνθρωπο με τα προϊόντα της, αποτέλεσε το βασικό ερέθισμα για την ανάπτυξη της Χημείας, με απώτερο στόχο την εκμετάλλευση του τεράστιου (ποιοτικά και ποσοτικά) πλούτου των φυσικών χημικών ενώσεων. Η απομόνωση χρωστικών, αρωμάτων, φαρμακευτικών και άλλων ουσιών από εύκολα προσβάσιμες πηγές, όπως για παράδειγμα τα φυτά, είναι μια διαδικασία η οποία ξεκίνησε από τα πρώτα χρόνια της ανθρώπινης ιστορίας. Παρόλη την πρόοδο της συνθετικής Χημείας ακόμα και σήμερα πολλές από τις ενώσεις που καθημερινά χρησιμοποιεί ο άνθρωπος είναι φυσικής προέλευσης.

Μια ταξινόμηση των φυσικών προϊόντων μπορεί να γίνει στα: α) θεμελιώδη λειτουργικά συστατικά όλων των οργανισμών, δηλαδή τα προϊόντα πρωτογενούς μεταβολισμού όπως υδατάνθρακες, αμινοξέα, λίπη, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα κλπ, και β) προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού όπως φαινολικά παράγωγα, τερπένια, στεροειδή, αλκαλοειδή και ποικίλα ετεροκυκλικά μόρια.

Στο χημικό μονοπάτι μεταξύ πρωτογενούς και δευτερογενούς μεταβολισμού παρεμβάλλονται και άλλα μόρια ως πρόδρομα των δευτερογενών μεταβολιτών. Σήμερα ο όρος φυσικά προϊόντα εστιάζεται κυρίως στα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού (*Ραγκούση 1996*).

Η εμφάνιση με το πέρασ του χρόνου διαφόρων προβλημάτων τόσο στο περιβάλλον (ρύπανση, εξάντληση φυσικών πόρων, κλπ), όσο και στη ζωή του ανθρώπου (προβλήματα υγείας διατροφής, κλπ) έχει οδηγήσει σε νέα δεδομένα που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την απρόσκοπτη συνέχεια της ζωής. Η προσπάθεια για εξεύρεση λύσης σε προβλήματα όπως η διαχείριση των απορριμμάτων, η παραγωγή βιολογικών

προϊόντων, η αντικατάσταση των μη συμβατών, φιλικών και αφομοιώσιμων από το περιβάλλον ουσιών, περνά κατά ένα μεγάλο μέρος μέσα από την περαιτέρω ανάπτυξη και διεύρυνση της χρήσης των φυσικών προϊόντων.

Η Ελλάδα ως χώρα είναι από πολλές απόψεις σε πλεονεκτική θέση. Διαθέτει πολύ μεγάλη βιοποικιλότητα με μακρά παράδοση από την οποία δεν έχει τελείως αποκοπεί. Τα δεδομένα αυτά συμβαδίζουν πολλές φορές με σημαντικά αποτελέσματα, ιδιαίτερα στον τομέα των τροφίμων όπου ο παραπάνω συγκερασμός είναι ιδιαίτερα εμφανής. Η μεσογειακή διατροφή, της οποίας τα πλεονεκτήματα όλο και περισσότερο αναγνωρίζονται (κυρίως όσον αφορά τις ευεργετικές τις δράσεις στην υγεία του ανθρωπίνου οργανισμού), αποτελεί το τέλειο παράδειγμα για την αρμονική συνύπαρξη του φυσικού με το παραδοσιακό.

Επιπλέον στην εποχή της παγκοσμιοποίησης η αξιοποίηση της φύσης και της παράδοσης αποτελεί πράξη μείζονος σημασίας για τη διατήρηση της εθνικής ταυτότητας και την αύξηση της ανταγωνιστικότητας των ελληνικών προϊόντων. Επίσης συμβάλλει στη διατήρηση της τοπικής κουλτούρας και μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη με αποτέλεσμα την οικονομική και κοινωνική άνθηση περιοχών που μέχρι πρότινος είχαν οδηγηθεί στο μαρασμό.

Στην μελέτη αυτή εξετάστηκε η χρήση δυο φυσικών προϊόντων, του κρασιού και του αιθερίου ελαίου θυμαριού, για την παρασκευή και συντήρηση ενός τρίτου φυσικού προϊόντος, του κρέατος. Τα προϊόντα αυτά και ειδικά το κρασί και το κρέας, αποτελούν αναπόσπαστα στοιχεία όχι μόνο της ελληνικής αλλά της παγκόσμιας διατροφής.

1.2 Συντήρηση τροφίμων

Τα τρόφιμα αποτελούν ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, στο οποίο η συμπεριφορά (ανάπτυξη / επιβίωση/ θάνατος) των μικροοργανισμών είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων. Η θερμοκρασία, η απουσία/παρουσία οξυγόνου, η υγρασία, το pH, τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και η παρουσία τοξικών προϊόντων μικροβιακού μεταβολισμού, είναι μερικοί από τους κυρίαρχους ρυθμιστικούς παράγοντες της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών.

Οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, ανάλογα με τον βαθμό επικινδυνότητας, σε: (α) παθογόνους, οι οποίοι είτε με την παρουσία τους ή/και την παραγωγή τοξινών προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις, και (β) αλλοιογό-

νους, οι οποίοι είναι συνήθως αβλαβείς για τον άνθρωπο όμως προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των τροφίμων.

Το πρόβλημα της αλλοίωσης των τροφίμων έχει απασχολήσει τον άνθρωπο από τα αρχαία χρόνια. Αρχικά, η συντήρηση των τροφίμων εξασφαλιζόταν αποκλειστικά με τη χρήση φυσικών προϊόντων, όπως ο υποκαπνισμός, η προσθήκη ζάχαρης, άλατος, καρυκευμάτων, χωρίς όμως να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός της προστασίας που παρείχαν στα τρόφιμα (*Dziezak, 1989*). Σήμερα, το θέμα της συντήρησης των τροφίμων είναι πολύπλοκο αφού στην αγορά εμφανίζονται συνεχώς νέα προϊόντα, τα οποία οι καταναλωτές απαιτούν να είναι απολύτως ασφαλή από μικροβιολογικούς κινδύνους έχοντας παράλληλα δεχθεί όσον το δυνατόν μικρότερη επεξεργασία. Επιπλέον να μην περιέχουν συντηρητικά και να είναι υψηλής διατροφικής και οργανοληπτικής αξίας.

Οι μέθοδοι συντήρησης αποσκοπούν στον έλεγχο των παθογόνων και τη διατήρηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο χαμηλότερο δυνατό επίπεδο. Στη βιομηχανία τροφίμων, η παραγωγή προϊόντων με υψηλό επίπεδο υγιεινής και ποιότητας εξασφαλίζεται αφενός με τη λήψη προληπτικών μέτρων κατά την παραγωγική διαδικασία και αφετέρου με τη διεξαγωγή τακτικού μικροβιακού ελέγχου στις πρώτες ύλες, την διαδικασία παραγωγής και το τελικό προϊόν. Οι φυσικοχημικές παράμετροι (π.χ pH, a_w) και η θερμοκρασία αποθήκευσης των τροφίμων είναι μερικοί από τους κυρίαρχους παράγοντες που καθορίζουν ποιοι μικροοργανισμοί από την αρχική χλωρίδα του τροφίμου θα επιβιώσουν και θα αναπτυχθούν. Παράλληλα, οι εφαρμοζόμενες κατεργασίες κατά τη διαδικασία παραγωγής (αποστείρωση, παστερίωση, ακτινοβόληση, συσκευασία) επιδρούν στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των τροφίμων εντείνοντας τη δράση των παραγόντων που περιορίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Οι παραπάνω παράγοντες αποτελούν τα λεγόμενα «εμπόδια» (*Leistner, 1985*). Επομένως, η μικροβιακή κατάσταση ενός τροφίμου μετά την παραγωγή του, είναι ανά πάσα στιγμή συνάρτηση του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού, των εφαρμοζόμενων διεργασιών συντήρησης και των συνθηκών αποθήκευσης (*Roberts, 1989*).

Οι χρησιμοποιούμενες κατεργασίες συνήθως παρέχουν μία πρόσκαιρη μικροβιακή προστασία, η οποία εάν δεν συνοδεύεται από τις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης μειώνεται σταδιακά με την έκθεση του τροφίμου στον αέρα. Με απώτερο σκοπό την αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων, η ανάγκη εύρεσης δραστικότερων μεθόδων καταστροφής, περιορισμού ή παρεμπόδισης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών αποτελεί επιτακτική ανάγκη για τους χώρους παραγωγής τροφίμων, υπό

την προϋπόθεση βέβαια ότι χρησιμοποιούνται πρώτες ύλες υψηλής ποιότητας με χαμηλό μικροβιακό φορτίο (Roberts, 1989). Η έρευνα προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση κατέληξε στην επιλογή ποικίλων φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών, που είτε μόνα ή σε συνδυασμό με τις κλασικές μεθόδους συντήρησης, εξασφαλίζουν υψηλή προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς και μεγαλύτερη αντοχή στη δράση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών (Gould, 1996). Η χρήση των αντιμικροβιακών πρόσθετων εξαρτάται άμεσα από:

- (α) το επιθυμητό αποτέλεσμα, δηλαδή την παρεμπόδιση ή τη θανάτωση των μικροοργανισμών
- (β) το είδος του μικροοργανισμού για τον οποίο προορίζεται
- (γ) το μέγεθος και το εύρος της παρεμπόδισης που διαθέτει το αντιμικροβιακό συστατικό
- (δ) τις νομοθετικές ρυθμίσεις που αφορούν τη χρήση πρόσθετων στα τρόφιμα.

1.3 Αντιμικροβιακά συστήματα φυτικής προέλευσης

Τον τελευταίο καιρό έχει ενταθεί σε μεγάλο βαθμό το ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίηση "φυσικών" συντηρητικών για την αντικατάσταση των έως σήμερα χρησιμοποιούμενων που κρίνονται είτε ως ύποπτα (όσον αφορά την επίδραση στον ανθρώπινο οργανισμό) ή δεν είναι πλέον αποδεκτά από τον καταναλωτή. Ως βασικό κριτήριο για την χρήση τους θα πρέπει να είναι η αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή τους δράση σε σχέση με τη θανάτωση των παθογόνων και την παρεμπόδιση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Πολλά μόρια φυτικής προέλευσης με αναγνωρισμένη αντιμικροβιακή δράση ενδεχομένως είναι ικανά να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται τα φαινολικά παράγωγα (φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, ανθοκυάνες, τανίνες), φυτικής ή χημικής προέλευσης, τα οργανικά οξέα (οξικό, γαλακτικό, κιτρικό) και ποικίλα αιθέρια έλαια φυτών. Τα τελευταία λαμβάνονται με απόσταξη μεθ' υδρατμών ή εκχύλιση από καρκεύματα, βότανα ή άλλα φυτά.

Η δράση όλων των αντιμικροβιακών συστημάτων κινείται στους παραπάνω τρεις άξονες: (α) επίδραση στην κυτταρική μεμβράνη με επακόλουθη αύξηση της διαπερατότητάς της, (β) αδρανοποίηση ενζύμων και (γ) καταστροφή ή λειτουργική αδρανοποίηση του γενετικού υλικού (Davidson and Branen, 1981; Denyer and Hugo, 1991; Sikkema et al., 1995).

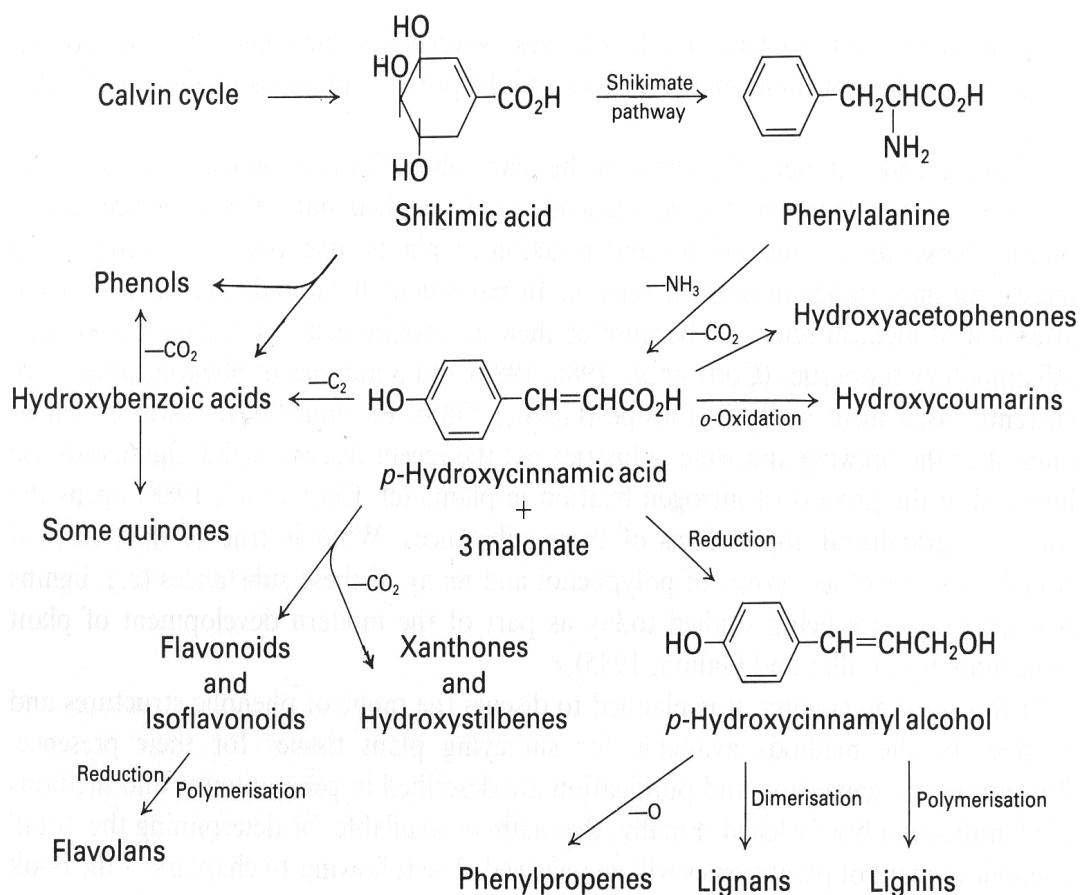
1.3.1 Φαινολικά παράγωγα

Ο όρος φυσικά φαινολικά παράγωγα περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό φυτικών μορίων που διαθέτουν στο μόριο τους τουλάχιστον έναν αρωματικό δακτύλιο που είναι υποκατεστημένος με μια ή περισσότερες υδροξυλομάδες (Πίνακας 1.1, Σχήμα 1.1-1.2). Οι κυριότερες κατηγορίες των φυτικών φαινολικών ενώσεων είναι:

- απλές μονοκυκλικές φαινόλες και φαινολικά οξέα
- φαινυλοπροπανοειδή
- φαινολικές κινόνες
- φλαβονοειδή
- πολυμερείς φαινολικές, όπως οι λιγνίνες οι μελανίνες και οι ταννίνες

Επιπλέον οι φαινόλες αποτελούν μέλη άλλων κατηγοριών μορίων όπως των αμινοξέων (τυροσίνη) και των τερπενοειδών (θυμόλη).

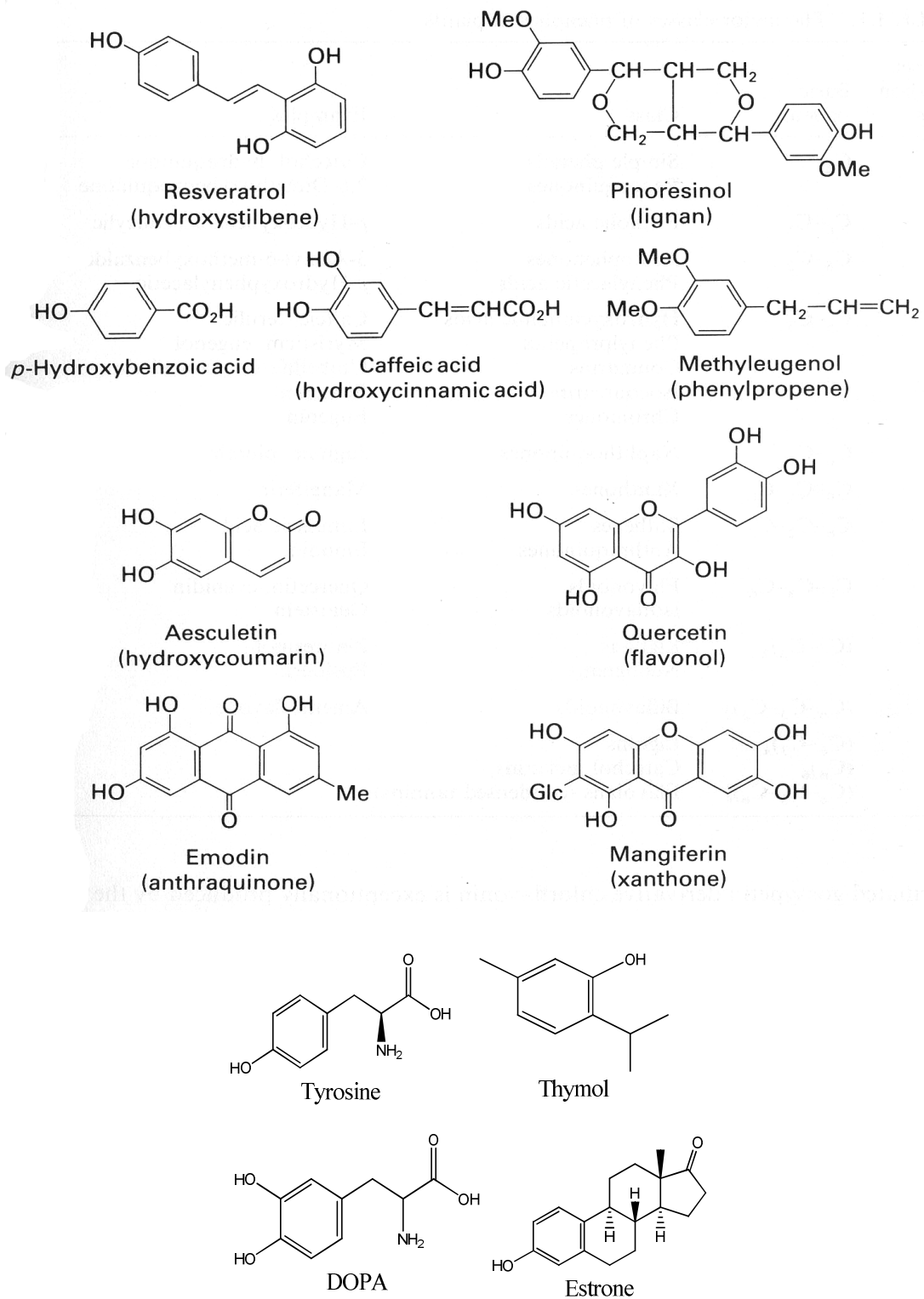
Σχήμα 1.1 Τα μεταβολικά μονοπάτια της παραγωγής των φαινολικών ενώσεων (Harborne 1980).



Πίνακας 1.1. Οι κυριότερες κατηγορίες φυτικών φαινολικών παραγώγων (*Harborne 1980*).

Αρ.ατ. C	Βασικός σκελετός	Τάξη - Κύριοι εκπρόσωποι
6	C ₆	<i>Απλές φαινόλες</i> : κατεχόλη, ουρισιόλη, βανιλίνη, θυμόλη, φλωρογλουκινόλη, καρβακρόλη. <i>Βενζοκινόνες</i> : υδροκινόνες, αρβουτίνη, πριμίνη 2,6-διμεθοξυβενζοκινόνη.
7	C ₆ -C ₇	<i>Φαινολικά οξέα</i> : υδροβενζοϊκό, πρωτοκατεχικό, βανιλλικό, συρινγικό, σαλικυλικό, γαλλικό, κινamikό, γεντισικό οξύ.
8	C ₆ -C ₂	<i>Ακετοφαινόλες</i> : βενζαλδεΐδη, κινamikή αλδ/δη, <i>Φαινολοξικό οξύ</i> : p-υδροξυφαινολοξικό οξύ.
9	C ₆ -C ₃	<i>Υδροξικινamikά οξέα</i> : κουμαρικό, καφεϊκό, σιναιτικό φερουλικό οξύ. <i>Φαινολοπροπένια</i> : χλωρογενικό οξύ, μυριστική, ευγενόλη. <i>Κουμαρίνες</i> : ουμπελιφερόνη, ασκολετίνη, σκοπολετίνη, ψοραλίνη, δαλ-βεργίνη, βεργαπτένη. <i>Ισοκουμαρίνες</i> : βεργενίνη, υδρανγενόλη. <i>Χρωμόνες</i> : ευγενίνη, κελίνη, βισναγίνη
10	C ₆ -C ₄	<i>Ναφθοκινόνες</i> : γιουγκλόνη
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	<i>Ξανθόνες</i> : μαγκκιφερίνη
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	<i>Στιλβένια</i> : λουνουλαρικό οξύ, αψισικό οξύ, μπατατασίνη, πευκοσιλβίνη, βινιφερίνη. <i>Ανθρακινόνες</i> : ανθραγαλλόλη, εμοδίνη, αλιζαρίνη, πουργουρίνη, παλμιδί-νη, υπεροσίνη.
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	<u>ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ</u> <i>Ανθοκάνες</i> : πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη <i>Φλαβονόλες</i> : καμφερόλη, κουερσετίνη μυρικετίνη <i>Φλαβόνες</i> : απιγενίνη, λουτεολίνη, τρισίνη <i>Χαλκόνες και χρυσόνες</i> : Χρυσίνη, μαρεΐνη <i>Φλαβανόνες & διυδροφλαβονόλες</i> : ναριγκινίνη, φλωριτζίνη, εριοδικτυό-λη, πευκοσεμβρίνη, κατεχίνη. <i>Ισοφλαβονοειδή</i> : λουτεόνη, ροτεόνη, γενιστεΐνη. <i>Προανθοκυανιδίνες</i>
N	(C ₆ -C ₃) _n (C ₆) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	<i>Λιγνίνες</i> <i>Μελανίνες</i> <i>Φλαβολάνια (συμπ/νες ταννίνες)</i>

Σχήμα 1.2 Δομές φαινολικών ενώσεων (Harborne, 1980).



Λόγω της μεγάλης δραστηριότητας, τα φαινολικά παράγωγα σπάνια απαντώνται στους ζώντες φυτικούς ιστούς σε ελεύθερη μορφή (*Harborne, 1980*). Βρίσκονται σχεδόν πάντοτε σε συζευγμένη μορφή α) με σάκχαρα, β) με αλκυλομάδες, γ) με οργανικά οξέα ως εστέρες, δ) με θειικά ιόντα και ε) με άλλα οργανικά μόρια όπως οργανικά οξέα, αμίνες, λιπίδια και τερπενοειδή. Τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και κυρίως το καφεϊκό το φερούλικό και το κουμαρικό οξύ, είναι τα φαινολικά παράγωγα που απαντώνται με τις περισσότερες συζευγμένες μορφές (Πίνακας 1.2). Επιπλέον η προσθήκη ενός λιπόφιλου συστατικού στον αρωματικό δακτύλιο των φαινολών δημιουργεί λιποδιαλυτά παράγωγα. Οι συνηθέστεροι λιπόφιλοι υποκατάστατες είναι οι μεθυλομάδες, οι μεθυλενοδιοξυ-ομάδες και οι ισοπρενοειδείς ενώσεις. Η αντικατάσταση του όξινου υδρογόνου του αρωματικού τους δακτυλίου με μεθυλενομάδες μετριάζει τη δραστηριότητα των φαινολών και τις καθιστά περισσότερο πτητικές, οπότε παραλαμβάνονται με απόσταξη μεθ' υδρατμών. Αντίθετα, η σύζευξη τους με ισοπρενοειδή, όπως για παράδειγμα την λουτεόνη (6-ισοπεντενυλ-7,7,2,4-τετραυδροξυισοφλαβόνη) συνήθως αυξάνει τη βιολογική τους δραστηριότητα. Τα λιποδιαλυτά παράγωγα βρίσκονται κυρίως στο κηρώδες περίβλημα των φύλλων.

Τα υποκατεστημένα με θειικά ιόντα φλαβονοειδή αποτελούν μία άλλη συζευγμένη μορφή φαινολικών παραγώγων, η οποία συναντάται συχνά στα φυτικά είδη. Περίπου 50 τύποι της κατηγορίας αυτής έχουν αναγνωρισθεί σε παραπάνω από 200 είδη από 20 διαφορετικές οικογένειες. Μερικά από αυτά περιέχουν εκτός των θειικών ιόντων και σάκχαρα, αλλά στην πλειονότητα τους είναι υποκατεστημένα με δι-σουλφιδικές ομάδες.

Η παραδοσιακή χρήση της φαινόλης ως αντιμικροβιακού παράγοντα έχει σταδιακά αντικατασταθεί από τη χρήση φαινολικών παραγώγων, τα οποία είναι περισσότερο αποτελεσματικά και λιγότερο τοξικά. Σήμερα είναι γνωστά μια σειρά από φαινολικά παράγωγα που παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μικροβιακής ανάπτυξης των τροφίμων. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι κατηγορίες όλων των φαινολικών ενώσεων που παράγονται από τον μεταβολισμό των φυτικών ειδών (Πίνακας 1.2).

Πίνακας 1.2. Εστέρες των υδροξυκιναμωμικών οξέων στα φυτά (*Harborne, 1980*).

Είδος υποκαταστάτη	Υποκαταστάτης	Εστεροποιημένο υδροξυκιναμικό οξύ
Κυκλοεξάνιο	Κυναμικό οξύ	CAF : χλωρογενικό οξύ FER/COUM
Καρβοξυλικό οξύ	Σικιμικό οξύ	CAF/COUM
Κυκλιτόλη	m-ινοσιτόλη	COUM
Σάκχαρα	Γλυκόζη	CAF/FER/COUM
	Ραμνόζη	CAF
	Φρουκτόζη	COUM
Οργανικά οξέα	Ταρταρικό οξύ	CAF
	Μαλικό οξύ	CAF: φασελικό οξύ
Αμίνες	Ντοπαλδεΰδη	CAF
	DOPA	CAF
	Τρυπταμίνη	FER/COUM
	Πουτρεσκίνη	CAF/FER/COUM
	Χολίνη	SIN: Σιναπίνη /FER
	Λουπινίνη	COUM
Φαινολικά	Σαλισίνη	CAF
	3,4,-διυδροξυφαινυλ-γαλακτικό οξύ	CAF: Ροζμαρινικό οξύ
	Κυανιδίνη 3-γλυκοζίτης	COUM: Υακινθίνη
	καμφερόλη 3-γλυκοζίτης	COUM
Λιπίδια	Γλυκερόλη	CAF/COUM
Τερπενοειδή	Βορνεόλη	COUM
	α-βερμπεσινόλη	COUM
	καταλόλη	COUM
	κουερεταροϊκό οξύ	CAF

COUM = p-κουμαρικό, CAF = καφεϊκό, FER = φερουλικό, SIN = σιναπικό

Από τις φαινολικές ενώσεις ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τα τρόφιμα παρουσιάζουν οι εξής κατηγορίες.

- Φαινολικά παράγωγα με κύρια αντιμικροβιακή δράση.
- Φαινολικά παράγωγα με δευτερεύουσα αντιμικροβιακή δράση.
- Φαινολικά οξέα και φαινυλοπροπανοειδή.
- Φλαβονοειδή.
- Πολυμερή φαινολικά (ταννίνες, μελανίνες και λιγνίνες)

1.3.1.1 Αντιμικροβιακά φαινολικά παράγωγα

Τέσσερις είναι φαινολικές ενώσεις που σήμερα επιτρέπεται να προστεθούν ως συντηρητικά στα τρόφιμα: οι μεθυλ-, αιθυλ-, προπυλ- και επτυλ-εστέρες του παραϋδροξυβενζοϊκού οξέος (parabens). Οι εστέρες αυτοί παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι του βενζοϊκού οξέος αφού επηρεάζονται λιγότερο από το pH (αφού δρουν σε εύρος pH 3-8 (pH_{opt} βενζοϊκού 2,5-4)). Το ποσοστό των parabens που παραμένει δραστικό σε pH 6,0 είναι 65-70% σε σύγκριση με το αντίστοιχο του υδροξικού νατρίου (16%), το σορβικό οξύ (6%), και το βενζοϊκό νάτριο (1,8%). Επιπλέον έχουν ηπιότερη γεύση και μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην υδρόλυση που λαμβάνει χώρα κατά τη θερμική κατεργασία των τροφίμων. Όσον αφορά την αντιμικροβιακή τους δράση, οι μύκητες είναι περισσότερο ευαίσθητοι των Gram (+) βακτηριών και αυτά των Gram (-). Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των parabens είναι ανάλογη με το μήκος της αλυσίδας τους για τα Gram (+) βακτήρια, ενώ η διαλυτότητά τους αντιστρόφως ανάλογη. Τα Gram (-) λόγω της λιποπολυ/σακχαρικής τους εξωτερικής μεμβράνης εμφανίζονται περισσότερο ευαίσθητα στους μικρότερης αλυσίδας εστέρες.

Ερευνητικά αποτελέσματα στα φαινολικά παράγωγα έχουν δείξει ότι η δράση τους εντοπίζεται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες και σε μικρότερη έκταση σε βάρος ενζυμικών συστημάτων ή την καταστροφή του γενετικού υλικού. Το δραστικό τους τμήμα φαίνεται, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, να αποτελεί η υδροξυλομάδα (Nychas 1995).

Στη βιομηχανία τροφίμων τα parabens θεωρούνται ως ήπια και ασφαλή συντηρητικά (Generally Regarded As Safe). Κυρίως χρησιμοποιούνται οι μεθυλ- και προπυλ-εστέρες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος σε αναλογία 2-3:1, σε αεριούχα αναψυκτικά, φρουτοσαλάτες, χυμούς φρούτων, μαρμελάδες, ελιές, τουρσιά κτλ. Επίσης επιτρέπεται η χρήση του ν-επτυλεστέρα σε μύρτες, (έως 12ppm) και σε ορισμένα μη αεριούχα μαλακά ποτά και χυμούς φρούτων (έως 20ppm). Στην Αγγλία γίνεται χρήση

και του αιθυλεστέρα, ενώ η Ιαπωνία είναι η μόνη χώρα που επιτρέπει την προσθήκη του βουτυλεστέρα (*Chichester and Tanner, 1972*). Το ποσοστό με το οποίο προστίθενται τα parabens στα τρόφιμα καθορίζεται κυρίως από το είδος του τροφίμου, αρκεί πάντα να μην υπερβαίνει το 0,1% (*Davidson and Branden, 1980*). Σε πολύ λιπαρά τρόφιμα ενδείκνυται η προσθήκη όσο το δυνατόν υψηλότερης ποσότητας parabens. Παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματά τους, η περιορισμένη διαλυτότητα, η πικρή γεύση και το υψηλό κόστος τους αποτελούν προς το παρόν περιοριστικούς παράγοντες για την ευρεία χρήση τους (*Kabara, 1991*).

1.3.1.2 Φαινολικά παράγωγα με δευτερεύουσα αντιμικροβιακή δράση

Τα μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες είναι ενώσεις που εμποδίζουν την οξείδωση των λιπών καθώς και των τροφίμων που περιέχουν λιπαρά συστατικά. Η λειτουργία τους συνίσταται στην παροχή ατόμων υδρογόνου για τη διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης σχηματισμού ελευθέρων ριζών και εν συνεχεία υπεροξειδίων. Όμως αρκετά από τα μόρια αυτά διαθέτουν και αντιμικροβιακές ιδιότητες (*Chang and Branen, 1975*).

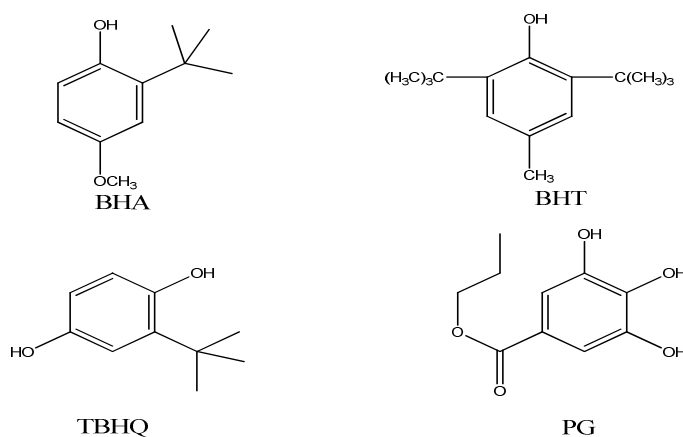
Οι κυριότερες φαινολικές αντιοξειδωτικές/αντιμικροβιακές ενώσεις (Σχήμα 1.3) που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία τροφίμων είναι: η βουτυλική υδροξυανισόλη (BHA), η βουτυλική υδροξυ-τολουόλη (BHT), η τετραβουτυλ-υδροκινόνη (TBHQ), και ο προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος (PG). Η παρεμποδιστική δράση τους έχει πιστοποιηθεί σε διάφορα βακτηρια όπως τα *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* κλπ, (*Davidson, 1997*). Τα Gram (+) βακτήρια αποδείχθηκαν περισσότερο ευαίσθητα από τα αρνητικά, με μοναδικές εξαιρέσεις τα Gram (-) *Ps. Fluorescens* και *Vibrio parahaemolyticus*. Συγκεντρώσεις TBHQ επιπέδου 300 ppm προκαλούν παράταση της φάσης προσαρμογής του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescens*, ενώ 100-200 ppm του ίδιου μορίου είναι ικανά να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη της μικροχλωρίδας σε φρέσκο κρέας καθώς και την αύξηση του *St. aureus* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ανασταλτική δράση των φαινολικών αντιοξειδωτικών στην παραγωγή των βακτηριακών τοξινών. Ποσότητες 100 ppm BHA και 150 ppm BHT παρεμποδίζουν πλήρως την παραγωγή εντεροτοξίνης από τον *St. aureus.*, ενώ 25-50

ppm BHA και 200 ppm BHT αναστέλλουν την παραγωγή τοξίνης από τρία στελέχη του *Clostridium botulinum* (Robach and Pierson, 1979).

Αναφορές στη δράση των φαινολικών παραγώγων στις κυτταρικές μεμβράνες, αποδίδουν την αντιμικροβιακή τους δράση στην αντίδρασή τους με τα δομικά συστατικά των μεμβρανών και ιδιαίτερα τις στοιβάδες των λιπιδίων. Χαρακτηριστική είναι η αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και η διόγκωση του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*, εξαιτίας της επίδρασης των φαινολικών στα φωσφολιπίδια και τα λιπαρά οξέα της μεμβράνης του (Bernheim, 1972). Είναι γνωστό ότι τα BHA και BHT επιτίθενται στις κυτταρικές μεμβράνες, προκαλώντας διαρροή ενδοκυτταρικού υλικού. Επιπλέον, προκαλούν δυσλειτουργία της μεμβράνης κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων, την αφομοίωση θρεπτικών υλικών από το περιβάλλον, τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και τη δράση της ATPάσης (Hugo, 1991; Kabara, 1991).

Οι ελάχιστες δραστικές αντιβακτηριακές συγκεντρώσεις των φαινολικών αντιοξειδωτικών κυμαίνονται σημαντικά ανάλογα με το είδος του βακτηρίου σε αντίθεση με τις αντιμυκητιακές συγκεντρώσεις, οι οποίες δεν διαφοροποιούνται σημαντικά μεταξύ των μυκήτων. Ωστόσο κατά την εφαρμογή τους στη βιομηχανία τροφίμων πρέπει ωστόσο να λαμβάνεται υπόψη το γεγονός ότι η αποτελεσματικότητά τους μειώνεται σημαντικά από την παρουσία λίπους.

Σχήμα 1.3. Κυριότερα φαινολικά αντιοξειδωτικά (Davidson, 1983)



1.3.1.3 Φαινολικά οξέα και φαινυλοπροπανοειδή

Τα φαινολικά οξέα που συναντώνται συχνά στα φυτά και κυρίως στα αγγειόσπερμα (Σχήμα 1.4) είναι κυρίως παράγωγα του π-υδροξυ-βενζοϊκού (πρωτοκατεχι-

κό, βανιλλικό, γαλλικό, συρινγκικό), του ο-υδροξυ-βενζοϊκού (σαλικυλικό) και του υδροξυκιναμμικού οξέος (π-κουμαρικό, καφεϊκό, χλωρογενικό, φερουλικό κτλ). Τα φαινολικά αυτά οξέα προκύπτουν από την αποικοδόμηση των φαινυλοπροπανοειδων. Οι απλές φαινόλες και τα φαινολικά οξέα σπάνια απαντώνται ελεύθερα στο φυτό, αλλά συνήθως βρίσκονται ενωμένα υπό μορφή εστέρων, αλάτων ή απλών γλυκοζιτών (Ραγκούση 1996)

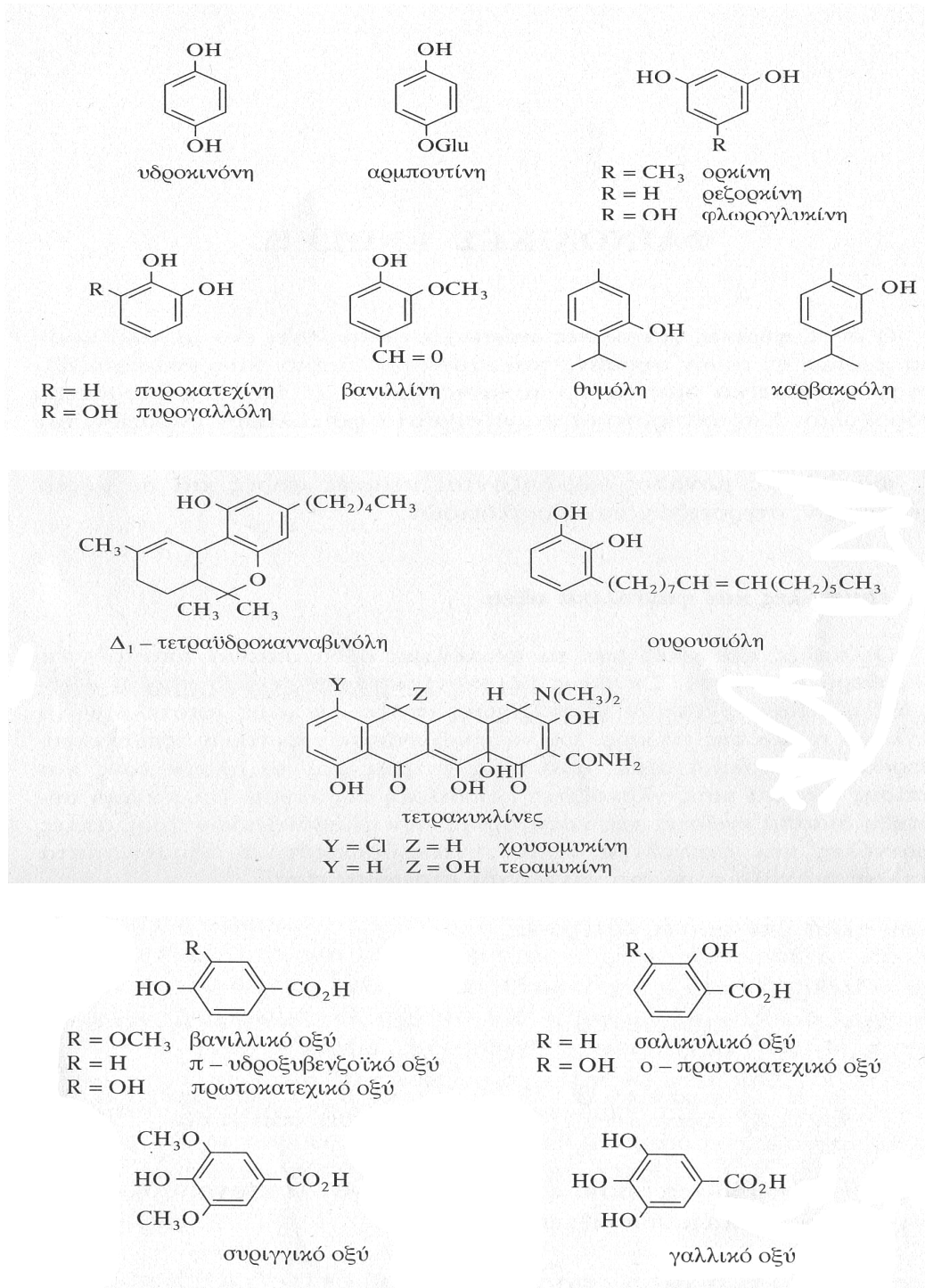
Ποσότητες 100 ppm γαλλικού, καφεϊκού και κινικού οξέος αναστέλλουν τη ζύμωση του οίνου παρουσία 6% αιθανόλης (Davidson, 1997). Μελέτες με τα οξέα, το χλωρογενικό, ισοχλωρογενικό, καφεϊκό, γαλλικό και ελλαγικό κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ένα 800 ppm μείγμα τους είναι ικανό να αναστείλει κατά 50% τις ζύμες του κρασιού (Davidson, 1997). Το ελλαγικό οξύ σε ποσότητα 200 ppm θεωρείται το δραστικότερο από τα παραπάνω οξέα.

Τα φαινυλοπροπανοειδή είναι φαινολικές ενώσεις με πλάγια αλυσίδα τριών ατόμων άνθρακα. Οι κυριότερες κατηγορίες των φαινυλοπροπανοειδων είναι τα υδροξυκιναμωμικά οξέα όπως το φερουλικό το σιναπικό και το καφεϊκό (απαντούν συνήθως ως εστέρες), οι κουμαρίνες και τα φαινυλοπροπένια (ευγενόλη, ανιθόλη, σαφρόλη) (Σχήμα 1.5) Η σύγκριση της αντιμικροβιακής δράσης μεταξύ των υδροξυκιναμωμικών οξέων και δυο αντιβιοτικών, της πενικιλίνης (για τα Gram +) και της χλωρομυκετίνης (για τα Gram -), έδειξε ότι τα 75 mg φαινολικού εκχυλίσματος, προερχόμενου από ρίζες του φυτού *Chicorium intybus* L πλούσιου σε χλωρογενικό και ισοχλωρογενικό οξύ, δρουν εξίσου ίδιο αποτελεσματικά εναντίον Gram (+) βακτηρίων όπως οι 10 μονάδες πενικιλίνης και εναντίον Gram (-) όπως τα 75mg χλωρομυκετίνης. Το δραστικότερο από τα υδροξυκιναμωμικά οξέα είναι το καφεϊκό (Davidson, 1997), ενώ 1000 ppm φερουλικού οξέος, ή 500-1000 ppm π-κουμαρικού οξέος δρουν παρεμποδιστικά για τα Gram (+) βακτηρια *Bacillus cereus* και *St. aureus*. Τα ίδια μόρια επηρεάζουν ελάχιστα την ανάπτυξη των Gram (-) *P. fluorescens* και *E. coli* (Davidson, 1997).

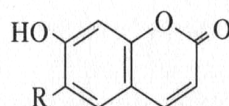
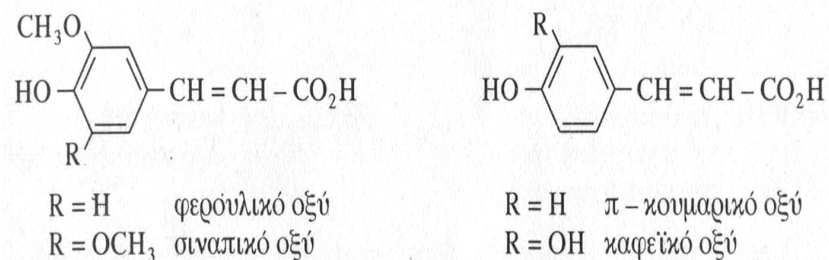
Η επίδραση των τεσσάρων φαινολικών οξέων, καφεϊκού, χλωρογενικού, π-κουμαρικού και φερουλικού έχει μελετηθεί στην ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae*. Μεμονωμένα το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ δεν επηρεάζουν καθόλου τον μικροοργανισμό σε ποσότητες 1000 ppm, ενώ ίδια συγκέντρωση π-κουμαρικού προκαλούν πλήρη αναστολή της ζύμης. Το φερουλικό οξύ είναι το ισχυρότερο αντιμικροβιακό, καθώς 50 ppm του οξέος παρατείνουν τη φάση προσαρμογής του *S. cer-*

envisiae, ενώ ποσότητες των 250 ppm αναστέλλουν πλήρως την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. (Baranowski et al 1980).

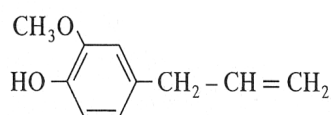
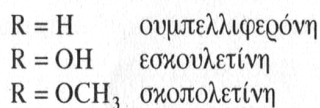
Σχήμα 1.4. Δομές απλών φαινολών και φαινολικών οξέων (Ραγκούση 1996).



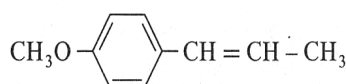
Σχήμα 1.5. Υδροξυκινναμωμικά οξέα και εστέρες τους ((Ραγκούση 1996).



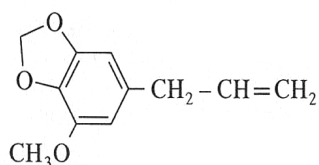
κουμαρίνες



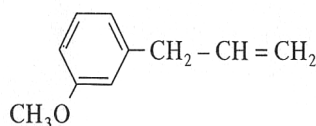
ευγενόλη



ανιθόλη



μυριστικίνη



σαφρόλη

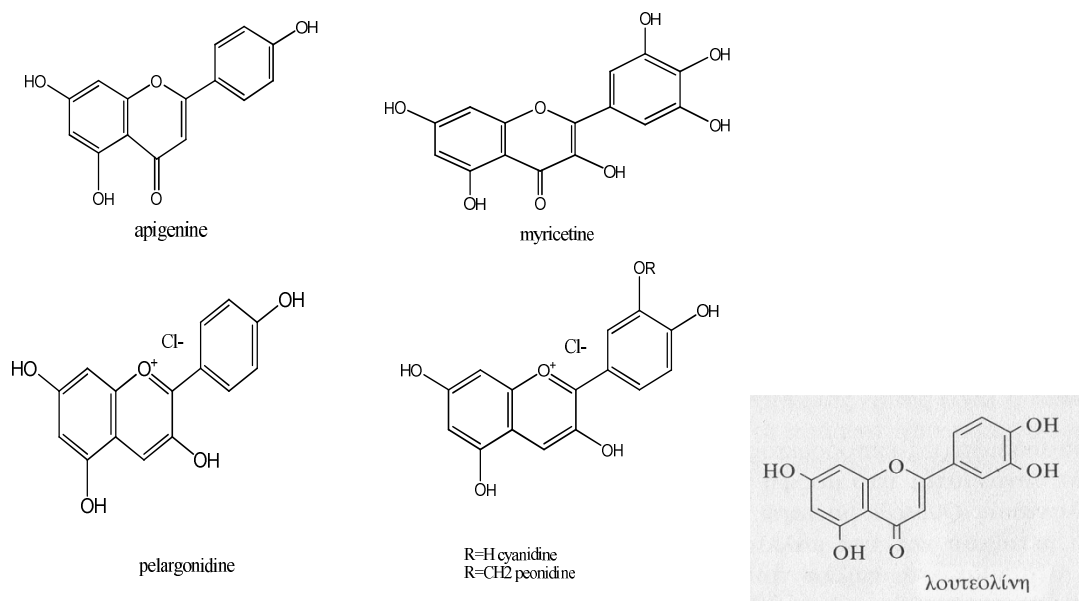
1.3.1.4 Φλαβονοειδή

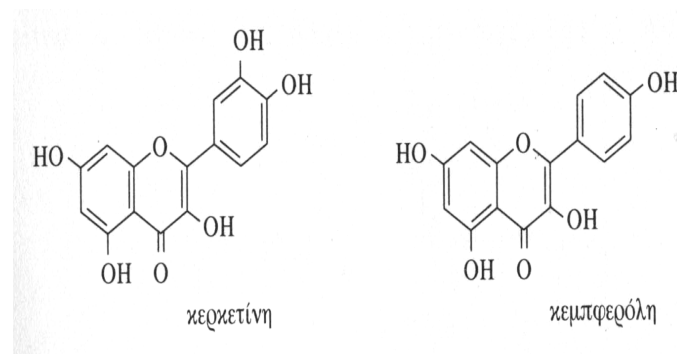
Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πολυπληθέστερη τάξη των φυσικών φαινολικών και προσδίδουν χαρακτηριστική γεύση, χρώμα και άρωμα σε τρόφιμα και ποτά φυτικής προέλευσης. Εκτιμάται ότι υπάρχουν περισσότερες από 2000 ταυτοποιημένες χημικές δομές φλαβονοειδών (Harborne 1980), τα οποία παρα τη μεγάλη ποικιλομορφία τους εμπεριέχουν το σκελετό της φλαβόνης, που αποτελείται από 3 αρωματικούς δακτυλίους και 15 άτομα άνθρακα. Η ομάδα των φλαβονοειδών αποτελείται από 12 ομάδες που διαφέρουν μεταξύ τους στο βαθμό οξείδωσης του κεντρικού αρωματικού δακτυλίου. Από άποψη δομής χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, α) στα πα-

ράγωγα της φλαβόνης δηλαδή τις φλαβόνες (350), φλαβονόλες (350), φλαβανόνες (150), τα ισοφλαβονοειδή (150), τις χαλκόνες (60), και β) τις ανθοκυανίνες δηλαδή τις κατεχίνες (20), τις προανθοκυανιδίνες (50), τις φλαβανο-3,4-διόλες (20) και τις διυδροχαλκόνες (20). Οι σπουδαιότερες από τις παραπάνω ομάδες είναι οι ανθοκυάνες, οι φλαβόνες και οι φλαβονόλες, με τις παρακάτω να συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον: πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη (ανθοκυάνες), кемπερολόη, κερκετίνη, μυρισετίνη (φλαβονόλες) και απιγενίνη, λουτεολίνη (φλαβόνες) (Σχήμα 1.6).

Οι ανθοκυάνες είναι μια ομάδα φυσικών υδατοδιαλυτών χρωστικών που περιέχονται στα φρούτα των οποίων το άγλυκο τμήμα, οι ανθοκυανιδίνες, είναι υποκατεστημένα, με υδροξύ και μέθεξη/ομάδες παράγωγα του φλαβυλίου. Σύμφωνα με τον Masquielier, (1959) οι ανθοκυανιδίνες διαθέτουν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη των *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium* παρεμποδίζεται στο κόκκινο κρασί. Ο ίδιος ερευνητής έδειξε ότι η μαλβιδίνη (μέλος των ανθοκυανιδινών), μαζί με το καφεϊκό οξύ αποτελούν τα δύο κύρια αντιμικροβιακά συστατικά του κρασιού. Οι ενώσεις δελφινιδίνη-3-μονογλυκοζίτης, πελαργονιδίνη-3-μονογλυκοζίτης και μαλβιδίνη-3,5-διγλυκοζίτης είναι τα δραστικότερα μόρια μεταξύ των ανθοκυανών και ανθοκυανιδινών που περιέχονται στα σταφύλια και τις φράουλες (Davidson, 1997). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα αντιμικροβιακά συστατικά είναι τα άγλυκα τμήματα που προκύπτουν από την υδρόλυση των γλυκοζιτών.

Σχήμα 1.6 Φλαβονοειδή (Ραγκούση 1996).





1.3.1.5 Πολυμερή φαινολικά (ταννίνες, λιγνίνες, μελανίνες)

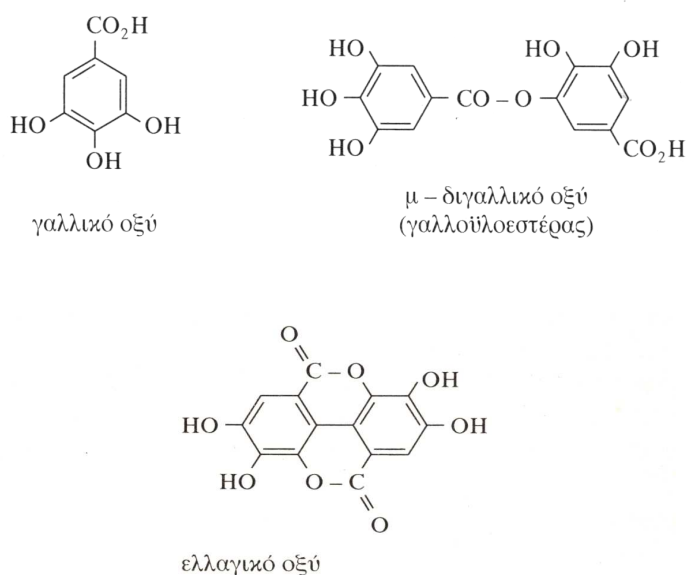
Στα φυτά απαντώνται πολύ συχνά πολυμερείς φαινολικές ενώσεις όπως οι ταννίνες, οι λιγνίνες και οι μελανίνες. Οι λιγνίνες είναι μη γλυκοζιτικά πολυμερή μεγάλου μοριακού βάρους που αποτελούν το δομικό υλικό των κυτταρικών τοιχωμάτων του ξυλώδους ιστού των φυτών. Οι φυτικές μελανίνες, στις οποίες αποδίδονται τα μαύρα χρώματα του φλοιού των σπόρων ορισμένων φυτών, είναι επίσης φαινολικά πολυμερή. Τέλος, οι ταννίνες είναι πολυφαινόλες χωρίς κάποιο βασικό σκελετό. Είναι συνήθως άχρωμες μη κρυσταλλικές ενώσεις που σχηματίζουν κολλοειδή διαλύματα στο νερό και ανιχνεύονται στο φλοιό πολλών φυτικών ειδών.

Από άποψη δομής δυο είναι οι κύριοι τύποι των ταννινών στο φυτικό βασίλειο οι συμπυκνωμένες ταννίνες ή φλαβολάνια και οι υδρολυόμενες ταννίνες, (γαλλικό οξύ, μ-διγαλλικό οξύ, ελλαγικό οξύ) (Σχήμα 1.7) Πολλές από τις ταννίνες που απαντούν σε διάφορα φυσικά προϊόντα έχουν εξεταστεί για την αντιμικροβιακή τους δράση εναντίον των ζυμών του κρασιού. Οι ταννίνες σε συγκέντρωση έως 20 ppm δεν ασκούν καμία παρεμποδιστική δράση στις ζύμες του κρασιού, στις άγριες ζύμες και τα οξικά βακτήρια. Σε υψηλότερες όμως ποσότητες (π.χ των 2000 ppm) παρεμποδίζουν τη ζύμωση του κρασιού. Ενδέχεται η αυξημένη αντιμικροβιακή δράση των κρασιών ηλικίας 8-10 ετών να οφείλεται (και είναι ανάλογη) με το ποσό των περιεχομένων ταννινών (Singelton and Esau 1969),.

Το τσάι (μαύρο και πράσινο) είναι ένα προϊόν με έντονη μικροβιοκτόνο δράση κατά μικροοργανισμών όπως τα *Campylobacter jejuni* και *Campylobacter coli* (Nychas, 1995). Η υψηλή αντιμικροβιακή δράση του τσαγιού οφείλεται στη β-ιονόνη και τις πολυφαινόλες που περιέχει. Εκχυλίσματα από ιαπωνικό πράσινο τσάι βρέθηκε ότι παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του *Streptococcus mutans*, ένα βακτήριο που θεωρείται υπεύθυνο για τις οδοντικές σήψεις (Sakanaka et al., 1989). Στην ίδια μελέτη

αναφέρεται ότι αφού στο εκχύλισμα δεν περιέχεται φθόριο, ο παράγοντας που παρεμποδίζει την εμφάνιση των σήψεων είναι φαινολικός και πιθανότατα τα κύρια δραστικά συστατικά του εκχυλίσματος η γαλλοκατεχίνη (GC), η επιγαλλοκατεχίνη (EGC) και η επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού οξέος (EGCg).

Σχήμα 1.7 Ταννίνες (Ραγκούση 1996).



1.4 Αιθέρια έλαια

Τα φυτά αποτελούν τη σημαντικότερη πηγή από την οποία αντλεί ο άνθρωπος τα χρήσιμα για αυτόν φυσικά προϊόντα. Εκτός από τα φαινολικά παράγωγα που ήδη παρουσιάστηκαν υπάρχει μια επιπλέον κατηγορία φυτικών προϊόντων, τα καρυκεύματα και τα βότανα, που εκτός από το φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων τους, προσφέρουν δύο ξεχωριστά κλάσματα πτητικών ουσιών με έντονη αντιμικροβιακή δράση, τα αιθέρια έλαια και τις ελαιορητίνες.

Για την καλύτερη διάκριση μεταξύ καρυκευμάτων και βότανων είναι απαραίτητη η παράθεση του ορισμού έκαστου. Έτσι ως καρυκεύματα ορίζουμε τα τμήματα των αρωματικών φυτών (μπουμπούκια, άνθη, καρποί, ρίζες, σπόροι ή εκκρίματα) που ευδοκούν σε τροπικά και ημιτροπικά κλίματα. Αντίθετα ως βότανα τα φύλλα και τους χλωρούς (μη ξυλοποιημένους) βλαστούς των ποωδών φυτών, στα οποία ο κύριος βλαστός νεκρώνεται και απλώνεται στο έδαφος μετά το πέρας της βλαστικής περιόδου. Τα βοτανοφόρα φυτά ευδοκούν σε ήπια κλίματα και διακρίνονται σε ετήσι-

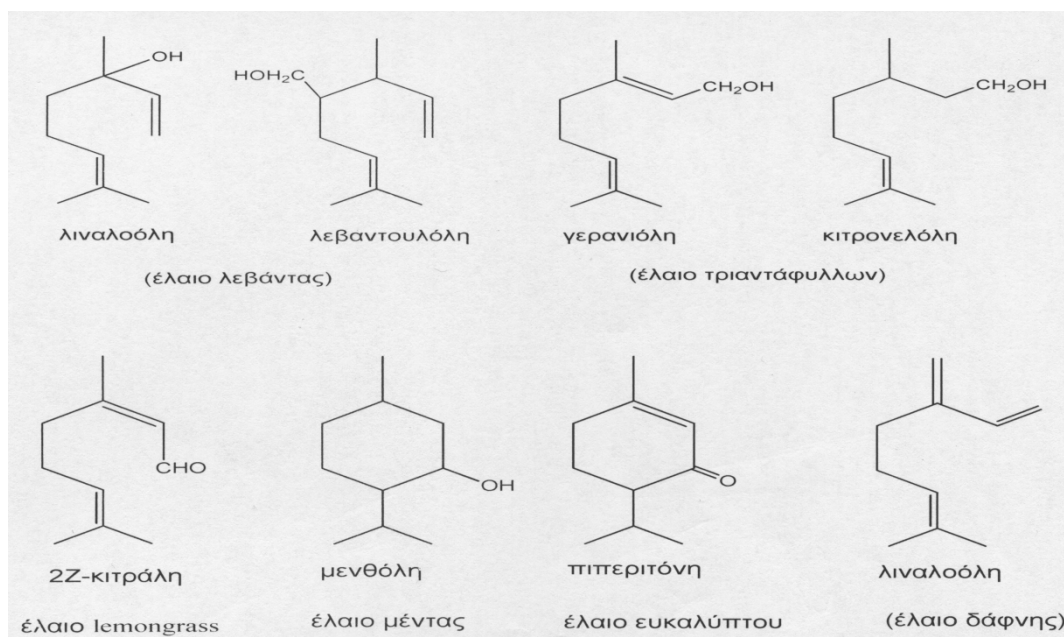
α, διετή και πολυετή, ενώ επιπλέον των κλασικών φυτών με τρυφερό βλαστό υπάρχουν είδη με ημιξυλοποιημένο ή πλήρως ξυλοποιημένο βλαστό (κορμό), τα οποία δίνουν επίσης βότανα όπως το δεντρολίβανο, η δάφνη και το θυμάρι.

Το άρωμα των καρυκευμάτων και των βοτάνων οφείλεται στα αιθέρια έλαια που περιέχουν. Τα καρυκεύματα διαθέτουν υψηλότερο ποσοστό αιθερίων ελαίων σε σχέση με τα βότανα. Με ειδική μέθοδο λαμβάνονται συνολικά 3 διαφορετικά κλάσματα από καρυκεύματα και βότανα, τα οποία ωστόσο δεν ξεπερνούν το 0,5-1% του συνολικού βάρους του φυτού και είναι: τα αιθέρια έλαια, οι ελαιορητίνες και τα παράγωγα των αιθερίων ελαίων και των ελαιορητινών.

Τα αιθέρια έλαια (Σχήμα 1.8) είναι υγρά μίγματα πτητικών συστατικών με ευχάριστη οσμή, που ανήκουν κατά κύριο λόγο στην ομάδα των τερπενίων (κυρίως μονοτερπένια και σεσκιτερπένια) αλλά και των εστέρων, αλδεϋδών και κετονών (φαινολοπροπανοειδή, θειούχες ή αζωτούχες ενώσεις, αλεικυκυκλικούς υδρογονάνθρακες κλπ). Αυτά παράγονται στους ειδικούς αδένες των αρωματικών φυτών και είναι διαλυτά στην αλκοόλη και λιγότερο διαλυτά στο νερό (Hargreaves et al 1975).

Τα τερπένια είναι οργανικά μόρια με τεράστια ποικιλομορφία στη δομή τους αφού σήμερα είναι γνωστή η δομή χιλιάδων τερπενίων τα οποία είναι είτε υδρογονάνθρακες ή περιέχουν και άτομα οξυγόνου σε μόρια ανοιχτής αλυσίδας ή δακτυλίων.

Σχήμα 1.8 Αιθέρια έλαια.



Η παραγωγή των αιθερίων ελαίων στα φυτά γίνεται από ειδικευμένους εκκριτικούς σχηματισμούς, όπως είναι τα ελαιοφόρα δοχεία, τα αδενώδη τοιχώματα, οι ελαιοφόροι πόροι και τα ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα. Ο πραγματικός ρόλος των αιθερίων ελαίων στα φυτά δεν είναι ακόμη γνωστός, αλλά υπάρχουν μόνο υποθέσεις για τη σημασία και το ρόλο τους. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα αιθέρια έλαια είναι πρόδρομες ουσίες δραστικών μεταβολιτών που μειώνουν την απώλεια του νερού με την διαπνοή. Τα αιθέρια έλαια προσελκύουν τα έντομα, που μαζεύουν τη γύρη βοηθώντας έτσι στην αναπαραγωγή και επικονίαση.

Οι αρχαίοι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν πολλά αρωματικά φυτά είτε ως αρτύματα ή για τον αρωματισμό του κρασιού. Η εμπορία των αιθερίων ελαίων ξεκίνησε από την Ασία (πριν από 6000-7000 χρόνια) από τους Κινέζους και συνεχίστηκε από τους Άραβες οι οποίοι τη μετέφεραν στην Ευρώπη. Για την παραγωγή και απομόνωση των αιθερίων ελαίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της απόσταξης, η οποία αναπτύχθηκε από ανατολικούς λαούς, κυρίως τους Ινδούς, Πέρσες και Αιγύπτιους. Το πρώτο αιθέριο έλαιο που αποστάχθηκε (με πρωτόγονο τρόπο) ήταν το τερεβινθέλαιο από το ρετσίνι των κωνοφόρων δένδρων. Για να εκχυλίσουν τα αιθέρια έλαια από τα άνθη, τα φύλλα και τις ρίζες, τοποθετούσαν τα φυτικά αυτά τμήματα μέσα σε δοχεία που περιείχαν λίπος εκλεκτής ποιότητας και τα άφηναν στον ήλιο για κάποιο χρονικό διάστημα. Με την αφαίρεση του λίπους, το προϊόν που παρέμενε ήταν μια αρωματική αλοιφή.

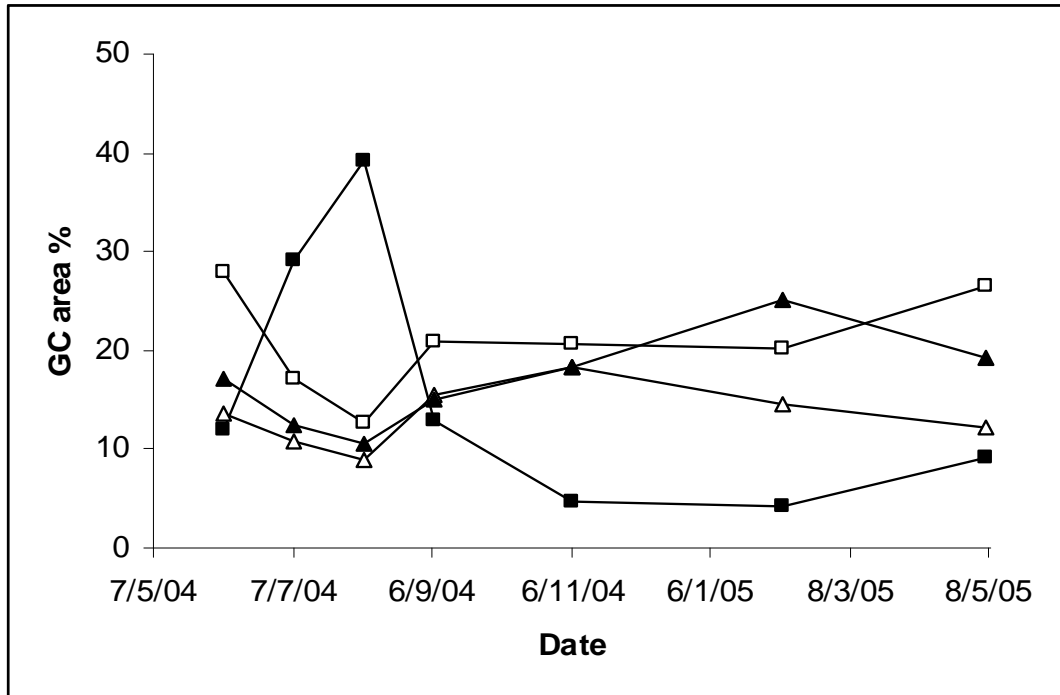
Η πρώτη λεπτομερής περιγραφή απόσταξης αιθερίων ελαίων ανήκει στον γιατρό Arnald de Villanova (1235-1311). Η απόσταξη ως μέθοδος παραλαβής του αιθερίου ελαίου από φυτά, με τη βοήθεια της θερμότητας πραγματοποιήθηκε από τον Ελβετό Bombastus Paracelsus von Honhehheim (1493-1541). Εώς τον 18^ο αιώνα αρκετοί ερευνητές, κυρίως φαρμακοποιοί, ασχολήθηκαν και περιέγραψαν ποικίλες μεθόδους παραλαβής και την φύση των αιθερίων ελαίων.

Σήμερα τα αιθέρια έλαια παραλαμβάνονται κυρίως με τη μέθοδο της απόσταξης με υδρατμούς (*steam distillation*) και ενίοτε με ψυχρή, ξηρή ή υπό κενό εκχύλιση με οργανικό διαλύτη. Η μέθοδος της απόσταξης με πτητικούς διαλύτες (π.χ. οξικό οξύ, αιθανόλη, χλωριούχο αιθυλένιο) συμβάλλει στην παραλαβή από τα φυτά ενός προφίλ φυσικών ουσιών πλουσιότερων σε άρωμα και αντιμικροβιακές ιδιότητες, σε σύγκριση με την μέθοδο της απόσταξης με υδρατμούς με την οποία λαμβάνεται αποκλειστικά το κλάσμα των αιθερίων ελαίων (*Dziedzak, 1989*).

Η σύσταση των αιθερίων ελαίων ποικίλλει ανάλογα με το είδος, τη γεωγραφική τοποθεσία και τη χρονική περίοδο της συλλογής των φυτικών ιστών. Για παράδειγμα, τα αιθέρια έλαια του *Origanum vulgare subsp. hirtum* όταν συλλέχθηκαν τα τέλη φθινοπώρου από έξι διαφορετικά τμήματα των τριών μεγάλων γεωγραφικών περιοχών της Ελλάδας, εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στα τέσσερα κυρίαρχα συστατικά τους: το γ-τερπινένιο, που κυμαινόταν από 0.6 έως 3.6% του συνολικού αιθερίου ελαίου, το π-κυμένιο με διακύμανση από 17.3 έως 51.3%, τη θυμόλη από 0.2 έως 42.8% και την καρβακρόλη από 1.7% έως 69.6% (Kokkini et al., 1997). Σημαντικές διακυμάνσεις παρατηρήθηκαν και όταν τα φυτά συλλέχθηκαν στα μέσα του καλοκαιριού. Ωστόσο ο σημαντικότερος περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σύσταση των αιθερίων ελαίων είναι το υψόμετρο. Υψηλότερες συγκεντρώσεις των παραπάνω συστατικών βρέθηκαν στα χαμηλότερα υψόμετρα και σε θερμότερες περιοχές, δηλαδή σε συνθήκες που προσομοιάζουν στα Μεσογειακά οικοσυστήματα. (Vokou et al., 1993).

Σε αντίστοιχη μελέτη τα αιθέρια έλαια των φυτών *Satureja thymbra* και *Satureja parnassica* παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη σύσταση, ανάλογα με τη χρονική περίοδο συγκομιδής του φυτικού ιστού (Σχήμα 1.9). Έτσι στο αρχικό στάδιο πριν την ωρίμανση του φυτού το γ-τερπινένιο αποτελεί το κύριο συστατικό του αιθερίου ελαίου. Κατά το στάδιο της άνθησης το κλασμα των μονοτερπενίων (γ-τερπινένιο και π-κυμένιο) ως πρόδρομων ουσιών μειώνεται με παράλληλη σταδιακή αύξηση της θυμόλης και της καρβακρόλης. Ακριβώς πριν από την άνθηση, η θυμόλη αποτελεί το κυρίαρχο συστατικό, ενώ κατά το στάδιο της πλήρους άνθησης η καρβακρόλη καθίσταται το κυρίαρχο συστατικό του αιθερίου ελαίου. Στο τέλος της περιόδου, άνθησης η καρβακρόλη μειώνεται σημαντικά και η θυμόλη γίνεται πάλι το κυρίαρχο συστατικό (Chorianopoulos et al 2006).

Σχήμα 1.9. Μεταβολή στη σύσταση του αιθέριου ελαίου του φυτού *Satureja thymbra* ανάλογα με την περίοδο συγκομιδής του. (■: καρβακρόλη, □: θυμόλη, ▲: γ-τερπινένιο και Δ: π-κυμένιο) (Chorianopoulos et al 2006).



Οι ελαιορητίνες είναι φυτικές ουσίες με υψηλό ιξώδες και σχετικά κολλώδη υφή που λαμβάνονται από αλεσμένα καρυκεύματα μέσω εκχύλισης με οργανικό διαλύτη. Οι διαλύτες που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, η αιθανόλη, και το χλωροφόρμιο. Το παχύρρευστο κλάσμα αποτελείται από αιθέρια έλαια, υδρόφοβες ρητίνες και άλλα μη πτητικά όπως σταθεροποιητές, φυσικά αντιοξειδωτικά και χρωστικές. Οι ελαιορητίνες όπως προκύπτει από τη σύστασή τους αποτελούν ένα αρκετά πυκνό μείγμα, με πλουσιότερο αρωματικό προφίλ σε σύγκριση με τα αιθέρια έλαια.

Μικρότερης σημασίας από τα αιθέρια έλαια και τις ελαιορητίνες είναι τα παράγωγα μίγματα που περιλαμβάνονται ως υγρά ή ξηρά συστατικά και οι παγιδευμένες σε άμυλο ελαιορητίνες. Τα υγρά συστατικά είναι χαρμάνια ελαιορητινών, αιθέριων ελαίων, πολυσορβικά οξέα και μαστίχες. Απομονώνονται σε υδατοδιαλυτή ή λιποδιαλυτή μορφή και χρησιμοποιούνται σε σιρόπια, σάλτσες, κονσερβοποιημένες σούπες και στη βιομηχανία παγωτών. Τα ξηρά συστατικά είναι ελαιορητίνες προσηλωμένες σε ένα ξηρό υγροσκοπικό υλικό όπως το αλάτι και η δεξτρόζη. Χρησιμοποιούνται κυρίως στις βιομηχανίες κρεατοσκευασμάτων. Τέλος, ο ψεκασμός νερού, ελαιορητι-

νών και αμύλου σε θερμαινόμενο χώρο, έχει σαν αποτέλεσμα μετά την εξάτμιση του νερού, το άμυλο να περικλείει τα σωματίδια των ελαιορητινών δημιουργώντας ειδικά σκευάσματα, που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα υπό μορφή σκόνης.

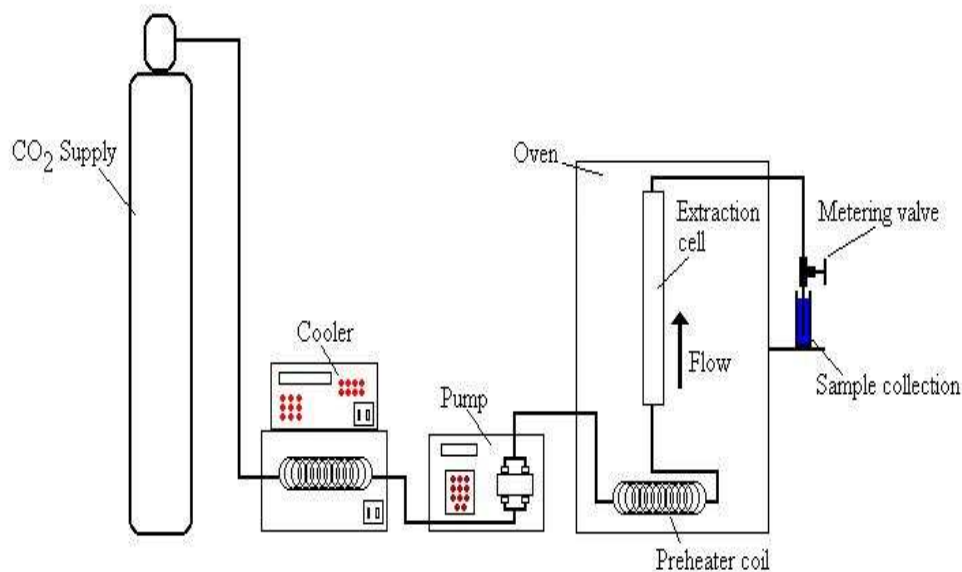
Από τις τρεις παραπάνω κατηγορίες φυτικών προϊόντων που λαμβάνονται από τα καρυκεύματα και τα βότανα αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση φαίνεται να διαθέτουν κυρίως τα αιθέρια έλαια και οι ελαιορητίνες, τα οποία παρουσιάζονται στη συνέχεια.

1.4.1 Παραλαβή αιθερίων ελαίων από τα φυτά

Οι κυριότερες μέθοδοι παραλαβής των αιθερίων ελαίων από τους φυτικούς ιστούς είναι:

- I. Εκχύλιση με τη χρήση οργανικού πτητικού διαλύτη όπως για παράδειγμα αιθανόλη 80% (0.1% HCl) η οποίας η οποία χρησιμοποιείται για την εκχύλιση της σκόνης που προέρχεται από την ξήρανση του φυτικού ιστού με τη βοήθεια υγρού αζώτου. Για τον ίδιο σκοπό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και οξικός αιθυλεστέρας υπό βρασμό και πίεση.
- II. Υδροαπόσταξη με συσκευή τύπου Clevenger. Κατά την υδροαπόσταξη το φυτικό μέρος (νωπό, κατεψυγμένο ή ξηρό) μεταφέρεται σε δοχείο που πληρώνεται με νερό και τοποθετείται σε θερμαινόμενη εστία. Οι υδρατμοί που παράγονται συμπυκνώνονται και συλλέγονται σε ένα δοχείο στο οποίο διακρίνονται δυο φάσεις (ανώτερη= καθαρό αιθέριο έλαιο και κατώτερη= μείγμα αιθερίου ελαίου – νερού). Η υδροαπόσταξη είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως σε βιομηχανική κλίμακα, λόγω του χαμηλού κόστους, της εύκολης μεταφοράς, της απλότητας και της δυνατότητας απόσταξης ολόκληρων τμημάτων φυτικού ιστού η οποία με άλλη μέθοδο θα ήταν αδύνατη. Κύρια μειονεκτήματα της είναι ο μεγαλύτερος χρόνος, η μικρή απόδοση σε αιθέριο έλαιο και τέλος η κακή ποιότητα του αιθερίου ελαίου λόγω της αποσύνθεσης που λαμβάνει χώρα κατά την θέρμανση.
- III. Απόσταξη με υδρατμούς του νωπού φυτικού υλικού. Τα πλεονεκτήματα της είναι η παραλαβή καλής ποιότητας αιθερίου ελαίου, η ικανότητα απόσταξης μεγάλων ποσοτήτων από όλα σχεδόν τα αρωματικά φυτά, εκτός από τα άνθη και τα κονιοποιημένα υλικά.
- IV. Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

Εικόνα 1.1 Εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά.



Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή (Εικόνα 1.1) το διοξείδιο του άνθρακα (κατάλληλο για τρόφιμα) βρίσκεται στον κύλινδρο ο οποίος τροφοδοτεί τη συσκευή, περνώντας από το σύστημα ψύξης για να αποκτήσει την απαιτούμενη θερμοκρασία. Το διοξείδιο του άνθρακα συμπιέζεται με τη βοήθεια μιας εμβολοφόρου αντλίας υψηλής πίεσης (σε προεπιλεγμένη πίεση 68, 102, ή 306 atm) και διοχετεύεται σε έναν κλίβανο, έτσι ώστε να αποκτήσει τη θερμοκρασία των 5, 27, ή 40 °C και να ρεύσει μέσω ενός κάθετα τοποθετημένου εξολκέα. Ένας υδροθάλαμος βοηθά στη διατήρηση της καθορισμένης θερμοκρασίας, ενώ το CO₂ περνώντας μέσα από τον εξολκέα που περιέχει το δείγμα παρασύρει το αιθέριο έλαιο και το κατευθύνει σε ειδική στήλη όπου εξατμίζεται το CO₂ με αποτέλεσμα το αιθέριο έλαιο να παραμένει και να συλλέγεται. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι, η μικρή της διάρκεια (1-2 ώρες), η ευελιξία της και η αποτελεσματικότητα αφού ρυθμίζοντας τις τιμές της πίεσης και της θερμοκρασίας του CO₂ μπορεί να αυξηθεί η απόδοση. Το υπερκρίσιμο υγρό απομακρύνεται εύκολα από την εκχυλιζόμενη ουσία ως αέριο σε ΚΣ, ενώ οι χρησιμοποιούμενοι “διαλύτες” είναι μη τοξικοί, αδρανείς και φιλικό προς το περιβάλλον. Μειονεκτήματα αποτελούν το κόστος της συσκευής και το εξειδικευμένο προσωπικό που απαιτείται για τη χρήση της.

- V. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME). Χαρακτηριστικές ίνες της SPME που χρησιμοποιούνται για την παραλαβή των αιθερίων ελαίων είναι (i) polydimethylsiloxane (100μm,PDMS), polydimethylsiloxane/divinylbenzene (65μm,PDMS/DVB), (ii) divinylbenzene/CarboxenTM/polydimethylsiloxane (50/30 μm StableFlex, DVB/CAR/PDMS), και (iii) Carbowax/divinylbenzene (65 μm,CW/DVB). Πριν από την ανάλυση εφαρμόζεται ένας ελαφρύς θερμικός καθαρισμός των ινών σε GC (πχ 30 min σε 250°C) και επίσης πραγματοποιείται η ανάλυση ενός μάρτυρα. Για τη μέθοδο χρησιμοποιούνται φιαλίδια των 10 mL που καθαρίζονται με τη χρήση υπερήχων και ακετόνης. Στη συνέχεια 1 gr φρέσκου (ή κατεψυγμένου) ή 0,5 gr ξηρού δείγματος τοποθετούνται στα φιαλίδια και αφού προσαρμοστεί το ειδικό κάλυμμα PTFE/silicon septa, θερμαίνονται για 10 min στους 30°C και στη συνέχεια εφαρμόζεται η μέθοδος SPME για 5 min στους 30°C.

1.4.2 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών των αιθέριων ελαίων

Το αιθέριο έλαιο που προκύπτει με κάποια από τις παραπάνω μεθόδους αποτελεί μείγμα πολλών και διαφορετικών συστατικών με αποτέλεσμα να είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός και η ταυτοποίηση τους.

Η ταυτοποίηση των συστατικών γίνεται με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας, κυρίως όμως την αέρια χρωματογραφία. Σε αυτήν υπάρχει μια στατική φάση (τριχοειδής στήλη), η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι υγρό σε στερεό φορέα και μια κινητή φάση που είναι το φέρον αέριο το οποίο πρέπει να είναι αδρανές ώστε να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν. Ως φέρουσα αέρια φάση συνήθως χρησιμοποιούνται το άζωτο (N₂), το ήλιο (He) ή το αργό (Ar) ανάλογα με τον ανιχνευτή. Επειδή η στατική φάση είναι ένα μη πτητικό υγρό προσροφημένο σε στερεό, η χρωματογραφία καλείται αέρια-υγρή χρωματογραφία (GLC). Ο διαχωρισμός των συστατικών γίνεται μέσω της κατανομής των μορίων των διαφορετικών συστατικών στο προσροφημένο υγρό της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες οι οποίες εξαρτώνται από τις διαφορετικές τάσεις ατμών και αλληλεπιδράσεις με τη στατική φάση.

Οι σημαντικότεροι παράμετροι στη αέρια χρωματογραφία είναι:

- Η θερμοκρασία του εισαγωγέα.

- Ο ρυθμός μεταβολής της θερμοκρασίας στη στήλη. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης η λειτουργία του φούρνου του χρωματογράφου μπορεί να είναι ισόθερμη ή αυξομειούμενης θερμοκρασίας. Η δεύτερη περίπτωση εφαρμόζεται συνήθως όταν το προς διαχωρισμό μείγμα αποτελείται συγχρόνως από συστατικά και υψηλού σημείου ζέσεως.
- Η ροή του φέροντος αερίου. Η ροή του φέροντος αερίου παίζει καθοριστικό ρόλο στο διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος. Η πολύ ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη επειδή οι χρόνοι συγκράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα.
- Το είδος της στήλης. Συνήθως χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες στις οποίες η υγρή στατική φάση μπορεί να ταξινομηθεί σε πολικές, σχετικά πολικές και μη πολικές.
- Το είδος του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. Συνήθως χρησιμοποιούνται ανιχνευτές ιονισμού φλόγας (FID) ή φασματοφωτομετρίας μαζών (MS).

Η ταυτοποίηση, ποσοτική και ποιοτική, των συστατικών του αιθερίου ελαίου γίνεται με τη χρησιμοποίηση του δείκτη συγκράτησης Kovats (σύγκριση του χρόνου συγκράτησης t_{R_x} της άγνωστης ουσίας με το t_{R_A} αλκανίων), του χρόνου συγκράτησης και τέλος των φασμάτων μάζας, με σύγκριση είτε με τα πρότυπα των ουσιών ή με τη χρήση κάποιας αξιόπιστης βιβλιοθήκης.

1.4.3 Αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια διαθέτουν ένα μεγάλο αριθμό πλεονεκτημάτων όσον αφορά τη χρήση τους από τη βιομηχανία τροφίμων. Δεν χρωματίζουν το προϊόν στο οποίο προστίθενται, προσδίδουν άρωμα στα τρόφιμα, είναι απαλλαγμένα από ένζυμα και τανίνες, αλλά ακόμη σημαντικότερη είναι η αντιμικροβιακή δράση τους, μέσω της οποίας συμβάλλουν στη συντήρηση των τροφίμων. Από τα πανάρχαια χρόνια, τα καρυκεύματα και τα βότανα χρησιμοποιούνταν χάρη στις αρωματικές, φαρμακευτικές, συντηρητικές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας και της ασφάλειας των τροφίμων.

Δομικά οι δραστικές ουσίες των αιθερίων ελαίων εμφανίζουν ομοιότητες με τα φαινολικά συστατικά, αλλά ανήκουν στην τάξη των πτητικών τερπενοειδών. Ενδει-

κτικά αναφέρονται τα μόρια θυμόλη, καρβακρόλη, π-κυμένιο, σιναμική αλδεΐδη, λιμονένιο, ευγενόλη, βορνεόλη, σινεόλη, πευκίνη, καμφίνη, καμφορά θυγιόνη, κλπ (Sofos et al., 1998).

Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί ο τρόπος δράσης των αιθερίων ελαίων έναντι των μικροοργανισμών, έχουν όμως προταθεί αρκετές θεωρίες οι οποίες άλλοτε τεκμηριώνονται πειραματικά και άλλοτε όχι. Σχετικές μελέτες της υποστηρίζουν ότι η παρεμποδιστική δράση των αιθερίων ελαίων οφείλεται στις επιπλοκές που προκαλούν σε ένα εύρος ενζυμικών συστημάτων, τα οποία εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό και στα μονοπάτια βιοσύνθεσης των δομικών υλικών της κυτταρικής μεμβράνης (Conner and Beuchat, 1984). Η συσχέτιση μεταξύ της χημικής δομής των συστατικών των αιθερίων ελαίων και της αντιμικροβιακής της δράσης οδήγησε στην υπόθεση ότι οι φαινόλες αντιδρούν με τα ενεργά σημεία των ενζύμων σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου. Σε πειράματα σε κύτταρα ζύμης έχει βρεθεί ότι οι ουσίες α -πινένιο, β -πινένιο και λεμονένιο καταστρέφουν την κυτταρική δομή παρεμποδίζοντας τη λειτουργία της αναπνοής στα μιτοχόνδρια. Ειδικότερα, το β -πινένιο παρεμποδίζει την αναπνοή τόσο σε ανέπαφα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae* όσο και σε μιτοχόνδρια που απομονώθηκαν από αυτή τη ζύμη. Επιπλέον μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του προκαλούν παρεμπόδιση στη μεταφορά των πρωτονίων και ιόντων καλίου, χωρίς να παρατηρείται επίδραση στη δραστηριότητα της ΑΤΡάσης. Ανάλογα συμπεράσματα προέκυψαν και για το λεμονένιο, όχι όμως για άλλα υδρόφοβα μόρια. Η επίδραση στην αναπνοή θα μπορούσε να αποδοθεί στη δράση στην περιοχή του συμπλόκου III της κυτοχρωμικής αλυσίδας. Μελέτες επιβεβαίωσαν ότι οι κυκλικοί τερπενικοί υδρογονάνθρακες συσσωρεύονται στη μεμβράνη, προκαλώντας διαταραχή των ημιπερατών ιδιοτήτων της και παρεμπόδιση του μηχανισμού της μετακίνησης των πρωτονίων.

Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τη δράση που παρουσιάζουν το πιπέρι, η ρίγανη, το δενδρολίβανο, το κρεμμύδι, το σκόρδο, η κανέλλα, το γαρύφαλλο, ο άνηθος, ο μαϊντανός, η μέντα, το φασκόμηλο κ.α., έναντι διαφόρων (κυρίως παθογόνων) μικροοργανισμών των τροφίμων όπως *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*. Ο βαθμός ευαισθησίας έκαστου μικροοργανισμού ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος, το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Paster et al., 1990, Stecchini et al., 1993) και την αντίδραση στη χρώση Gram (Farag et al., 1989). Γενικά, τα Gram (+) βακτήρια, λόγω της απουσίας του λιποπρωτεϊνικού στρώματος, είναι περισσότερο ευαίσθητα σε σύγκριση με τα Gram (-) (Nychas, 1995). Αντίστοιχα τα

Gram (-) βακτήρια διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ευαισθησία στην παρεμποδιστική δράση των αιθερίων ελαίων. Συγκεκριμένα, το *Escherichia coli* είναι λιγότερο ανθεκτικό από το *Pseudomonas fluorescense* και το *Serratia marcescens* στα αιθέρια έλαια δάφνης, δενδρολίβανου, κιμίνου, γαρίφαλου και θυμαριού (Farag et al., 1989). Οι *Salmonella enteritidis* και *S.typhimurium* είναι ανθεκτικότερες από το *Pseudomonas fragi* στα αιθέρια έλαια δάφνης και μαστίχας. Ωστόσο, μελέτη αιθερίων ελαίων από 50 φυτά έναντι 25 γενών βακτηρίων (Πίνακες 1.3-1.4) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει διαφορά ως προς το βαθμό παρεμπόδισης μεταξύ των Gram (+) και των Gram (-) βακτηρίων (Deans and Ritchie, 1987).

Πίνακας 1.3. Εξεταζόμενα βακτήρια και οι κωδικοί τους για τον Πίνακα 1.4.

Βακτήριο	κωδ.	Βακτήριο	κωδ.	Βακτήριο	κωδ.
<i>Acinetobacter calcoacetica</i>	A	<i>Clostridium sporogenes</i>	I	<i>Micrococcus luteus</i>	Q
<i>Aeromonas hydrophila</i>	B	<i>Enterobacter aerogenes</i>	J	<i>Moraxella sp.</i>	R
<i>Alcaligenes faecalis</i>	C	<i>Erwinia carotovora</i>	K	<i>Proteus vulgaris</i>	S
<i>Bacillus subtilis</i>	D	<i>Escherichia coli</i>	L	<i>P. aeruginosa</i>	T
<i>Benecka natriegens</i>	E	<i>F. suaveolens</i>	M	<i>Salmonella pullorum</i>	U
<i>Brevibacterium linens</i>	F	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N	<i>Serratia marcescens</i>	V
<i>Brocothrix thermosphacta</i>	G	<i>Lactobacillus plantarum</i>	O	<i>Staphylococcus aureus</i>	W
<i>Citrobacter freundii</i>	H	<i>Leuconostoc cremoris</i>	P	<i>Streptococcus faecalis</i>	X
				<i>Yershinia enerocolytica</i>	Y

Πίνακας 1.4. Παρεμποδιστική δράση των αιθέριων ελαίων έναντι των βακτηρίων Α-Υ του Πίνακα 1.3.

Αιθέριο έλαιο	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
Almond <i>bitter</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Almond <i>sweet</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Angelica An- ise Basil	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bay		+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Bergamot	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Calmus	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Chamomile	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cananga	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caraway	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cardamon	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
Celery	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Cinnamon	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Citronella	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Clove	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Coriander	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Dill	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Estragon	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Eucalyptous	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fennel	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Geranium	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Ginger	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Laurel	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Lavender	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lemon	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lime	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Lovage	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Mandarin	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Marjoran	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melissa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mint	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Nutmeg	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Orange	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Orange <i>bitter</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parsley	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pepper	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Pimento	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Peppermint	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
Rose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Rosemary	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
Sage	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
St John's Wort	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Sassafras	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spike	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Star anise	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Thuja	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Thyme	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Valerian	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

Τα περισσότερα παθογόνα βακτήρια είναι ευαίσθητα σε φυτικά εκχυλίσματα που προέρχονται από βότανα ή άλλους φυτικούς ιστούς. Η αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων έναντι του *Staphylococcus aureus* έχει εξεταστεί επανειλημμένα και έχει βρεθεί ότι σχεδόν όλα τα αιθέρια έλαια ασκούν παρεμποδιστική δράση τόσο στην ανάπτυξή του όσο και στην παραγωγή εντεροτοξίνης. Τα αιθέρια έλαια γαρύφαλλου και κορίανδου αναστέλλουν την ανάπτυξη του *Aeromonas hydrophila* (Stecchini et al., 1993) ενώ εξίσου δραστικά μειώνεται ο πληθυσμός του ίδιου βακτηρίου, όταν εμβολιαστούν με αυτό δείγματα βρασμένου χοιρινού κρέατος συσκευασμένα υπό κενό ή αέρα στους 2 και 10°C. Η βακτηριοκτόνος δράση των δύο αιθερίων ελαίων ήταν εντονότερη σε δείγματα που συσκευάστηκαν υπό κενό (Stecchini et al., 1993). Μεταξύ 32 διαφορετικών αιθερίων ελαίων που εξετάστηκαν έναντι 13 αλλοιογόνων βακτηρίων και βιομηχανικών ζυμών, διαπιστώθηκε ότι το έλαιο της κανέλλας και του γαρύφαλλου ήταν τα δραστικότερα (Conner and Beuchat, 1984). Το αιθέριο έλαιο γαρύφαλλου σε συγκεντρώσεις 0.2% παρεμπόδισε την ανάπτυξη του *Bacillus subtilis* και σε ποσοστό 0.02% ανέστειλε τον *St. aureus*.

Τα αιθέρια έλαια του πορτοκαλιού περιέχουν μια δραστική ουσία, την τερπενόλη, η οποία επιμηκύνει το χρόνο ζωής του παστεριωμένου άπαχου, χαμηλής λιποπεριεκτικότητας και πλήρους γάλακτος, κατά τουλάχιστον 56 ημέρες στους 4°C (Dabbah et al, 1970). Εξίσου ευεργετικά δρα το συνολικό κλάσμα των αιθερίων ελαίων των εσπεριδοειδών. Έτσι, τα γαλακτοκομικά προϊόντα που είναι αρωματισμένα με φρούτα, εκτός από το ευχάριστο άρωμα, διαθέτουν επιπλέον μια φυσική αντιμικροβιακή προστασία.

Το φασκόμηλο και το δενδρολίβανο είναι δύο βότανα που πολλές φορές προστίθενται στο κρέας, σε λουκάνικα, κοτόπουλο, ψάρι και άλλα τρόφιμα. Η αντιμικροβιακή τους δράση τόσο στο τεχνητό θρεπτικό υλικό όσο και σε τρόφιμα επιβεβαιώθηκε έναντι των *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium botulinum* και *Pseudomonas* sp. Συγκέντρωση 0,3% αιθερίου ελαίου από φασκόμηλο ή δενδρολίβανου σε στερεό υπόστρωμα ανάπτυξης, εμφανίζει ζώνες αναστολής σε 20 περιπτώσεις παθογόνων Gram (+) βακτηρίων. Η δράση τους στα τρόφιμα αυξάνεται ανάλογα με την περιεκτικότητα του τροφίμου σε νερό και αλάτι και αντιστρόφως ανάλογα με το περιεχόμενο σε λίπος και πρωτεΐνη.

Η αλλυσίνη είναι η ισχυρά αντιμικροβιακή ουσία που περιέχεται στα αιθέρια έλαια των ειδών του γένους *Allium spp.* όπως το σκόρδο (*Allium sativum*) και το

κρεμμύδι (*Allium cepa*). Η αλλυσίνη δρα ανασταλτικά σε πολύ μικρές ποσότητες έναντι ενός μεγάλου αριθμού Gram (+), και Gram (-) βακτηρίων και μυκήτων. Τα αιθέρια έλαια του σκόρδου και του κρεμμυδιού είναι άχρωμα, ιδιαίτερα καυστικά, η δράση τους έχει μελετηθεί ως επί το πλείστον σε τεχνητά θρεπτικά υλικά, που είχαν εμβολιαστεί με μικροοργανισμούς όπως οι *S.aureus*, *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*

Με δεδομένη την αποτελεσματικότητα των αιθερίων ελαίων στα μη σποριογόνα παθογόνα βακτήρια η μελέτη της αντιμικροβιακής τους δράσης επεκτάθηκε και στα σποριογόνα βακτήρια, *Clostridium botulinum*, *Cl.sporogenes* και *Cl. perfringens* (Hall and Maurer 1985; Paster et al, 1990). Από τα αιθέρια έλαια που δοκιμάστηκαν αποτελεσματικότερα απεδείχθησαν τα προερχόμενα από σκόρδο, κρεμμύδι, κανέλλα, θυμάρι, ρίγανη, γαρύφαλλο, μέντα και μαύρο πιπέρι. Αντίθετα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρεμπόδιση των ελαίων στη σπορογονία ήταν ελάχιστη (Ismael and Pierson, 1990). Τα έλαια από μαύρο πιπέρι και γαρύφαλλο άσκησαν μεγαλύτερη παρεμπόδιση στην κυτταρική ανάπτυξη από τα υπόλοιπα, ενώ κανένα αιθέριο έλαιο δεν είχε αξιοσημείωτη δράση στην εκβλάστηση των σπορίων του γένους *Clostridium* spp. Παρατηρήθηκε όμως μείωση τόσο στο ρυθμό όσο και την έκταση σπορογονίας του *Bacillus subtilis* παρουσία γαρυφάλλου και καθαρής ευγενόλης (Blank et al., 1986). Τέλος, σε πειράματα με προσθήκη αιθερίων ελαίων σε ποσότητες 1500 μg/g κρέατος, παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του *C. botulinum* και την παραγωγή τοξίνης τύπου A, ενώ δεν επηρεάστηκε καθόλου η παραγωγή των τοξινών τύπου B και D (De Wit et al., 1979).

Πολλές φορές παρατηρείται το φαινόμενο της ελάττωσης της αντιμικροβιακής δράσης των αιθερίων ελαίων σε *in vivo* περιβάλλον, όπως για παράδειγμα στο κρέας πιθανότατα επειδή η υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών και το λίπος του κρέατος ανταγωνίζονται τη δράση τους (Shelef, 1983). Γενικεύοντας την παρατήρηση η αποτελεσματικότητα των αιθερίων ελαίων σε γενικές γραμμές αναμένεται να είναι μικρότερη, κατά την εφαρμογή τους στα τρόφιμα (*in vivo*), σε σύγκριση με τα τεχνητά θρεπτικά υλικά (*in vitro*).

Με στόχο την καλύτερη αξιοποίηση των αιθερίων ελαίων στη συντήρηση των τροφίμων, είναι σημαντική η περαιτέρω μελέτη ορισμένων παραμέτρων όπως η μέθοδος παραλαβής τους, η διαφορές στη σύσταση των αιθερίων ελαίων σε συνάρτηση με το φυτικό είδος και τη γεωγραφική περιοχή και η απομόνωση των συγκεκριμένων μορίων που είναι υπεύθυνες για την αντιμικροβιακή δράση τους στα τρόφιμα.

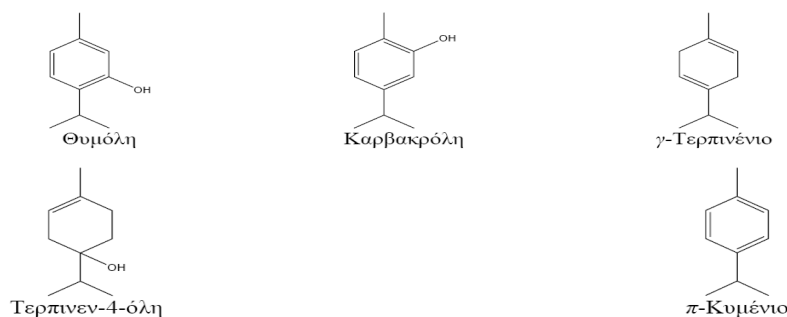
1.4.4 Αιθέριο έλαιο θυμαριού

Το θυμάρι (Thyme) περιλαμβάνει περίπου 350 είδη του γένους *Thymus* τα οποία απαντώνται στην Ευρώπη, τη Βόρεια Αφρική και την Ασία. Είναι ένα πολυετές, ποώδες φυτό, με χαμηλό και συχνά έρποντα βλαστό. Τα κυριότερα είδη είναι το άγριο θυμάρι *T. serpyllum*, το οποίο πήρε το λατινικό όνομά του από την έρπουσα μορφή του και το κοινό θυμάρι (ή θυμάρι κήπων) *T. vulgaris*, το οποίο αποτελεί την καλλιεργούμενη μορφή του άγριου θυμαριού.

Στον ελλαδικό χώρο αυτοφυούν περίπου 31 είδη του γένους *Thymus*, πέντε από τα οποία είναι ενδημικά. Το πλέον κοινό είδος στη χώρα μας είναι το *T. sibthorpii*. Παλαιότερα, στα είδη του γένους *Thymus* συμπεριλαμβανόταν και το *T. Capitatus*, ή αλλιώς θυμάρι κεφαλωτό, το οποίο σε πολλές περιοχές της Ελλάδας αναφέρεται απλά ως θυμάρι. Όμως σήμερα, η αποδεκτή λατινική του ονομασία είναι *Coridothymus capitatus* και διακινείται εμπορικά ως “ρίγανη” έχοντας με αυτό ως κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα την παρόμοια οσμή τους, που οφείλεται στην παρουσία της καρβακρόλης στα αιθέρια έλαια τους.

Τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του θυμαριού είναι η θυμόλη, η καρβακρόλη, η λιναλοόλη, η γερανιόλη, η α-τερπινεόλη και το π κυμένιο, (Σχήμα 1.9). Το τελευταίο αποτελεί το πρόδρομο μόριο από το οποίο προκύπτουν κατά το δευτερογενή μεταβολισμό τα δυο κυρίαρχα συστατικά του αιθερίου ελαίου του θυμαριού, η θυμόλη και η καρβακρόλη (Σχήμα 1.10). Βέβαια παρατηρείται μια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση στην εκατοστιαία περιεκτικότητα των παραπάνω συστατικών, η οποία υποδηλώνει την ύπαρξη διαφορετικών χημειότυπων θυμαριού, όπως *T. vulgaris* ct. thymol (χημειότυπος θυμόλης, κόκκινο θυμάρι), ή *T. vulgaris* ct. geraniol (χημειότυπος γερανιόλης, γλυκό θυμάρι), κ.λπ.

Σχήμα 1.10 Κύρια συστατικά αιθερίου ελαίου θυμαριού.



Η σημαντική αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου του θυμαριού έχει μελετηθεί διεξοδικά έναντι πολλών μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα η *Salmonella typhimurium* είναι περισσότερο ευαίσθητη σε σύγκριση με την *Pseudomonas*

aeruginosa στο αιθέριο έλαιο του θυμαριού (Paster et al., 1990), ενώ η ανάπτυξη του *Alcaligenes faecalis* αναστέλλεται σε ποσοστό 100% παρουσία του αιθερίου ελαίου και κατά 88% ο *Aerobacter aerogenes* (Dabbah et al., 1970). Επίσης το αιθέριο έλαιο του θυμαριού προκαλεί πτώση του βακτηριακού πληθυσμού, όταν προστεθεί σε δείγματα χοιρινού κρέατος εμβολιασμένα με *Listeria monocytogenes*, (Aureli et al., 1992). Η θυμόλη και η καρβακρόλη, αναστέλλουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις την ανάπτυξη των βακτηρίων *B.subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *P. aeruginosa*, *Proteus morgani*, και *E. coli*, (Katayama et al., 1960). Το αιθέριο έλαιο αλλά και τρίμματα φυτού θυμαριού δρουν ως βακτηριοκτόνα σε συγκεντρώσεις 0,5% κατά του *Vibrio parahaemolyticus* (Beuchat, 1976), ενώ αναστέλλουν και την ανάπτυξη πολλών στελεχών του γένους *Salmonella spp* (Dabbah et al., 1970; Deans and Richie, 1987; Paster et al., 1990).

1.4.5 Νομοθεσία

Τα φυσικά αντιμικροβιακά πριν εφαρμοστούν στα τρόφιμα πρέπει να πληρούν ορισμένα νομοθετικά κριτήρια, αφού «φυσικά» δεν σημαίνει απαραίτητα και «ασφαλής». Άλλωστε, πολλά φυσικά συστατικά είναι δυνατόν να είναι τοξικά ή και καρκινογόνα (Branen, 1993). Η χρήση της καρβακρόλης που αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου του θυμαριού έχει ήδη επιτραπεί στις Η.Π.Α, σύμφωνα με τον Κώδικα Ομοσπονδιακών Κανονισμών (Code of Federal Regulations-CFR), υπό την προϋπόθεση να προστίθεται στην ελάχιστη αναγκαία ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration). Γενικά, τόσο η καρβακρόλη όσο και τα βότανα και καρυκείματα που την περιέχουν χαρακτηρίζεται ως ασφαλή (*General Regarded as Safe, GRAS*) από τους ειδικούς εκπαιδευμένους δοκιμαστές του Οργανισμού Παρασκευαστών Αρωμάτων και Εκχυλισμάτων (Ultee, 2000). Ωστόσο, η νομοθεσία για τα φυσικά αντιμικροβιακά τα θεωρεί ως νέα πρόσθετα τροφίμων όταν χρησιμοποιούνται για νέους σκοπούς στην Τεχνολογία Τροφίμων, με αποτέλεσμα η χρήση τους να απαιτεί περαιτέρω τοξικολογικές μελέτες (Πίνακας 1.5), παρά τη σήμανση τους ως ασφαλή. Η απευθείας χρήση ολόκληρου του φυσικού ιστού που περιέχει το αντιμικροβιακό συστατικό είναι ο πλέον φυσικός τρόπος εφαρμογής τους. Όμως, η προσθήκη φυτικών ιστών σε ποσότητες που να αντιστοιχούν στην επιθυμητή συγκέντρωση του εκάστοτε ενεργού συστατικού του αιθερίου ελαίου απαιτεί πολύ μεγάλύ-

τερες ποσότητες πρώτης ύλης, σε σχέση με την απευθείας προσθήκη καθαρού αιθέριου ελαίου, πράγμα που καθιστά ανέφικτη μια τέτοια πρακτική (Ultee, 2000).

Οι δοκιμές τοξικότητας μέχρι τώρα γίνονται σε μύες και η βασική τους σκοπιμότητα αφορά τη χρήση τους στην αρωματοποιία και αρωματοθεραπεία. Δεν υπάρχουν αναφορές για παρόμοια δεδομένα σε ανθρώπους και την εφαρμογή τους ως συντηρητικών τροφίμων.

Πίνακας 1.5. Στοιχεία τοξικότητας ορισμένων αιθερίων ελαίων, με κριτήριο την ημίσεια θανατηφόρο δόση (LD₅₀) (Tisserand and Balacs, 1992).

Φυτική προέλευση	LD ₅₀ * (g/Kg Σ.Β.)	Κυρίαρχα συστατικά ^α	Φυτική προέ- λευση	LD ₅₀ * (g/Kg Σ.Β.)	Κυρίαρχα συστατικά ^α
Αμύγδαλο <i>Prunus amygdalus</i>	A	Βενζαλδεϋδή Υδροκιάνη	Κέδρος <i>Juniperus com- munis</i>	Δ	α-πινένιο Μυρσένιο Β-πινένιο
Αγγελική (ρίζα) <i>Angelica archangelica</i>	Γ/Δ	β-φαλαιανδρένιο Φουρανοκου- μαρίνες	Δάφνη <i>Laurus nobilis</i>	Γ	1,8 σινεόλη λιναλοόλη
Άνηθος <i>Pimpinella anisum</i>	Γ	Trans-ανιθόλη	Λεβάντα <i>Lavandula angus- tifolia</i>	Γ/Δ	Καμφορά Φενσόλη
Βασιλικός <i>Ocimum basilicum</i>	B	Εστραγκόλη	Λεμόνι <i>Citrus limonum</i>	Δ	Λεμονένιο φουρανοκου- μαρίνες
Ινδική δάφνη <i>Pimenta racemosa</i>	B	Ευγενόλη	Μαντζουράνα <i>Origanum marjo- rana</i>	Γ	Καρβακρόλη Θυμόλη
Περγαμόντο <i>Citrus bergamia</i>	Δ	Οξική λιναλοό- λη Λεμονένιο Λιναλοόλη	Μαστίχα <i>Pistacia lentiscus</i>	Δ	?
Καμφορά	Γ	Σαφρόλη	Πορτοκάλι	Δ	δ-λεμονένιο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<i>Cinnamomum camphora</i>		Καμφορά	<i>Citrus aurantium</i>		
Σέλινο	Γ	Trans-ανιθόλη	Ρίγανη	B	Καρβακρόλη
<i>Anethum graveolens</i>			<i>Origanum vulgare</i>		Θυμόλη π-κυμένιο
Σκόρδο	Δ	Αλλισίνη	Μαϊντανός	B/Γ	Μυριστικήνη
<i>Allium sativum</i>			<i>Petroselinum sativum</i>		π-μενθα- 1,3,8-τριένιο
Χαμομήλι	Δ	?	Πιπέρι	Δ	?
<i>Anthemis nobilis</i>			<i>Piper nigrum</i>		
Κανέλλα	Γ	Σιναμική αλ- δεΐδη Ευγενόλη	Δενδρολίβανο	Δ	α-πινένιο
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>		Σαφρόλη	<i>Rosemarinus officinalis</i>		Καμφορά 1,8-σινεόλη
Καρότο	Δ	?	Μέντα	Γ	Μενθόλη
<i>Daucus carota</i>			<i>Menta viridis</i>		
Κασσία	Γ	Σιναμική αλ- δεΐδη Ευγενόλη	Φασκόμηλο	Γ	α-θουγιόνη
<i>Cinnamomum cassia</i>			<i>Salvia officinalis</i>		β-θουγιόνη Καμφορά
Γαρύφαλλο	B/Γ	Ευγενόλη	Θυμάρι	Γ	Καρβακρόλη
<i>Syzygium aromaticum</i>		Ισο-ευγενόλη	<i>Thymus vulgaris</i>		Θυμόλη
Ευκάλυπτος	Γ	?	Μανταρίνι	Δ	?
<i>Eucalyptus globules</i>			<i>Citrus reticulata</i>		
Μάραθος	Γ	Trans-ανιθόλη	Κορίανδρος	Γ	?
<i>Foeniculum vulgare</i>		Φενχόνη Εστραγκόλη	<i>Coriandrum sativum</i>		
Ζιγγίβερις	Δ	?	Τσάι	Γ	?
<i>Zingiber officinale</i>			<i>Camellia sinensis</i>		

* A: <1.0 g/Kg, B: 1-2 g/Kg, Γ: 2-5 g/Kg, Δ: >5 g/Kg.

Τα συστατικά αναγράφονται με φθίνουσα σειρά συγκέντρωσης στο αιθέριο έλαιο. Με έντονα γράμματα αναφέρεται το τοξικό συστατικό.

1.5 Κρασί

Το κρασί ή οίνος είναι το αλκοολούχο ποτό προϊόν της ζύμωσης των σταφυλιών ή του χυμού τους (μούστος). Ποτά παρεμφερή του κρασιού παράγονται και από άλλα φρούτα ή άνθη ή σπόρους, αλλά η λέξη κρασί από μόνη της συνδέεται με παραγωγή από σταφύλια. Στους βυζαντινούς χρόνους η λέξη "κρασί" αντικατέστησε τη λέξη "οίνος" πιθανότατα επειδή ο "οίνος" (όπως και ο "άρτος") ως όρος του χριστιανικού λειτουργικού-θρησκευτικού λεξιλογίου, αποτελούσε λέξη "ταμπού". Η λέξη προέρχεται με μεσολάβηση των τύπων κρασίν<κρασίον από τη λέξη κράσις=ανάμειξη, η οποία αποτελεί παράγωγο του ελληνικού θέματος κρα<ινδοευρωπαϊκό θέμα kera- (πρβλ. το ρήμα κεράννυμι=αναμειγνύω και το ουσιαστικό κρατήρ=σκεύος ανάμειξης). Η ετυμολογία της λέξης αντανakλά τη συνήθεια των αρχαίων Ελλήνων να πίνουν το κρασί τους ανακατεμένο με νερό.

Η λέξη "οίνος" μαρτυρείται στην ελληνική γλώσσα ήδη από τους μυκηναϊκούς χρόνους (στη γραμμική Β: wo-no, μεταγραφόμενο: Φοίνος), ωστόσο δεν είναι γνωστή η προέλευσή της. Η λέξη απαντάται σε όλες σχεδόν τις γλώσσες της Μεσογείου καθώς και στις περισσότερες της ινδοευρωπαϊκής οικογένειας. Οι τύποι των σημιτικών γλωσσών (εβρ. jajin, αραβ. wain) έχουν προέλθει από τους γειτονικούς λαούς ενώ οι κελτικοί τύποι (αρχ. ιρλανδ. fin, γαλατ. gwīn) έχουν δανειστεί από τη λατινική γλώσσα (vinum), κάτι που ορισμένοι δέχονται και για το γοτθικό-γερμανικό wein, από το οποίο με τη σειρά τους κατάγονται πιθανότατα οι τύποι των σλαβικών και βαλτικών γλωσσών. Υποστηρίχθηκε ότι η καταγωγή της λέξης είναι ινδοευρωπαϊκή, από τη ρίζα uei- ή wei- "κάμπω, στρέφω" με αναφορά στη χαρακτηριστική μορφολογία της αμπέλου (πρβλ. λατιν. vitis=άμπελος, επίσης ελλ. ιτύς, λατιν. vitus και γερμ. weide=ιτιά). Ωστόσο πιθανότερη θεωρείται η εκδοχή η λέξη να προήλθε από μια άγνωστη γλώσσα της περιοχής του νοτίου Καυκάσου-Εύξεινου Πόντου, από όπου επίσης δείχνει να κατάγεται η σύγχρονη άμπελος.

Το αμπέλι από το οποίο προέρχεται το κρασί έχει σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους, προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών. Ακόμα και πριν από την εποχή των παγετώνων ευδοκίμωσε στην πολική ζώνη, κυρίως στην Ισλανδία στη Βόρεια Ευρώπη αλλά και τη βορειοδυτική Ασία. Οι παγετώνες περιόρισαν σημαντικά την εξάπλωσή του και επέβαλαν κατά κάποιο τρόπο την γεωγραφική απομόνωση πολλών ποικιλιών, μέρος των οποίων εξελίχθηκαν και σε διαφορετικά είδη. Στην πορεία των χρόνων, διάφοροι πληθυσμοί άγριων αμπέλων μετακινήθηκαν προς θερμότερες ζώνες,

κυρίως προς την ευρύτερη περιοχή του νοτίου Καυκάσου. Στην περιοχή αυτή, μεταξύ Ευξείνου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας, γεννήθηκε το είδος Άμπελος η οиноφόρος (*Vitis vinifera*), οι διαφορετικές ποικιλίες του οποίου καλλιεργούνται και σήμερα.

Η καλλιέργεια της αμπέλου είναι γνώστη από το 5000 π.Χ με πρώτους λαούς που ασχολήθηκαν με αυτήν τους Πέρσες, τους Σημιτικούς λαούς και τους Ασσύριους. Μεταγενέστερα οι γνώσεις της αμπελοργίας και η τέχνη της οινοποιίας μεταφέρθηκαν στους Αιγύπτιους, τους Φοίνικες και τέλος τους πληθυσμούς της Μικρασίας και του Ελλαδικού χώρου.

Οι αρχαίοι Έλληνες έπιναν το κρασί με νερό, σε αναλογία συνήθως 1:3 (ένα μέρος οίνου προς τρία μέρη νερού). Διέθεταν δε ειδικά σκεύη τόσο για την ανάμειξη (κρατήρες), όσο και για την ψύξη του. Η κατανάλωση κρασιού χωρίς ανάμειξη με νερό ("άκρατος οίνος") θεωρείτο βαρβαρότητα και συνηθιζόταν μόνο από αρρώστους ή κατά τη διάρκεια των ταξιδιών ως τονωτικό. Ο τρόπος παραγωγής του κρασιού στις παλαιότερες εποχές δεν διέφερε ουσιαστικά από τις σύγχρονες πρακτικές. Είναι αξιοσημείωτο πως ως τις μέρες μας σώζονται κείμενα του Θεόφραστου που περιέχουν πληροφορίες για τους τρόπους καλλιέργειας, ενώ οι Έλληνες γνώριζαν και την παλαίωση του κρασιού, την οποία επιτύγχαναν μέσα σε θαμμένα πιθάρια σφραγισμένα με γύψο και ρετσίνι. Το κρασί εμφιαλωνόταν σε ασκούς ή σε σφραγισμένους πήλινους αμφορείς, αλειμμένους με πίσσα για να παραμένουν στεγανοί.

Το εμπόριο των ελληνικών κρασιών απλωνόταν σε ολόκληρη τη Μεσόγειο έως την Ιβηρική χερσόνησο και τον Ευξείνο πόντο και αποτελούσε μία από τις σημαντικότερες οικονομικές δραστηριότητες. Σε αρκετές πόλεις υπήρχαν ειδικοί νόμοι ώστε να εξασφαλίζεται όχι μόνο η ποιότητα του κρασιού, αλλά και ο ανταγωνισμός των εισαγωγών. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αποτελεί η νομοθεσία της Θάσου, σύμφωνα με την οποία πλοία με ξένο κρασί που πλησίαζαν το νησί θα έπρεπε να δημεύονται.

Οι Ρωμαίοι ήρθαν σε επαφή με το κρασί από τους Έλληνες αποίκους και τους γηγενείς Ετρούσκους οι οποίοι επίσης επιδίδονταν στην αμπελοκαλλιέργεια. Με την κατάρρευση της Ρώμης και τις μεταναστεύσεις των λαών η αμπελοργία γνώρισε περίοδο ύφεσης και εγκαταλείφθηκε για αιώνες σε κάποιες περιοχές. Σημαντικό ρόλο στη διάσωση της οινοποιίας έπαιξαν οι κληρικοί και μοναχοί, οι οποίοι χρησιμοποίησαν το κρασί για τελετουργικούς σκοπούς. Στη Βυζαντινή Αυτοκρατορία, με δεδομένο ότι οι μεγαλύτερες εκτάσεις γης ανήκαν στην εκκλησία οι μοναχοί επωμίστηκαν

την καλλιέργεια των αμπελιών και την παραγωγή του κρασιού. Μάλιστα την περίοδο αυτή πρέπει να εγκαταλείφθηκε και η πρακτική της ανάμειξης του κρασιού με νερό.

Στη Δύση την ίδια περίοδο η τέχνη του κρασιού γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη με αποτέλεσμα τον 16ο αιώνα να έχει ήδη εξαπλωθεί στην Ισπανία και τη Γαλλία. Την εποχή αυτή υιοθετήθηκαν και αρκετές τεχνικές καινοτομίες, όπως η χρήση της υάλινης φιάλης και του φελλού. Επιπλέον έγινε γνωστή η παρασκευή του αφρώδους οίνου, όπως για παράδειγμα η σαμπάνια, που αποδίδεται στον Γάλλο βενεδικτίνο μοναχό Πε.

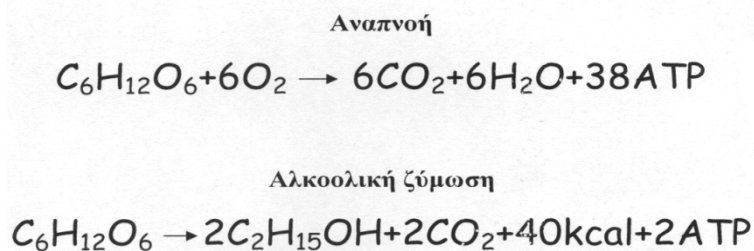
Το κρασί παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφενός ως δημοφιλές ποτό που συνοδεύει και ενισχύει ένα ευρύ φάσμα ευρωπαϊκών και μεσογειακών γεύσεων και αφετέρου επειδή αποτελεί σημαντικό γεωργικό προϊόν που αντικατοπτρίζει την ποικιλία του εδάφους και το κλίμα ενός τόπου. Επίσης το κρασί χρησιμοποιείται από πολλούς πολιτισμούς σε θρησκευτικές τελετές, ενώ το εμπόριο κρασιού είναι ιστορικής σπουδαιότητας για πολλές περιοχές.

1.5.1 Οινοποίηση

Η ρώγα του σταφυλιού, που υφίσταται οινοποίηση αποτελεί, περιέχει σάκχαρα, οργανικά οξέα και νερό σε περιεκτικότητες οι οποίες εξαρτώνται από την ποικιλία, τις εδαφοκλιματικές και καλλιεργητικές συνθήκες-πρακτικές και τη χρονική στιγμή της ωρίμανσης του σταφυλιού. Μετά τον τρύγο (συγκομιδή), ακολουθεί η γλυκοποίηση, δηλαδή η διαδικασία κατά την οποία παράγεται το γλεύκος (μούστος) από το σταφύλι. Για την παραγωγή του μούστου χρησιμοποιούνται διάφορα ειδικά μηχανήματα που συνθλίβουν το σταφύλι συνήθως με περιστρεφόμενους κυλίνδρους. Πριν τη γλυκοποίηση, επιβάλλεται η αφαίρεση των κοτσανιών (*αποβοστρύχωση*) του σταφυλιού, καθώς είναι επιζήμια για την γεύση του τελικού κρασιού (*Κουράκου, 1998*).

Στη συνέχεια, ακολουθεί η τελική διαδικασία της ζύμωσης κατά την οποία παράγεται το οινόπνευμα που περιέχει το κρασί από τα σάκχαρα του μούστου με την αλκοολική ζύμωση, (Σχήμα 1.11). Αυτή επιτελείται από ειδικά ένζυμα, τις *ζυμάσες* των ζυμομυκήτων και κυρίως του είδους *Saccharomyces cerevisiae*. Η διαφορά της αντίδρασης της αλκοολικής ζύμωσης από την αναπνοή έγκειται στη απουσία οξυγόνου, η οποία οδηγεί στην παράγωγή αιθυλικής αλκοόλης. Οι ζυμομύκητες υπάρχουν αδρανοποιημένοι στο φλοιό των σταφυλιών και καθώς έρχονται σε επαφή με το μούστο χρησιμοποιούν ως θρεπτικό υπόστρωμα τα σάκχαρα που περιέχονται σε αυτόν, πολλαπλασιάζονται και επιτελούν τη ζύμωση.

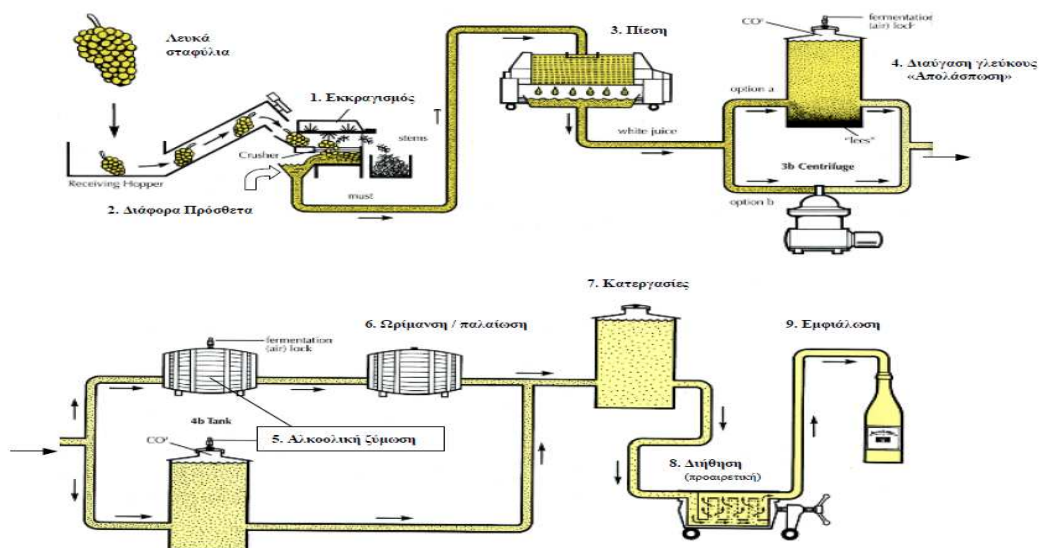
Σχήμα 1.11 Αλκοολική ζύμωση.



Εκτός από αιθυλική αλκοόλη παράγεται και διοξείδιο του άνθρακα αλλά και μια σειρά από δευτερεύοντα προϊόντα με καθοριστική πολλές φορές σημασία για την ποιότητα του οίνου. Η διαδικασία της ζύμωσης διαρκεί συνήθως 8-25 ημέρες αλλά είναι σύνηθες η ζύμωση να παρατείνεται ή να διακόπτεται με τεχνητά μέσα, κυρίως μέσω της διατήρησης της θερμοκρασίας σε χαμηλά ή υψηλά επίπεδα αντίστοιχα. Ο χρόνος της ζύμωσης είναι καθοριστικός για το κρασί που θα παραχθεί τελικά. Επιπλέον γίνεται συνήθως λόγος για λευκή και ερυθρή οινοποίηση (Εικόνα 1.2, 1.3) ανάλογα με το χρώμα του παραγόμενου κρασιού.

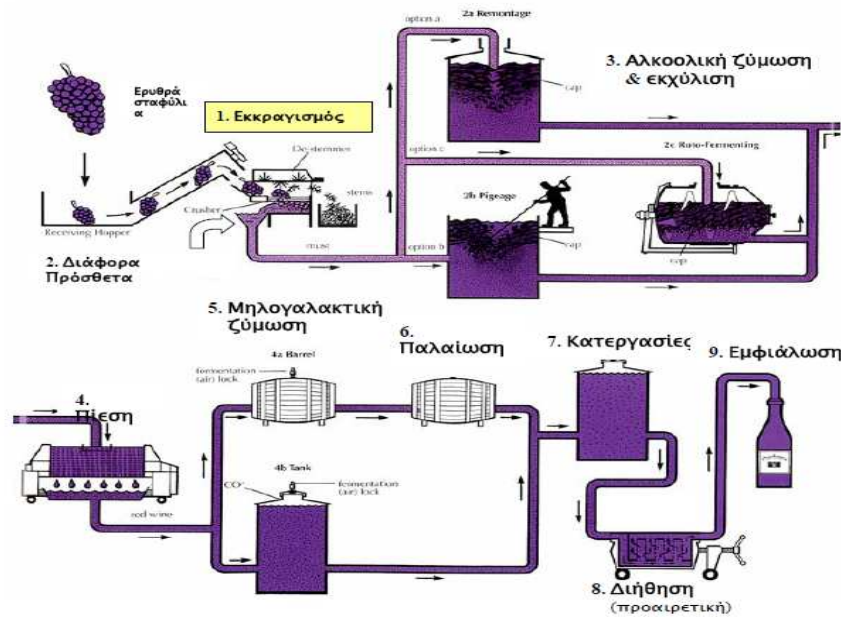
Εικόνα 1.2 Λευκή οινοποίηση.

ΛΕΥΚΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ



Εικόνα 1.3 Ερυθρή οινοποίηση.

ΕΡΥΘΡΗ ΟΙΝΟΠΟΙΗΣΗ



Οι διαφορές της λευκής από την ερυθρά οινοποίηση αναφέρονται στο χρόνο παραμονής των στέμφυλων κατά τη διάρκεια της αλκοολικής ζύμωσης. Στην ερυθρά τα στέμφυλα παραμένουν έως 8 ημέρες με αποτέλεσμα να διεξάγεται ταυτόχρονα και εκχύλιση των συστατικών της ρώγας από το υδροαλκοολικό διάλυμα που σχηματίζεται κατά την αλκοολική ζύμωση (Κουράκου, 1998). Ως αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής είναι η ποιοτική και ποσοτική διαφορά στη σύσταση, μεταξύ ερυθρών και λευκών οίνων.

Τέλος, έχει ιδιαίτερη αξία και η διαδικασία ωρίμανσης του κρασιού. Γενικά ένα ερυθρό κρασί γίνεται καλύτερο όσο παλιώνει, παρότι διαφορετικά είδη κρασιού χαρακτηρίζονται από διαφορετική διάρκεια ζωής. Όμως στην πράξη κύρια επιδίωξη αποτελεί η αργή και ελεγχόμενη οξείδωση του κρασιού, ενώ η διάρκεια της ωρίμανσης του ποικίλλει και συνήθως κυμαίνεται από μερικούς μήνες έως λίγα χρόνια. Γενικά ελάχιστα κρασιά έχουν διάρκεια ζωής άνω των 50 ή 100 ετών, ενώ τα περισσότερα φθάνουν στην ποιοτική τους κορύφωση σε λίγα χρόνια.

1.5.2 Σύσταση των ερυθρών οίνων

Τα συστατικά των ερυθρών οίνων μπορούν να διακριθούν σε 3 μεγάλες κατηγορίες :

- Το νερό (80-85%)

- Τα οργανικά συστατικά (Οργανικά οξέα, Αλκοόλες, Αρωματικές ενώσεις, Σάκχαρα, Πολυσακχαρίτες, Φαινολικές ενώσεις, Αζωτούχες ενώσεις, Ύνζυμα, Βιταμίνες)
- Τα ανόργανα συστατικά (Ανιόντα : Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , F^- , Br^- , I^- , Κατιόντα : K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^+)

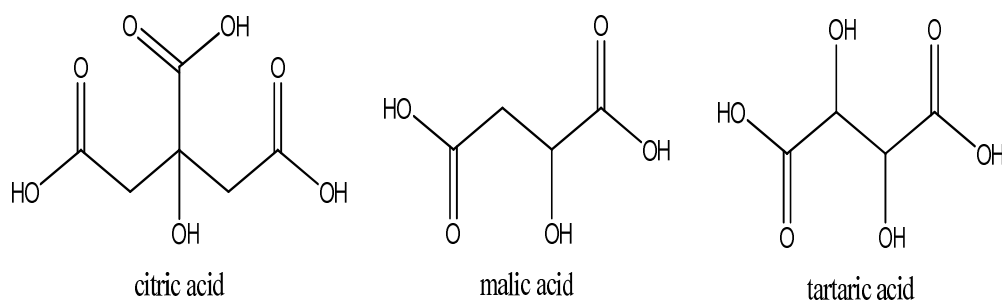
1.5.2.1 Οργανικά οξέα

Τα οργανικά οξέα αποτελούν μια πολύ σημαντική κατηγορία ενώσεων των οίνων που είναι υπεύθυνα για την

- ξινή τους γεύση
- προστασία τους από μικροβιολογικές ή χημικές προσβολές
- διατήρηση του χρώματος τους

Τα κυριότερα οξέα είναι: τρυγικό (2-5g/l), μηλικό (0-4g/l) και το κιτρικό οξύ (0.1g/l) (Σχήμα 1.12).

Σχήμα 1.12 Τα κυριότερα οργανικά οξέα του κρασιού.



1.5.2.2 Αλκοόλες

Η αιθανόλη είναι μετά το νερό το σημαντικότερο συστατικό του κρασιού αφού αποτελεί το 10-16% του όγκου του. Η γλυκερόλη είναι το 3ο συστατικό σε ποσότητα (5-20 g/l). Οι αλκοόλες, τα σάκχαρα και η γλυκερόλη αποτελούν τα γλυκαντικά συστατικά του κρασιού που εξουδετερώνουν τη ξινή γεύση των οξέων και την πικρή των φαινολικών ενώσεων.

1.5.2.3 Φαινολικές ενώσεις

Οι κυριότερες φαινολικές ενώσεις των κρασιών είναι:

- Τα φαινολικά οξέα
- Οι φλαβόνες

- Οι ανθοκυάνες
- Οι ταννίνες

Οι φαινολικές ενώσεις είναι υπεύθυνες για:

- Το χρώμα και τη γεύση (στιφάδα) του κρασιού
- Την αντιοξειδωτική και αντιβακτηριακή προστασία
- Την παλαίωση του κρασιού

Οι φαινολικές ενώσεις επειδή προέρχονται από τα στερεά μέρη του σταφυλιού βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στους ερυθρούς οίνους.

Εκτός των παραπάνω στο κρασί απαντώνται και ενώσεις όπως :

- Βιταμίνες (θειαμίνη-B₁, κοβαλαμίνη-B₁₂, ριβοφλαβίνη-B₂, μεσοινοσιτόλη-I, νικοτιναμίδη-B₃, βιοτίνη-H, αδενίνη-B₄, ασκορβικό οξύ-C, παντοθενικό οξύ-B₅, βιταμίνη της διαπερατότητας-P, πυριδοξίνη-B₆)
- αζωτούχες ενώσεις (Πρωτεΐνες, Πολυπεπίδια, Αμινοξέα)
- ενζυμα (καταλάσες, οξειδάσες, ιμπερτάσες, πρωτεάσες κλπ)

Είναι φανερό ότι το κρασί (και ειδικότερα το κόκκινο) περιέχει ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων με σημαντική αντιμικροβιακή δράση.

1.6 Κρέας

Με την έννοια ‘κρέας’ οι καταναλωτές αντιλαμβάνονται τους σκελετικούς μύες των σφαζόμενων ζώων, πτηνών, ζώων κυνηγιού και ψαριών (*Μεταξόπουλος, 1989*). Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ως ‘κρέας’ χαρακτηρίζονται τα αυτοτελή σώματα ή τμήματα σωμάτων των θερμόαιμων ζώων ή πτηνών που είναι κατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου και διατίθενται στην κατανάλωση χωρίς καμία, εκτός της ψύξης, επεξεργασία. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Κοινότητας, με την έννοια ‘κρέας’ νοούνται όλα τα κατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου μέρη των βοοειδών, αιγοπροβάτων, χοίρου και μονόπλων τα οποία εκτρέφονται σαν κατοικίδια ζώα. Το μέρος του σώματος των θερμόαιμων ζώων που παραμένει μετά τη σφαγή, την αφαίμαξη, την εκδορά, τον εκσπλαχνισμό και πιθανόν την αφαίρεση της κεφαλής και των άκρων αποτελεί το σφάγιο.

Ανάλογα με την προέλευσή του το κρέας διακρίνεται σε ερυθρό, πουλερικών, ιχθυηρών και κυνηγιού. Στην κατηγορία των ερυθρών κρεάτων περιλαμβάνονται τα κρέατα των βοειδών, χοίρων, αιγοπροβάτων, του αλόγου, της αντιλόπης, της καμήλας, του βουβάλου, του κουνελιού και πολλών ακόμα θερμόαιμων ζώων.

Οι κύριοι ιστοί που απαρτίζουν το κρέας είναι ο μυϊκός, ο συνδετικός και ο λιπώδης. Ο μυϊκός ιστός αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του σφάγιου και διακρίνεται σε γραμμωτό, καρδιακό και λείο μυϊκό ιστό. Ο γραμμωτός μυϊκός ιστός περιλαμβάνει περισσότερους από 300 ανεξάρτητους μύες, οι οποίοι κατά τη μικροσκοπική τους εξέταση εμφανίζουν εγκάρσιες γραμμώσεις και ονομάζονται ως γραμμωτοί ή σκελετικοί ή εκούσιοι μύες. Η βασική μονάδα έκαστου μύος είναι η μυϊκή ίνα η οποία αποτελείται από το σαρκείλημα, τα μυϊκά ινίδια, το σαρκόπλασμα και τους πυρήνες (*Μεταξόπουλος, 1989*).

Ο συνδετικός ιστός αποτελείται κυρίως από τις πρωτεΐνες κολλαγόνο, ελαστίνη και ρετικουλίνη. Τέλος, ως λιπώδης θεωρείται ο ιστός που απαρτίζεται από τα λιπώδη κύτταρα και προέρχεται από το κρέας ή τις περιοχές των φυσικών κοιλοτήτων (κοιλίας, πύλου) εκτός από τα έντερα (*Μεταξόπουλος, 1989*).

Η χημική σύσταση του κρέατος ποικίλει ανάλογα με το είδος, το φύλο και την ηλικία του ζώου, αλλά και το είδος της διατροφής, τη μεταχείριση πριν (και κατά) τη σφαγή, και τέλος τη διάρκεια και θερμοκρασία ωρίμανσης και συντήρησης του κρέατος. Η εκατοστιαία χημική σύνθεση ενός σκελετικού μύος απαλλαγμένου από το ορατό λίπος είναι κατά μέσο όρο: 72-75% νερό, 18.5-21% πρωτεΐνες, 1-3% λίπη, 1.7% εκχυλισματικές αζωτούχες ουσίες, 0.9-1% εκχυλίσιμες μη αζωτούχες ουσίες και 1% ανόργανα άλατα. Στον Πίνακα 1.6 παρουσιάζεται η χημική σύσταση ενός μύος από ενήλικο θηλαστικό μετά τη νεκρική ακαμψία. Ανάλογα με την σχετική αναλογία των συστατικών αυτών, το κρέας αποκτά μία ιδιαίτερη δομή, υφή, άρωμα, χρώμα και θρεπτική αξία. Είναι κατά συνέπεια ένα τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας με μεγάλη οικονομική σημασία, το οποίο ταυτόχρονα αποτελεί ένα προϊόν ιδιαίτερα ευπαθές και ευαλλοίωτο.

Πίνακας 1.6: Ενδεικτική χημική σύσταση μύος ενήλικου θηλαστικού μετά τη μυϊκή ακαμψία (*Μεταξόπουλος, 1989*).

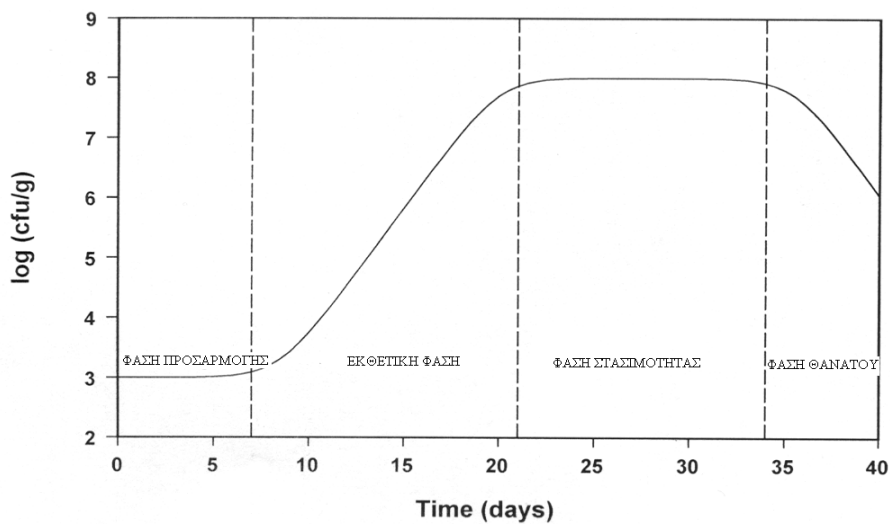
Συστατικό	% βάρος	
Νερό	75.5	
Πρωτεΐνες:	18.0	
Πρωτεΐνες μυϊκών ινιδίων	Μυοσΐνη	5.0
	Ακτΐνη	2.5
	Τροπομυοσΐνη, τροπονΐνη, πρωτεΐνες Μ και C, α και β ακτΐνη	2.5
Σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες	Μυογόνο, Γλοβΐνες	5.6
	Μυοσφαιρΐνη	0.36
	Αιμοσφαιρΐνη	0.04
	Πρωτεΐνες μιτοχονδρίων	0.002
Πρωτεΐνες σαρκοπλασματικού δικτύου και σαρκελήματος	Κολλαγόνο –Ελαστΐνη-Ρετικουλΐνη	2.0
Λίπος	3.0	
Υδατοδιαλυτές μη πρωτεΐνικές ουσΐες:	3.5	
Αζωτούχες μη πρωτεΐνικές ουσΐες	Κρεατΐνη	0.55
	Μονοφωσφορική ινοσΐνη	0.30
	Νουκλεοτΐδια	0.07
	Αμινοξέα	0.35
	Κερνοσΐνη, ανσερΐνη	0.30
Υδατάνθρακες	Γαλακτικό οξύ	0.90
	Γλυκογόνο	0.10
	Γλυκόζη	0.18
Ανόργανες ουσΐες	Διαλυτός φΐσφορος	0.20
	Κάλλιο	0.35
	Νάτριο	0.05
	Μαγνήσιο	0.02
	Ασβέστιο	0.007
	Ψευδάργυρος	0.005

1.6.1 Βασικές αρχές μικροβιακής αλλοΐωσης κρέατος

Το κρέας αποτελεί ένα περιβάλλον στο οποίο τα θρεπτικά συστατικά δεν είναι περιοριστικός παράγοντας για την μικροβιακή ανάπτυξη, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να πολλαπλασιάζεται με ευκολία. Για έναν συγκεκριμένο πληθυσμό η μεταβολή του δεκαδικού λογάριθμου της πυκνότητάς του σε σχέση με το χρόνο απεικονίζεται ως μία χαρακτηριστική καμπύλη. (Σχήμα 1.13).

Μετά από ένα χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο λογάριθμος του πληθυσμού παραμένει σταθερός, υπάρχει ένας αρχικός αργός ρυθμός αύξησης, σε συνάρτηση με το χρόνο και επιτυγχάνεται ένας σταθερός ρυθμός ανάπτυξης. Στη συνέχεια, ο ρυθμός αυτός μειώνεται και τελικά γίνεται αρνητικός. Με βάση λοιπόν την καμπύλη αυτή η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις φάσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως: α) λανθάνουσα, β) εκθετική, γ) στασιμότητας και δ) κάμψης ή θανάτου.

Σχήμα 1.13 Τυπική καμπύλη βακτηριακής ανάπτυξης



Η στασιμότητα των μικροοργανισμών στη λανθάνουσα φάση οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την περίοδο αυτή τα κύτταρα μέσω ορισμένων βιοχημικών διεργασιών (που σχετίζονται με τη φυσιολογία τους) προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον. Στη συνέχεια τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με τον ταχύτερο δυνατό ρυθμό επιδεικνύοντας μία εξισορροπημένη ανάπτυξη κατά την οποία ο ρυθμός σύνθεσης των συστατικών του κυττάρου (ένζυμα, δομικά μόρια, DNA κ.ά.) είναι τέτοιος ώστε να μην γίνεται μεγαλύτερη σύνθεση σε σχέση με αυτήν που απαιτείται για την παραγωγή των νέων κυττάρων. Δηλαδή κατά την εκθετική φάση η μεταβολική δράση των μικροορ-

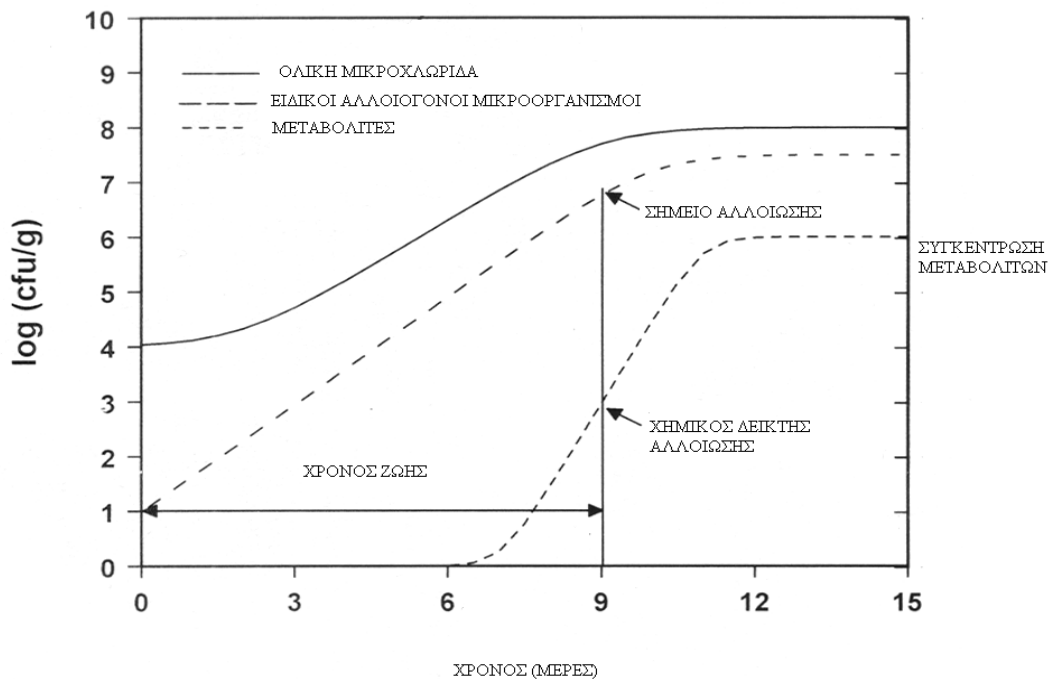
γανισμών κατευθύνεται εξολοκλήρου προς τη διαίρεση. Στη φάση αυτή τα κυτταρικά συστατικά βρίσκονται σε σταθερές αναλογίες για όλο τον πληθυσμό και τα κύτταρα θεωρούνται όμοια όσον αφορά την φυσιολογική τους κατάσταση. Κατά τη διάρκεια της αύξησης, λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών λαμβάνει χώρα η παραγωγή και συσσώρευση των προϊόντων μεταβολισμού τα οποία εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση με συνέπεια τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των κυττάρων και την εισαγωγή τους στη φάση στασιμότητας. Αν και η διάρκεια της φάσης αυτής ποικίλει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού και το περιβάλλον ανάπτυξης, τελικά η αύξηση της συγκέντρωσης των παρεμποδιστικών μεταβολιτών οδηγεί στην καταστροφή των κυττάρων (φάση θανάτωσης). Τις περισσότερες φορές η φάση στασιμότητας δεν παρουσιάζει άμεσο ενδιαφέρον αφού συνήθως η αλλοίωση παρατηρείται πριν από τη φάση αυτή. Βέβαια η σχέση της μικροβιακής αλλοίωσης με την οργανοληπτική υποβάθμιση του κρέατος είναι άμεση (Πινάκας 1.7).

Ο βαθμός αλλοίωσης ως αποτέλεσμα της μικροβιακής ανάπτυξης, θα πρέπει να σχετίζεται με το συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών. Όμως αυτό δεν ισχύει πάντα αφού συνήθως οι ουσίες που οδηγούν στην οργανοληπτική απόρριψη παράγονται μόνο από ένα τμήμα της συνολικής μικροχλωρίδας, τους 'ειδικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς' (*Gram and Huss, 1996*) (Σχήμα 1.14).

Πίνακας 1.7. Χαρακτηριστικά της μικροβιακής αλλοίωσης κρέατος (*Gram and Huss, 1996*).

Μικροβιακή δραστηριότητα	Οργανοληπτική εκδήλωση
Αποικοδόμηση συστατικών του τροφίμου	Παραγωγή δυσάρεστων οσμών
Παραγωγή εξωκυτταρικού πολυσακχαριτικού υλικού	Σχηματισμός γλοιώδους επιφάνειας
Ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων	Μεγάλες ορατές χρωματιστές ή άχρωμες αποικίες
CO ₂ – από υδατάνθρακες ή αμινοξέα	Παραγωγή αερίου
Παραγωγή χρωστικών που διαχέονται	Αποχρωματισμός

Σχήμα 1.14 Γενική εικόνα αλλαγών στον ολικό μικροβιακό πληθυσμό (OMX), στους ειδικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς και στους χημικούς δείκτες μικροβιακής αλλοίωσης κατά τη διάρκεια αλλοίωσης του κρέατος.



1.6.2 Μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος

Η μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος διακρίνεται σε 'εξωγενή' και 'ενδογενή' (Ingram and Dainty 1971), αφού η μόλυνση ενός νωπού κρέατος μπορεί να προέλθει ή από εσωτερικές ή από εξωτερικές πηγές μόλυνσης. Ως εσωτερικές πηγές μόλυνσης αναφέρονται εκείνα τα βακτήρια που αναπτύσσονται στο βάθος των ιστών του κρέατος. Ένας πιθανός μηχανισμός εσωτερικής επιμόλυνσης αποτελεί η εισαγωγή των βακτηρίων στο εσωτερικό τμήμα των σφαγίων από τα σπλάχνα είτε κατά τη σφαγή ή μεταθανάτια. Πάντως δεν έχει παρατηρηθεί μεταφορά βακτηρίων σε εσωτερικό ιστό κρέατος σε ζώα που είχαν ευσπλαχνιστεί μια μέρα μετά από το θάνατο ή είχαν εξαντληθεί πριν το θάνατο (Gill et al, 1978). Η διείσδυση μικροοργανισμών στο κρέας παρατηρείται όταν τα πρωτεολυτικά βακτήρια φτάνουν στη μέγιστη κυτταρική τους πυκνότητα και με τη βοήθεια των εξωκυτταρικών πρωτεασών που παράγουν, αποσυνθέτουν το συνδετικό ιστό μεταξύ των μυϊκών ινών (Gill and Penney, 1977). Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός εσωτερικής μόλυνσης είναι η εισαγωγή βακτηρίων από τις πληγές που έγιναν πριν ή μετά τη σφαγή μέσω της κυκλοφορίας του αίματος (Gill, 1998). Ο βαθμός επιμόλυνσης με αυτόν τον τρόπο εξαρτάται από τους μεταθανάτιους ανοσοποιητικούς μηχανισμούς του ζώου (Gill, 1976). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η

αλλοίωση στο εσωτερικό των σφαγίων παρατηρείται στη μυϊκή μάζα του οπίσθιου τεταρτημορίου των πρόβειων, χοιρινών και βοδινών σφαγίων, αφού λόγω μεγέθους και συνεπώς η θερμοκρασία στον πυρήνα τους μειώνεται με βραδύτερο ρυθμό, με αποτέλεσμα να επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες για τη μικροβιακή ανάπτυξη (Μπλούκας, 2007). Οι μικροοργανισμοί που συνήθως προκαλούν την εσωτερική μόλυνση είναι τα είδη *Clostridium* (Broda et al., 1996), ενώ έχουν αναφερθεί και τα είδη *Bacillus*, *Streptococcus* και μερικά είδη Enterobacteriaceae.

Το εσωτερικό του ακέραιου κρέατος που προέρχεται από υγιή ζώα και από υγιεινές συνθήκες σφαγής είναι στείρο ή σχεδόν στείρο. Όμως η επιφάνεια του επιμολύνεται κατά τη διάρκεια της σφαγής ή στη διάρκεια των μετέπειτα χειρισμών με διάφορους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ζύμες και μύκητες), αλλοιογόνους ή/και παθογόνους.

Τα κύρια αλλοιογόνα βακτήρια του φρέσκου κρέατος είναι Gram (-), όπως τα αερόβια ψυχρότροφα είδη *Pseudomonas*, *Moraxella/Acinetobacter* και τα προαιρετικά αναερόβια *Shewanella putrefaciens*. Ταυτόχρονα όμως απαντώνται και Gram (+) βακτήρια, όπως *Lactobacillus* και *Brochothrix thermosphacta*. Στους παθογόνους μικροοργανισμούς περιλαμβάνονται συνήθως τα γένη *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes*.

1.6.3 Συσκευασία κρέατος σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες

Η συσκευασία ενός τροφίμου σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες είναι η τοποθέτηση του σε πλαστική συσκευασία (μεμβράνη), στο εσωτερικό της οποίας η αέρια σύσταση έχει τροποποιηθεί με στόχο τη μείωση της αναπνοής, την ελάττωση της μικροβιακής ανάπτυξης και την επιβράδυνση της ενζυμικής αλλοίωσης, για την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής του προϊόντος. (Young et al. 1988). Οι συνηθέστερα εφαρμοζόμενες τροποποιημένες ατμόσφαιρες είναι: i) συσκευασία υπό κενό και ii) συσκευασία με αέριο μείγμα. Τα αέρια μείγματα που χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό διαφέρουν στη σύσταση από τον αέρα. Η μέθοδος της συσκευασίας υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες εμπεριέχει τη χρήση συγκεκριμένων πλαστικών υλικών-μεμβρανών συσκευασίας, μη διαπερατών ή επιλεκτικά διαπερατών στα αέρια. Επιπλέον τα υλικά αυτά προστατεύουν τα τρόφιμα από τη σκόνη, την περιβαλλοντική μόλυνση, τις μηχανικές βλάβες κλπ.

1.6.3.1 Συσκευασία υπό κενό

Αποτελεί την πλέον συνηθισμένη μορφή συσκευασίας που χρησιμοποιείται από τις βιομηχανίες κρέατος για την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής και τη διατήρηση της ποιότητας των προϊόντων. Το προϊόν τοποθετείται σε πλαστικές μεμβράνες συσκευασίας, οι οποίες έχουν χαμηλή διαπερατότητα σε O₂. Ο αέρας απομακρύνεται με τη βοήθεια συσκευής κενού ενώ η συσκευασία σφραγίζεται με θερμοκόλληση.

1.6.3.2 Συσκευασία κρέατος σε μείγματα αερίων

Αποτελεί την εναλλακτική μέθοδο η οποία αναφέρεται στη χρησιμοποίηση μείγματος διαφορετικής σύστασης αερίων O₂, CO₂ και N₂. Οι τροποποιημένες συνθήκες συσκευασίας είναι μία μέθοδος παράτασης της διάρκειας ζωής του κρέατος, που διευρύνει τους τρόπους προώθησης του και εξασφαλίζει τα κριτήρια που αφορούν τη διανομή του.

1.6.3.2.1 Αέρια συσκευασίας κρέατος

Οξυγόνο. Το αέριο O₂ προστίθεται στη συσκευασία κυρίως για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των αυστηρά αναερόβιων παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. *Clostridium botulinum*) και τη διατήρηση του χρώματος του κρέατος. Η υψηλή συγκέντρωση του αερίου αυτού στη συσκευασία προκαλεί την οξειδωση και τάγγιση των λιπιδίων (Genigeorgis, 1985).

Άζωτο. Χρησιμοποιείται για την αποφυγή της φθοράς της συσκευασίας, όταν μέρος του περιεχόμενου διοξειδίου του άνθρακα του μείγματος δεσμεύεται από το τρόφιμο. Συμπληρωματικά η χρήση του επιτρέπει τη μικρότερη προσθήκη οξυγόνου, με επακόλουθο την επιβράδυνση της ανάπτυξης των αερόβιων μικροοργανισμών (Enfors et al. 1979). Το άζωτο δεν παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση και δεν επιδρά στο χρώμα των ιστών του κρέατος.

Διοξείδιο του άνθρακα. Το αέριο αυτό αποτελεί ένα βακτηριοστατικό παράγοντα ο οποίος παρατείνει τη φάση προσαρμογής ή/και το χρόνο διπλασιασμού των κυττάρων των μικροοργανισμών. Η παρεμποδιστική δράση του εξαρτάται από: τη μερική πίεση του αερίου, το περιεχόμενο οξυγόνο, τη θερμοκρασία, το pH, την ενεργότητα του νερού, την αρχική ολική μικροβιακή χλωρίδα, το είδος των μικροοργανι-

σμών, το στάδιο της αύξησής τους, καθώς και από τα εγγενή χαρακτηριστικά του τροφίμου. Εργασίες που έχουν πραγματοποιηθεί για τη μελέτη του τρόπου δράσης (Wolfe, 1980, Finne, 1982, Genigeorgis, 1985, Dixon and Kell, 1989) συμφωνούν ότι η δράση του CO₂ για την τροποποίηση της κυτταρικής λειτουργίας αναφέρεται στη:

- Διάλυση του CO₂ στην κυτταρική μεμβράνη με αποτέλεσμα τη διαστολή ή και διάρρηξή της.
- Μεταβολή του ενδοκυτταρικού pH και διατάραξη της ενδοκυτταρικής ενζυμικής ισορροπίας (παρεμπόδιση των ενζύμων ή μείωση του ρυθμού δράσης τους).
- Μεταβολή των ενδοκυτταρικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων με αποτέλεσμα την μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των πρωτεϊνών.
- Απώλεια ενέργειας (ανάπτυξη της καρβοξυλίωσης και της αποκαρβοξυλίωσης).

Το μέγιστο επιθυμητό αποτέλεσμα της αντιμικροβιακής δράσης των τροποποιημένων ατμοσφαιρών επιτυγχάνεται με τη συντήρηση των προϊόντων σε χαμηλές θερμοκρασίες, επειδή η διαλυτότητα του CO₂ μειώνεται όταν η θερμοκρασία συντήρησης αυξάνεται (Daniel et al. 1985).

1.7 Υγιεινή και ασφάλεια του κρέατος

Η μικροβιακή ποιότητα και η διάρκεια ζωής του κρέατος εξαρτάται από το αρχικό μικροβιακό φορτίο και την τεχνολογία που θα χρησιμοποιηθεί για να παρεμποδιστεί ή ελαττωθεί ο ρυθμός ανάπτυξης των αλλοιογόνων βακτηρίων. Η συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες, η συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, η τροποποίηση διάφορων οικολογικών ιδιοτήτων του προϊόντος (ενεργότητα του νερού, προσθήκη οργανικών οξέων, αλάτων, φυσικών αντιμικροβιακών), η θερμική επεξεργασία αποτελούν ελάχιστα παραδείγματα της τεχνολογίας που εφαρμόζει ο άνθρωπος για να εξασφαλιστεί η άριστη ποιότητα των τροφίμων.

Εκτός όμως από την καλύτερη ποιότητα του προσφερόμενου προϊόντος και τη μεγαλύτερη παράταση της διάρκειας ζωής του, ένας επιπλέον σημαντικός στόχος της βιομηχανίας τροφίμων είναι η ελαχιστοποίηση ή εξάλειψη των μικροβιακών παραγόντων που προκαλούν μικρής ή μεγάλης κλίμακας, προβλήματα στην υγεία του ανθρώπου. Οι περιπτώσεις των τροφικών δηλητηριάσεων έχουν αυξηθεί στο βιομηχα-

νικό κόσμο την τελευταία δεκαετία, ανεξάρτητα από την εισαγωγή του όρου HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) και νομοθετικών ρυθμίσεων για την ασφάλεια των τροφίμων. Πιθανοί λόγοι για την αυξημένη επικινδυνότητα της επιμόλυνσης των τροφίμων από παθογόνους μικροοργανισμούς αποτελούν η ικανότητα επιβίωσης (ή/και ανάπτυξης) ορισμένων μικροοργανισμών στα τρόφιμα ή στις διάφορες κοινωνικές αλλαγές που συντελούνται ραγδαία σήμερα (π.χ. αλλαγές στη διατροφή, αυξημένη πληθυσμιακή μετανάστευση και μετακίνηση).

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, αποτελεί έναν από τους κύριους παθογόνους μικροοργανισμούς σε ποικίλα τρόφιμα, μεταξύ των οποίων και το κρέας. Είναι αερόβιο έως μικροαερόφιλο, μη σχηματίζον σπόρια, ψυχρότροφο Gram (+) κινητό ραβδόμορφο μικρόβιο, το οποίο αναπτύσσεται πολύ καλά στα συνήθη μέσα καλλιέργειας. Όλα τα παθογόνα για τον άνθρωπο στελέχη παράγουν μια μικρής έκτασης ζώνη β-αιμόλυσης στο άγαρ προβάτου. Η *L.monocytogenes* είναι ένας κοινός συμβιωτικός οργανισμός στην φύση. Βρίσκεται στο έδαφος, τη σκόνη, το νερό, στα βιομηχανικώς επεξεργασμένα τρόφιμα και στα κόπρανα των κατοικίδιων και άγριων ζώων. Υπάρχουν τέσσερις ορότυποι με τους υποτύπους 1/2a, 1/2b, 4b υπεύθυνους για τη μεγάλη πλειοψηφία των λοιμώξεων σε ανθρώπους και ζώα. Επειδή οι ίδιοι ορότυποι προκαλούν νόσο στους ανθρώπους και τα ζώα, αρχικά θεωρήθηκε ότι οι περισσότερες ανθρώπινες λοιμώξεις προέρχονταν μέσω απευθείας μετάδοσης από τα ζώα. Ωστόσο, αυτή η θεώρηση σπανιότατα έχει τεκμηριωθεί.

Οι περισσότερες περιπτώσεις λοίμωξης από τη *L.monocytogenes* στον άνθρωπο, (περιλαμβανομένης της λιστερίωσης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης) αποτελούν σποραδικές περιπτώσεις με σποραδικές επιδημικές εκρήξεις από κοινή πηγή. Οι τρέχουσες αποδείξεις υποστηρίζουν ότι τα μολυσμένα τρόφιμα είναι η συνηθέστερη πηγή μόλυνσης και στις σποραδικές περιπτώσεις και στις επιδημικές εκρήξεις.

Τα κυριότερα συμπτώματα κατά την προσβολή από *L.monocytogenes* είναι η ναυτία, ο εμετός και η διάρροια. Στις περιπτώσεις που προσβάλλει εγκύους ή άτομα με ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα (παιδιά, ηλικιωμένοι και άρρωστοι), μπορεί να οδηγήσει σε αποβολές, μηνιγγίτιδα, η ακόμα και το θάνατο.

1.8 Μαρινάρισμα

Το μαρινάρισμα είναι μία διαδικασία επεξεργασίας των κρεάτων που εφαρμόζεται πριν από το μαγείρεμα. Σε πολλές δε περιπτώσεις είναι δυνατόν να αντικαταστήσει το παραδοσιακό μαγείρεμα.

Η λέξη μαρινάρισμα-μαρινάδα προέρχεται από την ιταλική/λατινική λέξη “*marinara*” που σημαίνει “από την θάλασσα“. Όταν πρωτοχρησιμοποιήθηκε πριν από αιώνες ως μέθοδος κατεργασίας τροφίμων αναφερόταν στο θαλασσινό νερό (ή κάποιο άλλο υγρό με υψηλό επίπεδο αλατότητας) που χρησιμοποιείτο για τη συντήρηση, τον αρωματισμό και το μαλάκωμα των τροφών.

Οι περισσότερες μαρινάδες έχουν τρία βασικά συστατικά: α) ένα υγρό με αυξημένη οξύτητα όπως το κρασί, ξύδι, χυμός από λεμόνι ή πορτοκάλι, β) λίγο λάδι και γ) μπαχαρικά ή μυρωδικά. Το κρασί το ξύδι ή ο χυμός του λεμονιού μαλακώνουν και κάνουν τρυφερότερο το κρέας, προσθέτοντας παράλληλα άρωμα σε αυτό. Το λάδι δίνει σώμα στη μαρινάδα και βοηθάει να διατηρούν τα κρέατα την υγρασία τους. Συνήθως στο μαρινάρισμα χρησιμοποιούνται άγευστα και άοσμα λάδια όπως το ηλιέλαιο. Σε περιπτώσεις που χρειάζεται μια εντονότερη γεύση χρησιμοποιείται το ελαιόλαδο. Τα μυρωδικά και τα μπαχαρικά προσφέρουν τα ιδιαίτερα αρώματα τους.

Επειδή τα συνηθισμένα συστατικά μιας μαρινάδας (κρασί-ξύδι-μπαχαρικά) έχουν έντονη αντιμικροβιακή δράση, εάν ακολουθηθούν κατάλληλες συνθήκες υγιεινής κατά τη διαδικασία μαριναρίσματος είναι δυνατόν να μεγιστοποιηθεί η ασφάλεια του τελικού προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Στόχοι της διατριβής

Κύριος στόχος της διατριβής αυτής είναι η μελέτη της επίδρασης του μαριναρίσματος, με τη χρήση ερυθρού οίνου και αιθερίου ελαίου του θυμαριού, τόσο στην ενδογενή μικροχλωρίδα φιλέτων μοσχαρίσιου κρέατος όσο και σε φιλέτα εμβολιασμένα με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*. Αναλυτικά, οι στόχοι της παρούσας εργασίας είναι οι έξης:

- Προσδιορισμός της επίδρασης του μαριναρίσματος με κόκκινο κρασί στην ενδογενή μικροχλωρίδα φιλέτων μόσχου, αλλά και την ανάπτυξη/επιβίωση του παθογόνου *Listeria monocytogenes* (στελέχη τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε κανονικές ή συνθήκες οξίνισης) σε θερμοκρασίες συντήρησης 5-15⁰C και σε συσκευασία αέρα ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας (25% CO₂, 75% αέρα).
- Προσδιορισμός της επίδρασης του μαριναρίσματος με συνδυασμό κόκκινου κρασιού και αιθερίου ελαίου θυμαριού στην ενδογενή μικροχλωρίδα φιλέτων μόσχου αλλά και στην ανάπτυξη/επιβίωση του παθογόνου *Listeria monocytogenes* σε θερμοκρασίες συντήρησης 5-15⁰C και σε συσκευασία αέρα ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

2.2 Παραλαβή του αιθερίου ελαίου θυμαριού

Το θυμάρι (*Coridothymus capitatus* η *T. Capitatus*) που χρησιμοποιήθηκε για τη συγκεκριμένη μελέτη αγοράστηκε σε αποξηραμένη μορφή (όπως συνήθως κυκλοφορεί στην Ελλάδα) από ειδικό κατάστημα με καρυκεία βότανα και μπαχαρικά της Αθήνας. Για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου του θυμαριού χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της απόσταξης με υδρατμούς.

Συγκεκριμένα 100 g αποξηραμένου και μικροτεμαχισμένου θυμαριού (βλαστοί και φύλλα) τοποθετήθηκαν σε συσκευή τύπου Clevenger, η οποία διαθέτει ειδική εσφυρισμένη σφαιρική φιάλη χωρητικότητας 2 lt, επίθεμα κατάλληλο για έλαια ελαφρότερα του νερού, έναν ψυκτήρα και μια παγίδα. Στη φιάλη μαζί με τον φυτικό ιστό προστέθηκε 1.2 lt νερό και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε θερμαινόμενη εστία υπό ελαφρά ανάδευση και αφέθηκε να βράζει. Η απόσταξη διήρκεσε 4 ώρες. Μετά το τέλος της απόσταξης το αιθέριο έλαιο που συλλέχτηκε ψήχθηκε και μετρήθηκε απευ-

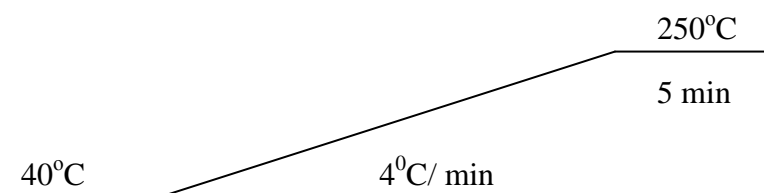
θείας στην παγίδα ο όγκος του. Η διαδικασία επαναλήφθηκε αρκετές φορές προκειμένου να εξασφαλιστεί η απαιτούμενη ποσότητα αιθερίου ελαίου για τη διενέργεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος του συλλεγέντος αιθερίου ελαίου τοποθετήθηκε σε μη διαπερατό από φως αεροστεγές γυάλινο δοχείο και διατηρήθηκε στους 4°C μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

2.3 Διαχωρισμός και ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου θυμαριού.

Για την ταυτοποίηση των συστατικών του αιθέριου ελαίου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC/MS). Τα προς ανάλυση δείγματα αραιώθηκαν 1/100 (v/v) με διχλωρομεθάνιο. Ποσότητα 1 μL εγχύθηκε στον εισαγωγέα σε λειτουργία *split* (split ratio 1/30). Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου του αέριου χρωματογράφου ήταν το ακόλουθο (Σχήμα 2.1):

- Θερμοκρασία εισαγωγέα: 230°C
- Θερμοκρασία γραμμής μεταφοράς(*interface*): 270°C
- Θερμοκρασία πηγής ιόντων: 200°C
- Τριχοειδείς στήλες : CP-Sil8 (30m X 0,32mm, df=0,25μm) (Chrompack) και DB-Wax (30m X 0,25mm, df=0,25μm) (J&W)
- Φέρον αέριο: Ήλιο υψηλής καθαρότητας με ταχύτητα ροής 1,0 mL/min.

Σχήμα 2.1. Θερμοκρασιακή μεταβολή του προγράμματος του αέριου χρωματογράφου.



Ο τρόπος λειτουργίας του φασματογράφου μάζας ήταν *electron impact*, με την ενέργεια ορισμένη στα 70 eV και εύρος σάρωσης μαζών 30-400 m/z. Η ταυτοποίηση των συστατικών έγινε με: i) σύγκριση των σχετικών δεικτών κατακράτησης (RRI) με τους αντίστοιχους πρότυπων ενώσεων (Adams, 2001). Για τον υπολογισμό των RRI χρησιμοποιήθηκαν υδρογονάνθρακες με άρτιο αριθμό ευθείας αλυσίδας ατόμων άνθρακα (C₈-C₂₄) (Niles, Illinois, USA), ii) σύγκριση των δεδομένων φασματοσκοπίας μαζών με τα αντίστοιχα πρότυπων ουσιών (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany, Acros Organics, Geel, Belgium, Fluka, Buchs, Germany και AppliChem, Darmstadt, Germany) και με τη χρήση των βιβλιοθηκών Wiley και NIST.

Η παρασκευή των διαλυμάτων των πρότυπων ουσιών (Πίνακας 2.1) έγινε αραιώνοντας 100μL πρότυπης ουσίας με διαλύτη διχλωρομεθάνιο έως συνολικό όγκο 10mL. Το διάλυμα εργασίας ήταν ένα μίγμα που προέκυψε από την ανάμιξη των προηγούμενων διαλυμάτων με υδρογονάνθρακες (C₈ -C₂₄) ως εξής: ποσότητα 50μL από όλες τις ουσίες και τους υδρογονάνθρακες εκτός από την θυμόλη (100μL) και την καρβακρόλη (30μL). Ποσότητα 1μL από το διάλυμα εργασίας εισήχθη στον αέριο χρωματογράφο με την τεχνική *split*.

Πίνακας 2.1 : Πρότυπες ενώσεις

α/α	Ένωση	Προέλευση	LRI (CP-Sil8)	LRI (DB-Wax)
1	(+)- α -πινένιο >99,5%	Fluka (Buchs, Germany)	940 \pm 1,2	1017 \pm 0,2
2	(-)- β -πινένιο	Fluka (Buchs, Germany)	975 \pm 1,2	1093 \pm 0,4
3	β -μυρκένιο	Fluka (Buchs, Germany)	991 \pm 1,3	1157 \pm 0,3
4	α -τερπινένιο	Fluka (Buchs, Germany)	1012 \pm 0,9	1174 \pm 0,4
5	π -κυμένιο	Fluka (Buchs, Germany)	1020 \pm 0,9	1266 \pm 0,01
6	λεμονένιο	Kit No. 85C, essential oil fingerprint Kit	1023 \pm 0,1	1197 \pm 0,2
7	γ -τερπινένιο	Fluka (Buchs, Germany)	1053 \pm 0,8	1243 \pm 0,01
8	λιναλοόλη 97%	Acros Organics (Geel, Belgium)	1096 \pm 0,2	1554 \pm 0,6
9	καμφορά	Fluka (Buchs, Germany)	1135 \pm 0,7	1514 \pm 0,9
10	(-)-βορνεόλη >99,5%	Fluka (Buchs, Germany)	1158 \pm 0,9	1708 \pm 0,3
11	(+)-4-τερπινεόλη	Fluka (Buchs, Germany)	1171 \pm 0,7	1605 \pm 0,7
12	θυμόλη	AppliChem, Darmstadt	1293 \pm 0,3	2192 \pm 0,2
13	καρβακρόλη	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)	1303 \pm 0,3	2221 \pm 0,4
14	<i>trans</i> -καρυοφυλένιο ή β -καρυοφυλένιο	Sigma-Aldrich, GmbH, Germany	1414 \pm 1,0	1594 \pm 0,01
15	(-)-οξειδίο του καρυοφυλενίου 95%	Acros Organics (Geel, Belgium)	1576 \pm 1,0	1984 \pm 0,2
16	<i>n</i> -παραφίνες με ζυγό αριθμό ανθρακοατόμων	PolyScience, Niles, Illinois		Kit No. 85C, essential oil fingerprint Kit

2.3.1 Γραμμικός Δείκτης Κατακράτησης (Linear Retention Index–LRI)

Το μίγμα ενώσεων που χρησιμοποιήθηκε στους προσδιορισμούς, είναι γνωστό ως NC (Netherlands Committee) μίγμα και αποτελείται από 6 συστατικά με χαρακτηριστικές ομάδες όμοιες με αυτές που συναντώνται στα αιθέρια έλαια. Επιπλέον τα δύο από τα τρία ζευγάρια συστατικών εκλύονται πολύ κοντά είτε σε πολική ή σε άπολη στήλη. Το μίγμα NC αποτελείται από λεμονένιο, λιναλοόλη, οξικό αστέρα της λιναλοόλης, ακετοφενόνη, ναφθαλένιο και κινναμωμική αλκοόλη.

Στον υπολογισμό του Γραμμικού Χρόνου Κατακράτησης των συστατικών χρησιμοποιείται και μία ομόλογη σειρά ζυγών υδρογονανθράκων (C₈-C₂₄). Τα κανονικά αλκάνια μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πολύ καλά αποτελέσματα ως συστατικά αναφοράς αφού βρίσκονται σε καθαρή μορφή, είναι εξαιρετικά σταθερά και εμφανίζουν τις λιγότερες χρωματογραφικές ανωμαλίες. Επιπλέον, η χρήση μιας οποιασδήποτε άλλης ομόλογης σειράς ενώσεων σε συνθήκες προγραμματιζόμενης λειτουργίας παρουσιάζει πολλές αποκλίσεις από τη γραμμικότητα του χρόνου έκλυσης – αριθμού ατόμων C. Η απόκλιση αυτή είναι ακόμα μεγαλύτερη για τις ομόλογες σειρές πολικών ενώσεων και αυτός είναι ένας ακόμη λόγος για την επιλογή της ομόλογης σειράς n-αλκανίων.

Ο Γραμμικός Χρόνος Κατακράτησης δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$LRI = \frac{\{100 \times (R_{tc} - R_{tn})\}}{R_t(n+2) - R_{tn}} + 100n$$

Όπου:

n: ο αριθμός των ατόμων άνθρακα του πρώτου υδρογονάνθρακα,

R_{tc}: ο χρόνος κατακράτησης (RRI) του υπό εξέταση συστατικού

R_{tn}: ο χρόνος κατακράτησης του υδρογονάνθρακα που προηγείται του συστατικού, και

R_{t(n+2)}: ο χρόνος κατακράτησης του υδρογονάνθρακα που έπεται του συστατικού.

2.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πολυφαινολών σε ερυθρό οίνο

Η διαδικασία παραλαβής των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία (Tsao and Yang, 2003):

150 mL ερυθρού οίνου της ποικιλίας Μανδηλαριά αραιώθηκαν με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 300 mL και αλκοολικού βαθμού 6%. Το διάλυμα που προέκυψε πέρασε μέσω στήλης διαμέτρου 3 cm, η οποία προηγουμένως είχε πληρωθεί με 10 g ρητίνης XAD-4 και είχε ενεργοποιηθεί με διαδοχικό πέρασμα 100 mL απεσταγμένου νερού, 100 mL μεθανόλης και 100 mL απεσταγμένου νερού. Η ταχύτητα ροής του δείγματος από τη στήλη προσαρμόστηκε στα 1 mL/min.

Μετά τη διέλευση του διαλύματος του οίνου, η στήλη εκπλύθηκε με 200 mL απεσταγμένου νερού προκειμένου να απομακρυνθούν τα σάκχαρα και στέγνωσε με διέλευση ρεύματος αέρα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διέλευση 50 mL μεθανόλης από την στήλη με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Το μεθανολικό κλάσμα που προέκυψε εξατμίστηκε υπό κενό δίνοντας ένα στερεό υπόλειμμα που αφού ζυγίστηκε επαναδιαλυτοποιήθηκε σε μεθανόλη επιτυγχάνοντας συγκέντρωση $2 \cdot 10^3 \mu\text{g/mL}$. Ακολούθησε διήθηση με φίλτρο διαμέτρου πόρων $0.45 \mu\text{m}$ και στη συνέχεια ανάλυση με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση καμπύλης αναφοράς διαλυμάτων από τα αντίστοιχα πρότυπα μόρια (Πίνακας 2.2).

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ουσιών πραγματοποιήθηκε με βάση τον χρόνο κατακράτησης και το φάσμα απορρόφησης των προτύπων ενώσεων. Συγκεκριμένα τα υδροξυβενζοϊκά οξέα, οι φλαβονόλες και οι προκυανιδίνες ανιχνεύθηκαν στα 280 nm, τα στιλβένια, τα υδροξυκιναμωμικά οξέα και οι εστέρες τους στα 320 nm ενώ οι φλαβονόλες και οι γλυκοζίτες τους στα 360 nm.

Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Thermo Finnigan 3000) με αντλία και θάλαμο ανάμιξης υψηλής πίεσης τεσσάρων καναλιών (P4000), απαερωτή, ανιχνευτή UV-Vis πολλαπλού μήκους κύματος και ανιχνευτή Diode Array. Το λογισμικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των δεδομένων ήταν το ChromQuest. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τυπου Lichrosphere C₁₈ (Merck, Germany) μαζί με την αντίστοιχη προστήλη.

Η κινητή φάση αποτελείται από τα διαλύματα:

A) Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COONa 20 mM με pH 2.7 το οποίο ρυθμίστηκε με τη προσθήκη CH₃COOH

B) Ακετονιτρίλιο

Η χρονική διάρκεια της ανάλυσης ήταν 70 min και η ροή ρυθμίστηκε στο 1 mL/min. Ο όγκος του δείγματος που εγχύθηκε ήταν 20 µL και ο διαχωρισμός των πολυφαινολών έγινε με πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, τα χαρακτηριστικά του οποίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.3.

Πίνακας 2.2 Πρότυπες ενώσεις

Πρότυπη ένωση	Μήκος κύματος (nm)	Εύρος συγκεντρώσεων (mg/L)	R ²	Όριο ανίχνευσης (mg/L)	Όριο ποσοτικοποίησης (mg/L)
Γαλλικό οξύ	280	30–0.47	0,9999	0,019	0,059
(+)- κατεχίνη	280	50–0.78	0,9999	0,025	0,076
(-)- επικατεχίνη	280	40–0.62	0,9999	0,159	0,477
Προκυανιδίνη B2	280	10–0.156	0,9981	0,032	0,097
Γαλλικός εστέρας της επικατεχίνης	280	10–0.156	0,9997	0,0054	0,016
trans-ρεσβερατρόλη	320	5–0.078	0,9999	0,002	0,006
Κερκετίνη	360	5–0.078	0,9959	0,01	0,031
Κεμπφερόλη	360	5–0.078	0,9997	0,016	0,048
Γαλακτοσίδης της κερκετίνης	360	10–0.156	0,9991	0,012	0,037
Γλυκοσίδης της κερκετίνης	360	10–0.156	0,9993	0,014	0,042
Ραμνοσίδης της κερκετίνης	360	10–0.156	1	0,024	0,072
Καφεϊκό οξύ	320	10–0.156	0,9999	0,016	0,049
π-κουμαρικό οξύ	320	40–0.62	1	0,02	0,061
Φερουλικό οξύ	320	10–0.312	1	0,03	0,089

Πινάκας 2.3 Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	Διαλύτης A (%)	Διαλύτης B (%)	Ροη mL/min
0	95	5	1.0
45	85	15	1.0
60	65	35	1.0
65	50	50	1.0
70	0	100	1.0

Για τον καθορισμό του ορίου ανίχνευσης (Detection Limit) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit) κάθε ουσίας χρησιμοποιήθηκαν οι σχέσεις:

$$DL = \frac{3.3 SD}{b}$$

$$QL = \frac{10 SD}{b}$$

όπου SD= η τυπική απόκλιση του σταθερού ορού της καμπύλης αναφοράς

και b = η κλίση της καμπύλης αναφοράς

2.5 Μεταχείριση δειγμάτων κρέατος

Σε όλες τις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε κρέας μόσχου ελληνικής προέλευσης και το τεμάχιο που εξετάστηκε κατά την πειραματική διαδικασία ήταν από την περιοχή της ωμοπλάτης του σφάγιου. Το κρέας αγοράστηκε από συνοικιακό κρεοπωλείο και μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο εργαστήριο σε λιγότερο από μισή ώρα.

Αυτό αποτελείτο από τρία μεγάλα τεμάχια των πέντε κιλών τα οποία στη συνέχεια τεμαχίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής σε φιλέτα βάρους 15 g και διαστάσεων 80mm x 40mm x 20mm και τοποθετήθηκαν σε ταψιά από αλουμίνιο μιας χρήσης του εμπορίου.

2.6 Παρασκευή εμβολίου

Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά στελέχη του παθογόνου βακτήριου *Listeria monocytogenes* (από την συλλογή μικροοργανισμών του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας τροφίμων (*Listeria monocytogenes* Scott A, *Listeria monocytogenes* 21350 και *Listeria monocytogenes* 21412)). Τα στελέχη βρίσκονταν σε συντήρηση στους -80°C μέσα σε ειδικά φιαλίδια τα οποία περιείχαν σφαιρίδια πάνω στα οποία βρισκόταν προσηλωμένος ο μικροοργανισμός. Για την προετοιμασία του κάθε εμβολίου, ένα σφαιρίδιο από τον κάθε μικροοργανισμό μεταφέρθηκε ασηπτικά σε 250ml υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (*broth*) Tryptic Soy Broth (LAB M). Ακολούθησε επώαση για 24 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (180 στροφ./min). Για τα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε μη όξινες συνθήκες ακολούθησε εμβολιασμός της αρχικής καλλιέργειας σε TSB χωρίς γλυκόζη, ενώ σε όσα είχαν υποστεί επίδραση οξίνισης ακολούθησε εμβολιασμός της αρχικής καλλιέργειας σε TSB με 1% γλυκόζη.

Η τελευταία ανανεωθείσα καλλιέργεια τοποθετήθηκε ασηπτικά σε πλαστικούς σωλήνες όγκου 10 ml και φυγοκεντρήθηκε (Heraeus Labofuge 400 R, Thermo Scientific) στις 5.000 στρ./min σε θερμοκρασία 4°C για 10 min. Μετά την απομάκρυνση της υπερκείμενης φάσης ακολούθησε έκπλυση της παραμένουσας βιομάζας με αποστειρωμένο διάλυμα $\frac{1}{4}$ φυσιολογικού ορού (Thisosulfate Ringer Solution-Lab M) και μετά ισχυρή ανάδευση προς επαναιώρηση και επανάληψη της φυγοκέντρωσης. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε δύο επιπλέον φορές για την πλήρη απομάκρυνση υπολειμμάτων του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα. Ακολούθησε επαναιώρηση των κυττάρων σε όγκο 10 ml Ringer. Τα τρία διαφορετικά στελέχη αναμίχθηκαν σε ίσους όγκους και μετά από δύο διαδοχικές δεκατονικές αραιώσεις με διάλυμα φυσιολογικού ορού προέκυψε το τελικό εμβόλιο της τάξης 10^6 cfu/ml.

2.7 Εμβολιασμός δειγμάτων

Όγκος 150μl από το εμβόλιο προστέθηκε με τη μέθοδο της επιφανειακής διασποράς σε έκαστο φιλέτο και ακολούθησε παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία 4°C για 1 ώρα έτσι ώστε να επιτευχθεί προσήλωση/απορρόφηση του εμβολίου

2.8 Παρασκευή διαλυμάτων μαρινάδας

Τα συστατικά των διαλυμάτων της μαρινάδας ήταν κόκκινο κρασί μόνο του ή σε συνδυασμό με αιθέριο έλαιο θυμαριού. Το κόκκινο κρασί αγοράστηκε από το εμπόριο σε συσκευασία 5 lt. Τα χαρακτηριστικά του ήταν: ερυθρός ξηρός οίνος (ποικιλία: Μανδηλαριά) με αλκοολικό τίτλο 12%. Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού προέκυψε από την προαναφερθείσα διαδικασία απόσταξης.

Για τις ανάγκες της διατριβής δυο διαφορετικές μαρινάδες παρασκευαστήκαν. Η μια αποτελείτο αποκλειστικά από κόκκινο κρασί, ενώ η δεύτερη εκτός από το κρασί περιείχε και αιθέριο έλαιο θυμαριού σε αναλογία 0.3%. Στην παρασκευή της δεύτερης μαρινάδας το κρασί τοποθετήθηκε σε δοχεία των δυο λίτρων και στη συνέχεια προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα αιθέριου ελαίου. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 30 min με σκοπό την ομογενοποίηση τους. Σε όλη τη διάρκεια της ανάδευσης τα δοχεία με το διάλυμα είχαν καλυφθεί με μεμβράνη για την αποφυγή απωλειών του αιθερίου ελαίου λόγω εξάτμισης.

2.9 Διαδικασία μαριναρίσματος

Σε κάθε ταγί με 20 φιλέτα εμβολιασμένου κρέατος προστέθηκαν 750 ml διαλύματος μαρινάδας. Στη συνέχεια τα ταγιά καλύφθηκαν με μεμβράνη και τοποθετήθηκαν στους 4⁰C για 12 ώρες.

2.10 Συσκευασία δειγμάτων

Μετά το πέρας της διαδικασίας του μαριναρίσματος ακολούθησε η συσκευασία των δειγμάτων. Τα δείγματα που συντηρήθηκαν σε συνθήκες αέρα τοποθετήθηκαν ατομικά σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και οδηγήθηκαν στους κλιβάνους συντήρησης στις αντίστοιχες θερμοκρασίες (5-15⁰C).

Κατά τη συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες τα δείγματα συσκευάστηκαν ατομικά σε πλαστικούς περιέκτες διαστάσεων 250mm x 100mm, (με χαρακτηριστικά υλικού: πάχος 90 mm, διαπερατότητα αερίων στους 20 °C, 50 % r.h., 25, 90 και 6 cm³m⁻²d.bar αντίστοιχα για τα αέρια CO₂, O₂ και N₂), σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (25% CO₂-75% αέρας). Η συσκευασία των δειγμάτων έγινε με μηχάνημα συσκευασίας προϊόντων Hencovac 1700 (Hectongen-Bosch), σύμφωνα με τα παρακάτω 3 διαδοχικά στάδια: (α) εκκένωση του περιέκτη από τον περιεχόμενο αέρα, (β)

διοχέτευση του μίγματος τροποποιημένης ατμόσφαιρας και (γ) διπλή θερμοκόλληση των περιεκτών. Η αναλογία δείγματος προς όγκο αέριας ατμόσφαιρας της συσκευασίας ήταν κατά μέσο όρο 1:3. Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στις θερμοκρασίες συντήρησης (5-15°C).

Ένας αριθμός εμβολιασμένων δειγμάτων τα οποία δεν υπεβλήθησαν σε μαρινάρισμα συσκευάστηκαν σε αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συντηρήθηκαν στις ίδιες θερμοκρασίες για να αποτελέσουν τους μάρτυρες του πειράματος.

2.11 Καταμέτρηση μικροβιακού πληθυσμού

Η μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο της μετασποράς. Από κάθε δείγμα ζυγίστηκαν ασηπτικά 15 g, τα οποία στη συνέχεια προστέθηκαν σε 125 ml ορρού Ringer και ομογενοποιήθηκαν για 60 s, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος σε συσκευή Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London). Ακολούθησε παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1 ml δείγματος από την προηγούμενη αραιώση σε 9 ml ορρού Ringer. Οι κατάλληλες κατά περίπτωση, δεκαδικές αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό τριπλής σειράς τρυβλίων για κάθε χρησιμοποιούμενο επιλεκτικό ή μη θρεπτικό υπόστρωμα. Οι κατηγορίες των μικροοργανισμών που προσδιορίστηκαν ήταν οι ακόλουθες:

(α) Αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα

- **Ολική μικροβιακή χλωρίδα (OMX):** Ποσότητα 0.1 ml από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος, εμβολιάστηκαν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα Plate Count Agar (PCA, Merck, 1.05463). Ακολούθησε επώαση στους 25°C για 2 ως 5 ημέρες και καταμέτρηση όλων των αποικιών, (Anon. 1978).
- **Γαλακτικά βακτήρια:** Ποσότητα 1 ml από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος, εμβολιάστηκαν με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα de Mann, Rogosa and Sharpe's (M.R.S, Merck, 1.10660). Ακολούθησε επώαση στους 25° C για 5 ημέρες κάτω από αναερόβιες συνθήκες (Gas-Pack system, BBL) (de Man et al. 1960).

- **Ψευδομονάδες:** Ποσότητα 0.1 ml από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος, εμβολιάστηκαν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα *Pseudomonas Agar Base* (Oxoid) με την προσθήκη των αντιβιοτικών C.F.C. (Oxoid) (*cetrimide-fusidinccephaloridine*). Ακολούθησε επώαση στους 25° C για 2 ως 3 ημέρες.
- **Ψυχρότροφα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που ζυμώνουν τη γλυκόζη:** Ποσότητα 1 ml από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος, εμβολιάστηκαν με την τεχνική της ενσωμάτωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα *Violet Red Bile Glucose Agar* (Merck). Ακολούθησε επώαση στους 37° C για 24 ώρες και απαρίθμηση όλων των μεγάλων αποικιών (> 0.5mm) που παρουσίασαν ιώδη χρωματισμό.

(β) Παθογόνοι μικροοργανισμοί

- ***Listeria monocytogenes*:** Ποσότητα 0.1 ml από σειρά διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων ομογενοποιημένου δείγματος, εμβολιάστηκαν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης στο επιλεκτικό υπόστρωμα *Palcam- Listeria Selective (PLS) Agar* (Merck, 1.11755) και προσθήκη *Palcam Listeria Selective Supplement*, (Merck, 1.12122). Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24-48 ώρες. Όταν ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* έπεσε κάτω από το όριο ανίχνευσης, το οποίο στην τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης είναι το 10² cfu/ml, ακολούθησε το στάδιο του εμπλουτισμού, της απομόνωσης και τέλος της ταυτοποίησης (ISO/Committee Draft 11290, Garrec et al.,2003). Ο εμπλουτισμός του δείγματος πραγματοποιήθηκε σε δύο διαδοχικά στάδια. α) Τον προ-εμπλουτισμό κατά τον οποίο τα 15 g του δείγματος, προστέθηκαν σε 125 ml ½ Fraser broth (LAB M, 164) με προσθήκη ½ Fraser Selective Supplement (LAB M, X 164) και ομογενοποιήθηκαν για 60s, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London). Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση στους 30°C για 24 ώρες. β) Τον εμπλουτισμό, κατά τον οποίο ποσότητα 0.1 ml από το παραπάνω εμβολιάστηκε σε δοκιμαστικούς σωληνες που περιείχαν 10 ml Fraser broth (LAB M, 164) με προσθήκη Fraser Selective Supplement (LAB M, X 165). Ακολούθησε επώαση στους 35°C για 24-48 ώρες. Από

τους δοκιμαστικούς σωληνες εμβολιάστηκαν τρυβλία με υπόστρωμα Palcam με την μέθοδο της γραμμικής εξάπλωσης και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24-48 ώρες. Οι τυπικές αποικίες των συγκεκριμένων στελεχών του είδους *Listeria monocytogenes* εμφανίστηκαν ως γκριζοπράσινο χρώμα και σχημάτισαν μια μαύρη περιφερειακή ζώνη. Οι αποικίες με τα μορφολογικά αυτά χαρακτηριστικά ταυτοποιήθηκαν στη συνέχεια με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE) (Schwartz, and Cantor, 1984), για το ολικό DNA. Εν συντομία μετά από τη λύση του βακτηριακού κυττάρου με τη βοήθεια λυσοζύμης και την απομόνωση του ολικού DNA σε πηκτή αγαρόζης ακολούθησε πέψη του ολικού DNA με την ενδονουκλεάση περιορισμού *ApaI* και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2 % σε τάση 6 V/cm, θερμοκρασία 14°C και διάρκεια 18 ωρών σε συσκευή CHEF-DR II System (Biorad)

Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων από κάθε αραίωση. Η επιλογή του κατάλληλου τρυβλίου για την καταμέτρηση έγινε σύμφωνα με τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο. Τα τρυβλία που επιλέχθηκαν είχαν περισσότερες από 30 αποικίες και λιγότερες από 300 (Meynel and Meynel, 1970). Στην περίπτωση που δύο αραιώσεις έδιναν κατάλληλο αριθμό αποικιών, τότε επιλεγόταν αυτή με τον μεγαλύτερο αριθμό αποικιών (Meynel and Meynel, 1970). Στην περίπτωση που τα τρυβλία περιείχαν πολύ μεγάλο αριθμό αποικιών, η καταμέτρηση γινόταν με το διαχωρισμό τους σε ίσα μέρη. Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού των βακτηρίων ανά γραμμάριο κρέατος ο μέσος όρος του αριθμού των αποικιών πολλαπλασιαζόταν με την αραίωση που χρησιμοποιήθηκε.

2.12 Προσδιορισμός pH

Σε κάθε δείγμα τροφίμου μετρήθηκε η τιμή του pH (Russel, Model RL150) ως ο μέσος όρος των τριών τιμών pH για το κάθε δείγμα.

Κεφάλαιο 3

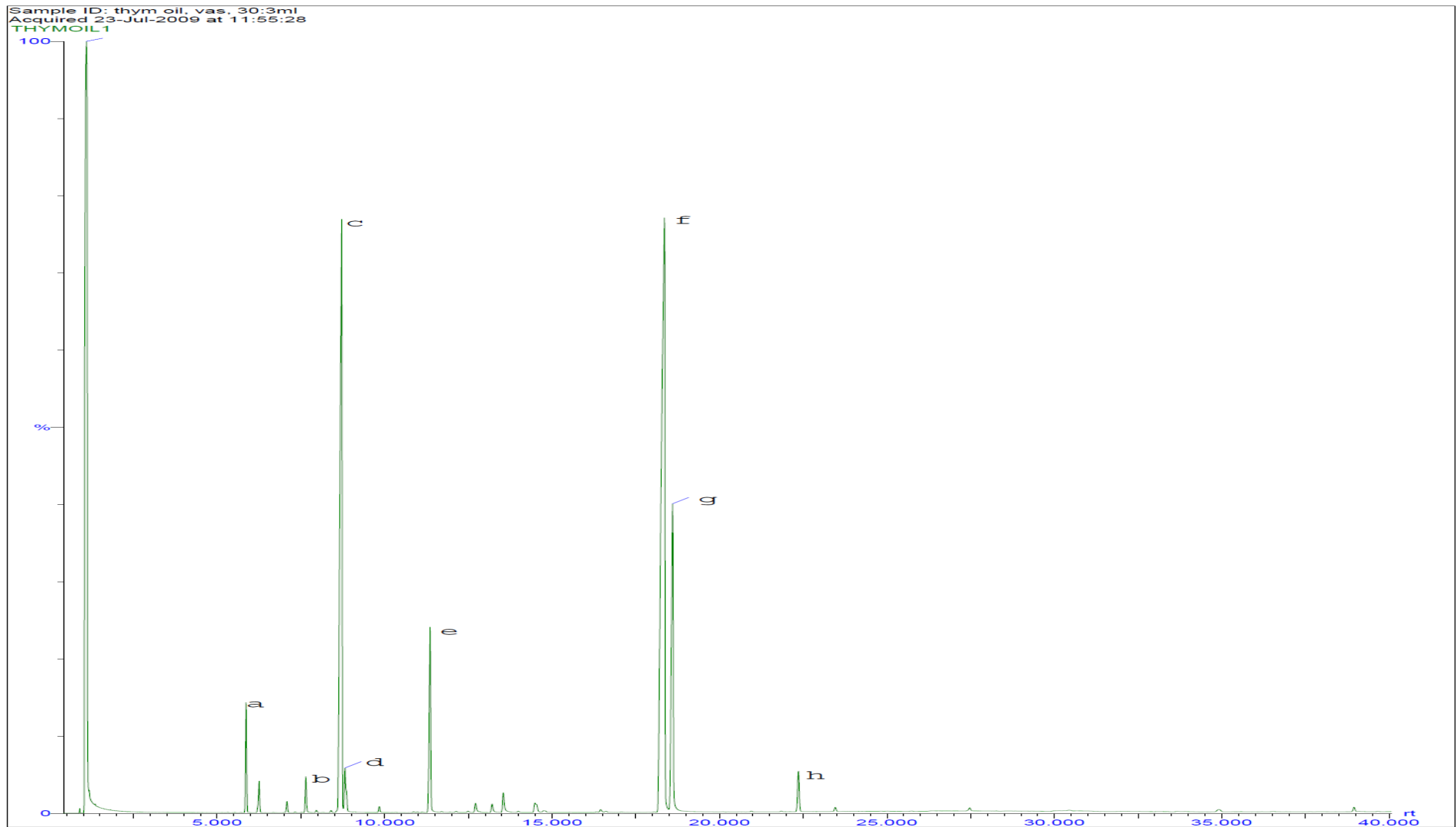
Αποτελέσματα

3.1 Σύσταση αιθερίου ελαίου θυμαριού

Ο προσδιορισμός της σύστασης του αιθερίου ελαίου που προέκυψε από το φυτικό ιστό του θυμαριού, έγινε με τη χρήση της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μάζας (GC/MS). Η σύσταση παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα, (Πινάκας 3.1), όπως επίσης και το αντίστοιχο χρωματογράφημα με τους χρόνους κατακράτησης για τις κύριες ενώσεις (Σχήμα 3.1).

Πινάκας 3.1. Χημική σύσταση αιθερίου ελαίου θυμαριού.

α/α	ένωση	t _R	LRI(CP-Sil8)	LRI(DB-Wax)	Σύσταση %
1	α-πινένιο	5.858	940	1017	2.5
2	καμφένιο	6.254	951	1053	0.9
3	β-πινένιο	7.086	975	1093	0.3
4	β-μυρκένιο	7.643	991	1157	0.9
5	α-τερπινένιο	8.397	1012	1174	0.1
6	π-κυμένιο	8.718	1020	1266	25.0
7	λεμονένιο	8.819	1023	1197	1.4
8	γ-τερπινένιο	9.836	1053	1243	0.2
9	λιναλοόλη	11.356	1096	1554	5.8
10	καμφορά	12.711	1135	1514	0.4
11	βορνεόλη	13.538	1158	1709	0.7
12	τερπινεν-4-όλη	13.990	1171	1605	0.0
13	α-τερπινεόλη	14.484	1185	1704	0.6
14	γ-τερπινεόλη	14.750	1195	nd	0.1
15	θυμόλη	18.357	1293	nd	41.4
16	καρβακρόλη	18.600	1303	2220	12.0
17	trans-καρυοφυλλένιο	22.360	1414	1594	1.4
18	α-χουμουλένιο	23.460	1449	1668	0.2
19	οξείδιο του καρυοφυλλενίου	27.472	1576	1984	0.3
Σύνολο					94.1



Σχήμα 3.1 Χρόνοι συγκράτησης των κύριων μορίων στο αιθέριο έλαιο του θυμαριού: a) α-πινένιο, b) β-μυρκένιο, c) π-κυμένιο, d) λεμονένιο, e) λιναλοόλη, f) θυμόλη, g) καρβακρόλη, h) trans-καρσοφυλλένιο.

Από τα παραπάνω δεδομένα μαρτυρούνται ότι τα κύρια συστατικά του συγκεκριμένου αιθερίου ελαίου του θυμαριού είναι η θυμόλη και ακολουθούν το *π*-κυμένιο η καρβακρόλη και τέλος η λιναλοόλη. Το *π*-κυμένιο όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί το πρόδρομο μόριο του δευτερογενούς μεταβολισμού από τον οποίο προκύπτει το κλάσμα των δραστικών ενώσεων του αιθερίου ελαίου του θυμαριού, γιατί και βρίσκεται σε τόσο σημαντική ποσότητα. Από τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό φαίνεται η επικράτηση της θυμόλης σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά και ειδικά την καρβακρόλη.

3.2 Πολυφαινολικό περιεχόμενο ερυθρού οίνου

Το πολυφαινολικό περιεχόμενο του ερυθρού οίνου της ποικιλίας Μανδηλαριά που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 3.2. Αναλυτικότερα, το γαλλικό οξύ αποτελεί την κύρια πολυφαινολική ένωση που περιέχεται σε αυτό και ακολουθούν η (+)-κατεχίνη, επικατεχίνη, προκυανιδίνη Β3 και το *trans*-καφταρικό οξύ. Σε μικρότερες ποσότητες ανιχνεύτηκε η παρουσία και άλλων φαινολικών οξέων (καφεϊκό, φερουλικό συριγγικό) και των φλαβονολών κερκετίνη και κεμπφερόλη.

3.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις-φυσικοχημικές αναλύσεις

3.3.1 Αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα

Η αυτόχθονη ΟΜΧ του κρέατος απαρτίζεται κυρίως από τα γαλακτικά βακτήρια και τα *Pseudomonas spp* και δευτερευόντως τα στελέχη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Στην περίπτωση του μάρτυρα (Σχήμα 3.2-3.3) φαίνεται καθαρά η ανάπτυξη των παραπάνω μικροοργανισμών ανάλογα με τις συνθήκες συσκευασίας και συντήρησης. Έτσι, στην αερόβια συντήρηση (Σχήμα 3.2 α) στους 5⁰C επικρατούν οι ψευδομονάδες και μάλιστα ο πληθυσμός τους (10 log₁₀ cfu/gr) είναι σχεδόν ταυτόσημος του ολικού μικροβιακού φορτίου. Αντίθετα, τα γαλακτικά βακτήρια κυμαίνονται σε μικρότερους πληθυσμούς της τάξης 5 log₁₀ cfu/gr, ενώ τα εντεροβακτήρια στο τέλος της συντήρησης φτάνουν το 8 log₁₀ cfu/gr. Στην περίπτωση της συντήρησης σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα πάλι στους 5⁰C (Σχήμα 3.2 β) παρατηρείται ότι οι ψευδομονάδες είναι ο κυρίαρχος πληθυσμός όμως υπολείπεται κατά 2 log₁₀ cfu/gr του αντίστοιχου πληθυσμού στον αέρα. Η παρουσία του CO₂ σε ποσοστό 25% στη σύσταση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας έχει ως αποτέλεσμα την μικρή αυτή ανα-

στολή του τελικού φορτίου των ψευδομονάδων ενώ η παρουσία του αέρα σε ποσοστό 75% εξηγεί γιατί ο πληθυσμός τους δεν είναι σημαντικά μικρότερος

Πίνακας 3.2 Πολυφαινολικό περιεχόμενο ερυθρού οίνου Μανδηλαριάς

α/α	Ένωση	Συγκέντρωση (mg/L)
1	Γαλλικό οξύ	134.12
2	(+)- κατεχίνη	83.86
3	(-)- επικατεχίνη	62.61
4	Προκυανιδίνη B3	41.00
5	trans-ρεσβερατρόλη	1.48
6	Κερκετίνη	3.30
7	Κεμπφερόλη	0.34
8	Γαλακτοσίδης της κερκετίνης	11.20
9	Γλυκοσίδης της κερκετίνης	6.88
10	Ραμνοσίδης της κερκετίνης	1.90
11	Καφεϊκό οξύ	6.99
12	π-κουμαρικό οξύ	3.15
13	Συριγγικό οξύ	5.07
14	trans- καφταρικό οξύ	57.30
15	ε-βινιφερίνη	0.23
16	Προκυανιδίνη B2	6.15

Τα γαλακτικά βακτηρια παραμένουν στα ίδια επίπεδα με την αερόβια συντήρηση. Η μείωση του πληθυσμού των ψευδομονάδων αντικατοπτρίζεται και στις τιμές του pH. Έτσι στον αέρα έχουμε μέγιστο pH=8, ενώ στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα η μέγι-

στη τιμή είναι pH=6. Στην θερμοκρασία τώρα των 15⁰C (Σχήμα 3.3) οι ψευδομονάδες είναι πάλι ο κυρίαρχος μικροοργανισμός και ακολουθούν τα εντεροβακτήρια και τα γαλακτικά βακτήρια. Το τελικό μικροβιακό φορτίο είναι σχεδόν παρόμοιο (10.5 log₁₀ cfu/gr) διαφοροποιείται όμως ο ρυθμός ανάπτυξης ο οποίος στην περίπτωση αυτή είναι σαφώς μεγαλύτερος. Στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα οι επιμέρους πληθυσμοί των τριών κύριων μικροοργανισμών στο τέλος της συντήρησης τείνουν να εξισωθούν ενώ η αύξηση του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων κατά 1 log₁₀ cfu/gr εξηγεί τη μειωμένη τελική τιμή του pH (pH=6 ενώ στον αέρα pH=8). Όπως και στους 5⁰C το τελικό μικροβιακό φορτίο είναι μικρότερο στις συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας από ότι στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης.

Στα δείγματα που εφαρμόστηκε μαρινάρισμα μόνο με κόκκινο κρασί και συντηρήθηκαν στους 5⁰C στον αέρα, παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες αλλαγές σε σχέση με τον μάρτυρα. Ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων ήταν μηδενικός σχεδόν μέχρι την 8^η μέρα συντήρησης, ενώ και στο τέλος της συντήρησης δεν ξεπέρασε το 6 log₁₀ cfu/gr. Όσον αφορά την ολική μικροβιακή χλωρίδα, αυτή κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα σχεδόν μέχρι τα τρία τέταρτα του χρόνου συντήρησης (3 log₁₀ cfu/gr), ενώ ο τελικός πληθυσμός ήταν πολύ ελαττωμένος σε σύγκριση με τον μάρτυρα (7 log₁₀ cfu/gr). Στην περίπτωση της συντήρησης σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η ολική μικροβιακή χλωρίδα σε όλη τη διάρκεια του χρόνου συντήρησης διατηρήθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα (3 log₁₀ cfu/gr) (Σχήμα 3.4).

Στους 15⁰C παρατηρήθηκε μείωση τόσο του τελικού πληθυσμού της ολικής μικροβιακής χλωρίδας κατά 1 log₁₀ cfu/gr όσο και του ρυθμού ανάπτυξης της. Ειδικότερα, στην συντήρηση σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η μείωση ήταν μεγαλύτερη φτάνοντας το 2 log₁₀ cfu/gr (Σχήμα 3.5). Η διαδικασία του μαριναρίσματος με κρασί επέδρασε σημαντικά και στην τιμή του pH των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, ενώ το pH του κρέατος ήταν αρχικά 5.5-5.6 μετά το μαρινάρισμα έπεσε σε 4.6-4.7. Στην αερόβια συντήρηση παρέμεινε σε όλη σχεδόν τη διάρκεια της σε τιμές κοντά στο 5 και μόνο προς το τέλος αυξήθηκε και στο 7.5. Αντίθετα, στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα η τελική τιμή ήταν 5.

Όταν το μαρινάρισμα έγινε με κόκκινο κρασί και προσθήκη 0.3% αιθέριου ελαίου θυμαριού, στους 5⁰C σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης ή/και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ο πληθυσμός της ολικής μικροβιακής χλωρίδας ήταν στα όρια ανί-

χνευσης δηλαδή $\geq 2 \log_{10}$ cfu/gr ή τα ξεπέρασε ελάχιστα, κυρίως στη συντήρηση στον αέρα (Σχήμα 3.6). Σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα και συντήρηση στους 15°C τα αποτελέσματα ήταν ταυτόσημα με αυτά των 5°C και μόνο προς το τέλος του χρόνου συντήρησης ο πληθυσμός της ολικής μικροβιακής χλωρίδας άγγιξε το $3 \log_{10}$ cfu/gr. Αντίθετα στην αερόβια συντήρηση παρατηρήθηκε ανάπτυξη λίγο πριν τη μέση της ολικής διάρκειας της ενώ στο τέλος της ο πληθυσμός τόσο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας όσο και των γαλακτικών βακτηρίων έφτασε το $7 \log_{10}$ cfu/gr (Σχήμα 3.7).

Τέλος το pH των δειγμάτων ήταν αντίστοιχο, δηλαδή παρατηρήθηκε μείωση του μετά τη διαδικασία μαριναρίσματος, ενώ κατά τη συντήρηση σε όλες τις περιπτώσεις η τελική του τιμή δεν ξεπέρασε το 5-5.5.

3.3.2 *Listeria monocytogenes*

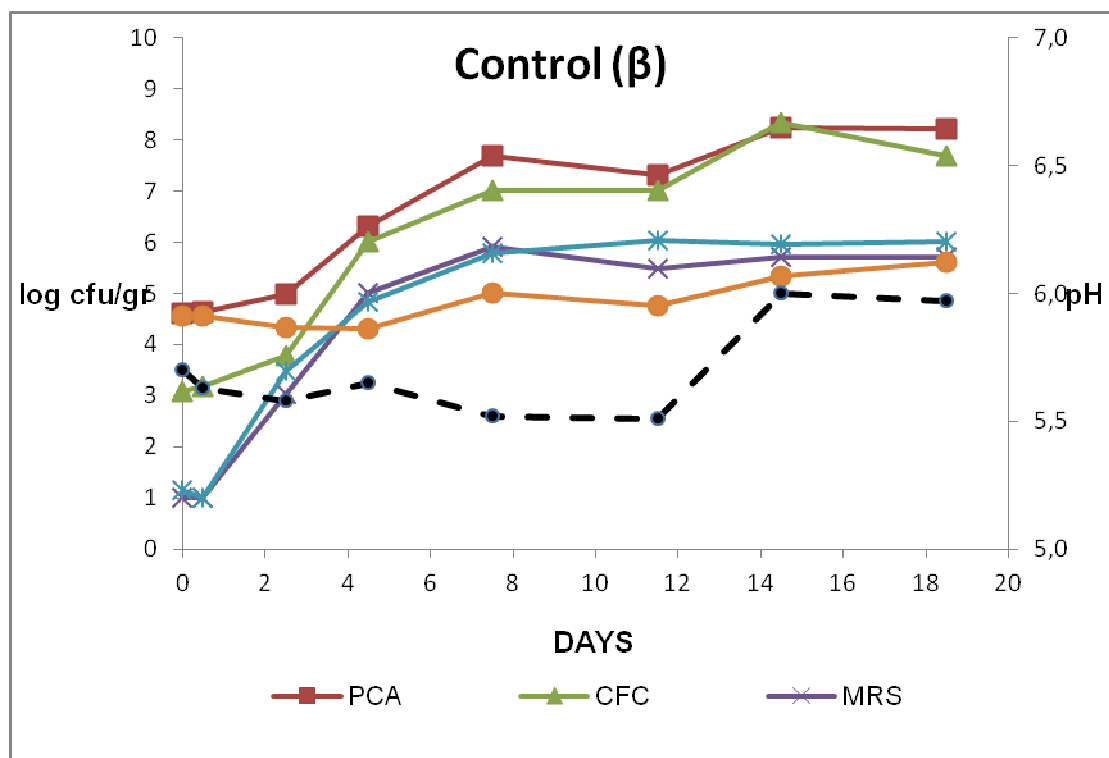
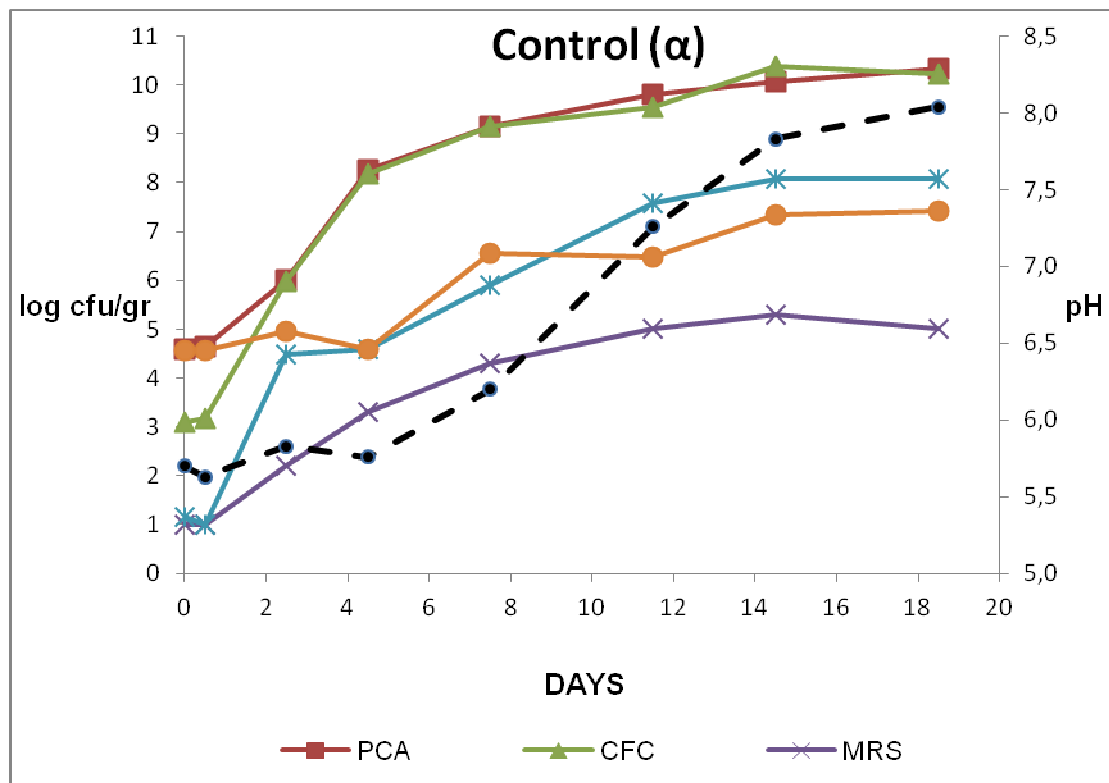
Εκτός από την αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα, στη συγκεκριμένη διατριβή εξετάστηκε και η συμπεριφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes*, ο οποίος εμβολιάστηκε υπό τη μορφή μείγματος τριών διαφορετικών στελεχών που είχαν αναπτυχθεί σε κανονικό ή όξινο περιβάλλον, προκειμένου να αποκτήσουν αντοχή σε αυτό.

Στον μάρτυρα φαίνεται ότι ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* με τον οποίο εμβολιάστηκαν τα δείγματα ήταν της τάξης του $4.5 \log_{10}$ cfu/gr. Στη θερμοκρασία των 5°C και την αερόβια συντήρηση ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν αρχικά χαμηλός όμως μετά την 5^η μέρα αυξήθηκε και στο τέλος της διάρκειας συντήρησης ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* ήταν της τάξης $7 \log_{10}$ cfu/gr και στις δυο περιπτώσεις εμβολίου (Σχήμα 3.8). Αντίθετα, στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Σχήμα 3.9) ο ρυθμός ανάπτυξης παρέμεινε χαμηλός σε όλη τη χρονική ακολουθία και μόνο προς το τέλος τα στελέχη του παθογόνου που είχαν αναπτυχθεί σε όξινο περιβάλλον άγγιξαν το $7 \log_{10}$ cfu/gr. Στους 15°C (Σχήμα 3.10) ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν αισθητά μεγαλύτερος και την 4^η ημέρα ο πληθυσμός του παθογόνου έφτασε το $8.5 \log_{10}$ cfu/gr που ήταν και η τελική τιμή του. Στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν συγκριτικά χαμηλότερος χωρίς όμως αυτό να επηρεάζει σημαντικά τον τελικό πληθυσμό της *Listeria monocytogenes* ($8 \log_{10}$ cfu/gr) (Σχήμα 3.11). Μεταξύ των δυο διαφορετικών εμβολίων δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές.

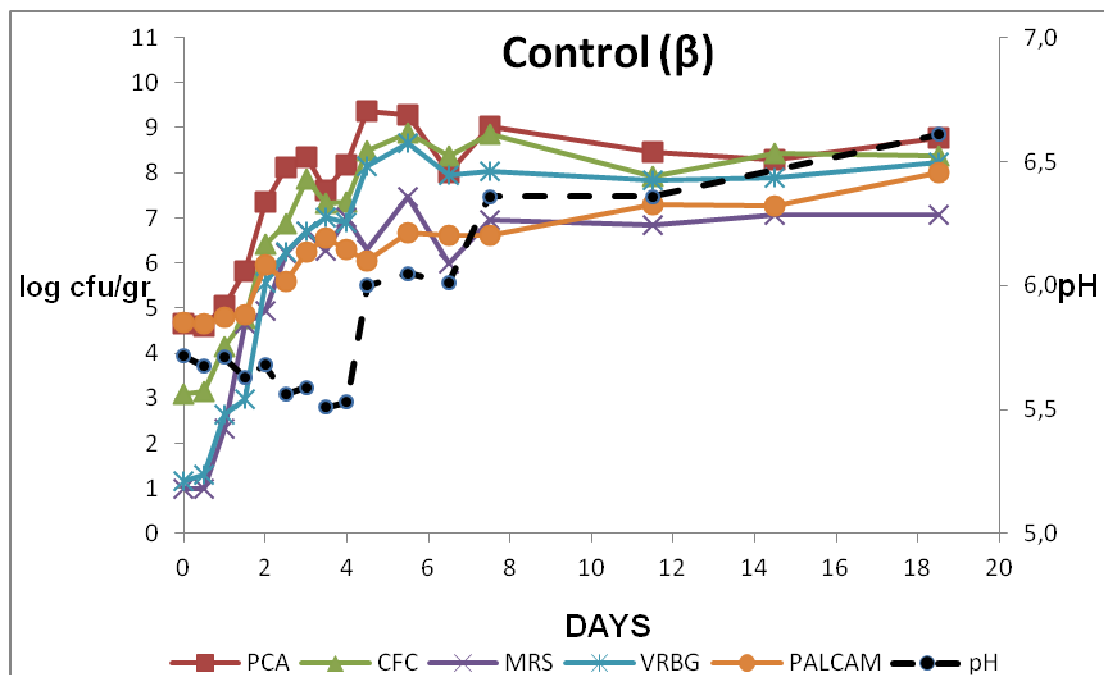
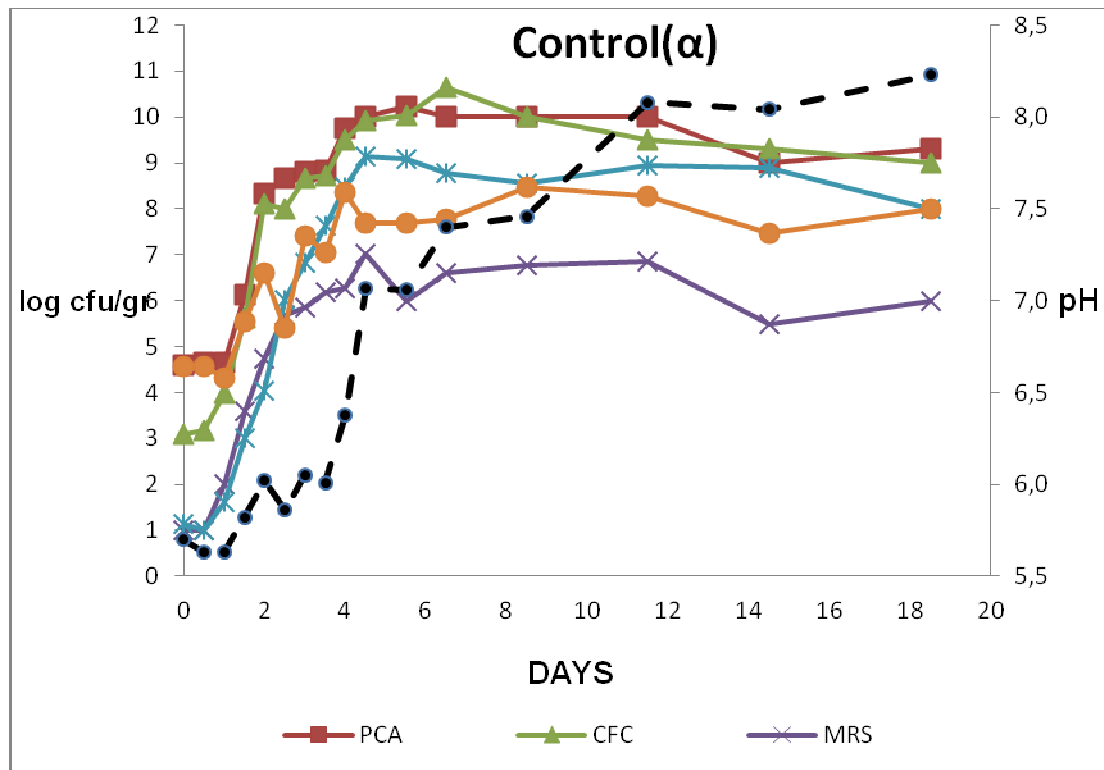
Στην περίπτωση του μαριναρίσματος με κρασί παρατηρήθηκε στην αρχή μείωση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* αμέσως μετά την εξαγωγή των δειγμάτων από το διάλυμα της μαρινάδας (πριν την συσκευασία τους). Η μείωση ήταν μεγαλύτερη στο εμβόλιο που προήλθε από κύτταρα ανεπτυγμένα σε μη όξινες συνθήκες ($\approx 2 \log_{10}$ cfu/gr), ενώ στο εμβόλιο που προήρθε από κύτταρα ανεπτυγμένα σε όξινες συνθήκες η μείωση ήταν μικρότερη ($> 1 \log_{10}$ cfu/gr). Όσον αφορά τις συνθήκες συντήρησης στους 5°C ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* παρέμεινε σταθερός μέχρι το τέλος δηλαδή περίπου στα $3 \log_{10}$ cfu/gr στον αέρα (Σχήμα 3.8) και ελάχιστα μικρότερος στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα ($2-2.5 \log_{10}$ cfu/gr) (Σχήμα 3.9). Στους 15°C και σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης (Σχήμα 3.10), ο πληθυσμός του παθογόνου παρέμεινε σταθερός όπως διαμορφώθηκε μετά το μαρινάρισμα μέχρι το μέσο του χρόνου συντήρησης, οπότε άρχισε να αυξάνει για να φτάσει σε τελική τιμή $6 \log_{10}$ cfu/gr. Αντίθετα, στη συντήρηση σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού στα όρια ανίχνευσης (Σχήμα 3.11).

Στην περίπτωση του μαριναρίσματος με κρασί και προσθήκη αιθέριου ελαίου παρατηρήθηκε η ίδια μείωση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* ακριβώς μετά την διαδικασία μαριναρίσματος. Η μείωση ήταν αντίστοιχη με αυτήν που παρατηρήθηκε στο μαρινάρισμα μόνο με κρασί. Όσον αφορά την συντήρηση, στους 5°C στον αέρα παρατηρήθηκε περαιτέρω μείωση. Όμως η μείωση ήταν βραδύτερη και η θανάτωση του μικροοργανισμού επήλθε μετά την 8^η ημέρα συντήρησης (Σχήμα 3.8), ενώ στην περίπτωση της συντήρησης σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η θανάτωση παρατηρήθηκε από την 5^η κιόλας ημέρα (Σχήμα 3.9). Τέλος στον αέρα και 15°C θερμοκρασία (Σχήμα 3.10) παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού του παθογόνου στα όρια ανίχνευσης. Αντίθετα στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα παρατηρήθηκε θανάτωση από την 4^η ημέρα συντήρησης (Σχήμα 3.11).

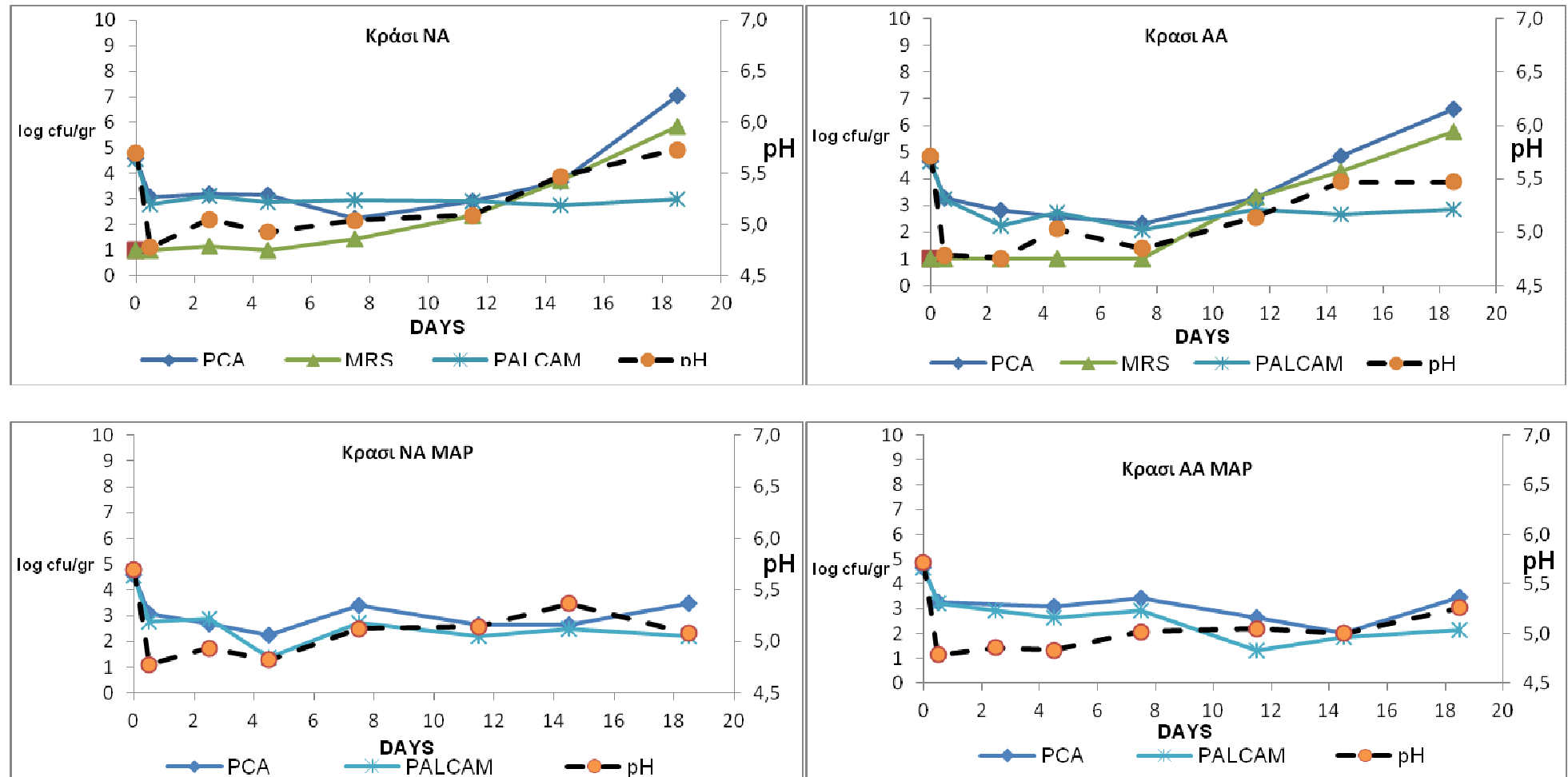
Όταν ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης με την μέθοδο των τρυβλίων ακολούθησε η διαδικασία του εμπλουτισμού σύμφωνα με την περιγραφή του προηγούμενου κεφαλαίου. Οι μικροοργανισμοί που προέκυψαν από την διαδικασία αυτή ταυτοποιήθηκαν με την βοήθεια ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου πεδίου. Τα αποτελέσματα (γενετικά αποτυπώματα) των τριών στελεχών της *Listeria monocytogenes* με τα οποία εμβολιάστηκαν τα δείγματα και τα οποία προέκυψαν μετά από την διαδικασία εμπλουτισμού παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.1.



Σχήμα 3.2. Μεταβολές στην Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, στον πληθυσμό της *L. Monocytogenes* και στο pH του μάρτυρα κατά την συντήρηση του σε θερμοκρασία 5⁰C τόσο στον αέρα (α) όσο και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) (25% CO₂-75% αέρας).

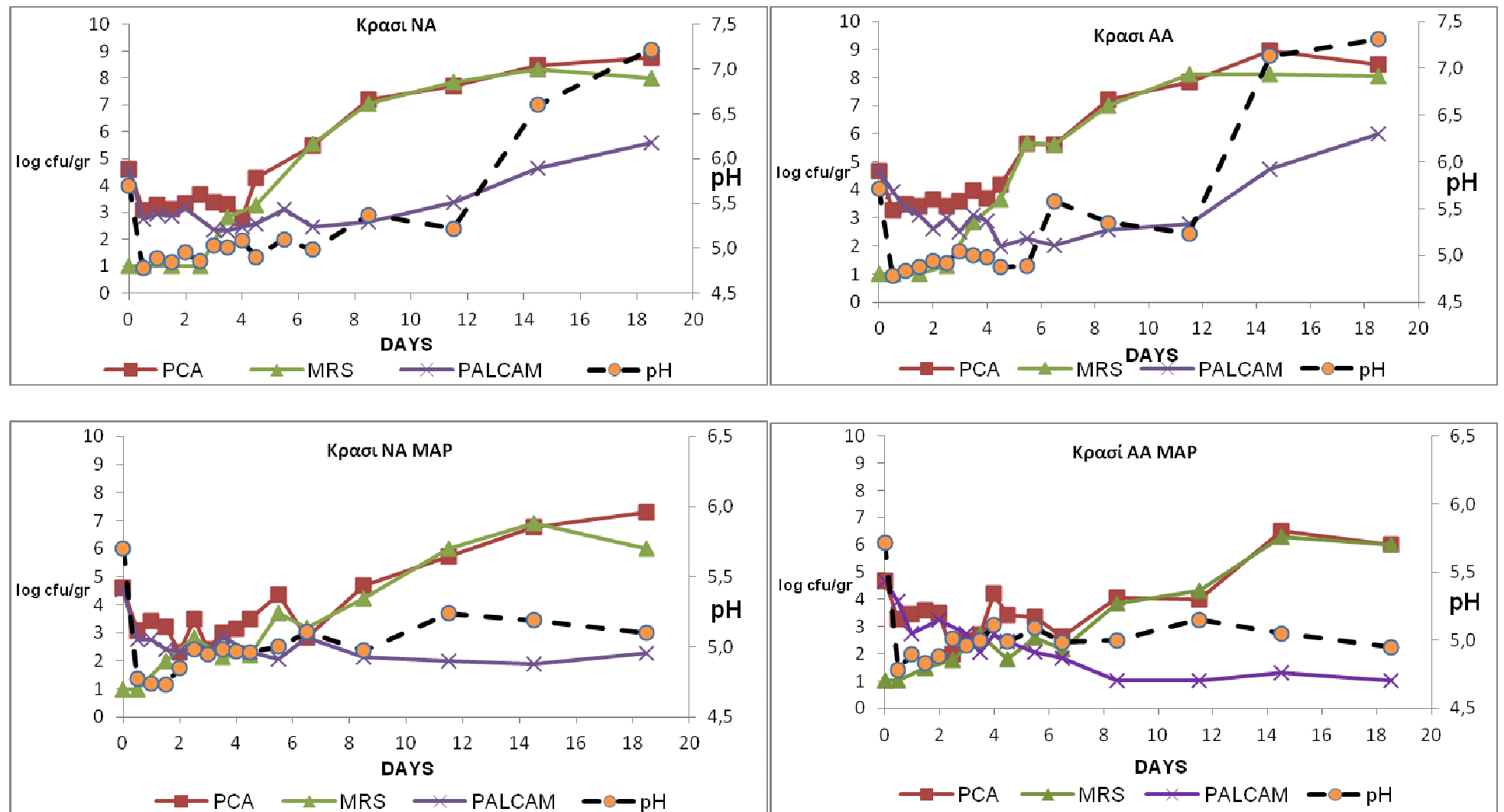


Σχήμα 3.3. Μεταβολές στην Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, στον πληθυσμό της *L. Monocytogenes* και στο pH του μάρτυρα κατά την συντήρηση του σε θερμοκρασία 15⁰C τόσο στον αέρα (α) όσο και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (β) (25% CO₂-75% αέρας)



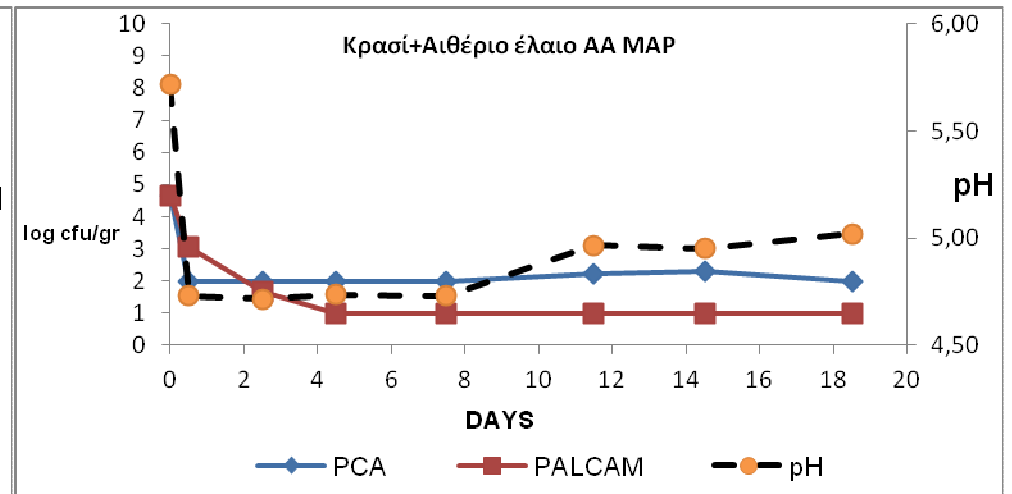
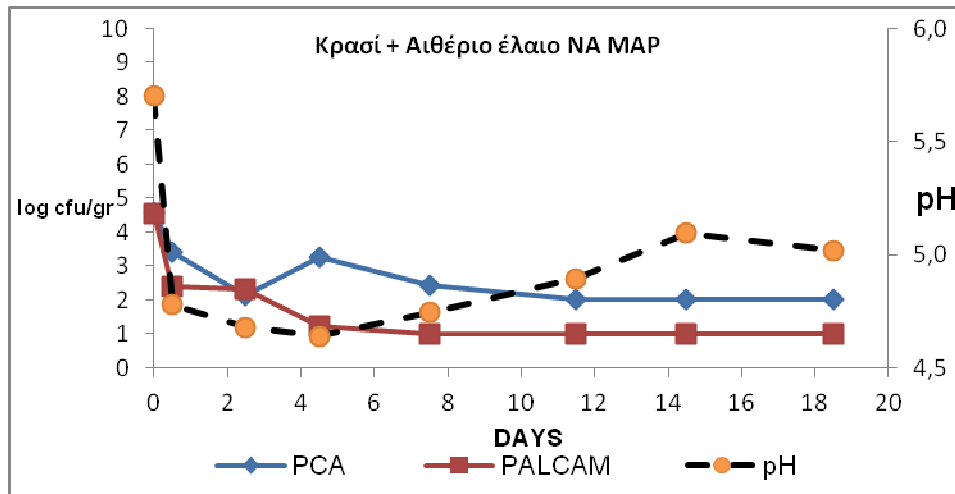
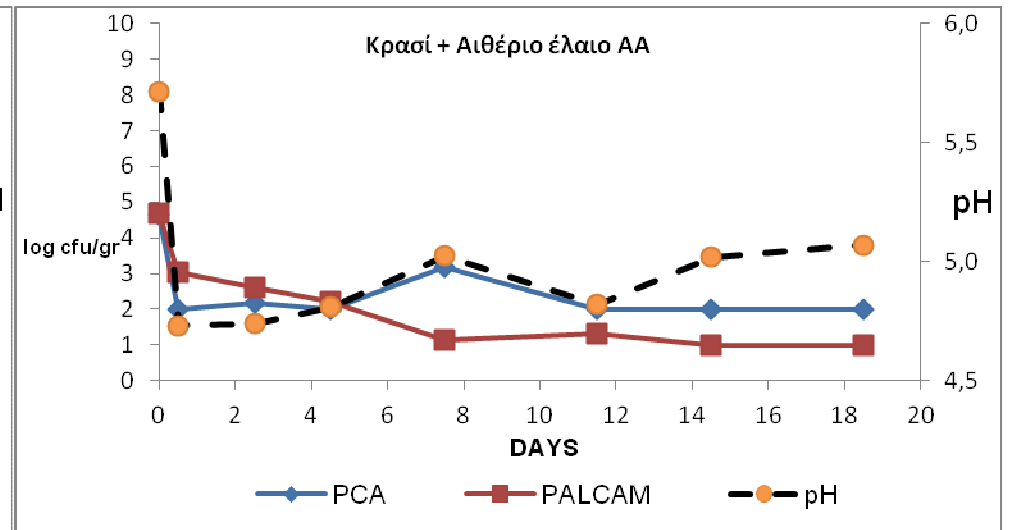
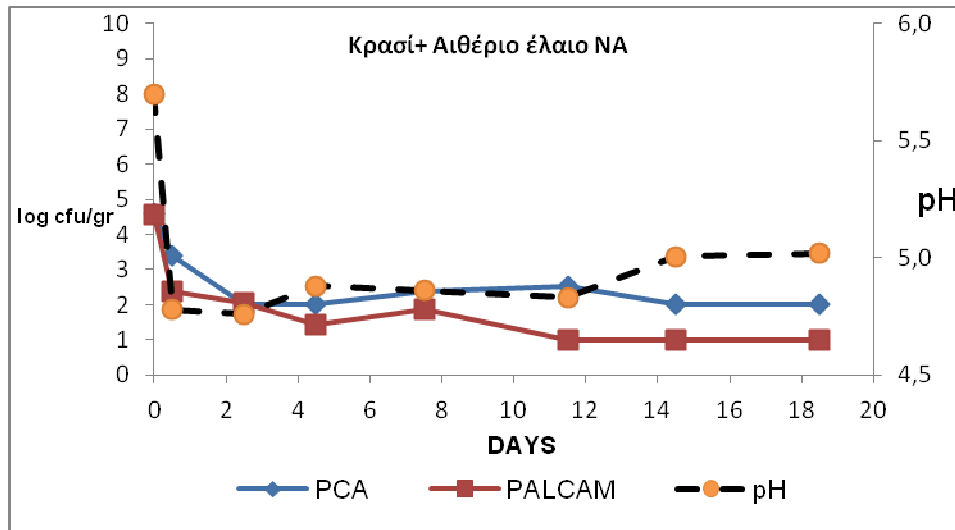
Σχήμα 3.4. Μεταβολές στην Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, στον πληθυσμό της *L. Monocytogenes* (στελέχη με (AA) και χωρίς επίδραση οξίνισης (NA) και στο pH μετά το μαρινάρισμα με κρασί και κατά την συντήρηση σε θερμοκρασία 5⁰C στον αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

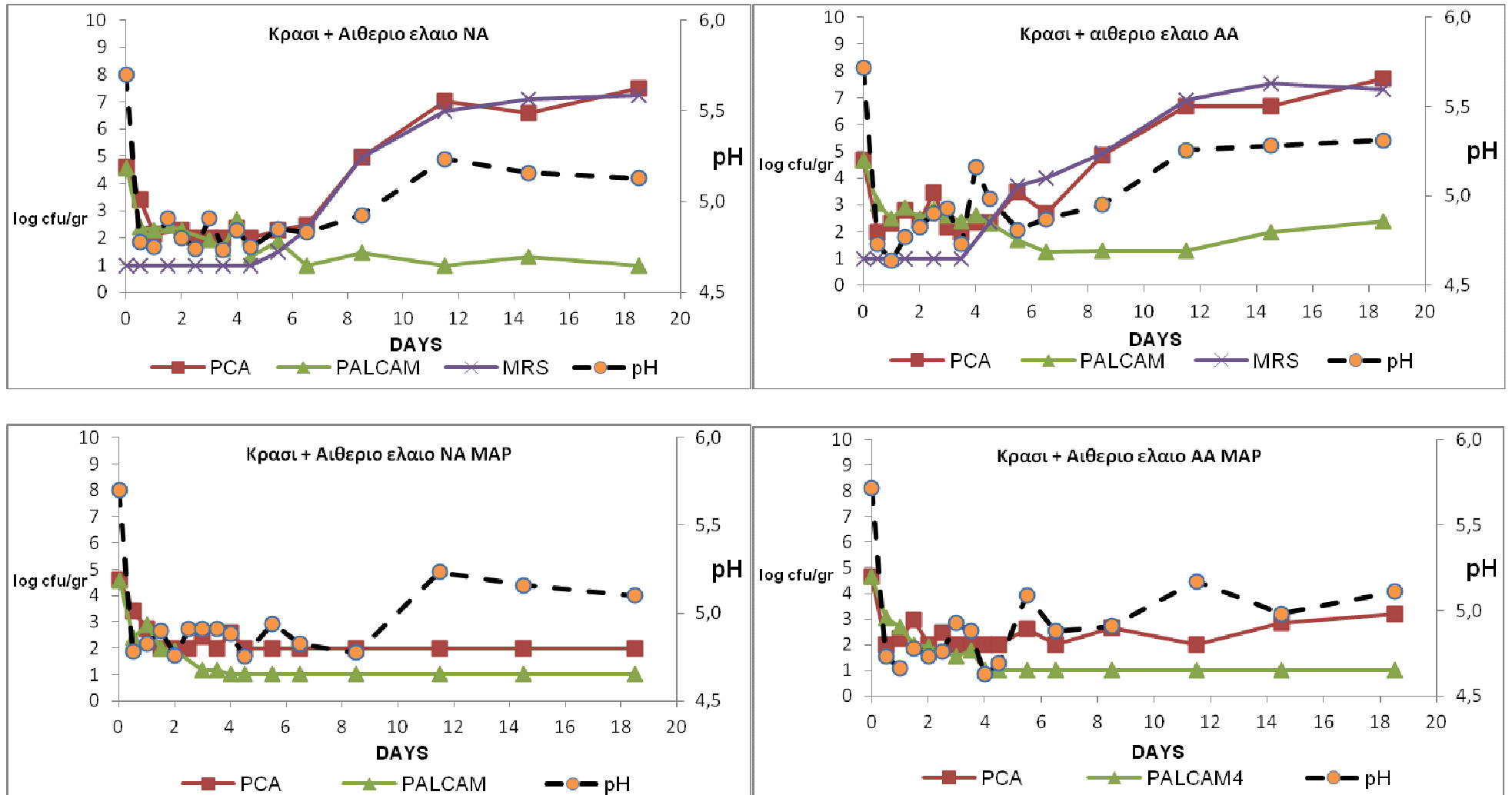


Σχήμα 3.5. Μεταβολές στην Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, στον πληθυσμό της *L. Monocytogenes* (στελέχη με και χωρίς επίδραση οξίνισης) και στο pH μετά το μαρινάρισμα με κρασί και κατά την συντήρηση σε θερμοκρασία 15⁰C στον αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.

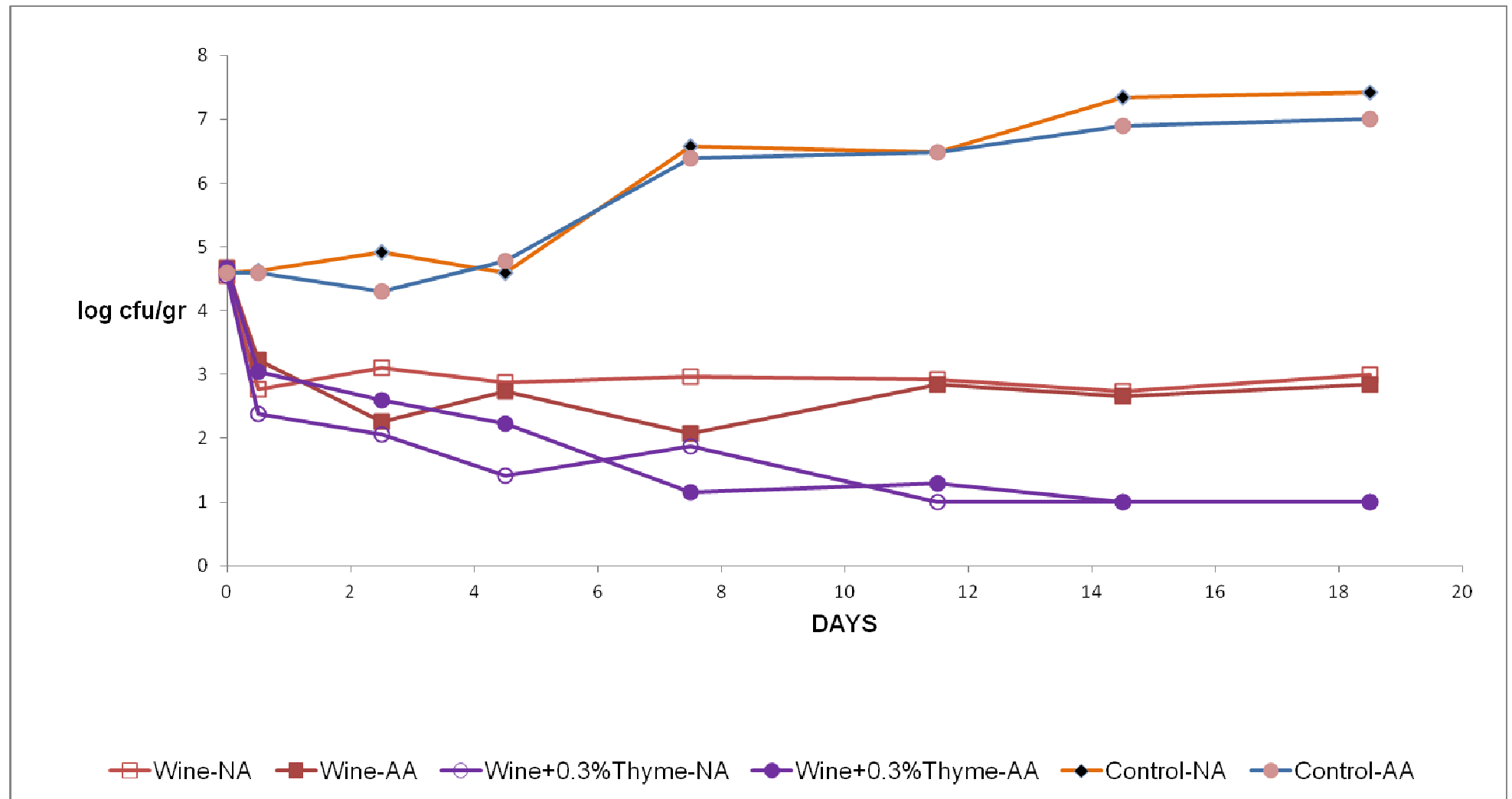
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



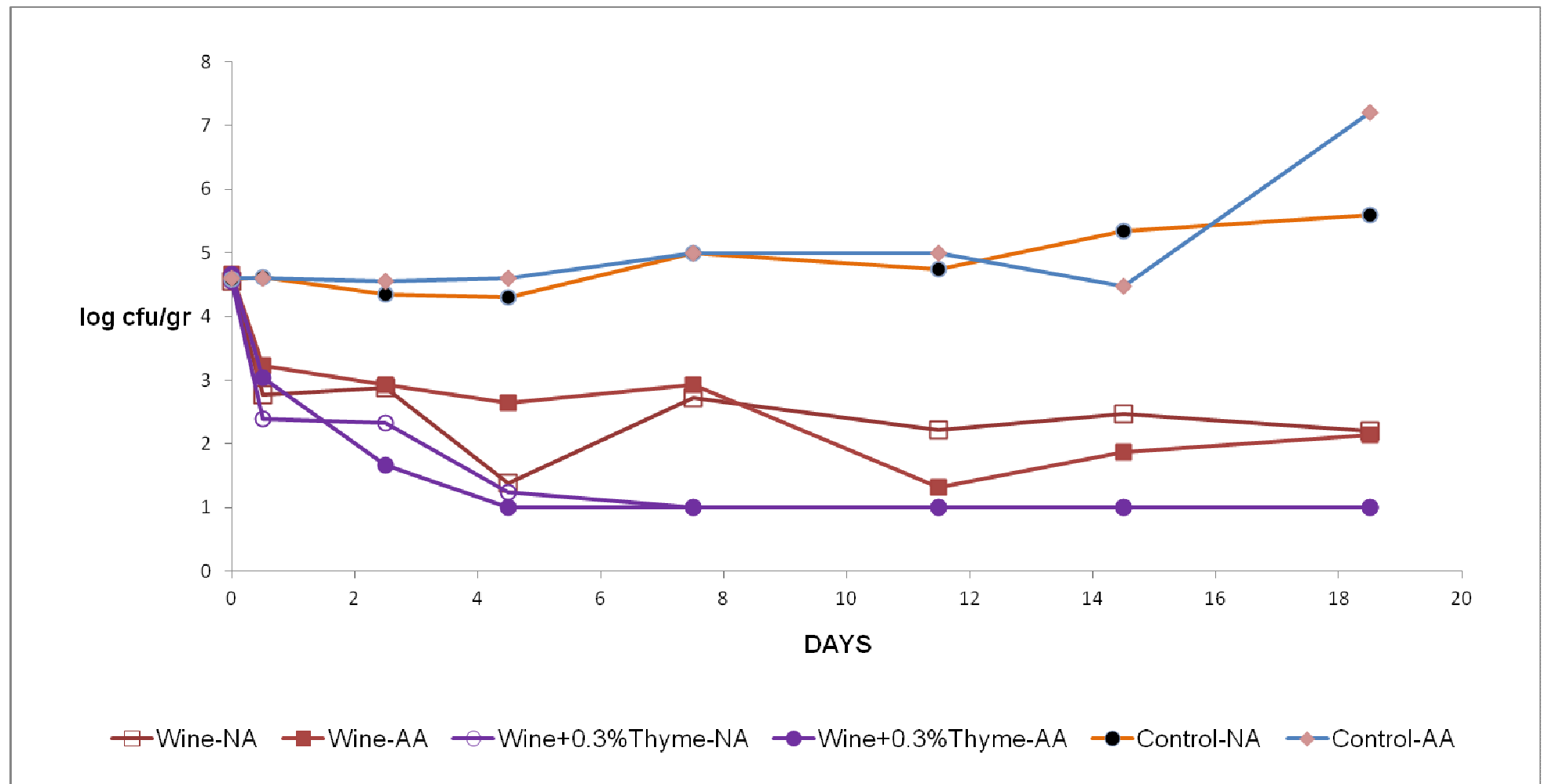
Σχήμα 3.6. Μεταβολές στην Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, στον πληθυσμό της *L. Monocytogenes* (στελέχη με και χωρίς επίδραση οξίνισης) και στο pH μετά το μαρινάρισμα με κρασί και αιθέριο έλαιο και κατά την συντήρηση σε θερμοκρασία 5⁰C στον αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.



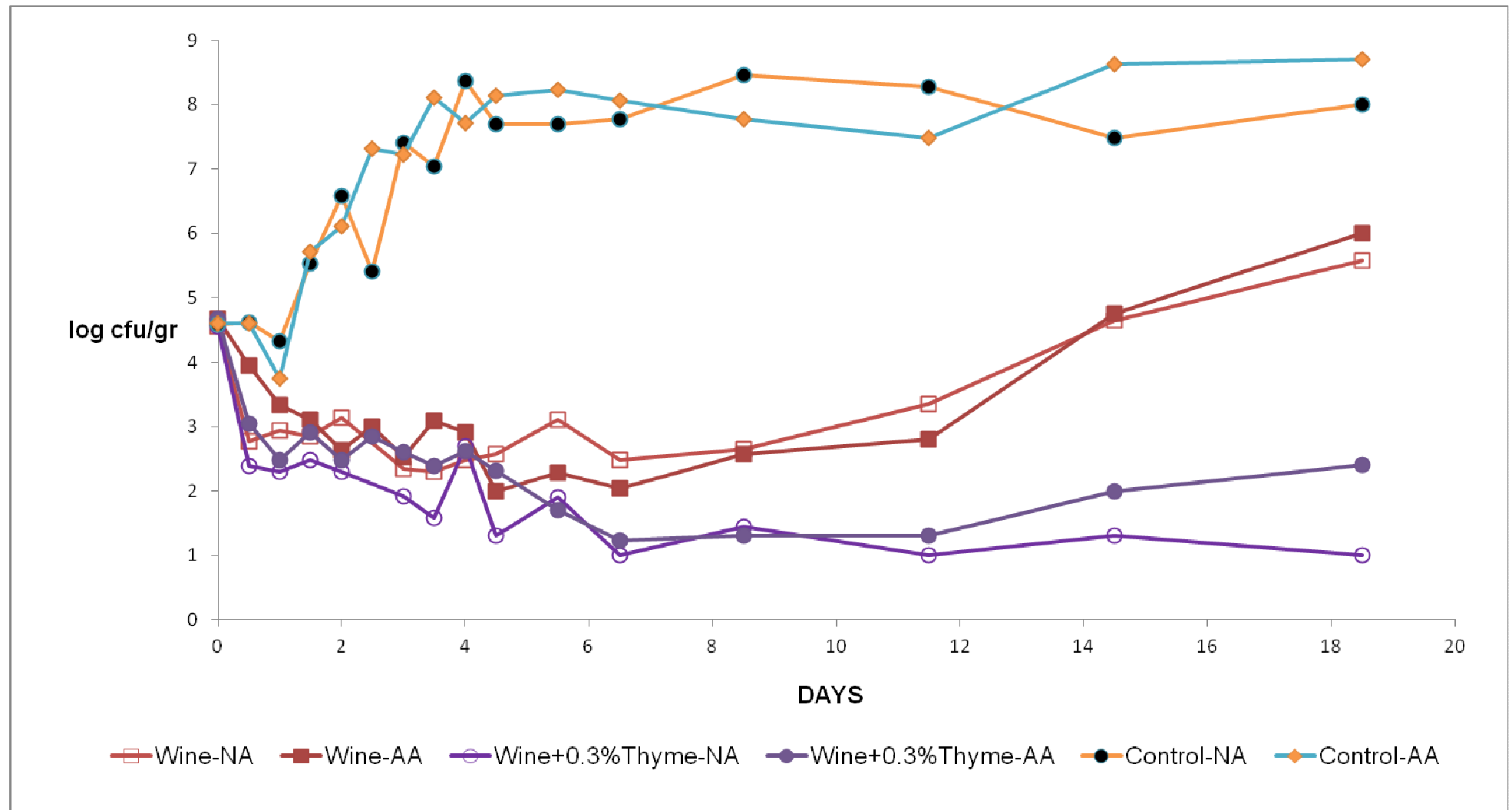
Σχήμα 3.7. Μεταβολές στην Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, στον πληθυσμό της *L. Monocytogenes* (στελέχη με και χωρίς επίδραση οξίνισης) και στο pH μετά το μαρινάρισμα με κρασί και αιθέριο έλαιο και κατά την συντήρηση σε θερμοκρασία 15⁰C στον αέρα και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα.



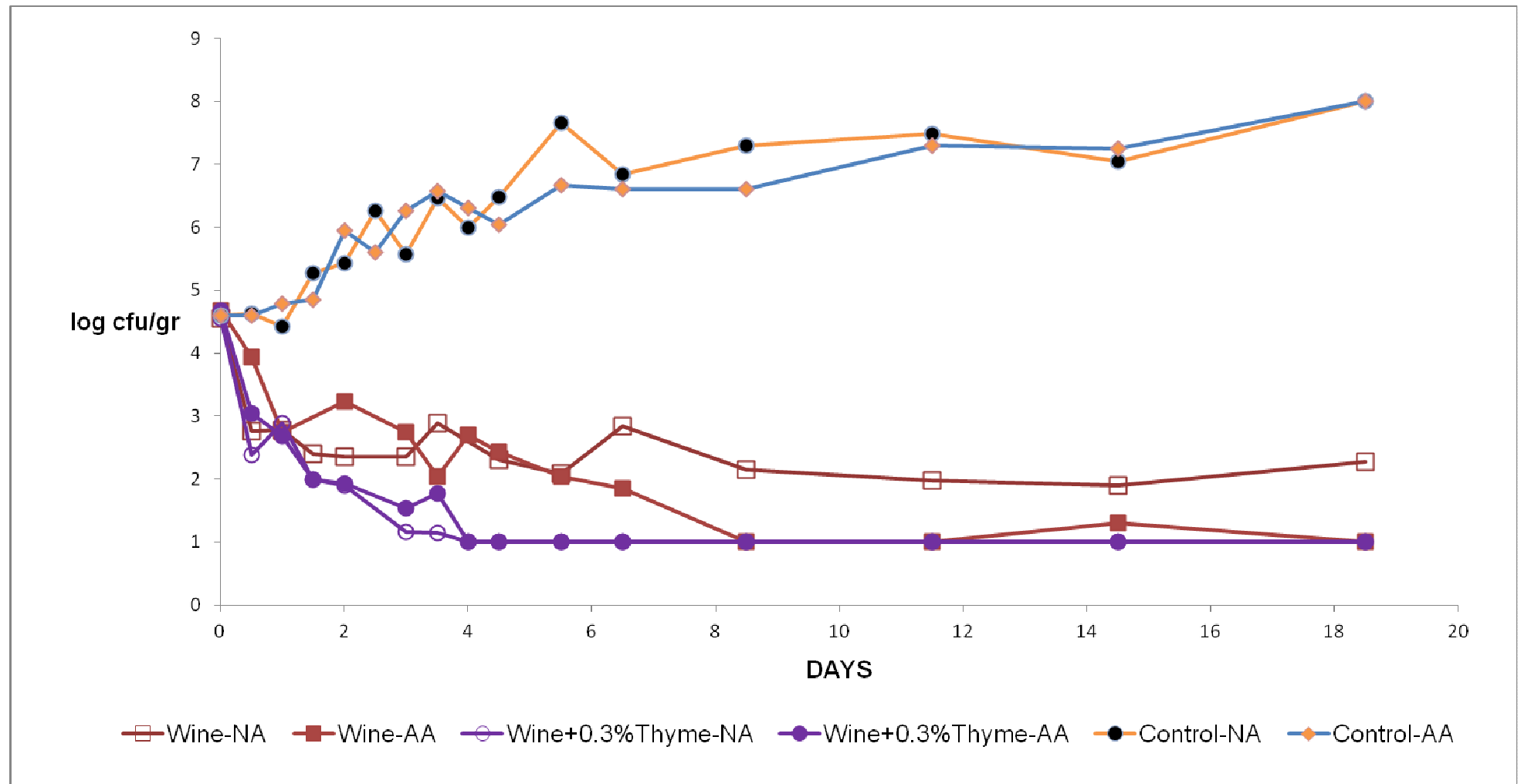
Σχήμα 3.8. Διαφορές στον πληθυσμό της *L. monocytogenes* (στελέχη με η χωρίς επίδραση οξίνισης) στον μάρτυρα, σε φιλέτα μαριναρισμένα με κρασί μόνο αλλά και με κρασί και αιθέριο έλαιο ,και τα οποία συντηρήθηκαν στους 5⁰C στον αέρα.



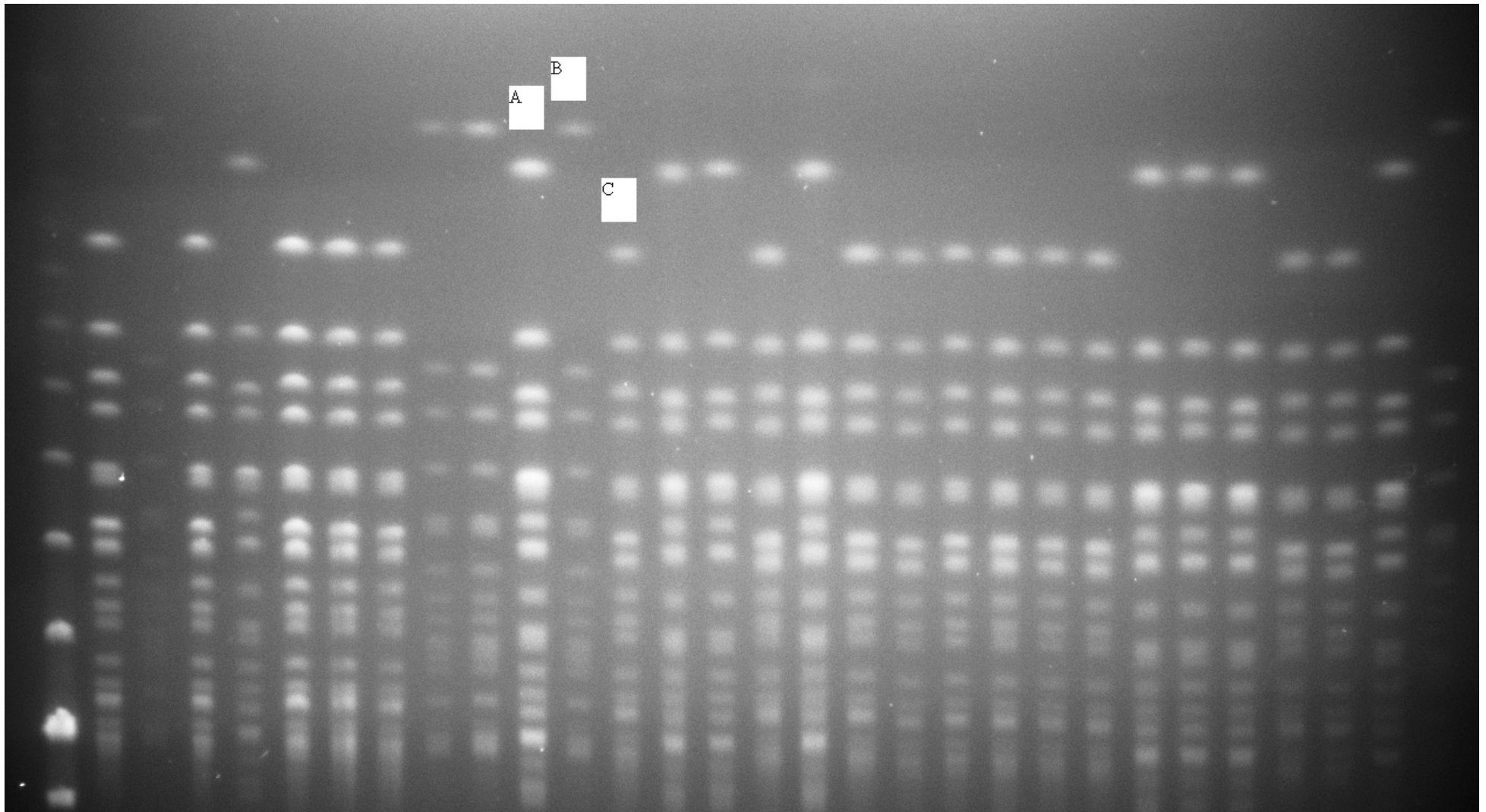
Σχήμα 3.9. Διάφορες στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* (στελέχη με η χωρίς επίδραση οξίνισης) στον μάρτυρα, σε φιλέτα μαριναρισμένα με κρασί μόνο αλλά και με κρασί και αιθέριο έλαιο ,και τα οποία συντηρήθηκαν στους 5⁰C σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (25% CO₂-75% αέρας).



Σχήμα 3.10. Διάφορες στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* (στελέχη με η χωρίς επίδραση οξίνισης).στον μάρτυρα, σε φιλέτα μαριναρισμένα με κρασί μόνο αλλά και με κρασί και αιθέριο έλαιο ,και τα οποία συντηρήθηκαν στους 15⁰C στον αέρα.



Σχήμα 3.11. Διάφορες στον πληθυσμό της *L.monocytogenes* (στελέχη με η χωρίς επίδραση οξίνισης).στον μάρτυρα, σε φιλέτα μαριναρισμένα με κρασί μόνο αλλά και με κρασί και αιθέριο έλαιο ,και τα οποία συντηρήθηκαν στους 15⁰C σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (25% CO₂-75% αέρας).



Εικόνα 3.1. Ταυτοποίηση των εμβολιασθέντων στελεχών της *L.monocytogenes* κατά το στάδιο του εμπλουτισμού με την βοήθεια ηλεκτροφόρησης εναλλασσόμενου πεδίου (PFGE), A) *L.monocytogenes* 21412, B) *L.monocytogenes* 21350, C) *L.monocytogenes* Scott A.

Κεφάλαιο 4

Συζήτηση-Συμπεράσματα

4.1 Γενικά

Η μικροβιακή οικολογία των τροφίμων εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων και αρχών, η σημασία των οποίων είναι μεγάλη για την κατανόηση της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στο τρόφιμο (*Body and Wimpenny, 1992*).

Πολλές από αυτές (π.χ. τροποποιημένες ατμόσφαιρες, φυσικά αντιμικροβιακά συστήματα) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών ή μεθόδων ελέγχου της αλλοίωσης και στην ασφάλεια των τροφίμων. Ειδικότερα, πολλοί ενδογενείς (pH, aw, δυναμικό οξειδοαναγωγής θρεπτικά συστατικά) ή εξωγενείς (λόγος O₂ /CO₂, θερμοκρασία, προσθήκη χημικών ή φυσικών συντηρητικών) παράγοντες έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρεμπόδιση της *L. monocytogenes* σε ποικίλα τρόφιμα (*Chen and Shelef, 1992; Grau and Vanderlinde, 1992; Harmayani et al., 1993; Wjtzes et al., 1993; Farber et al., 1996; George et al., 1996*).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση στην συμπεριφορά της αυτόχθονης μικροχλωρίδας και του παθογόνου *L. monocytogenes* των παρακάτω παραμέτρων συντήρησης:

- θερμοκρασία συντήρησης (5⁰C-15⁰C)
- σύσταση της ατμόσφαιρας συντήρησης (αέρας-τροποποιημένη ατμόσφαιρα 25% CO₂-75% αέρας)

και μεθόδων επεξεργασίας:

- μαρινάρισμα με κρασί και συντήρηση στις παραπάνω συνθήκες θερμοκρασίας και σύστασης ατμόσφαιρας
- μαρινάρισμα σε κρασί με προσθήκη αιθερίου ελαίου θυμαριού και συντήρηση στις παραπάνω συνθήκες θερμοκρασίας και σύστασης ατμόσφαιρας

4.2 Αυτόχθονη μικροχλωρίδα

Όσον αφορά την αυτόχθονη μικροχλωρίδα εξεταστήκαν οι τρεις κυριότεροι μικροοργανισμοί του κρέατος δηλαδή οι *Pseudomonas sp* τα γαλακτικά βακτηρια και τα εντεροβακτήρια. Η θερμοκρασία συντήρησης δεν έδειξε σημαντική επίδραση στο τελικό πληθυσμό τόσο της ολικής μικροβιακής χλωρίδας όσο και στους δυο επιμέρους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν. Η συμβολή της όμως ήταν μεγάλη στη

φάση προσαρμογής και το ρυθμό ανάπτυξης τους. Ειδικότερα, στους 5⁰C (Σχήμα 3.2 α) η φάση προσαρμογής είναι μεγαλύτερη και ο ρυθμός ανάπτυξης εξαιρετικά χαμηλός. Αντίθετα στους 15⁰C (Σχήμα 3.3 α) η φάση προσαρμογής είναι πολύ μικρή και ο ρυθμός ανάπτυξης μεγάλος. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται να προστεθούν στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία ειδικά τα αερόβια ψυχρόφιλα βακτήρια (*Pseudomonas sp*) παρουσιάζουν αντίστοιχη συμπεριφορά ανάλογα με την θερμοκρασία συντήρησης (Ingraham and Bailey, 1959).

Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (25% CO₂-75% αέρας δηλαδή 25% CO₂-58% N₂-17% O₂) είχε ως αποτέλεσμα τη δραστική μείωση του πληθυσμού του κυρίαρχου αερόβιου μικροοργανισμού *Pseudomonas sp*, ενώ ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων παρέμεινε σταθερός (Σχήμα 3.2 β-3.3 β). Όμως τα Gram (-) βακτήρια όπως τα είδη του γένους *Pseudomonas* είναι γενικά πολύ περισσότερο ευαίσθητα στην βακτηριοστατική δράση του CO₂ σε σύγκριση με τα Gram (+), όπως είναι τα γαλακτικά βακτήρια (Church, 1994). Η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας συντήρησης σε CO₂ (20-60%) παρουσιάζει βακτηριοστατική δράση έναντι των αερόβιων βακτηρίων, η οποία αποδίδεται στην ικανότητα του να διαρρηγνύει την κυτταρική μεμβράνη και να προκαλεί μείωση του ενδοκυτταρικού pH (Smith et al., 1990). Όσον αφορά τα γαλακτικά βακτήρια αυτά αναπτύχθηκαν πολύ περισσότερο απουσία οξυγόνου (Viana, Gomide, and Vanetti, 2005) σε σύγκριση με τις συνθήκες έστω μερικής παρουσίας αυτού.

Το μαρινάρισμα των δειγμάτων με το κρασί είχε ως άμεσο επακόλουθο την κατακόρυφη πτώση του pH από τα φυσιολογικά επίπεδα (5.5-5.7) σε 4.5-4.7. Ο όξι-νος χαρακτήρας του διαλύματος της μαρινάδας του κρασιού ήταν ένας παράγοντας που απεδείχθη ότι επιδρά ανασταλτικά στην ανάπτυξη της αυτόχθονης μικροχλωρίδας. Επιπλέον η παρουσία της αιθανόλης που περιέχεται στο κρασί και των φαινολικών συστατικών συμβάλλουν σημαντικά στην αντιμικροβιακή δράση του κρασιού, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης (Σχήμα 3.4-3.5). Ο όξι-νος χαρακτήρας του κρασιού, ο οποίος οφείλεται στην παρουσία ασθενών οργανικών οξέων (τρυγικό, κιτρικό και μηλικό), έχει ως αποτέλεσμα την πτώση του pH. Το pH αποτελεί σημαντικό ρυθμιστικό παράγοντα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών οι περισσότεροι από τους οποίους αναπτύσσονται καλύτερα σε τιμές κοντά στο 7.0, ενώ ελάχι-

στοι αυξάνονται κάτω από το 4.0. Ειδικά στα βακτήρια η επίδραση αυτή είναι περισσότερο ευδιάκριτη σε σύγκριση με τις ζύμες και τους μύκητες. Η επίδραση του χαμηλού pH συνίσταται στην υδρόλυση των νουκλεϊκών οξέων συμπεριλαμβανομένου των DNA, RNA και ATP (Jay. 1992). Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.4 κατά την συντήρηση στον αέρα των δειγμάτων που μαριναριστήκαν με κρασί, ο ρυθμός ανάπτυξης της OMX και συγκεκριμένα των γαλακτικών βακτηρίων, παρέμεινε για μεγάλο διάστημα χαμηλός και αυξήθηκε μόνο προς το τέλος της ενώ επιμηκύνθηκε κατά πολύ η φαση προσαρμογής. Η παρατήρηση αυτή είναι δυνατόν να αποδοθεί στην ικανότητα ανάπτυξης των γαλακτικών βακτηρίων σε όξινες συνθήκες (Jay. 1992) αλλά και στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης οι οποίες επιτείνουν την εξάτμιση της αιθυλικής αλκοόλης. Αντίθετα στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα όπου το κλασμα της αιθυλικής αλκοόλης παραμένει σταθερό διατηρήθηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες (Morton, 1983, Larson, and Morton. 1991) και δεν παρατηρήθηκε σημαντική ανάπτυξη των βακτηρίων. Στη θερμοκρασία των 15⁰C (Σχήμα 3.5) επικρατούν πάλι τα γαλακτικά βακτήρια όμως λόγω της υψηλότερης θερμοκρασίας η αιθανόλη στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης εξατμίστηκε ταχύτερα, με αποτέλεσμα ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών να είναι ταχύτερος. Στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα παρατηρήθηκε μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης για τους λόγους που παρατέθηκαν παραπάνω.

Η προσθήκη αιθερίου ελαίου θυμαριού στο διάλυμα τη μαρινάδας με το οποίο υπέστησαν μεταχείριση τα φιλέτα μόσχου, παρουσίασε περαιτέρω διαφοροποιήσεις όσον αφορά την ανάπτυξη της αυτόχθονης μικροχλωρίδας. Στη θερμοκρασία των 5⁰C στην αερόβια συντήρηση (Σχήμα 3.6) παρατηρήθηκε ότι το αιθέριο έλαιο έδρασε συνεργιστικά με το κρασί, με αποτέλεσμα να μην παρατηρηθεί αύξηση της OMX και των γαλακτικών βακτηρίων προς το τέλος του χρόνου συντήρησης. Τα επίπεδα των πληθυσμών παρέμειναν εξαιρετικά χαμηλά, σχεδόν στα όρια ανίχνευσης. Στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα τα αποτελέσματα ήταν ταυτόσημα με την αερόβια συντήρηση και την περίπτωση μαριναρίσματος μόνο με κρασί. Όμως στην θερμοκρασία των 15⁰C η οποία σίγουρα ευνοεί περισσότερο την ανάπτυξη της OMX και συγκεκριμένα στην συντήρηση στον αέρα, η προσθήκη του αιθερίου ελαίου επιμήκυνε τη φαση προσαρμογής κατά 3 ημέρες περίπου σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του μαριναρίσματος μόνο με κρασί. Επίσης μειώθηκε ο τελικός πληθυσμός κατά 1 log₁₀ cfu/gr. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αντίστοιχα με σχετικές μελέτες που έχουν

δείξει ότι η ανασταλτική δράση του αιθέριου ελαίου είναι πολύ μεγαλύτερη σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας παρόμοιες με αυτήν της παρούσας μελέτης (40% CO₂/30% N₂/30% O₂) σε σύγκριση με τον αέρα (*Skandamis and Nychas, 2002, Chouliara et al., 2007*).

4.3 *Listeria monocytogenes*

Εκτός της προσπάθειας που γίνεται τα τελευταία χρόνια για την ανάπτυξη μεθόδων που θα μεγιστοποιούν το χρόνο συντήρησης του κρέατος, μεγάλη βαρύτητα έχει δοθεί και στον τομέα της ασφάλειας και στην ελαχιστοποίηση του κινδύνου προσβολής των τροφίμων από κάποιον παθογόνο μικροοργανισμό. Η *L. monocytogenes* αποτελεί τον παθογόνο μικροοργανισμό με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης και πρόκλησης επιδημικών φαινομένων. Χαρακτηρίζεται μάλιστα από υψηλό ποσοστό θνησιμότητας, ειδικά σε συγκεκριμένες ευπαθείς ομάδες. Η προσπάθεια αυτή αποτέλεσε έναν από τους στόχους της παρούσας μελέτης.

Στην περίπτωση του μάρτυρα, δηλαδή του δείγματος στο οποίο ο παθογόνος μικροοργανισμός εμβολιάστηκε σε τεμάχια κρέατος (4.5 log₁₀ cfu/gr) και στη συνέχεια συντηρήθηκε χωρίς την επεξεργασία του μαριναρίσματος παρατηρήθηκε ότι σε θερμοκρασία 5^oC και αερόβια συντήρηση, η φάση προσαρμογής ήταν σχετικά μικρή (4 ημέρες) με σχετικά μεγάλο ρυθμό ανάπτυξης με αποτέλεσμα ο τελικός πληθυσμός να προσεγγίσει το 7 log₁₀ cfu/gr (Σχήμα 3.8). Πιθανότατα η μεγάλη ανάπτυξη των ψευδομονάδων αερόβια ενεργοποίησε και την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έχουν γίνει σε κρέας μόσχου, σε γάλα και σε προμαγειρεμένα φιλέτα κοτόπουλου (*Gouet et al., 1978; Farrag and Marth, 1989; Marshall and Schmidt, 1988; Marshall et al., 1992*). Το φαινόμενο έχει αποδοθεί στην παραγωγή ελεύθερων αμινοξέων και μικροπεπτιδίων κατά την υδρόλυση των πρωτεϊνών του κρέατος, η οποία λαμβάνει χώρα όταν οι ψευδομονάδες φθάσουν σε υψηλά επίπεδα (*Marshall and Schmidt, 1991; Nychas and Tassou, 1997*). Στη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα η φάση προσαρμογής επιμηκύνθηκε κατά πολύ και ουσιαστικά δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Σχήμα 3.9). Η αντιμικροβιακή δράση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας και συγκεκριμένα του CO₂ σε σχέση με την *L. monocytogenes* έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών με αντικρουόμενα αποτελέσματα παρότι η βασική επίδραση του CO₂ στη *L. monocytogenes* είναι

βακτηριοστατική (μείωση ρυθμού ανάπτυξης, αύξηση φάσης προσαρμογής) (Farber *et al.*, 1996). Αριθμός μελετών έχει δείξει ότι ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται στις θερμοκρασίες 1-5⁰C σε διάφορα είδη κρέατος (κοτόπουλο, αρνί, μοσχάρι) και περιβάλλον 100% CO₂ (Hart *et al.*, 1991, Gill and Reichel, 1989, Sheridan *et al.*, 1992). Αντίθετα σε περιβάλλον CO₂ /N₂ (50/50) παρατηρείται ανάπτυξη σε εύρος θερμοκρασιών 4-10⁰C στο αρνί, λουκάνικα Φρανκφούρτης και χοιρινό (Nychas, 1994, Kramer and Baumgart, 1992, Manu-Tawiah *et al.*, 1993). Ο ρόλος της παρουσίας του οξυγόνου σε ατμόσφαιρες με CO₂ δεν είναι ξεκάθαρος. Η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* φαίνεται να επηρεάζεται από την προσθήκη 5% O₂ (CO₂/O₂/N₂, 72.5:5:22.5) σε αναερόβια ατμόσφαιρα (CO₂/O₂/N₂, 72.5:0:22.5) (Wimpfheimer *et al.* 1990). Αντίθετα καμία μεταβολή στην ανάπτυξη της δεν παρατηρείται σε χοιρινό κρέας σε θερμοκρασία 4⁰C σε αναερόβιες (CO₂/O₂/N₂, 40:0:60) ή αερόβιες συνθήκες (CO₂/O₂/N₂, 40:10:50) (Wimpfheimer *et al.* 1990). Στην θερμοκρασία των 15⁰C τόσο στις αερόβιες συνθήκες συντήρησης όσο και στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Σχήμα 3.10-3.11) η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ήταν κανονική και μόνο στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα επιμηκύνθηκε κατά πολύ λίγο η φάση προσαρμογής. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με την παρατήρηση ότι η μεγαλύτερη περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας συντήρησης σε CO₂ και η μικρότερη θερμοκρασία συντήρησης έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική αναστολή της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (Garcia de Fernando *et al.* 1995, Fernandez *et al.* 1997). Διαφορές στα στελέχη του μικροοργανισμού που αναπτύχθηκαν σε όξινες ή κανονικές συνθήκες δεν παρατηρήθηκαν.

Όταν μετά τον εμβολιασμό τους με τον παθογόνο μικροοργανισμό τα δείγματα του κρέατος εμβολιάστηκαν στη μαρινάδα του κρασιού για χρονικό διάστημα 12 ωρών παρατηρήθηκε (αμέσως μετά την απομάκρυνση τους από το διάλυμα της μαρινάδας) μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* κατά 1.5 log₁₀ cfu/gr. Σύμφωνα με μελέτες το κόκκινο κρασί είναι δυνατόν να οδηγήσει σε πλήρη θανάτωση πληθυσμό της *L. monocytogenes* ίσο με 200 κύτταρα (όχι εμβολιασμένα σε τρόφιμο) σε 1 ώρα και σε θερμοκρασία 4⁰C (Friedman *et al.* 2007). Αντίστοιχα η σημαντική αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου της ρίγανης κατά παθογόνων, αλλοιογόνων βακτηρίων και μυκήτων έχει επιβεβαιωθεί πολλάκις σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα (Paster *et al.*, 1990, 1995; Daouk *et al.*, 1995; Quattara *et al.*, 1997), ενώ σημαντικές διαφορές έχουν παρατηρηθεί κατά την εφαρμογή των μεμονωμένων συστατικών της

στα τρόφιμα (Tassou et al., 1996; Skandamis and Nychas 2000; Skandamis et al., 2000). Η δομή και η σύσταση των τροφίμων επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τόσο τη μορφολογία όσο και τη φυσιολογία και ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Robins et al., 1994). Κατά την συντήρηση των μαριναρισμένων δειγμάτων σε αέρα και θερμοκρασία 5⁰C, ο πληθυσμός του παθογόνου παρέμεινε σταθερός στα επίπεδα που βρισκόταν μετά το μαρινάρισμα (Σχήμα 3.8) ενώ σε θερμοκρασία 15⁰C, μετά από μια μεγάλη φάση προσαρμογής παρουσίασε ανάπτυξη προς το τέλος της συντήρησης (Σχήμα 3.11). Αντίθετα, στη συντήρηση σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα παρουσιάστηκε μια επιπλέον μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes* που έφτασε σχεδόν στα όρια ανίχνευσης (Σχήμα 3.9-3.11) τόσο στους 5⁰C όσο και στους 15⁰C.

Η προσθήκη αιθερίου ελαίου θυμαριού, δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τον πληθυσμό του παθογόνου μετά το μαρινάρισμα, σε σχέση με την κατεργασία των δειγμάτων μόνο με κρασί όμως επηρέασε την επιβίωση του μικροοργανισμού κατά την διάρκεια της συντήρησης, αφού στη συντήρηση σε θερμοκρασία 5⁰C παρατηρήθηκε μείωση και τελικά θανάτωση του μικροοργανισμού (Σχήμα 3.8,-3.9). Η θανάτωση ήταν ταχύτερη σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Αναστολή του παθογόνου σε αερόβιες συνθήκες από διάφορα αιθέρια έλαια (ρίγανη, δενδρολίβανο, πιπέρι, μέντα) έχει επίσης αναφερθεί σε λουκάνικα συκωτιού και μαγειρεμένα φιλέτα κοτόπουλου (Pandit and Shelef, 1994; Hao et al., 1998). Ωστόσο επειδή οι μελέτες αυτές έγιναν σε μαγειρεμένα τρόφιμα με χαμηλή έως μηδενική φυσική χλωρίδα, υπάρχει έλλειψη γνώσης για τη δραστηριότητα των αιθερίων ελαίων σε φυσικώς επιμολυσμένα τρόφιμα (π.χ. κρέας, ψάρι) και ειδικότερα συσκευασμένα σε κενό/τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Tassou et al., 1996). Τέλος στη θερμοκρασία των 15⁰C παρατηρήθηκε παρόμοια συμπεριφορά με την διάφορα ότι στην αερόβια συντήρηση προς το τέλος παρατηρήθηκε επιβίωση και πιθανή αύξηση των στελεχών της *L. monocytogenes* που είχαν αναπτυχθεί σε όξινο περιβάλλον (Σχήμα 3.10-3.11).

4.4 Συμπεράσματα

Απο τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι το μαρινάρισμα με κρασί αποτελεί μια ήπια φυσική επεξεργασία του κρέατος που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική όσον αφορά την επιμήκυνση του χρόνου συντήρησης του. Επιπλέον όμως συντελεί στην αύξηση της ασφάλειας του κρέατος και γενικά των τροφίμων λόγω της ικανό-

τητας του κρασιού να αναστέλλει την ανάπτυξη/επιβίωση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως η *L. monocytogenes* που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη.

Όταν μάλιστα συνδυαστεί με την ταυτόχρονη προσθήκη ενός αιθέριου ελαίου με αποδεδειγμένη αντιμικροβιακή δράση όπως το αιθέριο έλαιο θυμαριού το συνδυαστικό τους αποτέλεσμα είναι σαφώς βελτιωμένο. Επιπλέον η συσκευασία σε κατάλληλες τροποποιημένες ατμόσφαιρες και η συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες οδηγεί στη μεγιστοποίηση των θετικών αποτελεσμάτων στο τρόφιμο.

Η στροφή λοιπόν τα τελευταία χρόνια των καταναλωτών σε τρόφιμα περισσότερο υγιεινά και χωρίς την προσθήκη χημικών συντηρητικών ταυτόχρονα όμως και πιο ασφαλή, καθιστά το μαρινάρισμα αλλά και τη χρήση των αιθερίων ελαίων μια αποδεκτή μέθοδο συντήρησης των τροφίμων.

Σε αντίθεση με τα αιθέρια έλαια ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει έως σήμερα με αντικείμενο την αντιμικροβιακή δράση του κρασιού στο κρέας και πολύ περισσότερο σε συνδυασμό με κάποιο αιθέριο έλαιο. Έτσι τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής αποτελούν ένα πολύ σημαντικό δεδομένο για την περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη του συγκεκριμένου αντικειμένου, με σκοπό την εξαγωγή περισσότερων στοιχείων που μπορεί να οδηγήσουν σε νέες μεθόδους και πρακτικές για την συντήρηση και ασφάλεια των κρεατοσκευασμάτων.

Κεφάλαιο 5

Βιβλιογραφία

1. Adams, R.P. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL (2001).
2. Anon. (1978). Microorganisms in Foods 1. Their Significance and Methods of Enumeration. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2nd edn. Toronto: University of Toronto Press.
3. Aureli, P., Costantini, A. and Zolea, S. (1992) Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, **55**, 344-348
4. Baranowski, J. D., P. M. Davidson, C. W. Nagel, and A. L. Branen. (1980). Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by naturally occurring hydroxycinnamates. *J. Food Sci.* **45**:592-594.
5. Bernheim, F. (1972). The effect of chloroform, phenols, alcohols and cyanogen iodide on the swelling of *Pseudomonas aeruginosa* in various salts. *Microbios.* **5**, 143.
6. Beuchat, L. R. (1976) Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food Sci.*, **41**, 899-902.
7. Blank, G., Al-Khayat, M. and Ismond, M.A.H. (1986) Germination and heat resistance of *Bacillus subtilis* spores produced on clove and eugenol based Media. *Food Microbiol.*, **4**, 35 - 42
8. Branen, A.L. (1993) Introduction to use antimicrobials. *In: Antimicrobials in foods*, 2nd ed. Eds. Davidson, P.M. and Branen, A.L. pp. 1-9. Marcel Dekker, Inc, New York.
9. Broda, D.M., De Lacy, K.M., Bell, R. G. and Penney, N. (1996). Association of psychrotrophic *Clostridium* spp. with deep tissue spoilage of chilled vacuum-packed lamb *International Journal of Food Microbiology* **29**,(2-3),371-378.
10. Body, L. and Wimpenny, J.W.T. (1992) Ecological concepts in food microbiology. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 23-38.
11. Chang, H. C., and Branen, A. L. (1975). Antimicrobial effects of butylated hydroxyanisole (BHA). *J. Food Sci.* **40**(2), 349-51.

12. Chen, N. and Shelef, L.A. (1992) Relationship between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J. Food Protect.*, **55**, 574-578.
13. Chichester, D.F. and Tanner, F.W. (1972) Antimicrobial food additives. In: Handbbok of food additives 2nd ed. Eds. Furia, T.E. pp. 115-184. CRC Press, Inc, Boca Raton, Finland.
14. Chorianopoulos, N, Evergetis,E, Mallouchos, A, Kalpoutzakis, E, Nychas, G. J, and Haroutounian, S.(2006) Characterization of the Essential Oil Volatiles of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica*: Influence of Harvesting Time and Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** 3139-3145
15. Church, P. N. (1993). Meat products. In R. T. Parry (Ed.), Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods (pp. 229–268). New York: Blackie Academic & Professional.
16. Conner, D. E., Beuchat, L. R., Worthington, R. E. and Hitchcock, H. L. (1984) Effects of essential oils and oleoresins of plants on ethanol production, respiration and sporulation of yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, **1**, 63-74.
17. Conner, D.E. and Beuchat, L.R. (1984) Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Sci.*, **49**, 429-34.
18. Dabbah, R., Edwards, V.M. and Moats, W.A. (1970) Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. *Appl. Microbiol.*, **19**, 27-31.
19. Daniels. J.A., Krishnamurthi, R., Rizvi, S.S.H. (1985). A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, **48**, 532-537.
20. Davidson, P. M., and A. L. Branen. (1980). Inhibition of two psychrotrophic *Pseudomonas* species by butylated hydroxyanisole. *J. Food Sci.* **45**:1603-1606.
21. Davidson, M.P. and Branden L.A., (1981) Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *J. Food Protect.*, **44**, 623-632.
22. Daouk, R, Dagher, S.M., and Sattout, E. (1995) Antifungal activity of the essential of *Origanum syriacum* L. *J. Food Protect.*, **58**, 1147-1149.
23. Deans, S.G. and Ritchie, G. (1987) Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.*, **5**, 165-180.

24. De Man, J.C. Rogossa, M., Sharpe, Elisabeth (1960) "A Medium for the Cultivation of Lactobacilli". *J. Appl. Bact.* **23**. 130-135
25. Denyer, S.P. and Hugo, W.B. (1991). Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In Mechanisms of action of chemical biocides; their study and exploitation. *The Society for Applied Bacteriology, Technical Series 27*. Eds. Denyer, S.P, and Hugo, W.B. pp.171-188. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford.
26. DeWit, J.C., Notrmans, S., Gorin, N. and Kampelamacher, E.H. (1979) Effect of garlic oil or onion oil on toxin production of *Clostridium botulinum* in meat slurry. *J. Food Protect.*, **42**, 222-224.
27. Dixon, N.M., Kell, D.B., (1989). The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* **67**, 109-136.
28. Dziezak, J.D. (1989) Spices. *Food Technol.*, **43**, 102-116.
29. Enfors, S.O., Molin, G., and Ternström, A. (1979) Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen or air on the microbial flora of pork stored at 4°C. *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 197-208.
30. Farber, J.M., Cai, Y. and Ross, W.H. (1996) Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 133-144.
31. Farrag, S.A. and Marth, E.H. (1989) Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonads fluorescens* at 7 or 13°C in skim milk. *J. Food Protect.*, **52**, 852-855.
32. Fernández, P.S., George, S.M., Sills, C.C. and Peck, M.W. (1997) Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **37**, 37-45.
33. Finne, G. (1982). Modified and controlled atmosphere storage of muscle foods. *Food Technology* **36**, 128-133.
34. Freeze E, Chingju, S.W. and Galliers, E. (1972) Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*. 321 – 324.
35. García de Fernando, G.D., Nychas, G.J.E., Peck, M.W. and Ordóñez, J.A. (1995) Growth/survival of psychrotrophic pathogens on meat packaged under modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**, 221-231.

36. Genigeorgis, C. (1985). Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *International Journal of Food Microbiology* **1**, 237-251.
37. George, S.M., Richardson, L.C.C. and Peck, M.W. (1996) Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **32**, 73-90.
38. Gill, C.O. (1998) Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. *In: The Microbiology of Meat and Poultry*. Eds. Board, R.G. and Davies, A.R. pp. 118-152. Blackie Academic and Professional, London.
39. Gill, C. O., and Penney, N. (1977). Penetration of bacteria into meat. *Appl Environ Microbiol.* **33**(6): 1284-1286 .
40. Gill, C. O., Penney, N and Nottingham, P. M., (1978). Tissue sterility in unviscerated carcasses. *Appl Environ Microbiol.* **36**(2): 356-359.
41. Gill, C.O. (1976) Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.*, **41**, 401-410.
42. Gill, C.O., Reichel, M.P., (1989). Growth of cold tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiology.* **6**, 223-320
43. Gram, L. and Huss, H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. of Food Microbiol.*, **33**, 121-137.
44. Gouet, P., Labandie, J. and Serratore, C. (1978) Development of *Listeria monocytogenes* in monoxenic and poluxenic beef minces. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B.*, **166**, 87-94
45. Gould, G. W. (1996) Methods for preservation and extension of shelf life. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**, 51-64.
46. Grau, F.H. and Vanderlinde, P.B. (1992) Occurrence, numbers and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. *J. Food Protect.*, **55**, 4-7.

47. Hall, A.M. and Maurer, J.A. (1985) Spice extracts, lauricidin, and propylene glycol as inhibitors of *Clostridium botulinum* in turkey frankfurter slurries. *Spice Extracts, Lauricidin, Propylene Glycol*. 1167 – 1171.
48. Hao, Y.Y., Bracket, R.E. and Doyle, M.P. (1998) Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. *Food Microbiol.*, **15**, 367-378.
49. Harborne B.J. (1980) Plant Phenolics. *In: Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series V.8 Eds. Bell, E.A. and Chartwood, B.V. pp. 329-402.
50. Hargreaves, L.L., Jarvis, B., Rawlinson, A.P. and Wood, J.M. (1975) The antimicrobial effects of spices, herbs and extracts from these and other food plants. The British Food Manufacturing Industries Research Association Scientific and Technical Surveys, **88**.
51. Harmayani, E., Sofos, J.N. and Schmidt, G.R. (1993) Fate of *Listeria monocytogenes* in raw and cooked ground beef with meat processing additives. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**, 223-232.
52. Hart, C.D., Mead, G.C. and Norris, A.P. (1991) Effects of gaseous environment and temperature on the storage behaviour of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 40-46.
53. Hugo W.B. (1991) A review: A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. *J. Appl. Bacteriol.*, **71**, 9.
54. Ingram, M and Dainty, R. H. (1971). Changes Caused by Microbes in Spoilage of Meats. *Journal of Applied Microbiology* **34** (1) ,21-39.
55. Ingraham, J. L. and Bailey, G. F. (1959) A comparative study of the effect of temperature on the metabolism of psychrophilic and mesophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, **77**, 609-613.
56. Ismael A. Adnan, and Pierson D.M. (1990) Inhibition of germination, outgrowth, and vegetative growth of *Clostridium botulinum* 67B by spice oils. *J. Food Protect.*, **53**, 755-758.
57. Jay, J.M.. *Modern Food Microbiology*. Avi Book, 4th edition 1992.
58. Kabara, J.J. and Eklund, T. (1991) Organic acids and esters. *In: Food Preservatives*. Eds. Russell, N.J. and Gould, G.W. pp. 44-71. Blackie, Glasgow.

59. Katayama, T. and Nagai, I. (1960) Chemical significance of the volatile compounds of spices in the food preservative viewpoint. VI. Structure and antibacterial activity of terpenes. *Bull. Japanese Soc. Scient. Fisher.*, **26**, 29-32.
60. Kramer, K.-H., Baumgart, J., (1992). Bruhwurstaufschmitt. Hemmung von *Listeria monocytogenes* durch eine modifizierte atmosphere. *Fleischwirtsch* 72, 666-668.
61. Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry* **44**: 883-886
62. Κουράκου, Σ.: Θέματα Οινολογίας. Εκδόσεις Τροχαλία Αθήνα 1992
63. Larson, E. L., and H. E. Morton. (1991). Alcohols, p. 191–203. In S. S. Block (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
64. Leistner, L. (1985). Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. In: *Properties of Water in Foods*. Eds. Simatos D. and Multon, J.J. pp. 309-329. Martinus Nijhof, Dordrecht.
65. Manu-Tawiah, W., Myers, D.J., Olson, D.G., and Molins, R.A., (1993) Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in pork chops packaged under modified gas atmospheres. *J. Food Sci.* **58**, 475-479.
66. Marshall, D.L., Andrews, L.S., Wells, J.H. and Farr, A.J. (1992) Influence of modified atmosphere packaging on the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonads fluorescens* on precooked chicken. *Food Microbiol.*, **9**, 303-309.
67. Marshall, D.L. and Schmidt, R.H. (1988) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected pseudomonads. *J. Food Protect.*, **51**, 277-282.
68. Marshall, D.L., and Schmidt, R.H. (1991) Physiological evaluation of stimulated growth of *Listeria monocytogenes* by *Pseudomonas* species in milk. *Can. J. Microbiol.*, **37**, 594-599.
69. Masquelier, J. (1959). The bactericidal action of certain phenolics of grapes and wine. In *The Pharmacology of Plant Phenolics*. pp. 123-131. Edited by J.W.Fairbairn. London: Academic Press.

70. Mendel Friedman, P.R. Henika, C.E. Levin, and R.E.Mandrell.(2007) Recipes for Antimicrobial Wine Marinades against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enteric*. *Journal of Food Science.*, **72** (6) 207-213.
71. Μεταξόπουλος , Ι. Τεχνολογία μεταποιημένων προϊόντων κρέατος. Αθίνα 1989.
72. Meynel, G.G. and Meynel, E. (1970) Theory and practice in experimental bacteriology. 2nd Cambridge University Press.
73. Morton, H. E. 1983. Alcohols, p. 225–239. In S. S. Bloch (ed.), Disinfection, sterilization, and preservation, 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.
74. Μπλουκας, Ι. Τεχνολογία κρέατος. Εκδοσεις Σταμουλή .Αθίνα 2007.
75. Nychas G.J.E (1994) "Modified Atmosphere Packaging of Meats" In: Minimal Processing of Foods and Process optimization, An Interface.pp.417-436 Eds R.P. Singh, F.A.R Oliveira, CRC Press, London
76. Nychas G.J.E (1995) Chapter 4; Natural Antimicrobials from plants. In: New Methods of Food Preservation, Ed G.W. Gould,pp. 58-89, Blackie Academic.
77. Nychas, G.J.E and Tassou, C.C. (1997) Spoilage processes and proteolysis in chicken as detected by HPLC. *J. Sci. Food Agricult.*, **74**, 199-208.
78. Pandit, V.A. and Shelef, L.A. (1994) Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiol.*, **11**,57-63.
79. Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U. and Juven, B. (1995) Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J. Food Prot.*, **58**, 81-85.
80. Paster, N., Juven, B.J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., and Ravid U, (1990). Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Let. Appl. Microbiol.*, **11**, 33-37.
81. Quattara, B., Simard, R.E., Holley, R.A. Piette, G.J.P. and Begin, A. (1997) Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.*, **37**, 155-162.
82. Robach, M. C., and M. D. Pierson. (1979). Inhibition of *Clostridium botulinum* types A and B by phenolic antioxidants. *J. Food Protect.* **42**:858-861.

83. Roberts A.T., (1989) Combinations of antimicrobials and processing methods-models for predicting response of microorganisms to various factors could help us understand and control microbial growth in foods. *Food Technol.*, 156 – 163.
84. Robins, M.M, Brocklehurst, T.F, and Wilson, P.D.G (1994) Food structure and the growth of pathogenic bacteria. *Food Technol. Int. Eur.*, 31-36
85. Sakanaka S., Kim, M., Taninguchi, M. and Yamamoto, T. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric. Biol. Hem.*, **53**, 2307-2311
86. Schwartz, D.C., and Cantor, C.R. (1984). "Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis." *Cell* **37**, 67-75.
87. Shelef, L.A (1983). Antimicrobial effects of spices. *J.Food Safety*. **6**, 29-44.
88. Sheridan, J.J., Doherty, A., Allen, P., McDowell, D.A., Blair, I.S. and Harrington, D. (1995) Investigations on the growth of *Listeria monocytogenes* on lamb under modified atmospheres. *Food Microbiol.*, **12**, 259-266.
89. Sikkema, J., de Bont, J. A. M., and Poolman, B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiology reviews* **59**, 201-222
90. Singelton, V.L. and Esau, P. (1969) Phenolic substances in grapes and wine and their significance. Academic Press, New York.
91. Skandamis, N.P. and Nychas, G.J.E. (2000) Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Appl. Env. Microbiol.*, **66**, 1646-1653.
92. Skandamis, P., Tsigarida, E. and Nychas, G.J.E. (2000) Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within gelatin gel with or without the addition of oregano essential oil. *W. J. Microbiol. Biotechn.*, **16**, 31-35.
93. Skandamis, P., Nychas, G.-J.E., (2002). Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions *International Journal of Food Microbiology* **79** 35– 45
94. Smith, J. P., Ramaswamy, H. S., & Simpson, B. K. (1990). Developments in food packaging technology. Part II. Storage aspects. *Trends in Food Science and Technology*, **1**(5), 111–118.

95. Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davidson, P.M. and Johnson, E.A. (1998) Naturally occurring antimicrobials in foods. Council for Agricultural Science and Technology, West Lincoln, USA.
96. Stecchini, M.L., Sarais, I. and Giavedoni, P. (1993) Effect of essential oils on *Aeromonas hydrophila* in a culture medium and in cooked pork. *J. Food Protect.*, **56**, 1075-1078.
97. Tassou, C.C., Drosinos, E.H. and Nychas, G.J. E. (1996) Inhibition of the resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fillets in olive oil, oregano and lemon juice under modified atmosphere or air. *J. Food Protect.*, **59**, 31-34.
98. Tisserand, M. and Ballacs, G. (1992). Essential oils.
99. Tsao, R. and Yang, R. (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography. A.*, 1018, 29-40.
100. Ultee, A. (2000) Bacterial action of cavracol towards the food pathogen *Bacillus cereus*: A case study of a novel approach to mild food preservation. PhD Thesis. Wageningen University, Netherlands.
101. Viana, E. S., Gomide, L. A. M., & Vanetti, M. C. D. (2005). Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. *Meat Science*, **71**, 696–705.
102. Vokou, D., S. Vereltzidou & P. Katinakis, (1993). Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **47**: 223–235.
103. Ραγκούση-Ιγνατιάδου, Β. Χημεία Φυσικών Προϊόντων. Αθήνα 1996.
104. Wijtzes, T., McClure, P.J., Zwietering, M.H. and Roberts, T.A. (1993) Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. *Int. J. Food Microbiol.*, **18**, 139-149.
105. Wimpfheimer, L., Altman, N.S., Hotchkiss, J.H., (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A serotype 4 and competitive spoilage organisms in raw chicken packaged under modified atmospheres and in air. *Int. J. Food. Microbiology*. **11**, 205-214.
106. Wolfe, S. (1980). Use of CO and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish and produce. *Food Technology* **34**(3), 55-58, 63.

107. Young, L. L, Reverie, R. D. and Cole, A. B. (1988). Fresh red meats: A place to apply modified atmospheres. *Food Technol.* **42**, 65-69.