



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ  
ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών μεθόδων  
εφαρμογής αλκοολούχων αποσταγμάτων στην  
παρατάση του χρόνου ζωής μοσχαρίσιου κιμά**

**ΠΑΤΕΡΑΚΗ Ι. ΓΕΩΡΓΙΑ- ΛΗΤΩ**

**ΑΘΗΝΑ, 2014**

**Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης**

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη της επίδρασης διαφορετικών μεθόδων εφαρμογής αλκοολούχων αποσταγμάτων στην παράταση του χρόνου ζωής μοσχαρίσιου κιμά**

**ΠΑΤΕΡΑΚΗ Ι. ΓΕΩΡΓΙΑ- ΛΗΤΩ**

Επιβλέπων καθηγητής: Σκανδάμης Παναγιώτης

### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δροσινός Ελευθέριος  
Σκανδάμης Παναγιώτης  
Τσακαλίδου Ευαγγελία

Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α  
Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α  
Καθηγήτρια Γ.Π.Α

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μοσχαρίσιος κιμάς είναι από τα πιο δημοφιλή προϊόντα κρέατος στην προτίμηση των καταναλωτών παγκοσμίως, όμως χαρακτηρίζεται ως ευπαθές και ευαλλοίωτο προϊόν. Ο λόγος αυτός ωθεί τη βιομηχανία τροφίμων στην εφαρμογή μοντέρνων μεθόδων συντήρησης. Έτσι σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν α) η εκτίμηση του πιο αποτελεσματικού αντιμικροβιακού συνδυασμού (τύπος αντιμικροβιακού και εφαρμοζόμενος όγκος) μέσω διάχυσης ή/και εξάτμισης σε μοσχαρίσιο κιμά που συσκευάστηκε σε εμπορικές συσκευασίες και β) η ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων που περιγράφουν την επίδραση της θερμοκρασίας στην αύξηση των κυρίαρχων αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε μοσχαρίσιο κιμά που συσκευάστηκε με ή χωρίς την εφαρμογή αιθανόλης ή τσίπουρου και η επικύρωση τους υπό μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. Στο πρώτο μέρος εφαρμόστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης (38, 70, 100% κ.ό.) και τσίπουρο (~38% κ.ό) ως αντιμικροβιακά σε εμπορικές συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά (500 g). Και τα δύο αντιμικροβιακά προστέθηκαν σε απορροφητικά υφάσματα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία κρέατος. Τα υφάσματα αυτά, μεγέθους 17.5 x 10 cm ή 17.5 x 20 cm, εμποτίστηκαν με 10, 20, 30, 40 και 60 mL από τα δύο προαναφερθέντα αντιμικροβιακά και τοποθετήθηκαν στη βάση της συσκευασίας. Επίσης, εφαρμόστηκε ένα επιπλέον απορροφητικό ύφασμα ( 7.5 x 10) στο οποίο είχε εφαρμοσθεί όγκος 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο παρασκεύασμα, στη μεμβράνη συσκευασίας κάτω από την ετικέτα (συνολικοί όγκοι που εφαρμόστηκαν σε συσκευασίες 500 g μοσχαρίσιου κιμά: 30, 40, 50 και 60 mL). Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub> : 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκαν στους 7°C. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν ως προς τη μεταβολή των αερίων εντός της συσκευασίας, τη μικροβιακή ανάλυση της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικών βακτηρίων, ψευδομονάδων, ζυμών και μυκήτων, το pH, τη μεταβολή του χρώματος ( παράμετροι  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), την οσμή και τη συνολική εμφάνιση τους. Η αιθανόλη που μετανάστευσε στον κιμά, αξιολογήθηκε με τη χρήση της αέριας χρωματογραφίας (GC- FID). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από την πάνω και κάτω στρώση του κιμά (βάθους

1cm) ώστε να εντοπιστούν πιθανές διαφορές μετανάστευσης της αιθανόλης και του τσίπουρου μέσω διάχυσης ή/ και εξάτμισης. Στο δεύτερο μέρος που αφορά τα μοντέλα πρόβλεψης, χρησιμοποιήθηκε ο πιο δραστικός συνδυασμός τύπου αντιμικροβιακού (αντιμικροβιακή δράση και οργανοληπτικές ιδιότητες) και εφαρμοζόμενου όγκου (τσίπουρο, συνολικός όγκος 50 mL). Τα δείγματα συντηρήθηκαν σε σταθερές θερμοκρασίες 0, 4, 8 και 12°C και αναπτύχθηκαν πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα ανάπτυξης για τους κυρίαρχους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς. Η επικύρωση των μοντέλων που αναπτύχθηκαν πραγματοποιήθηκε σε μεταβαλλόμενες συνθήκες με εύρος 0- 10°C.

Κυρίαρχοι μικροοργανισμοί σε όλες τις μεταχειρίσεις ήταν ο *B. thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η ανάπτυξη του *B. thermosphacta* (πρώτος σε κυριαρχία) παρεμποδίστηκε από την αύξηση α) του εφαρμοζόμενου όγκου αιθανόλης ή τσίπουρου (από 30 έως 70 mL) και β) της συγκέντρωσης της αιθανόλης (38% έως 100% κ.ό.). Οι εφαρμοζόμενοι όγκοι των αλκοολούχων αποσταγμάτων και συγκεντρώσεων αιθανόλης είχαν παρόμοια δράση και στην ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (δεύτερα σε κυριαρχία) καθώς και στους υπόλοιπους μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν. Η αντιμικροβιακή δράση ήταν ισχυρότερη στα δείγματα που ελήφθησαν από την κάτω στρώση του κιμά (μετανάστευση μέσω διάχυσης και εξάτμισης) σε σύγκριση με τα δείγματα από την πάνω στρώση του κιμά (μετανάστευση κυρίως μέσω εξάτμισης) ανεξαρτήτως της εφαρμοζόμενης μεταχείρισης. Τα δείγματα στα οποία είχαν εφαρμοστεί αιθανόλη και τσίπουρο παρουσίασαν πιο σταθερό ερυθρό χρώμα συγκρινόμενα με τους μάρτυρες, στους οποίους η σταδιακή μείωση της παραμέτρου  $a^*$  πραγματοποιήθηκε πιο γρήγορα. Μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων, η προσθήκη 50 mL τσίπουρου παρουσίασε την καλύτερη σταθερότητα ερυθρού χρώματος καθώς και την υψηλότερη βαθμολογία σε χαρακτηριστικά όπως η συνολική εμφάνιση και η οσμή. Σύμφωνα με τα δεδομένα που ελήφθησαν από την GC-FID, τα ποσοστά αιθανόλης που ανιχνεύθηκαν στη μάζα των δειγμάτων με μεταχείριση ήταν 2-4 φορές υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά στους μάρτυρες. Επίσης δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές αιθανόλης μεταξύ των δειγμάτων που παρελήφθησαν από την επιφάνεια (άνω στρώση) και τη βάση του κιμά (κάτω στρώση). Οι προβλέψεις από τα μοντέλα ανάπτυξης που δημιουργήθηκαν για τους δύο κυρίαρχους μικροοργανισμούς και οι παρατηρούμενες τιμές που προέκυψαν από τις μεταβαλλόμενες συνθήκες, είχαν ικανοποιητική συσχέτιση.

Τα αποτελέσματα της μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η εφαρμογή τσίπουρου αποτελεί μια ήπια και αποτελεσματική τεχνολογία αντιμικροβιακής συσκευασίας για την επέκταση του χρόνου ζωής μοσχαρίσιου κιμά κατά τη διάρκεια συντήρησης στην ψυκτική αλυσίδα.

Επιστημονική περιοχή: Ποσοτική Μικροβιολογία

Λέξεις κλειδιά: αλκοολούχα αποστάγματα, αιθανόλη, μοσχαρίσιος κιμάς, χρόνος ζωής, πτητικά.

## ABSTRACT

Ground beef is considered a popular food commodity worldwide; however it is also perishable and the food industry is in need of applying modern preservation methods for the extension of its shelf-life. Thus, the present study aimed a) to estimate the most effective antimicrobial combination (type of antimicrobial/ applied volume) through diffusion and/ or evaporation in ground beef stored in commercial packages and b) to develop mathematical models describing the effect of temperature on growth of dominant microorganisms in ground beef packaged with or without ethanol or tsipouro and their subsequent validation under dynamic temperature conditions.

The present study was conducted in two independent experiments. In the first part, different concentrations of ethanol (38, 70, 100% v/v) and tsipouro were applied as antimicrobials in commercial packages of ground beef (500 g). Both antimicrobials were added in absorbent cloths, provided by the meat industry. Cloths of 17.5 x 10 cm or 17.5 x 20cm were placed underneath beef and soaked with 10, 20, 30, 40 and 60 mL of the two aforementioned antimicrobials respectively. In all assays, cloths (7.5 x 10 cm) supplemented with 10 mL of the respective antimicrobial were also mounted under the packaging film of each package (total volume applied/ packaging 500 g : 30, 40, 50 and 60 mL). Packages were stored under 80% O<sub>2</sub> : 20% CO<sub>2</sub>, at 7°C. Untreated samples served as controls. Total viable counts, pseudomonads, *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria (LAB), yeasts and molds, pH, colour ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), odour and overall appearance were evaluated. The migrated ethanol to the minced beef was estimated by GC-FID. All measurements were performed on samples taken from the top and bottom of the package to investigate potential differences regarding the antimicrobial efficacy and migration of ethanol and tsipouro through evaporation and/ or diffusion. In the second part relating to predictive models, the most effective combination (antimicrobial activity and sensory properties) of antimicrobial type and applied volume was used (tsipouro, total volume of 50 mL). All samples were stored at constant temperatures of 0, 4, 8, 12°C and development of *B. thermosphacta* and LAB growth models was performed. Validation of the developed growth models was carried out under dynamic temperature conditions ranging from 0 to 10°C.

*B. thermosphacta* and LAB dominated the microbial association of meat in all treatments. Growth of *B. thermosphacta* (dominant microorganism) was delayed by increasing: i) the applied volume (from 30 to 70 mL) of ethanol or tsipouro and ii) the concentration of ethanol (from 38% to 100% v/v). Similar was the effect of the applied volume and concentration of ethanol on growth of LAB (second in dominance) and all the rest tested microorganisms. The antimicrobial activity was stronger when sampling was performed from the bottom layer of ground beef (migration through diffusion and evaporation) regardless of the applied treatment. Samples treated with ethanol and tsipouro showed more stable red color compared to controls, in which the gradual decrease of  $a^*$  parameter took place faster. Among the different treatments, the addition of 50 mL tsipouro showed the best red color stability and the highest scores in attributes like overall appearance and odor. With regards to GC- FID data, the detected ethanol (component) was 2 to 4 fold higher than the respective values of ethanol in controls (metabolic product of microorganisms). No significant differences in ethanol content were observed between samples analyzed from the upper and down layer of ground beef. Predictions of *B. thermosphacta* and LAB growth models and observations under dynamic temperature conditions showed good correlation.

Overall, the application of tsipouro may be an effective and mild antimicrobial packaging method for extending shelf- life of ground beef along the chilling chain.

Scientific field: Predictive Microbiology

Keywords: alcoholic beverages, minced beef, shelf- life, vapors, ethanol

*Στη Στέλλα και το Γιώργο που θα θυμάμαι πάντα*



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων και Ποτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και ολοκληρώθηκε χάρη στη συμβολή και συνεργασία αρκετών ανθρώπων.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Σκανδάμη Παναγιώτη για την πολύτιμη συνεργασία, τη συνεχή καθοδήγηση και παροχή της καίριας επιστημονικής του άποψης, την εμπιστοσύνη που μου υπέδειξε κατά τη διάρκεια της διατριβής αλλά και για την τιμή που μου έκανε να με δεχτεί ως μέλος αυτής της δυναμικής ερευνητικής ομάδας. Ακόμα τον ευχαριστώ θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να διευρύνω τις γνώσεις και τις δυνατότητες μου καθώς και για τη δυνατότητα να ερευνήσω το συναρπαστικό κόσμο της Επιστήμης και Τεχνολογίας τροφίμων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Καπετανάκου Αναστασία για τη διαρκή και ουσιαστική βοήθεια, την επιστημονική καθοδήγηση, την υπομονή της και την υποστήριξη που παρείχε σε οποιοδήποτε πρόβλημα προέκυπτε κατά την εκπόνηση αυτής της μελέτης. Η άψογη συνεργασία μας και η εμπιστοσύνη που υπέδειξε στο πρόσωπο μου, υπήρξε πολλές φορές κινητήριο δύναμη και έμπνευση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διατριβής.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω όλα ανεξαιρέτως τα μόνιμα μέλη του εργαστηρίου και τους υποψήφιους Διδάκτορες, για την άριστη συνεργασία, το ευχάριστο κλίμα εργασίας και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε χρειάστηκα, πάντα με προθυμία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δούλτσο Δημήτριο, για την καθοριστική συμβολή του, τις συμβουλές, τη συνεργασία, το χρόνο που διέθεσε και τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διάρκεια της ερευνητικής μελέτης. Ακόμα ευχαριστώ πολύ τις συναδέλφους και φίλες μεταπτυχιακές φοιτήτριες που εργαστήκαμε μαζί όλο αυτόν τον καιρό, τη Διαμαντή Λαμπρινή, Σκαμπαρδώνη Λαμπρινή και ιδιαίτερα την Καλογιαννάκη Καλλιόπη για την ηθική στήριξη και βοήθεια τους αλλά και την όμορφη διαδρομή που διανύσαμε παρέα.

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη με την ευγενική προσφορά της εταιρείας ΦΛΩΡΙΔΗΣ ΑΕΒΕΚ, η οποία ήταν πρόθυμη ανά πάσα στιγμή να καλύψει τις

απαιτήσεις του πειράματος μέσω της διάθεσης των δειγμάτων και γι αυτό θα ήθελα να τους ευχαριστήσω θερμά! Η συνεργασία μας υπήρξε για μένα πολύτιμη εμπειρία.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου για την υπομονή τους, τη θετική τους ενέργεια, την εμπιστοσύνη και υποστήριξη τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την οικογένεια μου, τους αγαπημένους μου γονείς, που μου έδωσαν την ευκαιρία να εκπληρώσω ένα ακόμα προσωπικό μου στόχο, την αδερφή μου, Μελίνα και το Θοδωρή που πάντα είναι δίπλα μου και υποστηρίζουν τις επιλογές μου.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	3
ABSTRACT .....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	9
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>13</b>
1.1 Κρέας.....	13
1.1.1 Αλλοίωση του κρέατος .....	15
1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση του κρέατος.....	16
1.1.3 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την αλλοίωση του κρέατος..	19
1.2 Συντήρηση φρέσκου κρέατος .....	24
1.2.1 Συντήρηση με μεθόδους χαμηλής θερμοκρασίας.....	27
1.2.1.1 Διατήρηση σε ψύξη (Cool Storage).....	28
1.3 Συσκευασία .....	29
1.3.1 Συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες.....	30
1.3.1.1 Αέρια που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα.....	33
1.3.2 Ενεργός Συσκευασία .....	36
1.3.2.1 Αντιμικροβιακή συσκευασία.....	36
1.3.3 Αντιμικροβιακοί παράγοντες .....	39
1.3.3.1 Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες.....	39
1.3.3.2 Η αιθανόλη ως αντιμικροβιακός παράγοντας. ....	40
1.4 Μικροβιολογία πρόβλεψης (Ποσοτική μικροβιολογία) .....	41
1.5 Σκοπός της μελέτης .....	43
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>44</b>
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός .....	44
2.2 Αντιμικροβιακές ουσίες .....	46
2.3 Προετοιμασία δειγμάτων και συντήρηση.....	46
2.4 Μέτρηση αερίων εντός της συσκευασίας .....	50
2.5 Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	50
2.6 Μετρήσεις pH.....	52
2.7 Μετρήσεις χρώματος .....	53
2.8 Ανάλυση Αέριας Χρωματογραφίας .....	54
2.9 Αξιολόγηση της οσμής.....	55
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>57</b>
3.1 ΕΝΟΤΗΤΑ Α: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ, ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΟΥ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ.....	57
3.1.1 1 <sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία .....	57
3.1.1.1 Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας.....	57
3.1.1.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	59
3.1.1.3 Οπτική παρατήρηση δειγμάτων.....	66
3.1.2 2 <sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία.....	68
3.1.2.1 Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας.....	68

3.1.2.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	70
3.1.2.3	Οπτική παρατήρηση δειγμάτων.....	76
3.1.3	3 <sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία .....	78
3.1.3.1	Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας.....	78
3.1.3.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	80
3.1.3.3	Οπτική παρατήρηση των δειγμάτων και μέτρηση της μεταβολής του χρώματος .....	86
3.1.3.4	Οργανοληπτική αξιολόγηση- Οσμή.....	90
3.2	ΕΝΟΤΗΤΑ Β: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΛΙΚΗΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ .....	93
3.2.1	Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας.....	93
3.2.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις .....	95
3.2.3	Μέτρηση της μεταβολής του χρώματος.....	104
3.2.4	Οργανοληπτική αξιολόγηση (Οσμή) .....	107
3.2.5	Αέρια Χρωματογραφία (GC-FID).....	111
3.2.6	Πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης .....	113
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	122
5.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	124
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	127

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Κρέας

Ο όρος κρέας αναφέρεται στους μυϊκούς ιστούς όλων των ειδών των ζώων, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως τροφή. Το «νωπό κρέας» ειδικότερα, ορίζεται το κρέας το οποίο δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία συντήρησης εκτός από την ψύξη, την κατάψυξη ή την ταχεία κατάψυξη, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που είναι συσκευασμένο σε κενό αέρος ή σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ.853/2004).

Το κρέας αποτελεί βασικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής από τα προϊστορικά ακόμα χρόνια, έως και σήμερα, που πλέον η κτηνοτροφία έχει εντατικοποιηθεί και λάβει τεράστιες διαστάσεις. Χημικά, το κρέας αποτελείται από τέσσερα κύρια συστατικά, το νερό, τις πρωτεΐνες, τα λιπίδια, τους υδατάνθρακες, καθώς και άλλα δευτερεύοντα συστατικά όπως βιταμίνες, ένζυμα, χρωστικές και αρωματικές ουσίες (Πίνακας 1). Λόγω της σχετικής αναλογίας όλων αυτών των συστατικών, το κρέας αποκτά μια ιδιαίτερη δομή, υφή, άρωμα, χρώμα και θρεπτική αξία. Οι πλέον κύριες πηγές κρέατος είναι η αγελάδα, το πρόβατο, ο χοίρος, το κοτόπουλο και το ψάρι. Στη Βόρεια και Νότια Αμερική, στην Αφρική και την Ευρώπη το μοσχάρι αποτελεί το κυριότερο είδος κρέατος, ενώ το αρνίσιο και το χοίρινο κρέας είναι σημαντικά σε Μέση και Άπω Ανατολή αντίστοιχα. Σε γενικές γραμμές, ο δυτικός κόσμος καταναλώνει τις μεγαλύτερες ποσότητες κρέατος. Το κρέας αποτελεί δείκτη οικονομικής ευημερίας και οι τρόποι διάθεσης και επεξεργασίας του συνεχώς πληθαίνουν (Warris, 2000).

**Πίνακας 1.** Χημική σύσταση κρέατος (Τσακαλίδου, 2001)

<b>Συστατικό</b>	<b>% Βάρος</b>
Νερό	75
Πρωτεΐνες	19
Λίπος	2.5
Υδατάνθρακες	1.2
Διαλυτά μη πρωτεϊνούχα συστατικά:	
Άζωτο	1.65
Ανόργανα	0.65
Βιταμίνες	Ίχνη

Η ποιότητα του κρέατος εξαρτάται από δύο βασικούς παράγοντες. Αρχικά, από τη βιολογική λειτουργία των μυών στο ζώο όταν αυτό είναι ζωντανό. Οι εξειδικευμένες λειτουργίες των μυών καθορίζονται από τις πρωτεΐνες τους, καθώς και από τις πηγές άνθρακα (υδατάνθρακες και λίπη) και τα μεταβολικά μονοπάτια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας. Ο δεύτερος παράγοντας είναι η απώλεια της βιολογικής ρύθμισης μετά το θάνατο του ζώου. Οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα καθορίζουν την ποιότητα του κρέατος αυτού καθ' αυτού, αλλά και τις λειτουργικές ιδιότητες του κρέατος όταν αυτό χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή προϊόντων επεξεργασίας κρέατος (π.χ. αλλαντικά) (Τσακαλίδου, 2001)

Το μοσχαρίσιο κρέας και ειδικότερα ο κιμάς θεωρείται παγκοσμίως ένα από τα πιο δημοφιλή εμπορεύματα τροφίμων που σημειώνει υψηλά ποσοστά εξαγωγών. Ωστόσο είναι ένα ιδιαίτερα ευπαθές και ευαλλοίωτο προϊόν, καθώς ο χρόνος ζωής του είναι περιορισμένος λόγω της επεξεργασίας του κατά τη γραμμή παραγωγής αλλά και της μεγάλης επιφάνειας του που εκτίθεται και διευκολύνει την αλλοίωση. Το ποσοστό των μεταβολών που θα πραγματοποιηθούν λόγω αλλοίωσης εξαρτάται από τη σύνθεση του κρέατος, τις πρακτικές υγιεινής κατά την κοπή, την άλεση, την παρασκευή αλλά και από τις συνθήκες αποθήκευσης. Ο πιο σημαντικός παράγοντας στον έλεγχο της αλλοίωσης του κρέατος είναι το αρχικό μικροβιακό φορτίο και κατ' επέκταση η μικροβιακή

ανάπτυξη, η οποία επηρεάζει τόσο την ποιότητα όσο και την ασφάλεια του προϊόντος (Limbo et al., 2010).

### **1.1.1 Αλλοίωση του κρέατος**

Ως αλλοίωση τροφίμου συνήθως ορίζεται οποιαδήποτε μεταβολή στην εμφάνιση, την οσμή ή τη γεύση του εκάστοτε προϊόντος που το καθιστούν ακατάλληλο προς κατανάλωση. Ο χρόνος ζωής (shelf-life) του κρέατος και των προϊόντων του, ορίζεται ως το διάστημα που μεσολαβεί από την αποθήκευση έως την αλλοίωση. Το σημείο της αλλοίωσης δύναται να καθοριστεί από ένα ανώτατο επιτρεπτό όριο μικροβιακής ανάπτυξης ή από μη αποδεκτά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως οσμή, γεύση, χρώμα, συνολική εμφάνιση (Borch et al., 1996). Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η αλλοίωση του κρέατος αποτελεί ένα θέμα με τεράστιες οικονομικές επιπτώσεις. Η προσοχή της επιστημονικής κοινότητας απέναντι στην μικροβιολογία του κρέατος αυξήθηκε ιδιαίτερα, όταν τεράστιες ποσότητες κρέατος άρχισαν να αποστέλλονται σε μεγάλες αποστάσεις (π.χ. από την Αυστραλία στο Ηνωμένο Βασίλειο) και συνεχίστηκε το 1950 με την εμφάνιση των υπεραγορών (Nychas et al., 2008). Υπάρχουν τρεις κύριοι μηχανισμοί αλλοίωσης που αφορούν το κρέας και τα προϊόντα κρέατος, μετά το σφαγείο και κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και συντήρησης: α) μικροβιακή αλλοίωση, β) οξείδωση λιπιδίων και γ) αυτολυτική ενζυματική αλλοίωση (Dave and Ghaly, 2011).

Η αλλοίωση του κρέατος είναι δυνατό να μην είναι πάντοτε εμφανής, ωστόσο οι καταναλωτές κρίνουν ότι η συνύπαρξη αποχρωματισμού, δυνατών οσμών και η εμφάνιση βλέννας στο κρέας, καθιστούν τα κύρια ποιοτικά κριτήρια για την απόρριψη του (Nychas et al., 2007). Γενικότερα η αλλοίωση υπόκειται στην υποκειμενική κρίση του καταναλωτή, η οποία μπορεί να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως το πολιτιστικό και οικονομικό του υπόβαθρο. Πάνω από 50 μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί και τεκμηριωθεί ανά τα χρόνια για την ανίχνευση του μικροβιολογικά αλλοιωμένου ή επιμολυσμένου κρέατος (π.χ. οργανοληπτικές, μικροβιολογικές και φυσικοχημικές) (Ammor et al., 2009). Παράλληλα, σε μια εποχή συνεχούς τεχνολογικής προόδου και εξέλιξης του τρόπου ζωής των καταναλωτών, η ευρωπαϊκή βιομηχανία τροφίμων καλείται να ανταποκριθεί στις φαινομενικά αντιφατικές απαιτήσεις της αγοράς. Ενώ, σε

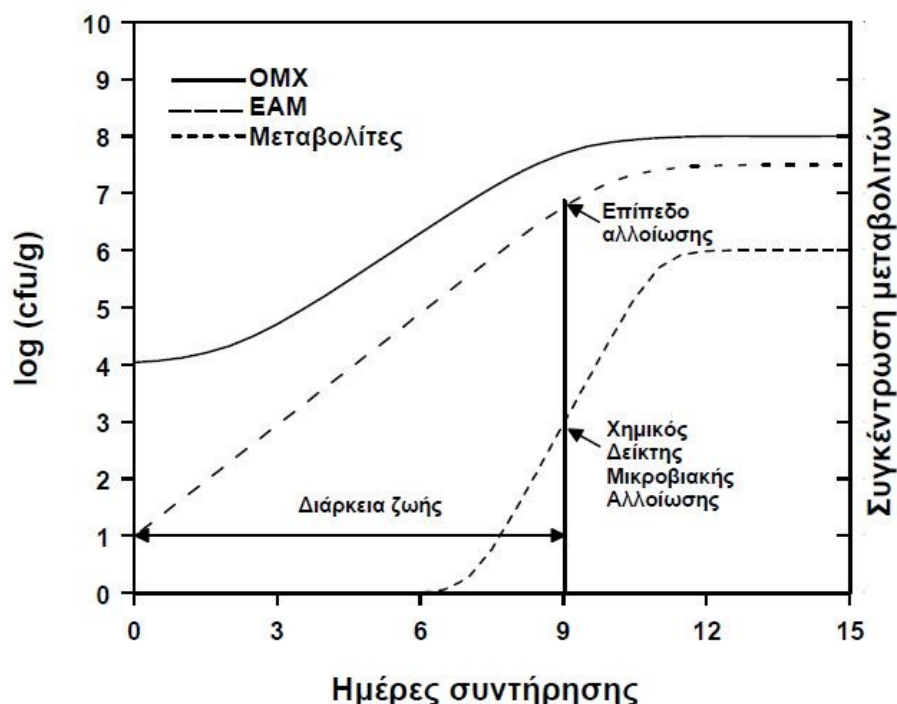
γενικές γραμμές, οι νέες τεχνολογίες γίνονται γρήγορα αποδεκτές και σημειώνουν απορρόφηση, οι προσδοκίες των καταναλωτών αναφορικά με τα προϊόντα τροφίμων (κρέας) είναι σχετικά αμφίρροπες. Από τη μια επιζητούν προϊόντα διατροφής αναβαθμισμένης ποιότητας (οργανοληπτικά), εγγυημένης ασφάλειας, με αυξημένες λειτουργικές και θρεπτικές ιδιότητες, παραδοσιακά και με καλή συνολική εικόνα, αλλά ταυτόχρονα επιθυμούν ακόμη λιγότερη επεξεργασία, πρόσθετα ή τεχνολογικές παρεμβάσεις. Επιπλέον, αναμένουν παρατεταμένη διάρκεια ζωής και ευκολία στην παρασκευή και χρήση (Nychas et al., 2008). Για να ανταποκριθεί η ευρωπαϊκή βιομηχανία τροφίμων στις απαιτήσεις της αγοράς, των παραγωγών και των ρυθμιστικών αρχών, επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και την εφαρμογή συστημάτων διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας, που βασίζεται σε ενδεδειγμένη ανάλυση των κινδύνων και την πρόληψη μέσα από τον έλεγχο της παρακολούθησης και καταγραφής των κρίσιμων σημείων καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής των προϊόντων. Αυτά τα συστήματα περιλαμβάνουν την πρωτογενή παραγωγή και ιδανικά εκτείνονται ως το τραπέζι του καταναλωτή. Η Συστηματική Διαχείριση της Ασφάλειας των προϊόντων με βάση το κρέας μέσω του HACCP περιλαμβάνει την επιλογή των πρώτων υλών και τον έλεγχο των συνθηκών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και διανομής (Koutsoumanis et al., 2003; Sofos, 2005)

### **1.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την αλλοίωση του κρέατος**

Η αλλοίωση του κρέατος μπορεί να θεωρηθεί ως ένα οικολογικό φαινόμενο, το οποίο περιλαμβάνει τις αλλαγές στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά, λόγω της επικράτησης και του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στους μεταβολίτες των μικροοργανισμών και γίνονται αντιληπτές κυρίως μέσω των μεταβολών που παρατηρούνται στην οσμή, το χρώμα, τη γεύση, και γενικότερα στη συνολική εικόνα του τροφίμου. Η αλλοίωση δεν αποδίδεται σε όλους τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται πάνω στο κρέας, αλλά σε ένα συγκεκριμένο κάθε φορά μικροβιακό πληθυσμό, ο οποίος αναφέρεται και ως Εφήμεροι (Ειδικοί) Αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί (EAM) (Ephemeral/ specific Spoilage microorganisms, E-S-SO). Η επικράτηση των EAM δεν είναι προκαθορισμένη, αλλά εξαρτάται κάθε φορά από μία σειρά παραγόντων κατά τη



σφαγή, την επεξεργασία, μεταφορά και συντήρηση του κρέατος (Nychas et al., 2008). Οι μικροοργανισμοί που θα καταφέρουν τελικά να επικρατήσουν είναι αυτοί που διαθέτουν τέτοιες στρατηγικές, που τους επιτρέπουν να προσαρμοστούν καλύτερα στο μικροπεριβάλλον του τροφίμου. Η διαμόρφωση των διαφορετικών ομάδων μικροοργανισμών που δυνητικά θα διαδραματίσουν τον κύριο ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος εξαρτάται από: α) τις συνθήκες συντήρησης που θα εφαρμοστούν και β) τον μεταξύ τους ανταγωνισμό. Έχει αναφερθεί ότι ο καθορισμός της μικροβιακής διαδοχής, επηρεάζει σημαντικά τον τύπο της αλλοίωσης. Για παράδειγμα είναι πιθανές δύο διαφορετικές περιπτώσεις: i) όταν προαιρετικά αναερόβιοι ή αναερόβιοι, Gram-θετικοί μικροοργανισμοί, καθορίζουν τις αλλαγές στο οικοσύστημα (πχ. κρέας που συντηρείται κάτω από συνθήκες χαμηλής διαθεσιμότητας σε οξυγόνο, με ή χωρίς την παρουσία αντιμικροβιακών αερίων) και ii) όταν αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, κυριαρχούν στη μικροβιακή διαδοχή (πχ. κρέας που συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες) (Doulgeraki et al., 2012). Από τα παραπάνω γίνεται διακριτό το γεγονός ότι ο όρος EAM είναι διαφορετικός από τον όρο της μικροβιακής σύστασης (microbial association) του κρέατος. Η μικροβιακή σύσταση περιγράφει τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στο κρέας κατά τη στιγμή της αλλοίωσης. Ο πληθυσμός των EAM μπορεί αρχικά να βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, αποτελώντας ένα κομμάτι της ολικής μικροβιακής χλωρίδας, όμως λόγω ευνοϊκότερων συνθηκών, οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται με μεγαλύτερους ρυθμούς σε σχέση με την υπόλοιπη μικροχλωρίδα και καταφέρνουν τελικά να επικρατήσουν, παράγοντας τους μεταβολίτες που καθιστούν το προϊόν οργανοληπτικά απορριπτέο. Στο σημείο αυτό, το επίπεδο της ανάπτυξης των EAM μπορεί να χαρακτηριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως χημικός δείκτης αλλοίωσης (Chemical Spoilage Index, CSI) (Σχήμα 1) –( Huis, 1996).



**Σχήμα 1:** Γενική διαγραμματική απεικόνιση ανάπτυξης μικροοργανισμών κατά την αλλοίωση του κρέατος. Παρατηρείται η ανάπτυξη της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας σε σχέση με αυτή των EAM, και τις μεταβολές στους χημικούς δείκτες κατά τη διάρκεια συντήρησης (Dalgaard et al., 1993).

Είναι πλέον γνωστό και αποδεκτό ότι σε κάθε τρόφιμο, πέντε είναι τα είδη παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Πίνακας 2) (Nychas & Skandamis, 2005). Η τροποποίηση ή/ και ο έλεγχος ενός ή περισσότερων από τους παραπάνω παράγοντες οδηγεί σε διαφορετική επιλογή ή/ και εξέλιξη των μικροοργανισμών, χαρακτηριστικό που μπορεί να έχει εφαρμογή στη δημιουργία προϊόντων με μεγαλύτερο χρόνο ζωής (Nychas & Skandamis, 2005). Πρέπει να σημειωθεί πως κάθε παράγοντας επηρεάζει τη δράση των υπολοίπων, γι' αυτό και η συνολική συνδυαστική δράση παραγόντων εμφανίζεται να είναι γενικά πολύ ισχυρότερη από εκείνη που έχει ένας μεμονωμένος παράγοντας (συνεργιστική δράση) (Huis, 1996).

**Πίνακας 2:** Είδη παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. (Nychas and Skandamis, 2005)

---

Ενδογενείς (Intrinsic)	Δομή κρέατος: aw, pH, παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων, οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σύσταση θρεπτικών συστατικών (περιεκτικότητα υδρογονανθράκων και κυρίως γλυκόζης)
Παράγοντες κατά την επεξεργασία (Processing)	Μπορούν να επηρεάσουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα του τροφίμου
Εξωγενείς (Extrinsic)	Θερμοκρασία, σχετική υγρασία και σύσταση της ατμόσφαιρας κατά τη διανομή και συντήρηση
Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες (Implicit)	Αναφέρεται σε φαινόμενα όπως ο ανταγωνισμός και ο συνεργισμός μεταξύ βακτηρίων
Συνεργιστικοί παράγοντες (The emergent effects)	Παράγοντες που αλληλεπιδρούν, με αποτέλεσμα φαινόμενα εντονότερα απ' αυτά που θα υπήρχαν εάν οι παράγοντες δρούσαν ξεχωριστά

---

Από τους εξωγενείς παράγοντες, η θερμοκρασία θεωρείται ως ο πιο σημαντικός παράγοντας. Πολλές χώρες μάλιστα έχουν θεσπίσει κανονισμούς που αφορούν τα μέγιστα επιτρεπτά όρια θερμοκρασιών για συντήρηση υπό ψύξη. Ωστόσο στην πράξη τα όρια αυτά πολύ συχνά παραβιάζονται. Οι έρευνες έχουν δείξει ότι η άνοδος της θερμοκρασίας (>10°C) σε οποιοδήποτε στάδιο της ψυκτικής αλυσίδας, μπορεί να επιφέρει απροσδόκητη απώλεια της ποιότητας και μείωση του χρόνου ζωής του προϊόντος (Koutsoumanis et al., 2006).

### **1.1.3 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την αλλοίωση του κρέατος**

Τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες στο κρέας, θεωρούνται ψυχρότροφα και περιλαμβάνουν τα είδη: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria- LAB) και διαφορετικά γένη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (Doulgeraki et al., 2012). Στον πίνακα 3 αναφέρονται γένη βακτηρίων

που απομονώνονται συχνότερα σε ωμό κρέας που συντηρείται κάτω από διαφορετικές συνθήκες συντήρησης. Στο κρέας απαντώνται ακόμη, ζύμες και μύκητες (Huis, 1996).

**Πίνακας 3:** Γένη βακτηρίων που απαντώνται συνήθως στο ωμό κρέας που συντηρείται κάτω από διαφορετικές συνθήκες. (Casaburi et al., 2014)

Gram- θετικά	Συνθήκες συντήρησης			Gram-αρνητικά	Συνθήκες συντήρησης		
	Αέρας	MAP	κενό		Αέρας	MAP	κενό
<i>Bacillus</i>	+		+	<i>Achromobacter</i>	+		
<i>Brochothrix</i>	+	+	+	<i>Acinetobacter</i>	+	+	+
<i>Carnobacterium</i>	+	+	+	<i>Aeromonas</i>	+		+
<i>Corynebactenum</i>	+			<i>Alcaligenes</i>	+	+	+
<i>Clostridium</i>			+	<i>Alteromonas</i>	+	+	+
<i>Enterococcus</i>	+	+		<i>Campylobacter</i>	+		
<i>Kocuria</i>	+			<i>Chromobacterium</i>	+		
<i>Kurthia</i>	+			<i>Citrobacter</i>	+	+	
<i>Lactobacillus</i>	+	+	+	<i>Enterobacter</i>	+	+	
<i>Lactococcus</i>	+			<i>Escherichia</i>	+		
<i>Leuconostoc</i>	+	+	+	<i>Flavobacterium</i>	+		
<i>Listeria</i>	+	+		<i>Hafnia</i>	+	+	+
<i>Microbacterium</i>	+	+	+	<i>Klebsiella</i>	+		
<i>Micrococcus</i>	+	+		<i>Kluyvera</i>	+		
<i>Paenibacillus</i>	+			<i>Moraxella</i>	+		
<i>Staphylococcus</i>	+	+	+	<i>Pantoea</i>	+		+
<i>Streptococcus</i>	+	+		<i>Proteus</i>	+	+	
<i>Weissella</i>	+	+	+	<i>Providencia</i>	+	+	+
				<i>Pseudomonas</i>	+	+	+
				<i>Serratia</i>	+	+	+
				<i>Shewanella</i>	+		
				<i>Vibrio</i>	+		
				<i>Yersinia</i>	+		+
				<i>Moraxella</i>	+		

Η φυσιολογική κατάσταση του ζώου κατά τη σφαγή, οι πιθανές επιμολύνσεις που μπορεί να προκύψουν κατά τη σφαγή, την επεξεργασία, η θερμοκρασία και γενικότερα οι συνθήκες συντήρησης και διανομής, κατέχουν κυρίαρχο ρόλο σε ότι αφορά την ποιότητα τους κρέατος (Πίνακας 4- Nychas et al., 2008). Μάλιστα, στην πραγματικότητα, κάποιοι μικροοργανισμοί μπορεί να προέρχονται από το ίδιο το ζώο (εντερικός σωλήνας), ακόμα και από το περιβάλλον που βρισκόταν εκείνο πριν ή κατά τη διάρκεια της σφαγής (Koutsoumanis & Sofos, 2004).

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο § 1.1.2, η αλλοίωση προέρχεται από την ομάδα εκείνη των μικροοργανισμών, της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας του κρέατος, που θα καταφέρει να κυριαρχήσει (Nychas et al., 2007). Στο κρέας που συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες και σε εύρος θερμοκρασιών (-1 έως 25°C) , το γένος *Pseudomonas* spp., είναι η ομάδα των μικροοργανισμών που συνήθως κυριαρχεί και ευθύνεται για την αλλοίωση (Stanbridge & Davis, 1998, Koutsoumanis et al. , 2006). Οι ψευδομονάδες όπως και τα περισσότερα αρνητικά κατά Gram, ραβδόμορφα βακτήρια, αποτελούν συνήθως μικρό ποσοστό της αρχικής μικροχλωρίδας των φρέσκων τροφίμων. Ωστόσο, εξαπλώνονται με ευκολία στο περιβάλλον και έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν ευρύ φάσμα υλικών, ως υπόστρωμα για να αναπτυχθούν (Huis, 1996). Οι ψευδομονάδες, που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του κρέατος καταναλώνουν κατά προτίμηση γλυκόζη και όταν η διαθέσιμη γλυκόζη δεν επαρκεί για τους μεγάλους αριθμούς αλλοιογόνων βακτηρίων (>10<sup>6</sup> CFU/g), καταβολίζουν πρωτεΐνες και αμινοξέα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αμμωνίας, βιογενών αμινών, σουλφιδίων, εστέρων και κατ' επέκταση δυσσομίας (off- odors), βλέννας (slime) και δυσάρεστων οσμών (off- flavors) (Skandamis and Nychas 2002, Nychas et al. 2007).

Μια ακόμη ομάδα μικροοργανισμών που αποτελεί μέρος της μικροχλωρίδας κρέατος που συντηρείται αερόβια σε θερμοκρασίες ψύξης είναι τα ψυχρότροφα είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae (π.χ. *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*) (Nychas et al., 1998). Τα εντεροβακτήρια συμβάλλουν σπάνια στην αλλοίωση του κρέατος, ενώ κυρίως αποτελούν δείκτες υγιεινής του. Ωστόσο μπορεί να διαδραματίσουν ρόλο στην αλλοίωση εάν το οικοσύστημα του κρέατος ευνοεί την ανάπτυξη τους. Τα βακτήρια αυτά καταναλώνουν ως επί το πλείστον γλυκόζη και 6-φωσφορική γλυκόζη (glycose-6-phosphate). Επιπλέον, κάποια μέλη της οικογένειας παράγουν αμμωνία, πτητικές σουλφίδες, συμπεριλαμβανομένου του υδρόθειου (H<sub>2</sub>S)

και δύσοσμων αμινών, κατά τον μεταβολισμό των αμινοξέων (Nychas and Skandamis, 2005). Στο μοσχαρίσιο κιμά, οι κύριοι εκπρόσωποι της οικογένειας είναι οι: *Pantoea agglomerans*, *Escherichia coli* και *Serratia liquefaciens* (Nychas et al. 1998, Nychas et al. 2008, Doulgeraki et al. 2011, Anbalagan et al. 2014, Casaburi et al. 2014).

**Πίνακας 4:** Βακτήρια που απαντώνται σε κρέας και πουλερικά. X: είναι δυνατό να υπάρχει, XX: υπάρχει σε μεγάλη συχνότητα. (Nychas et al.,2007,2008)

<b>Μικροοργανισμοί</b>	<b>Αντίδραση Gram</b>	<b>Φρέσκο</b>	<b>Επεξεργασμένο</b>
<i>Achromobacter</i>	–	X	
<i>Acinetobacter</i>	–	XX	X
<i>Aeromonas</i>	–	XX	X
<i>Alcaligenes</i>	–	X	
<i>Alteromonas</i>	–	X	X
<i>Arthrobacter</i>	±	X	X
<i>Bacillus</i>	+	X	X
<i>Brochothrix</i>	+	X	X
<i>Campylobacter</i>	–	X	
<i>Carnobacterium</i>	+	X	
<i>Chromobacterium</i>	–	X	
<i>Citrobacter</i>	–	X	
<i>Clostridium</i>	+	X	
<i>Corynebactenum</i>	+	X	X
<i>Enterobacter</i>	–	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X
<i>Escherichia</i>	–	X	
<i>Flavobacterium</i>	–	X	
<i>Hafnia</i>	–	X	X
<i>Janthinobacterium</i>	–		X
<i>Klebsiella</i>	–	X	
<i>Kluyvera</i>	–	X	
<i>Kocuria</i>	+	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX

<i>Lactococcus</i>	+	X	
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X
<i>Listeria</i>	+	X	X
<i>Microbacterium</i>	+	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X
<i>Moraxella</i>	-	XX	
<i>Paenibacillus</i>	+	X	X
<i>Pantoea</i>	-	X	
<i>Proteus</i>	-	X	
<i>Providencia</i>	-	X	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX	X
<i>Shewanella</i>	-	X	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X
<i>Streptococcus</i>	+	X	X
<i>Vibrio</i>	-	X	
<i>Weissella</i>	+	X	X
<i>Yersinia</i>	-	X	

Το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta*, θετικό κατά Gram, αποτελεί ένα ακόμα μικροοργανισμό που σχετίζεται με την αλλοίωση του κρέατος που συντηρείται σε συνθήκες αερόβιες, κενού και τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Έχει αναφερθεί ότι συμβάλει στην ανάπτυξη έντονων δυσάρεστων οσμών (Stanbridge and Davies, 1998, Casaburi et al., 2014). Τόσο το βακτήριο *B. thermosphacta* όσο και τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανιχνεύονται στο κρέας που συντηρείται υπό ψύξη, ωστόσο δε θεωρούνται ότι συμβάλλουν σημαντικά στην αλλοίωση σε αερόβιες συνθήκες (Holzapfel, 1998). Αντίθετα, τα δύο αυτά είδη βακτηρίων θεωρούνται η κύρια, αν όχι η πιο σημαντική αιτία αλλοίωσης, που γίνεται αντιληπτή κυρίως υπό μορφή ξινίσματος (souring) και όχι τόσο σήψης (putrefaction) σε κρέας που συσκευάζεται σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες ή/ και υπό κενό (Nychas et al., 2008). Στα μεταβολικά προϊόντα των οξυγαλακτικών βακτηρίων συμπεριλαμβάνονται τα οξέα: L, D-γαλακτικό, οξικό, μυρμηγκικό και η ακετοΐνη, το διακετύλιο, το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, η αιθανόλη, τα λιπαρά οξέα και το υδρόθειο.

Ανάλογα με τις συνθήκες συντήρησης του τροφίμου υπάρχουν δύο είδη αλλοίωσης. Ο πρώτος οφείλεται στον ανταγωνισμό των Gram<sup>-</sup> βακτηρίων (και κυρίως των ψευδομονάδων), οι οποίοι προκαλούν σήψη του κρέατος (putrefaction), ενώ ο δεύτερος αποδίδεται στον ανταγωνισμό των Gram<sup>+</sup> βακτηρίων, τα οποία προκαλούν οξίνιση (souring) (Nychas and Skandamis, 2005). Η μεταβολική δραστηριότητα των ΕΑΜ που επικρατούν στο οικοσύστημα του κρέατος υπό ορισμένες αερόβιες συνθήκες, ή που παρουσιάζονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, οδηγεί τελικά σε μεγάλες αλλαγές ή στην αλλοίωση του τροφίμου. Οι αλλαγές αυτές μπορεί να σχετίζονται με α) τον τύπο, τη σύνθεση και τον πληθυσμό των μικροοργανισμών και β) τον τύπο και τη διαθεσιμότητα των ενεργειακών υποστρωμάτων στο κρέας. Ο τύπος και η έκταση της αλλοίωσης εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των ενεργειακών υποστρωμάτων χαμηλού μοριακού βάρους (π.χ. γλυκόζη, γαλακτικό οξύ) (Nychas & Skandamis 2005, Nychas et al., 1998).

## **1.2 Συντήρηση φρέσκου κρέατος**

Το ενδιαφέρον της βιομηχανίας κρέατος, με το πέρασμα των χρόνων, στρέφεται όλο και περισσότερο στην ανάπτυξη τεχνολογιών που θα επεκτείνουν το χρόνο ζωής, και θα βελτιώσουν την αποδοχή των καταναλωτών απέναντι στα προϊόντα ζωικής προέλευσης. Ταυτόχρονα, επιζητείται η διατήρηση υψηλής διατροφικής ποιότητας και η διασφάλιση της ασφάλειας των προϊόντων (Chiavaro et al., 2008).

Ως συντήρηση ορίζεται η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση μιας υπάρχουσας κατάστασης ή για την αποτροπή πιθανής αλλοίωσης που μπορεί να επέλθει από χημικούς, φυσικούς ή βιολογικούς παράγοντες. Η συντήρηση των τροφίμων κατέστησε δυνατή τη διαθεσιμότητα τροφίμων από τη συγκομιδή και τη σφαγή για ένα χρονικό διάστημα έως την κατανάλωση, ανάγκη που αναδύθηκε κυρίως από τη γρήγορη ανάπτυξη των υπεραγορών και τις απαραίτητες μεταφορές των προϊόντων σε μεγάλες αποστάσεις. Συνεπώς, ο κύριος στόχος της συντήρησης είναι να καθυστερεί την αλλοίωση των τροφίμων και κατ' επέκταση να αποτρέπει οποιαδήποτε αλλαγή στη γεύση, την υφή, το χρώμα, την οσμή και τη θρεπτική τους αξία (Gould 1996, Davidson 1997, Nychas et al., 2008).



Οι διάφορες μέθοδοι συντήρησης που εφαρμόζονται στοχεύουν: α) στην αναστολή της μικροβιακής αλλοίωσης και β) στην ελαχιστοποίηση της οξείδωσης και της ενζυματικής αλλοίωσης. Οι πιο «παραδοσιακές» μέθοδοι συντήρησης κρέατος, όπως η ξήρανση, το κάπνισμα, το αλάτισμα, η ζύμωση, η ψύξη και η κονσερβοποίηση, έχουν αντικατασταθεί από νεότερες μεθόδους, όπως προσθήκη συντηρητικών, βιοσυντηρητικά και μη θερμικές τεχνικές (Zhou et al., 2010). Οι τρέχουσες μέθοδοι συντήρησης που αφορούν το κρέας, μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τρεις ευρύτερες κατηγορίες μεθόδων με βάση α) τον έλεγχο της θερμοκρασίας, β) τον έλεγχο της ενεργότητας νερού και πιο άμεσα με βάση γ) τις ανασταλτικές διεργασίες (βακτηριοκτόνες και βακτηριοστατικές, όπως η ιονίζουσα ακτινοβολία, η συσκευασία κα). Παρόλα αυτά, μια συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να περιλαμβάνει αρκετές αντιμικροβιακές αρχές (Zhou et al., 2010). Κάθε βήμα ελέγχου μπορεί να θεωρείται μεμονωμένα ως «εμπόδιο» έναντι του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών, ενώ επινοούνται και συνδυασμοί μεθόδων (Τεχνολογία των εμποδίων- Hurdle Technology), ώστε να επιτευχθούν συγκεκριμένοι στόχοι τόσο στα μικροβιακά όσο και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Lawrie & Ledward, 2006).

Από τις πιο πρόσφατες τεχνολογίες συντήρησης για το φρέσκο κρέας, αυτές που έχουν διερευνηθεί περισσότερο είναι τεχνολογίες μη θερμικής αδρανοποίησης (π.χ. υψηλή υδροστατική πίεση- high hydrostatic pressure), νέα συστήματα συσκευασίας όπως η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) και η ενεργός συσκευασία (AP), οι φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες και βιοσυντήρηση. Όλες αυτές οι εναλλακτικές τεχνολογίες, ανταποκρινόμενες στις αυξημένες απαιτήσεις των καταναλωτών, επιδιώκουν να είναι ήπιες, φιλικές προς το περιβάλλον, ενεργειακά μη κοστοβόρες και να εγγυώνται μια φυσική εμφάνιση του τροφίμου, διατηρώντας σε χαμηλά επίπεδα τους παθογόνους και αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (Zhou et al., 2010).

Οι κυριότερες τεχνικές συντήρησης που εφαρμόζονται εδώ και πολλές δεκαετίες παρουσιάζονται στον πίνακα 5, με τέτοιο τρόπο ώστε να τονιστεί το γεγονός, ότι οι περισσότερες από αυτές δρουν κυρίως επιβραδυντικά, και σε κάποιες περιπτώσεις ανασταλτικά ως προς την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι νεότερες τεχνικές, ακολουθώντας τις ανάγκες των καταναλωτών, χρησιμοποιούν πιο φυσικές μεθόδους οι οποίες περισσότερο στοχεύουν να απενεργοποιήσουν τους μικροοργανισμούς παρά από το να τους αναστείλουν (Gould 1996, 2000).

**Πίνακας 5:** Κατηγοριοποίηση διεργασιών που χρησιμοποιούνται στη συντήρηση τροφίμων. (Russell and Gould, 2003)

<b>Διεργασία</b>	<b>Παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη ή την επιβίωση</b>
Ψύξη, διανομή υπό ψύξη και αποθήκευση	Χαμηλή θερμοκρασία για την επιβράδυνση της ανάπτυξης
Κατάψυξη, διανομή υπό κατάψυξη και αποθήκευση	Χαμηλή θερμοκρασία και μείωση της ενεργότητας νερού για να προληφθεί η ανάπτυξη
Ξήρανση, αλάτισμα και conserving	Ελάττωση της ενεργότητας νερού, ικανή να καθυστερήσει ή να προλάβει την ανάπτυξη
Συσκευασία κενού και ελεύθερη οξυγόνοι	Χαμηλή περιεκτικότητα οξυγόνου για την αναστολή των αυστηρά αερόβιων και καθυστέρηση της ανάπτυξης των προαιρετικά αναερόβιων μο.
Συσκευασία τροποποιημένης Ατμόσφαιρας (MAP)	Διοξείδιο του άνθρακα σε συνδυασμό με άλλα αέρια για την αναστολή περαιτέρω ανάπτυξης
Προσθήκη οξέων	Μείωση της τιμής του pH και μερικές φορές επιπλέον αναστολή από το συγκεκριμένο οξύ που προστίθεται
Γαλακτική και οξική ζύμωση	Μείωση της τιμής του pH in situ από τη μικροβιακή δράση και μερικές φορές επιπλέον αναστολή από το γαλακτικό και οξικό οξύ που σχηματίζεται και από άλλα προϊόντα μικροβιακής ανάπτυξης
Αλκοολική ζύμωση	Αύξηση της συγκέντρωσης της αιθανόλης
Γαλακτωματοποίηση	Διαμερισματοποίηση και ο περιορισμός θρεπτικών εντός των υδατικών σταγονιδίων σε γαλάκτωμα water- in- oil
Προσθήκη συντηρητικών	Αναστολή συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών
Παστερίωση και αποστείρωση	Παροχή επαρκούς θερμότητας για την αδρανοποίηση μικροοργανισμών στόχων στον επιθυμητό βαθμό
Διεργασίες με ακτινοβολία (Radurization, radicidation και radappertization)	Παροχή ιονίζουσας ακτινοβολίας σε επαρκή δόση αδρανοποίηση μ/ών στόχων στον επιθυμητό βαθμό
Ασηπτικές διεργασίες	Συσκευασία αποστειρωμένων τροφίμων χωρίς επιμόλυνση
Απολύμανση	Χειρισμοί με θερμότητα, ακτινοβολία ή χημικές ουσίες επί των υλικών συσκευασίας και των συστατικών τροφίμων για τη μείωση της μικροβιακής επιμόλυνσης

### 1.2.1 Συντήρηση με μεθόδους χαμηλής θερμοκρασίας

Όπως προαναφέρθηκε η θερμοκρασία φαίνεται να είναι ο πιο καθοριστικός παράγοντας που επηρεάζει τόσο την αλλοίωση, όσο και την ασφάλεια του κρέατος (Koutsoumanis & Taoukis, 2005). Η μαζική κατανάλωση νωπού κρέατος και προϊόντων με βάση το κρέας, καθώς και τα νέα πρότυπα του καταναλωτή με διαφορετικές πλέον συνήθειες (π.χ. μικρός χρόνος ψησίματος του κρέατος, μαγείρεμα σε φούρνο μικροκυμάτων), έχουν καταστήσει απαραίτητη την ανάγκη για συνεχή και συστηματικό έλεγχο του χειρισμού της θερμοκρασίας, καθ' όλα τα στάδια διανομής των προϊόντων αυτών στην ψυκτική αλυσίδα, από το σημείο παραγωγής έως την τελική τους κατανάλωση. Πρόσφατα έχουν διεξαχθεί διάφορες μελέτες που επικεντρώνονται στην εκτίμηση της σημασίας που έχει η χαμηλή θερμοκρασία κατά τον χειρισμό προϊόντων κρέατος αναφορικά με την ποιότητα αυτών, εστιάζοντας στην επίδραση που μπορεί να έχουν οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας ή η παραβίαση των ορίων κατά τους χειρισμούς (Koutsoumanis and Taoukis, 2005, McMeekin et al., 2006).

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η αποτελεσματική παρακολούθηση χρόνου/ συνθηκών θερμοκρασίας, είναι μια σημαντική πτυχή στη διανομή και την κατανάλωση φρέσκου κρέατος, που επηρεάζει τόσο την ασφάλεια όσο και την συνολική ποιότητα του κρέατος. Η ευρωπαϊκή βιομηχανία, οι έμποροι, οι αρχές τροφίμων, ακόμη και οι καταναλωτές, έχουν αναγνωρίσει ότι τα διάφορα στάδια της πραγματικής ψυκτικής αλυσίδας, όπως οι μονάδες μεταφοράς ή οι αποθήκες, είναι ο πιο αδύναμος κρίκος στη διαχείριση ευπαθών τροφίμων που διατηρούνται με απλή ψύξη. Προϊόντα κρέατος μπορούν να χαλάσουν σε σχετικά σύντομο διάστημα, εκτός και αν συσκευασθούν, μεταφερθούν και αποθηκευθούν κατάλληλα (Nychas et al., 2008).

Οι τεχνικές με εφαρμογή ψύξης, έχουν ως βασικό στόχο την επιβράδυνση ή τον περιορισμό του ρυθμού αλλοίωσης. Είναι γνωστό ότι όταν η θερμοκρασία βρίσκεται κάτω ένα βέλτιστο εύρος, καθίσταται δυνατή η αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης (Cassens, 1994). Οι μέθοδοι συντήρησης με χαμηλή θερμοκρασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρία επίπεδα: α) Ψύξη (chilling), β) Κατάψυξη (freezing) και γ) Υπερψύξη (superchilling). Και τα τρία αυτά επίπεδα βοηθούν στην αναστολή ή στην εξολοκλήρου διακοπή της βακτηριακής ανάπτυξης (Zhou et al., 2010). Ωστόσο, η

ανάπτυξη ψυχρόφιλων ομάδων βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων δεν προλαμβάνεται από όλα τα επίπεδα ψύξης με συνέπεια οι ενζυματικές και μη ενζυματικές αλλαγές να συνεχίζουν με αρκετά βραδύτερο ρυθμό (Berkel et al. 2004).

### **1.2.1.1 Διατήρηση σε ψύξη (Cool Storage)**

Από τους πρώτους κιόλας πολιτισμούς είχε αναγνωριστεί η ευεργετική επίδραση που είχε στη συντήρηση ευαλλοίωτων προϊόντων όπως το κρέας, η διατήρηση τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Το γεγονός αυτό, είχε οδηγήσει στην αποθήκευση τέτοιων προϊόντων σε φυσικά σπήλαια όπου η θερμοκρασία κυμαινόταν σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Η αρχή του σχηματισμού τεχνητού πάγου και της μηχανικής ψύξης χρονολογείται περίπου το 1750 (Lawrie & Ledward, 2006).

Η αποθήκευση των τροφίμων σε θερμοκρασίες από περίπου 15°C μέχρι -2°C, είναι γνωστή ως κοινή ψύξη ή αποθήκευση στο ψυγείο. Η ψύξη χρησιμοποιείται ευρέως γιατί είναι αποτελεσματική για βραχυχρόνια συντήρηση επιβραδύνοντας τα παρακάτω φαινόμενα:

1. Ανάπτυξη μικροοργανισμών
2. Μεταβολικές δραστηριότητες, μετά τη συλλογή των ακέραιων φυτικών ιστών, και μεταβολικών δραστηριοτήτων των ζωικών ιστών μετά τη σφαγή
3. Χημικές αντιδράσεις υποβίβασης, συμπεριλαμβανομένων της ενζυματικής οξειδωτικής αμαύρωσης, της οξείδωσης των λιπών και των χημικών αλλαγών που σχετίζονται με την υποβάθμιση του χρώματος, την αυτολυσία των ψαριών και την απώλεια θρεπτικής αξίας των τροφίμων γενικά.
4. Απώλεια υγρασίας

Ανάλογα με την εγγενή ικανότητα αποθήκευσης των ωμών τροφίμων, η διάρκεια αποθήκευσης στο ψυγείο μπορεί να ποικίλει από μερικές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες. Πράγματι η συντήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες καθυστερεί τη μικροβιακή ανάπτυξη και παρατείνει το χρόνο ζωής. Η έκταση στην οποία ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας διαφέρει ανάλογα με τον τύπο και το είδος των μικροοργανισμών. Οι συνήθεις θερμοκρασίες ψύξης επιτρέπουν την ανάπτυξη των ψυχρόφιλων και ψυχρότροφων μικροοργανισμών. Εάν ο αρχικός πληθυσμός τους είναι

μεγάλος, τα υπό ψύξη τρόφιμα μπορεί να χαλάσουν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Ψυχρότροφα παθογόνα όπως η *Listeria monocytogenes* και *Aeromonas hydrophila*, είναι πολύ σημαντικά, ιδιαίτερα για τρόφιμα “ελάχιστα επεξεργασμένα- έτοιμα προς βρώση” που διατηρούνται για μεγάλο διάστημα στο ψυγείο. Ακόμη, δεδομένου ότι διαφέρουν οι απαιτήσεις των διαφόρων μικροοργανισμών σε θερμοκρασία, η ψύξη μπορεί να αλλάξει σημαντικά την ποιοτική σύνθεση της μικροχλωρίδας (Farkas, 1997), (Ρόδης, 1995). Για ευαλλοιώτα τρόφιμα όπως το κρέας, το ψάρι, τα γαλακτοκομικά κα. η διατήρηση υπό ψύξη πρέπει να γίνεται σε ένα εύρος από  $-1^{\circ}\text{C}$  μέχρι το πολύ  $+7^{\circ}\text{C}$ . Τα όρια θερμοκρασιών σχετίζονται με τη χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία οι παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να αναπτυχθούν. Ενδεικτικά παρουσιάζονται στον πίνακα 6 οι χαμηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης για μερικούς μικροοργανισμούς.

**Πίνακας 6:** Όρια χαμηλών θερμοκρασιών για ορισμένους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Μικροοργανισμός	Θερμοκρασία ( °C )
<i>Salmonella spp.</i>	5
<i>Listeria monocytogenes</i>	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-1
<i>Clostridium botulinum</i> , type A & B	10
<i>Clostridium botulinum</i> , type E	3.3

Για πολλά τρόφιμα η ψύξη μπορεί να είναι η μόνη μέθοδος συντήρησης, και η διάρκεια ζωής τους να αυξάνεται χαμηλώνοντας τη θερμοκρασία διατήρησης. Ωστόσο ο συνδυασμός της με άλλους παράγοντες όπως π.χ. η συσκευασία μπορεί να επιφέρει πολύ καλύτερα αποτελέσματα.

### 1.3 Συσκευασία

Η συσκευασία προστατεύει τα τρόφιμα από αποτελέσματα υποβάθμισης, τα οποία μπορεί να περιλαμβάνουν αποχρωματισμό, ανάπτυξη άσχημης γεύσης και δυσάρεστων οσμών, απώλεια θρεπτικών συστατικών, μεταβολές της υφής, παθογένεια και άλλους μετρήσιμους παράγοντες. Συγκεκριμένα η συσκευασία του φρέσκου κρέατος χρησιμοποιείται για την αποφυγή επιμόλυνσης και την καθυστέρηση της αλλοίωσης, ενώ

επιτρέπει σε κάποιο βαθμό την ενζυματική δραστηριότητα για τη βελτίωση της τρυφερότητας. Συμβάλλει ακόμα στη μείωση της απώλειας βάρους και όπου είναι δυνατό βοηθάει στη διατήρηση του χρώματος στο κόκκινο κρέας, στα επίπεδα που απαιτεί η αγορά και οι καταναλωτές. Οι μεταβλητές που μπορούν να επηρεάσουν το χρόνο ζωής του φρέσκου συσκευασμένου κρέατος είναι ο τύπος του προϊόντος, το μείγμα των αερίων, η συσκευασία και ο υπερκείμενος χώρος, ο εξοπλισμός της συσκευασίας, η θερμοκρασία αποθήκευσης και τα πρόσθετα (Zhou et al., 2010).

Σήμερα υπάρχουν πολλά συστήματα συσκευασίας κρέατος κάθε ένα από τα οποία έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές. Ωστόσο, οι απαιτήσεις των καταναλωτών για ελάχιστα επεξεργασμένα τρόφιμα αυξάνονται συνεχώς, γεγονός που καθιστά την τεχνολογία συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας/συσκευασία κενού όλο και πιο ελκυστικές (Paramithiotis et al. 2009). Οι συσκευασίες τύπου περιτυλίγματος χρησιμοποιούνται για βραχυπρόθεσμη διατήρηση σε ψύξη, ενώ υπάρχει ποικιλία συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP) που εξασφαλίζουν συντήρηση σε ψύξη μεγαλύτερης διάρκειας. Μία εκδοχή της MAP είναι και τα συστήματα που αποτελούνται 100% από διοξείδιο του άνθρακα, για συντήρηση μακράς διάρκειας σε ψύξη. Ωστόσο, λόγω της ποικιλομορφίας των χαρακτηριστικών των προϊόντων, των απαιτήσεων της βασικής συσκευασίας κρέατος και των εφαρμογών της, κάθε νέα τεχνολογία που προσφέρει καλύτερο έλεγχο του προϊόντος και της ποιότητας αυτού με οικονομικό και διαφορετικό τρόπο είναι ευπρόσδεκτες. Πρόσφατα υπάρχουν δύο τέτοιες προσεγγίσεις και μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, οι τεχνολογίες της ενεργούς συσκευασίας και της έξυπνης συσκευασίας (Kerry et al., 2006).

### **1.3.1 Συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες**

Η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Modified atmosphere packaging-MAP) έχει αναγνωριστεί ως μια από τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους επέκτασης του χρόνου ζωής τροφίμων (φρέσκα φρούτα και λαχανικά, νωπό κρέας, γαλακτοκομικά, προϊόντα αρτοποιίας κ) και σημειώνει συνεχώς ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Καταλαμβάνει σημαντικό ρόλο και στην περίπτωση συσκευασίας φρέσκου κρέατος όπου χρησιμοποιείται ευρέως από τη βιομηχανία, για να επιβραδύνει την αλλοίωση του κιμά και άλλων προϊόντων (Koutsoumanis et al., 2008). Η τεχνολογία αυτή απαιτεί το φραγμό

της υγρασίας και της διαπερατότητας των αερίων διαμέσου των υλικών, ώστε να διατηρείται ένα σταθερό περιβάλλον εντός της συσκευασίας κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Σε όλους τους τύπους MAP που υπάρχουν είναι απαραίτητη η απομάκρυνση ή η αλλαγή της συνήθους σύστασης του ατμοσφαιρικού αέρα. Τα κύρια αέρια που απαρτίζουν τη σύσταση του ξηρού αέρα είναι: το άζωτο- $N_2$  (78 % v/v) , το οξυγόνο-  $O_2$  ( 20,99 % v/v ) , το αργό-  $Ar$  ( 0,94 % v/v ) και το διοξείδιο του άνθρακα-  $CO_2$  ( 0,03 % v/v ) , ωστόσο τα ποσοστά διαφέρουν όταν υπολογίζονται κατά βάρος (McMillin, 2008). Επομένως η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας μπορεί να οριστεί ως η απομάκρυνση και/ή η αντικατάσταση της ατμόσφαιρας που περιβάλλει το τρόφιμο, πριν το σφράγισμα της συσκευασίας.

Η συντήρηση σε MAP συνήθως συνεισφέρει και στη βελτίωση της εμφάνισης του προϊόντος. Η αποτελεσματικότητα της, στην επέκταση του χρόνου ζωής συσκευασμένου κρέατος, έγκειται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες του  $CO_2$  που βρίσκεται εντός της συσκευασίας. Η παρουσία του  $CO_2$  στον υπερκείμενο χώρο αναστέλλει την μικροβιακή ανάπτυξη και προκαλεί μεταβολές στην κυρίαρχη μικροχλωρίδα, δίνοντας προβάδισμα σε βακτηριακές ομάδες με μικρότερο δυναμικό αλλοίωσης. (McMillin 2008). Η διατήρηση του χρώματος είναι επίσης πολύ σημαντική, καθώς είναι το πρώτο ποιοτικό χαρακτηριστικό που αξιολογούν οι καταναλωτές στο κρέας και επηρεάζει την απόφαση αγοράς (Kenedy et al., 2004). Η χρήση της MAP βοηθάει στη διατήρηση το χρώματος και σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί και να το βελτιώσει (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012). Τα ευεργετικά αποτελέσματα που προκαλούνται από τη MAP μπορεί να επικαλυφθούν, αν τα προϊόντα αποθηκευτούν σε ακατάλληλες θερμοκρασιακές συνθήκες. Όταν ένα προϊόν αποθηκεύεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες από ότι ορίζουν οι προδιαγραφές του, λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις, επιταχύνεται η μικροβιακή ανάπτυξη και αλλάζει η ατμόσφαιρα στο εσωτερικό της συσκευασίας με αποτέλεσμα να προωθείται η αλλοίωση (Limbo et al., 2010). Στον πίνακα 7 που ακολουθεί, αναφέρονται οι μεθοδολογίες/ τεχνικές συσκευασίας που χρησιμοποιούνται και δίνονται οι ορισμοί τους.

**Πίνακας 7:** Τεχνικές συσκευασίας σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (McMillin, 2008).

Συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (modified atmosphere packaging)	Υποκατάσταση του αέρα, με ένα αέριο ή μείγμα αερίων. Μόλις το αέριο γεμίσει τη συσκευασία, δεν εφαρμόζεται καμία άλλη τροποποίηση στη σύνθεση του αερίου. Οι αλλαγές στη σύνθεση του αερίου εξαρτώνται από το ρυθμό αναπνοής του τροφίμου και τη διαπερατότητα της μεμβράνης
Διατήρηση σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (Controlled atmosphere storage)	Το είδος του αερίου που χρησιμοποιείται καθώς και η σύνθεση του μείγματος αερίων ελέγχεται συνεχώς κατά την αποθήκευση.
Συσκευασία σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (Controlled atmosphere packaging)	
Συσκευασία εξισορρόπησης τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Equilibrium modified atmosphere packaging)	Η συσκευασία γεμίζεται με αέριο χωρίς περαιτέρω τροποποίηση. Η διαπερατότητα του υλικού συσκευασίας και του ρυθμού αναπνοής του τροφίμου μέσα στη συσκευασία οδηγεί σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ισορροπίας.
Συσκευασία σε κενό (Vacuum packaging)	Η συσκευασία εκκενώνεται από αέρα και το προϊόν κλείνεται σε συσκευασία χαμηλής διαπερατότητας.
Συσκευασία υψηλού κενού (Vacuum skin packaging)	Το κενό εφαρμόζεται μετά την τοποθέτηση ενός μαλακωμένου φιλμ πάνω από το προϊόν
Ενεργή συσκευασία (Active packaging)	Συγκεκριμένες ενώσεις ενσωματώνονται στη συσκευασία για να διατηρήσουν την ποιότητα των προϊόντων ή να επεκτείνουν το χρόνο ζωής
Έξυπνη συσκευασία (Intelligent or smart packaging)	Παρακολουθεί τις ιδιότητες των τροφίμων ή το περιβάλλον της συσκευασίας και μεταδίδει αυτή την πληροφορία στον μεταποιητή, τον έμπορο ή / και τον καταναλωτή

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο § 1.1.3, οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν στις διαφορετικές ατμόσφαιρες συσκευασίας, ανήκουν σε δύο διαφορετικές ομάδες αλλοιογόνων μικροοργανισμών (πίνακας 8). Σε κρέας που συσκευάζεται σε κενό και τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε θερμοκρασία ψύξης, επικρατούν Gram θετικά βακτήρια (κυρίως *B.thermosphacta* και οξυγαλακτικά βακτήρια) ενώ σε αερόβιες συσκευασίες κυριαρχούν αρνητικά κατά Gram βακτήρια.



**Πίνακας 8:** Μικροοργανισμοί που κυριαρχούν σε φρέσκο κιμά που συντηρείται σε θερμοκρασία 0-4°C, και συσκευάζεται σε διαφορετικές ατμόσφαιρες αερίων (Nychas et al., 2008).

Σύνθεση αερίων	Κρέας και πουλερικά
Αέρας	<i>Pseudomonas</i> spp.
>50% CO <sub>2</sub> with O <sub>2</sub>	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
50% CO <sub>2</sub>	<i>Enterobacteriaceae</i> , οξυγαλακτικά βακτήρια
<50% CO <sub>2</sub> with O <sub>2</sub>	<i>B. thermosphacta</i> , οξυγαλακτικά βακτήρια
100% CO <sub>2</sub>	οξυγαλακτικά βακτήρια

### 1.3.1.1 Αέρια που χρησιμοποιούνται στη συσκευασία με τροποποιημένη ατμόσφαιρα

Στη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα αέρια, καθένα από τα οποία διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο στη συντήρηση των τροφίμων. Τα τρία βασικά αέρια που χρησιμοποιούνται είναι το οξυγόνο, το άζωτο και το διοξείδιο του άνθρακα. Η επιλογή του αερίου εξαρτάται άμεσα από τον τύπο του προϊόντος που συσκευάζεται. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα είτε συνδυαστικά, για την επέκταση του χρόνου ζωής, διατηρώντας τις βέλτιστες οργανοληπτικές ιδιότητες του τροφίμου. Τα αέρια αυτά συνήθως συνδυάζονται με τους παρακάτω τρόπους: α) πλήρωση του χώρου συσκευασίας με χρήση N<sub>2</sub>, β) πλήρωση με συνδυασμό CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> ή O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> ή γ) πλήρωση του κενού με χρήση CO<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (Arvanitoyannis & Stratakos, 2012). Ευγενή ή αδρανή αέρια όπως το αργόν χρησιμοποιούνται σε εμπορική κλίμακα κυρίως σε προϊόντα όπως ο καφές και τα σνακ. Ωστόσο η βιβλιογραφία σχετικά με την εφαρμογή τους και τα οφέλη τους είναι περιορισμένη. Άλλα αέρια που έχουν αναφερθεί είναι το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και το διοξείδιο του θείου (SO<sub>2</sub>), η χρήση τους κυρίως όμως περιορίζεται σε ερευνητικό επίπεδο λόγω περιοριστικών παραγόντων που προκύπτουν σχετικά με την ασφάλεια και το κόστος (Sandhya, 2010). Στα συστήματα συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας για φρέσκο κόκκινο κρέας, έχει επικρατήσει η σύσταση αερίων: 20–30% CO<sub>2</sub> + 70–80% O<sub>2</sub>

(Esmer et al. 2011, Kim et al. 2010), επειδή το O<sub>2</sub> διατηρεί το λαμπερό κόκκινο χρώμα και το CO<sub>2</sub> συνεισφέρει στην πρόληψη της μικροβιακής ανάπτυξης (Stubbs et al., 2002).

### Διοξείδιο του άνθρακα

Το διοξείδιο του άνθρακα θεωρείται το πιο σημαντικό αέριο που χρησιμοποιείται στις τροποποιημένες ατμόσφαιρες, λόγω των αντιμικροβιακών του χαρακτηριστικών. Τα αποτελέσματα της δράσης του είναι πιο έντονα, κυρίως έναντι των αρνητικών κατά Gram αερόβιων μικροβίων, όπως οι ψευδομονάδες. Η επίδραση του εξαρτάται από τη συγκέντρωση του, το αρχικό μικροβιακό φορτίο, τη θερμοκρασία αποθήκευσης και τον τύπο του τροφίμου. Πρόκειται για άχρωμο αέριο, που διαλύεται εύκολα στο νερό και επιφέρει σημαντική μείωση στο pH του τροφίμου, μέσω της διάστασης του ανθρακικού οξέος. Έχει προταθεί ότι η κύρια αντιμικροβιακή δράση του CO<sub>2</sub> προέρχεται από την ικανότητά του να αποκτά πρόσβαση στις βακτηριακές μεμβράνες και να μεταβάλλει το εσωτερικό pH των κυττάρων, αλλάζοντας έτσι τις κυτταρικές μεταβολικές διεργασίες. Παρότι οι υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> μπορεί να είναι ευεργετικές για την αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών, σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας κρέατος, μπορεί να αποτελέσει αιτία εμφάνισης σκούρου χρωματισμού στο προϊόν. Αντιθέτως σε κρέας πουλερικών όπου η μεταβολή του χρώματος δεν είναι τόσο εμφανής σε σχέση με το κόκκινο κρέας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Sandhya 2010, Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

### Οξυγόνο

Το οξυγόνο παίζει σημαντικό ρόλο στη συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα κόκκινου κρέατος κυρίως λόγω της ικανότητας του να διατηρεί το ελκυστικό κόκκινο χρώμα στο κρέας για παρατεταμένη χρονική περίοδο. Πρόκειται για άχρωμο, άοσμο αέριο, με χαμηλή διαλυτότητα σε νερό. Από μικροβιολογικής άποψης, το οξυγόνο ενισχύει την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών και μπορεί να περιορίσει την ανάπτυξη των αυστηρά αναερόβιων. Ωστόσο οι υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου στην ατμόσφαιρα συσκευασίας, έχουν συνδεθεί με διάφορες αντιδράσεις ποιοτικής και θρεπτικής υποβάθμισης στα τρόφιμα, όπως τάγγιση και οξείδωση λιπών και ελαίων σε κρέατα, ψάρια, προϊόντα αρτοποιίας, ενζυμική αμαύρωση και ταχεία ωρίμανση των φρούτων και λαχανικών, οξείδωση βιταμινών και χρωστικών (Lund et al., 2007). Ως εκ

τούτου λόγω των αρνητικών επιπτώσεων που προκύπτουν, η ατμόσφαιρα συσκευασίας πρέπει να περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου για να παραταθεί ο χρόνος ζωής σε πολλά τρόφιμα. Ωστόσο η παρουσία του είναι απαραίτητη σε άλλες περιπτώσεις, όπως το κόκκινο κρέας όπου είναι απαραίτητο για τη διατήρηση του χρώματος όπως προαναφέρθηκε και τα νωπά φρούτα και λαχανικά, προκειμένου να διατηρήσουν τις βασικές διαδικασίες αερόβιας αναπνοής (Floros and Matsos 2005, Nychas and Skandamis 2005).

### Άζωτο

Το άζωτο είναι ένα σχετικά αδρανές αέριο, άοσμο, χωρίς γεύση και χρώμα. Παρουσιάζει ελάχιστη επίδραση στις μεταβολικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στο κρέας, λόγω της χαμηλής διαλυτότητας σε νερό και άλλα συστατικά των τροφίμων (πχ λίπος) (Church, 1994). Χρησιμοποιείται ως αέριο συμπλήρωσης σε προϊόντα κρέατος που συσκευάζονται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, επειδή οι συσκευασίες με υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> έχουν την τάση να καταρρέουν λόγω της υψηλής διαλυτότητας του τελευταίου. Ακόμα χρησιμοποιείται για να αντικαταστήσει το O<sub>2</sub>, ώστε να επιβραδυνθεί η οξειδωτική τάγγιση και η ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών. Το άζωτο δεν υποστηρίζει την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών και ως εκ τούτου αναστέλλει την αερόβια αλλοίωση. Ωστόσο δεν εμποδίζει την ανάπτυξη αναερόβιων βακτηρίων (Sandhya, 2010, Arvanitoyannis & Stratakos, 2012).

### 1.3.2 Ενεργός Συσσκευασία

Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν αναπτυχθεί σπουδαίες τεχνολογίες στον τομέα της συσκευασίας τροφίμων, οι οποίες ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις των καταναλωτών για συντήρηση των τροφίμων με πιο φυσικές μεθόδους (Singh et al., 2011). Η ενεργός συσκευασία (active packaging- AP) είναι αδιαμφισβήτητα η τεχνολογία που έχει συγκεντρώσει μεγαλύτερο ενδιαφέρον και μπορεί να οριστεί ως το σύνολο από συστήματα- τεχνικές που δρουν συμπληρωματικά προς την κύρια συσκευασία ενός τροφίμου και έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν με το υλικό, τον υπερκείμενο χώρο στο εσωτερικό του περιέκτη (headspace) ή με το ίδιο το τρόφιμο, κατά τρόπο ελεγχόμενο και επιθυμητό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επιβράδυνση της ανάπτυξης μικροοργανισμών και των διαδικασιών υποβάθμισης της ποιότητας και κατά συνέπεια την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του εκάστοτε προϊόντος (Kerry et al. 2006, Coma 2008).

Η ανάπτυξη του εύρους συστημάτων ενεργού συσκευασίας, κάποια από τα οποία μπορεί να έχουν ήδη εφαρμογή τόσο σε νέα όσο και σε υπάρχοντα προϊόντα τροφίμων, είναι σχετικά καινούργια. Τα συστήματα ενεργούς συσκευασίας περιλαμβάνουν τον έλεγχο και την απορρόφηση της υγρασίας (moisture control, absorption), διαπερατά στο O<sub>2</sub> φιλμς, συστήματα απορρόφησης του O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub> scavengers or absorbers), παραγωγείς οξυγόνου (O<sub>2</sub> generators), συστήματα ελέγχου του CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> controllers), παραγωγείς CO<sub>2</sub> ή αιθανόλης (carbon dioxide or ethanol generation), και αντιμικροβιακά συστήματα (Zhou et al., 2010). Από τις προαναφερθείσες τεχνικές, η εφαρμογή αντιμικροβιακών παραγόντων στην ενεργό συσκευασία έχει συγκεντρώσει το περισσότερο ενδιαφέρον (Coma, 2008).

#### 1.3.2.1 Αντιμικροβιακή συσκευασία

Η αντιμικροβιακή συσκευασία (antimicrobial packaging- AM) είναι ένας τύπος ενεργού συσκευασίας, πολλά υποσχόμενος στον τομέα του κρέατος και των πουλερικών (Quintavalla & Vicini, 2002). Το ενδιαφέρον γι' αυτό τον τύπο συσκευασίας έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια κυρίως λόγω της ανησυχίας που υπάρχει σχετικά με τα τροφιμογενή

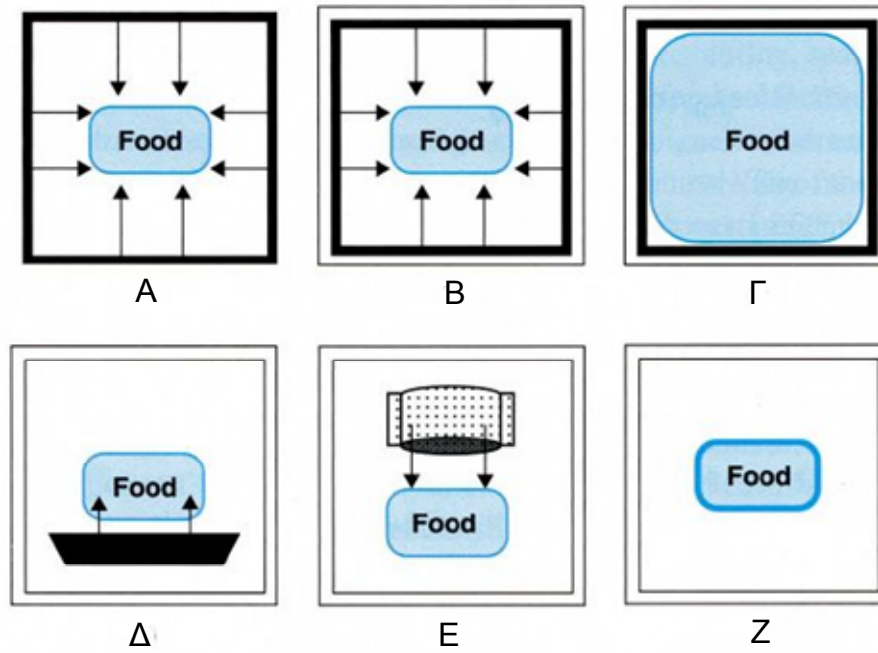
νοσήματα. Η δράση της είναι παραπλήσια με αυτή της ενεργούς συσκευασίας, με απώτερο σκοπό τη μείωση, την αναστολή ή την επιβράδυνση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που μπορεί να υπάρχουν στο τρόφιμο που συσκευάζεται ή στα υλικά συσκευασίας (Zhou et al., 2010).

Η αντιμικροβιακή συσκευασία μπορεί να έχει διάφορες μορφές. Μερικοί τύποι που χρησιμοποιούνται αναφορικά είναι:

1. Προσθήκη πτητικών αντιμικροβιακών παραγόντων σε θήκες (sachets) ή μαξιλαράκια (pads) εντός της συσκευασίας
2. Ενσωμάτωση των πτητικών και μη πτητικών αντιμικροβιακών παραγόντων απευθείας σε πολυμερή
3. Επικάλυψη ή προσρόφηση αντιμικροβιακών πάνω στις επιφάνειες πολυμερών
4. Ακινητοποίηση των αντιμικροβιακών ουσιών στα πολυμερή μέσω ιοντικών ή ομοιοπολικών συνδέσεων.
5. Χρήση πολυμερών που εγγενώς είναι αντιμικροβιακά (Arpendini & Hotchkiss, 2002).

Εμπορικά, η πιο επιτυχημένη εφαρμογή αντιμικροβιακής συσκευασίας είναι αυτή της ενθηλάκωσης, τα οποία περικλείονται ή προσκολλούνται στο εσωτερικό της συσκευασίας. Έχουν κυριαρχήσει τρεις μορφές: προσροφητήρες οξυγόνου, προσροφητήρες υγρασίας και παραγωγείς πτητικών αιθανόλης (ethanol vapor generators) (Arpendini & Hotchkiss, 2002). Στη βιομηχανία, χρησιμοποιούνται ευρύτατα απορροφητικά υφάσματα (Pads), σε κρέας και πουλερικά που συσκευάζονται σε δίσκους, για να απορροφούν τα εκκρίματα του κρέατος. Τα υφάσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν παράδειγμα αντιμικροβιακής συσκευασίας, καθώς μπορεί να επιβραδύνουν τη μικροβιακή ανάπτυξη και να παρεμποδίσουν παθογόνους μικροοργανισμούς εάν ενσωματωθούν σε αυτά οργανικά οξέα και επιφανειοδραστικές ουσίες (Hansen, Rippl, Midkiff, & Neuwirth, 1989, Cha & Chinan, 2004, Brody, 2005).

Στην εικόνα 1 που ακολουθεί απεικονίζονται οι πιθανές μορφές συστημάτων αντιμικροβιακής συσκευασίας.



**Εικόνα 1:** Πιθανά συστήματα αντιμικροβιακής συσκευασίας τροφίμων. Α) Χρήση αντιμικροβιακών υλικών συσκευασίας Β) Επικάλυψη (coating) αντιμικροβιακών ουσιών στα υλικά της συσκευασίας Γ) ακινητοποίηση αντιμικροβιακών παραγόντων στα πολυμερή των υλικών συσκευασίας Δ) χρήση αντιμικροβιακών δίσκων (trays) ή υφασμάτων pads Ε) χρήση (sachets)/ ένθετο που περιέχει πτητικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες και Ζ) αντιμικροβιακή βρώσιμη επικάλυψη στα τρόφιμα (Han, 2005).

Οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην ενεργή συσκευασία, μπορούν να μεταναστεύσουν στο τρόφιμο μέσω διάχυσης και διαμερισμού, είτε με άμεση προσθήκη στο τρόφιμο ή μέσω ενσωμάτωσης τους σε βρώσιμα υλικά που χρησιμεύουν ως φορείς, όπως είναι οι μεμβράνες (films) ή οι επικαλύψεις (coatings) (Emiroğlu et al. 2010; Zinoviadou et al., 2009). Εναλλακτικά τα αντιμικροβιακά μπορεί να απελευθερώνονται μέσω εξάτμισης στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας, δηλαδή, μεταξύ του τροφίμου και του περιέκτη (Argyri et al., 2011; Laird and Phillips, 2011; Matan et al., 2006; Skandamis and Nychas, 2002). Η τελευταία εφαρμογή έχει το πλεονέκτημα ότι το τρόφιμο δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τον αντιμικροβιακό παράγοντα, οπότε και θεωρείται πιο ήπια όσο αφορά τον οργανοληπτικό αντίκτυπο (Karpetanakou et al., 2014).

### **1.3.3 Αντιμικροβιακοί παράγοντες**

Διάφοροι αντιμικροβιακοί παράγοντες θα μπορούσαν να έχουν εφαρμογή σε συστήματα και υλικά συσκευασίας τροφίμων προς την ανάπτυξη καινούργιων αντιμικροβιακών συστημάτων συσκευασίας. Ενδεικτικά οι αντιμικροβιακοί παράγοντες μπορεί να είναι: οργανικά οξέα, άλατα οξέων, αλκοόλη, βακτηριοσίνες, λιπαρά οξέα και οι εστέρες τους, χηλικοί παράγοντες, ένζυμα, μέταλλα, αντιβιοτικά, εκχυλίσματα φυτών/ μπαχαρικά, προβιοτικά, μέταλλα, αντιοξειδωτικά κα. Μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες, τους χημικούς παράγοντες, τους φυσικούς και τα προβιοτικά (Han, 2005).

#### **1.3.3.1 Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες**

Η βιομηχανία τροφίμων ανταποκρινόμενη στις απαιτήσεις των καταναλωτών που ζητούν τρόφιμα χωρίς την προσθήκη χημικών συντηρητικών και με ήπια επεξεργασία, χρησιμοποιούν φυσικά αντιμικροβιακά για την επέκταση του χρόνου ζωής των τροφίμων. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται εκχυλίσματα βοτάνων, μπαχαρικά, βακτηριοσίνες κα.

Τα βότανα και εκχυλίσματα μπαχαρικών περιέχουν πολλαπλές φυσικές ενώσεις και είναι γνωστό ότι έχουν ένα ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα έναντι διάφορων μικροοργανισμών. Εκτός από την αντιμικροβιακή δράση, άλλα πλεονεκτήματα που τα χαρακτηρίζουν είναι η αντιοξειδωτική τους δράση και η επίδραση που μπορεί να έχουν ως εναλλακτικά φάρμακα. Η απ' ευθείας προσθήκη των αιθέριων ελαίων σε τρόφιμα όπως το κρέας και τα προϊόντα κρέατος έχει ως αποτέλεσμα την άμεση μείωση του βακτηριακού πληθυσμού, ταυτόχρονα όμως μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου (Skandamis & Nychas, 2001).

Η αντιμικροβιακή δράση των ενζύμων, είναι ευαίσθητη στα περιβάλλοντα και τα υποστρώματα, γι' αυτό θα πρέπει να εξετάζεται προσεκτικά η εξειδίκευση του ενζύμου. Για παράδειγμα, η δράση της λυσοζύμης μπορεί να επηρεάζεται σημαντικά από το pH και τη θερμοκρασία. Στις περισσότερες περιπτώσεις η λυσοζύμη δεν είναι αποτελεσματική σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια (Han, 2005). Αυτό οφείλεται στην

πολυπλοκότητα της δομής της κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων που περιβάλλει την πεπτιδογλυκάνη (Güçbilmez et al., 2007).

Διάφορες βακτηριοσίνες όπως η νισίνη, η πεδιοσίνη, η λακτισίνη κτλ., μπορούν να ενσωματωθούν σε τρόφιμα ή/και σε συστήματα συσκευασίας τροφίμων για να αναστείλουν την ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Daeschel, 1989). Οι βακτηριοσίνες, που είναι μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με πολλούς τρόπους, ωστόσο είναι σημαντικό να χαρακτηρίζεται η αντοχή τους στη θερμική επεξεργασία και το pH. Σε ζυμούμενα τρόφιμα, μπορεί να προστίθενται σκόπιμα ως προβιοτικά, ζωντανά βακτήρια που παράγουν βακτηριοσίνες, με απώτερο σκοπό την επίτευξη αντιμικροβιακού αποτελέσματος.

### **1.3.3.2 Η αιθανόλη ως αντιμικροβιακός παράγοντας**

Η αιθανόλη χρησιμοποιείται τακτικά ως αποστειρωτικός παράγοντας, σε ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές συσκευασίας (Smith et al., 1987). Έχει βρεθεί ότι αυξάνει το χρόνο ζωής στο ψωμί, σε κέικ και στην πίτσα, όταν ψεκάζεται πάνω στην επιφάνεια των προϊόντων πριν από τη συσκευασία, γεγονός που επιδεικνύει τη δυναμική που έχει ως αναστολέας αέριας φάσης (Suprakul et al., 2003). Προλαμβάνει τη μικροβιακή αλλοίωση σε τρόφιμα ενδιάμεσης υγρασίας (Intermediate moisture foods, IMFs), όπως είναι τα τυριά και προϊόντα αρτοποιίας, ενώ μειώνει την ταχύτητα μπαγιατέματος και τις οξειδωτικές μεταβολές.

Πολλές εφαρμογές με φιλμ παραγωγής αιθανόλης (ethanol generating films) ή θήκες (sachets) (π.χ., Ethicap™ sachet, Freund, Japan) έχουν κατοχυρωθεί και κυκλοφορούν στο εμπόριο, συμπεριλαμβανομένου και ενός συγκολλητικού φιλμ (μεμβράνη) που προσκολλάται στο εσωτερικό της συσκευασίας, παρέχοντας αντιμικροβιακή δραστηριότητα (Floros et al., 1997, Labuza and Breene, 1989, Smith et al., 1995; Suprakul et al., 2003).

Ο Smith και η ομάδα του το 1990, έδειξαν ότι η παραγωγή ατμών αιθανόλης (ethanol vapor generation) είναι αποτελεσματική ενάντια σε δέκα είδη μυκήτων, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *Aspergillus* και *Penicillium*, 15 είδη βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Salmonella*, *Staphylococcus* και *Escherichia coli* καθώς και σε είδη ζυμών που προκαλούν αλλοίωση. Ωστόσο, τα συστήματα παραγωγής αιθανόλης



(ethanol generators), έχουν εφαρμοστεί κυρίως σε συσκευασίες προϊόντων αρτοποιίας (MAP), λόγω της δράσης τους κατά των μυκήτων (Coma, 2008).

Η αιθανόλη υπάρχει φυσικά σε ένα μεγάλο εύρος τροφίμων και ποτών. Επιπλέον είναι επιτρεπόμενος διαλύτης που χρησιμοποιείται σε πολλά προϊόντα για τη διαμόρφωση του χρώματος και της οσμής. Από τοξικολογικής απόψεως, εφόσον η αιθανόλη πληροί τις προδιαγραφές καθαρότητας, δεν υπάρχει κανένας λόγος που να την καθιστά μη αποδεκτή ως συντηρητικό τροφίμων (Kalathenos & Russell, 2003). Παρά το γεγονός ότι η καθαρή αιθανόλη μπορεί να έχει καλή αντιμικροβιακή δράση, οι καταναλωτές μπορεί να την αντιμετωπίσουν με καχυποψία, ακόμη και αν προορίζεται για χρήση σε τρόφιμα (Zink, 1997). Μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική θα μπορούσαν να αποτελέσουν διάφορα αλκοολούχα αποστάγματα όχι μόνο σε επίπεδο συντήρησης τροφίμων, αλλά και από την οπτική του μάρκετινγκ, μιας και χρησιμοποιούνται ευρύτατα και πολλά χρόνια σε πολλές εθνικές κουζίνες όπως η Ιταλική και η Ελληνική, για να βελτιώσουν την γεύση κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Τα αλκοολούχα αποστάγματα θεωρούνται ήπιας εφαρμογής αντιμικροβιακά και το κύριο πλεονέκτημα τους είναι ότι αν εφαρμοστούν σε τρόφιμα που δεν είναι έτοιμα προς κατανάλωση, τα επίπεδα της αιθανόλης που θα έχουν μεταναστεύσει στο τρόφιμο, θα μειωθούν δραματικά μετά το ψήσιμο (Karetanakou et al., 2014).

#### **1.4 Μικροβιολογία πρόβλεψης (Ποσοτική μικροβιολογία)**

Η διασφάλιση της μικροβιολογικής ασφάλειας και του χρόνου ζωής των τροφίμων εξαρτάται από την ελαχιστοποίηση του αρχικού επιπέδου μικροβιολογικής επιμόλυνσης, την πρόληψη ή/ και τον περιορισμό του ρυθμού ανάπτυξης των μικροβίων ή την καταστροφή των πληθυσμών. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια η συχνότητα εμφάνισης των τροφιογενών ασθενειών αυξήθηκε στο βιομηχανοποιημένο κόσμο, παρά το γεγονός της καθιέρωσης του HACCP, και των κανονισμών σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων (McMeekin et al., 1997). Την ίδια ώρα οι καταναλωτές απαιτούν πρόσβαση σε μεγαλύτερη ποικιλία λιγότερο επεξεργασμένων ή/ και νωπών τροφίμων, γεγονός που δημιούργησε την ανάγκη για παροχή εγγυήσεων στην ασφάλεια και την ποιότητα τροφίμων, οι οποίες θα βασίζονται σε ταχείες και ακριβείς μεθόδους.

Μια εναλλακτική μέθοδος σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους για την εκτίμηση του χρόνου ζωής των τροφίμων αποτελεί το πεδίο της μικροβιολογίας πρόβλεψης ή ποσοτικής μικροβιολογίας. Η ποσοτική μικροβιολογία περιλαμβάνει την απόκριση της μικροβιακής ανάπτυξης σε σχέση με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και εκφράζεται με ποσοτικούς όρους μέσω μαθηματικών εξισώσεων (μοντέλα). Τα δεδομένα και τα μοντέλα καταχωρούνται σε βάσεις δεδομένων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ερμηνεία της επίδρασης των συνθηκών κατά την επεξεργασία, τη διανομή και την αποθήκευση επί της μικροβιακής ανάπτυξης (McMeekin et al., 1997). Η προσέγγιση αυτή παρέχει ακρίβεια στην εκτίμηση του χρόνου ζωής των τροφίμων, ενώ ο συνδυασμός των δεδομένων του θερμοκρασιακού ιστορικού του προϊόντος και μαθηματικών μοντέλων μπορεί να οδηγήσει σε έξυπνα συστήματα διαχείρισης προϊόντων για βελτιστοποίηση της ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων τη στιγμή της κατανάλωσης (Koutsoumanis et al., 2006). Εντούτοις, παρόλη την πρόοδο που σημειώνεται συνεχώς στον κλάδο αυτό, η χρήση των μοντέλων αλλοίωσης παραμένει κυρίως ως ερευνητικό εργαλείο παρά ως αποτελεσματική εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων. Έχουν αναφερθεί οι λόγοι για τους οποίους συμβαίνει αυτό (Koutsoumanis et al., 2006). Ένα μεγάλο πρόβλημα εντοπίζεται στο γεγονός ότι τα επικυρωμένα μοντέλα προέρχονται κυρίως από καλλιέργειες συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε εργαστηριακά μέσα και υπό δεδομένες συνθήκες (McMeekin et al., 1987). Τα αντίστοιχα μοντέλα που προέρχονται από πραγματικά προϊόντα τροφίμων συνήθως παρουσιάζουν δυσκολίες στην ανάπτυξη προβλέψεων ακριβείας με αποτέλεσμα η διαφοροποίηση στις προβλέψεις να είναι αναπόφευκτη για τρόφιμα πολύπλοκης σύστασης, όπως το κρέας. Γι αυτό το λόγο συνίσταται η ανάπτυξη και επικύρωση μοντέλων που προέρχονται από δεδομένα συγκεκριμένων προϊόντων με βάση το κρέας (Ψωμάς, 2012).

Τα μοντέλα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις κατηγορίες: α) Τα πρωτογενή μοντέλα, που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τις αλλαγές της συγκέντρωσης του μικροβιακού πληθυσμού χρησιμοποιώντας έναν αριθμό κινητικών παραμέτρων (χρόνος προσαρμογής, μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης, τελικός μικροβιακός πληθυσμός), β) τα δευτερογενή μοντέλα, τα οποία εκφράζουν την επίδραση των περιβαλλοντικών μεταβλητών (π.χ. θερμοκρασία, pH, % NaCl κ.α.) στις κινητικές παραμέτρους που υπολογίστηκαν από τα πρωτογενή μοντέλα (McMeekin et al., 2006) και γ) τα τριτογενή μοντέλα, τα οποία αποτελούν “εργαλεία” του υπολογιστή που ενσωματώνουν τα

πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα σε μορφή φιλική προς το χρήστη. Η ευρύτερη χρήση των μοντέλων στη βιομηχανία τροφίμων και στο ερευνητικό πεδίο εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα φιλικών λογισμικών προς το χρήστη, που περιλαμβάνουν μοντέλα πρόβλεψης και του δίνουν τη δυνατότητα να ανακτά πληροφορίες από αυτά με γρήγορο και εύκολο τρόπο (McMeekin et al., 2006).

Τα μοντέλα ανάπτυξης αποτελούν εργαλεία υψίστης σημασίας στην ποσοτική μικροβιολογία, ειδικά για τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (Ready-To-Eat) ή έτοιμα προς μαγείρεμα (Ready-To-Cook), δεδομένου ότι μπορούν να αξιολογούν την έκθεση των καταναλωτών στις δόσεις (επίπεδα) των παθογόνων βακτηρίων κατά τη στιγμή της κατανάλωσης. Σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλά λογισμικά σχετικά με την ποσοτική μικροβιολογία, με σκοπό την παροχή προβλέψεων της μικροβιολογικής απόκρισης στα τρόφιμα μέσω του ελέγχου των περιβαλλοντικών και φυσικοχημικών παραγόντων και/ή πρόσθετων τροφίμων (Psomas et al., 2011).

## **1.5 Σκοπός της μελέτης**

Το κρέας αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου, καθώς είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ορθή λειτουργία του οργανισμού. Ο μοσχαρίσιος κιμάς είναι από τα πιο δημοφιλή προϊόντα κρέατος στην προτίμηση των καταναλωτών παγκοσμίως, όμως χαρακτηρίζεται ως ευπαθές και ευαλλοίωτο προϊόν. Οι απαιτήσεις τις αγορές για ποιότητα, ασφάλεια, χαμηλό κόστος, μεγαλύτερη διάρκεια χρόνου ζωής στο κρέας και ταυτόχρονα αποφυγή προσθήκης «χημικών ουσιών», έχουν στρέψει την προσοχή της επιστημονικής έρευνας στην αναζήτηση εναλλακτικών τρόπων συντήρησης και συσκευασίας. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η μελέτη και ανάπτυξη μια νέας εμπορικής αντιμικροβιακής συσκευασίας για την επέκταση του χρόνου ζωής μοσχαρίσιου κιμά που συσκευάζεται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, με τη χρήση του τσίπουρου και της αιθανόλης ως αντιμικροβιακές ουσίες καθώς και η ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων για την πρόβλεψη της λογαριθμικής αύξησης των κυρίαρχων αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο βόειο κιμά, συναρτήσει της θερμοκρασίας.

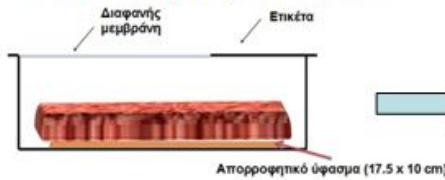
## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα. Το πρώτο πείραμα (Ενότητα Α) αφορούσε στην επιλογή του καταλληλότερου συνδυασμού: α) αντιμικροβιακής ουσίας (τσίπουρο ή αιθανόλη), β) προστιθέμενης ποσότητας της ουσίας αυτής και γ) της μεθόδου εφαρμογής της (προσθήκη σε απορροφητικό ύφασμα κάτω από το προϊόν, ή/ και κάτω από την ετικέτα, ή και τα δύο) με στόχο την επιμήκυνση του χρόνου ζωής βόειου κιμά. Η Ενότητα Α λοιπόν της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαδοχικές φάσεις, μιας και η κάθε μία χρησιμοποιήθηκε ως «βάση» για την επόμενη. Στη συνέχεια, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της Ενότητας Α, ακολούθησε η Ενότητα Β, της οποίας αντικείμενο ήταν η ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης της λογαριθμικής αύξησης των κυρίαρχων αλλοιογόνων μικροοργανισμών στο βόειο κιμά, συναρτήσει της θερμοκρασίας. (Εικόνα 1)

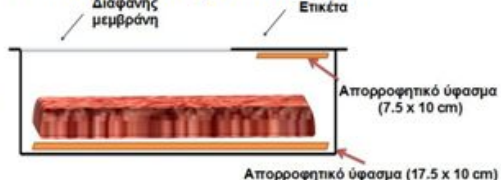
**ΕΝΟΤΗΤΑ Α: Επιλογή καταλληλότερου συνδυασμού**

**1<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία**



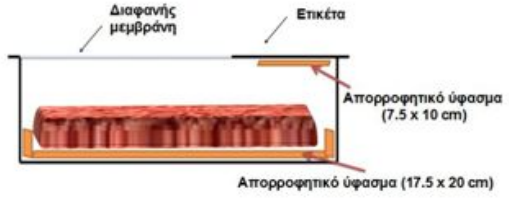
- 38% κ.ό. Αιθανόλη
- 70% κ.ό. Αιθανόλη
- 100% κ.ό. Αιθανόλη
- Τσίπουρο (38% κ.ό)
- ✓ Προστιθέμενος όγκος: 10, 20, 30 ml

**2<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία**



- 38% κ.ό. Αιθανόλη
- 70% κ.ό. Αιθανόλη
- Τσίπουρο (38% κ.ό)
- ✓ Προστιθέμενος όγκος: 20, 30 ml και 10ml (στο πάνω ύφασμα)

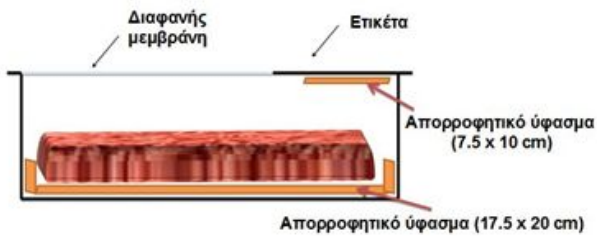
**3<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία**



- 70% κ.ό. Αιθανόλη
- Τσίπουρο (38% κ.ό)
- ✓ Προστιθέμενος όγκος: 20, 30,40,60 ml και 10ml (στο πάνω ύφασμα)

**Τροποποιημένη ατμόσφαιρα**  
80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>  
**Θερμοκρασία συντήρησης**  
7°C

**ΕΝΟΤΗΤΑ Β: Ανάπτυξη τελικής συσκευασίας**



**MAP**  
80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>  
**Θερμοκρασία συντήρησης**  
0°C, 4°C, 8°C, 12°C

- Τσίπουρο (38% κ.ό)
- ✓ Προστιθέμενος όγκος: 40 ml και 10ml (στο πάνω ύφασμα)

**Εικόνα 1:** Απεικόνιση του πειραματικού σχεδιασμού

## 2.2 Αντιμικροβιακές ουσίες

Οι αντιμικροβιακές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τσίπουρο (~38% κ.ό.) χωρίς γλυκάνισο και αιθανόλη διαφορετικών συγκεντρώσεων (38%, 70% κ.ό και 100% κ.ό.). Προηγούμενες μελέτες έχουν υποδείξει τόσο την καλή αντιμικροβιακή δράση του τσίπουρου και της αιθανόλης όσο και την θετική επίδραση επί των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε χοιρινό κρέας που συντηρείται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, μέσω των πτητικών ουσιών τους που απελευθερώνονται στον υπερκείμενο χώρο (Karetanakou et al., 2014). Σκοπός στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν να ελεγχθεί η αντιμικροβιακή τους δράση με διαφορετική προσέγγιση (μέθοδο) σε κρεατοσκευάσματα μοσχαρίσιου κιμά. Οι συγκεντρώσεις αιθανόλης 70% κ.ό και 100% κ.ό, συμπεριλήφθηκαν στις αντιμικροβιακές ουσίες, ως πιο «δραστικές» για να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα τους τόσο σε μικροβιολογικό όσο και σε οργανοληπτικό επίπεδο.

## 2.3 Προετοιμασία δειγμάτων και συντήρηση

Δείγματα βόειου κιμά σε εμπορικές συσκευασίες των 500 g χρησιμοποιήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Η προμήθεια του βόειου κιμά πραγματοποιήθηκε από τοπική βιομηχανία παραγωγής κρεατοσκευασμάτων. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου και αποθηκεύτηκαν για μισή ώρα σε χαμηλή θερμοκρασία (0-4°C).

### **ΕΝΟΤΗΤΑ Α: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ (αντιμικροβιακής ουσίας, προστιθέμενου όγκου και μεθόδου εφαρμογής)**

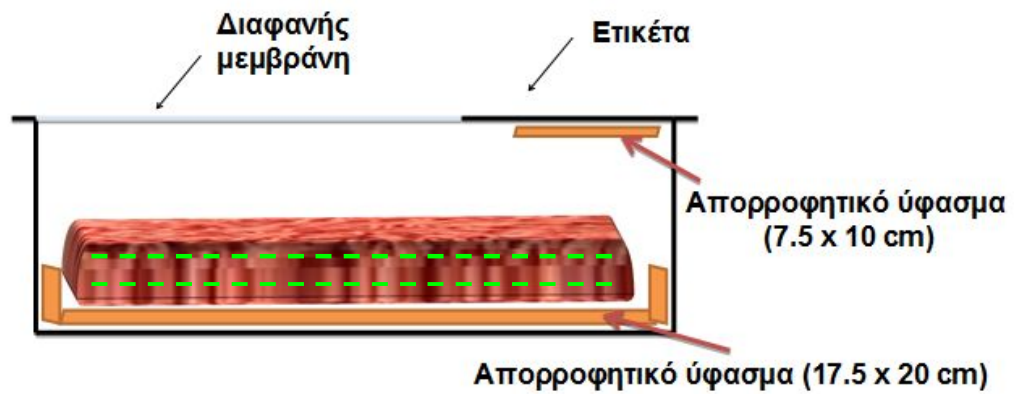
**1<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία :** Ως αντιμικροβιακές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν το τσίπουρο (~38% κ.ό.) και αιθανόλη 38%, 70% και 100% κ.ό.. Η εφαρμογή των αντιμικροβιακών πραγματοποιήθηκε με προσθήκη σε απορροφητικό ύφασμα (DRYLINE PLUS 2450 COLOURED, FLEXOGRAPHIKI®, Ελλάδα), διαστάσεων 17.5 x 10 cm, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη βάση της συσκευασίας κάτω από τον κιμά (τεμάχιο 500 g). Το απορροφητικό ύφασμα που επιλέχθηκε, χρησιμοποιείται ήδη από τη βιομηχανία τροφίμων σε συσκευασίες φρέσκου κρέατος και πουλερικών για να απορροφά τα εκκρίματα και πληρεί τις προδιαγραφές καταλληλότητας για επαφή με τρόφιμα. Η

αντιμικροβιακή δράση του εκάστοτε αντιμικροβιακού μελετήθηκε σε τρία επίπεδα προστιθέμενου όγκου 10, 20 και 30 mL.

**2<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία:** Ως αντιμικροβιακές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν το τσίπουρο (~38% κ.ό.), αιθανόλη 38% και 70% κ.ό. Για κάθε μία από τις προαναφερθείσες μεταχειρίσεις εφαρμόστηκαν όγκοι των 20 και 30 mL με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα (DRYLINE PLUS 2450 COLOURED, FLEXOGRAPHIKI®, Ελλάδα) διαστάσεων 17.5 x 10 cm, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε στη βάση της συσκευασίας κάτω από τον κιμά (τεμάχιο 500 g). Επιπλέον, τοποθετήθηκε ένα ακόμη απορροφητικό ύφασμα κάτω από την ετικέτα (DRYLINE PLUS 2450 COLOURED, FLEXOGRAPHIKI®, Ελλάδα), διαστάσεων 7.5 x 10 cm, στο οποίο εφαρμόστηκαν 10 mL από το αντίστοιχο αντιμικροβιακό. Ο λόγος της τοποθέτησης επιπρόσθετου απορροφητικού υφάσματος στο επάνω μέρος της συσκευασίας πραγματοποιήθηκε για να ενισχυθεί η δράση των αντιμικροβιακών μέσω της διάχυσης των πτητικών ουσιών.

**3<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία:** Ως αντιμικροβιακές ουσίες χρησιμοποιήθηκαν το τσίπουρο (~38% κ.ό.), και 70% κ.ό. αιθανόλη. Οι όγκοι του τσίπουρου και της αιθανόλης (20, 30, 40, 60 mL) εφαρμόστηκαν σε απορροφητικό ύφασμα διπλάσιας διάστασης (17.5 x 20cm) (DRYLINE PLUS 2450 COLOURED, FLEXOGRAPHIKI®, Ελλάδα) και τοποθετήθηκε στη βάση της συσκευασίας. Ομοίως όπως παραπάνω (Φάση 2), τοποθετήθηκε ένα ακόμη απορροφητικό ύφασμα κάτω από την ετικέτα (διαστάσεων 7.5 x 10cm), (DRYLINE PLUS 2450 COLOURED, FLEXOGRAPHIKI®, Ελλάδα) στο οποίο εφαρμόστηκαν 10 mL από το αντίστοιχο αντιμικροβιακό.

Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε πλαστικές σακούλες διαστάσεων 25 x 25 cm, με διαπερατότητα ca. 25, 90, και 6 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> ανά μέρα/10<sup>5</sup> Pa για το CO<sub>2</sub>, το O<sub>2</sub> και το N<sub>2</sub>, στους 20°C και σε σχετική υγρασία 50% (Flexo-Pack S.A., Athens, Greece), υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκαν στους 7°C. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε τακτά χρονικά διαστήματα στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της συντήρησης. Δείγματα βόειου κιμά τα οποία συσκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη αιθανόλης ή τσίπουρου αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Δύο δείγματα λαμβάνονταν από κάθε συσκευασία σε βάθος 1 cm από την βάση και επιφάνεια του εκάστοτε τεμαχίου κιμά. Τα σημεία δειγματοληψίας φαίνονται στο σχήμα της Εικόνας 2 που ακολουθεί.



**Εικόνα 2:** Μελετώμενη συσκευασία Ενότητα 1- 3<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία.

### **ΕΝΟΤΗΤΑ Β: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΛΙΚΗΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ως καταλληλότερη μέθοδος εφαρμογής, σε οργανοληπτικό και μικροβιολογικό επίπεδο επιλέχθηκε η εφαρμογή της 3<sup>ης</sup> μελετώμενης συσκευασίας με προσθήκη τσίπουρου ως αντιμικροβιακή ουσία. Συγκεκριμένα 40mL τσίπουρου εφαρμόστηκαν σε απορροφητικό ύφασμα διάστασης (17.5 x 20cm) (DRYLINE PLUS 2450 COLOURED, FLEXOGRAPHIKI®, Ελλάδα) και τοποθετήθηκε στη βάση της συσκευασίας. Επιπλέον τοποθετήθηκε ένα ακόμη απορροφητικό ύφασμα στη μεμβράνη συσκευασίας, κάτω από την ετικέτα, (7.5 x 10cm), στο οποίο εφαρμόστηκαν 10 mL από το τσίπουρο.





**Εικόνα 3:** Προετοιμασία δειγμάτων Μέρους Β. α) Απορροφητικά υφάσματα που χρησιμοποιήθηκαν για το κάτω και το πάνω μέρος της συσκευασίας β) Εφαρμογή αλκοολούχου αποστάγματος στο απορροφητικό ύφασμα πριν την τοποθέτηση του στο πάνω μέρος της συσκευασίας (κάτω από την ετικέτα) γ) Τοποθέτηση απορροφητικού υφάσματος στη βάση της συσκευασίας του κιμά δ) Εφαρμογή αλκοολούχου αποστάγματος στο απορροφητικό ύφασμα πριν την τοποθέτηση του κιμά και το κλείσιμο της συσκευασίας.

Τα δείγματα συσκευάστηκαν σε πλαστικές σακούλες διαστάσεων 25 x 25 cm, με διαπερατότητα ca. 25, 90, και 6 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> ανά μέρα/10<sup>5</sup> Pa για το CO<sub>2</sub>, το O<sub>2</sub> και το N<sub>2</sub>, στους 20°C και σε σχετική υγρασία 50% (Flexo-Pack S.A., Athens, Greece) υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub> : 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (0, 4, 8 και 12°C). Δείγματα βόειου κιμά τα οποία συσκευάστηκαν χωρίς την προσθήκη τσίπουρου αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες σε τακτά χρονικά διαστήματα. Από κάθε συσκευασία παραλήφθηκαν με εγκάρσια τομή 10 g κιμά προς μικροβιολογική ανάλυση. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε δύο ανεξάρτητες φορές (παραλαβή 2 διαφορετικές ημέρες), και σε κάθε μεταχείριση λαμβάνονταν δύο επαναλήψεις (2 διαφορετικές συσκευασίες).

## 2.4 Μέτρηση αερίων εντός της συσκευασίας

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα δείγματα συσκευάζονταν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub> :20% CO<sub>2</sub>. Πριν την πραγματοποίηση κάθε δειγματοληψίας, τα δείγματα ελέγχονταν ως προς τη σύσταση των αερίων του υπερκείμενου χώρου σε μηχανήμα μέτρησης αερίων (Checkmate 9900 O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>, PB1 Dansensor, Denmark). Η μέτρηση γινόταν με την εισαγωγή της βελόνας στο εσωτερικό της συσκευασίας.



**Εικόνα 4:** Λήψη μέτρησης των αερίων του υπερκείμενου χώρου της συσκευασίας και το μηχανήμα μέτρησης αερίων Checkmate 9900 O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>.

## 2.5 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Τα δείγματα αποσύρονταν από τη συντήρηση σε τακτά χρονικά διαστήματα για την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων. Η δειγματοληψία λάμβανε χώρα σε στείρο πάγκο εργασίας, δίπλα σε λύχνο Bunsen. Από κάθε συσκευασία βόειου κιμά (500 g) παρελήφθησαν υπό ασηπτικές συνθήκες 10 g (στις περιπτώσεις που το δείγμα παραλήφθηκε από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά, κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας μετρήθηκε και παραλήφθηκε για μικροβιολογική ανάλυση, η ανώτερη και κατώτερη στρώση του κιμά, αντίστοιχα, πάχους ενός εκατοστού) και τοποθετήθηκαν σε σακούλα Stomacher. Προστέθηκαν 90 mL αποστειρωμένου αραιωτικού διαλύματος Ringer (Lab M, Lancashire, UK) και ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Stomacher για 60 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν δεκαδικές αραιώσεις με μεταφορά 1 mL του ομογενοποιημένου διαλύματος σε 9ml αποστειρωμένου ¼ strength

διαλύματος Ringer. Στη συνέχεια 1 ή 0.1 mL από τις κατάλληλες αραιώσεις, ενσωματώθηκε ή εξαπλώθηκε αντίστοιχα, σε επιλεκτικά και μη επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες επώασης για κάθε κατηγορία μικροοργανισμού ήταν τα κάτωθι:

**Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (ΟΜΧ):** Η καταμέτρηση της ΟΜΧ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης, λαμβάνοντας 1mL δείγματος από την κατάλληλη αραιώση στο μη επιλεκτικό υπόστρωμα PCA (Plate Count Agar, LabM, Lancashire, UK). Η επώαση των τρυβλίων έλαβε χώρα στους 30°C, για 3 ημέρες και ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών.

**Brochothrix thermosphacta:** Η καταμέτρηση του *Brochothrix thermosphacta* πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Ποσότητα 0,1mL δείγματος από την κατάλληλη αραιώση εξαπλώθηκε σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα STAA (Streptomycin Thallus acetate Actiodione Agar, Biolife Italiana Srl, Italy), με την προσθήκη του αντιβιοτικού (streptomycin sulphate, thallus acetate και cycloheximide, Biolife Italiana Srl, Italy). Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 2 ημέρες στους 25°C. Καταμετρήθηκαν μόνο οι χαρακτηριστικές αποικίες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

**Ψευδομονάδες:** Η καταμέτρηση των Ψευδομονάδων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Ποσότητα 0.1mL δείγματος από την κατάλληλη αραιώση εξαπλώθηκε σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα *Pseudomonas* Agar Base (CFC, Lab M, Lancashire, UK) με προσθήκη αντιβιοτικού Ceftrimide Fucidin–Cephaloridine supplement (CFC; Lab M, Lancashire, UK). Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 2 ημέρες στους 25°C και καταμέτρηση των χαρακτηριστικών αποικιών, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κατασκευάστριας εταιρείας.

**Ζύμες- Μύκητες:** Η καταμέτρηση ζυμών και μυκήτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης. Ποσότητα 0.1mL δείγματος από την κατάλληλη αραιώση εξαπλώθηκε σε επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα RBC (Rose Bengal Chloramphenicol, LabM, Lancashire, UK), με προσθήκη αντιβιοτικού (Chloramphenicol, X009). Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων για 4 ημέρες στους 25°C και η καταμέτρηση των αποικιών.

**Οξυγαλακτικά βακτήρια:** Η καταμέτρηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης. Ποσότητα 1mL δείγματος από την κατάλληλη αραιώση ενσωματώθηκε σε επιλεκτικό υπόστρωμα MRS (de Man, Ragosa & Sharpe agar, Lab M, UK). Προστέθηκε και δεύτερη στρώση υποστρώματος ώστε να δημιουργηθούν αναερόβιες συνθήκες. Τα τρυβλία επωάστηκαν στους 30°C για 3 ημέρες και ακολούθησε η καταμέτρηση των αποικιών.

Τα δεδομένα (μετρήσεις πληθυσμών) των κυρίαρχων μικροοργανισμών αλλοίωσης μετατράπηκαν σε λογαριθμικές τιμές (log CFU/ g). Η προσαρμογή των δεδομένων που απαριθμήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία στο μοντέλο των Baranyi & Roberts (Baranyi & Roberts, 1994), έγινε με χρήση του λογισμικού προγράμματος DMFit (Institute of Food Research, Reading, UK). Οι παράμετροι που προσδιορίστηκαν από πρωτογενή μοντέλα ήταν : Η φάση προσαρμογής (lag phase), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης ( $\mu_{max}$ ) και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός ( $N_{max}$ ). Στη συνέχεια ο ειδικός ρυθμός αύξησης των δύο κυρίαρχων βακτηρίων αλλοίωσης μοντελοποιήθηκε συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης με τη χρήση του δευτερογενούς μοντέλου τύπου τετραγωνικής ρίζας. Ο τύπος που εκφράζει την τετραγωνική ρίζα του  $\mu_{max}$  σύμφωνα με το μοντέλο είναι ο παρακάτω:

$$\mu_{max} = b (T - T_{min}) \quad , \quad \text{εξίσωση 1}$$

όπου  $b$  είναι σταθερά, και  $T$  είναι η θερμοκρασία. Η παράμετρος  $T_{min}$  είναι η θεωρητικά ελάχιστη θερμοκρασία αύξησης.

## 2.6 Μετρήσεις pH

Σε όλες τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν, καταγράφηκε το pH των δειγμάτων, με τη χρήση ψηφιακού pHμέτρου που διαθέτει το εργαστήριο (Multical WTW 526 pH meter). Πριν την καταμέτρηση των τιμών του pH προηγήθηκε η βαθμονόμηση του pHμέτρου με χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων (pH 4.0 και pH 7.0). Το

ηλεκτρόδιο/ θερμόμετρο εμβαπτίζονται στην σακούλα Stomacher που βρισκόταν το εκάστοτε ομογενοποιημένο δείγμα, με το πέρας της μικροβιολογικής ανάλυσης.

## 2.7 Μετρήσεις χρώματος

Οι μεταβολές στο χρώμα των συσκευασμένων δειγμάτων αξιολογήθηκαν μετρώντας τις παραμέτρους  $L^*$ ,  $a^*$  και  $b^*$ , με τη χρήση φορητού χρωματόμετρου (Minolta, Model CR-200, Osaka, Japan). Πριν την καταμέτρηση, το χρωματόμετρο βαθμονομήθηκε με τη χρήση ειδικής λευκής πλάκας ( $L= 100$ ). Οι καταμετρούμενες παράμετροι χρώματος χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των ολικών μεταβολών του χρώματος ( $\Delta E$ ) σε κάθε ένα δείγμα σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad , \text{ εξίσωση 2 (Boakye \& Mittal, 1996)}$$

$L^*$ : φωτεινότητα,  $L_0^*$ : φωτεινότητα στο μηδενικό χρόνο,  $a^*$ : ερυθρότητα, όπου οι θετικές και αρνητικές τιμές εκπροσωπούν το κόκκινο και το πράσινο χρώμα αντίστοιχα,  $a_0^*$ : ερυθρότητα στο μηδενικό χρόνο,  $b^*$ : κίτρινο χρώμα, όπου οι θετικές και οι αρνητικές τιμές εκπροσωπούν το κίτρινο και το μπλέ χρώμα αντίστοιχα και  $b_0^*$ : κίτρινο χρώμα στο μηδενικό χρόνο. Για κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα, σε κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκαν 10 συνολικά μετρήσεις από διαφορετικά σημεία του δείγματος. Ο μέσος όρος από τις μετρήσεις κάθε παραμέτρου εισήχθησαν στην παραπάνω εξίσωση για τον υπολογισμό της συνολικής μεταβολής του χρώματος.



**Εικόνα 5:** Μέτρηση της μεταβολής του χρώματος με το φορητό χρωματόμετρο Minolta, Model CR-200.

## 2.8 Ανάλυση Αέριας Χρωματογραφίας

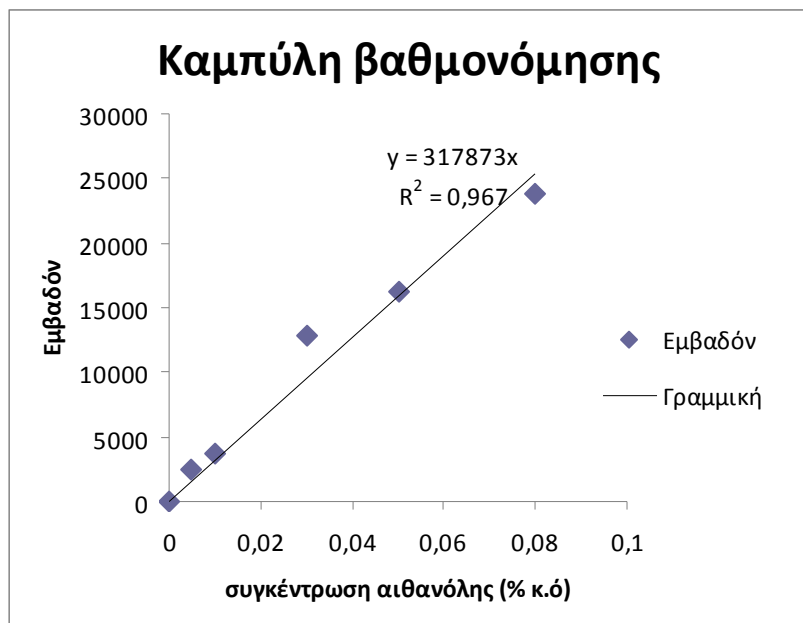
Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της αιθανόλης που περιεχόταν σε κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αέριας χρωματογραφίας GC-FID. Εκτός από τα δείγματα που λαμβάνονταν για μικροβιολογική ανάλυση στο μέρος Β, λαμβάνονταν και δύο δείγματα από τα ίδια τεμάχια κιμά κάθε συσκευασίας σε βάθος 1 cm από την βάση και επιφάνεια του εκάστοτε τεμαχίου κιμά για την ανίχνευση του ποσοστού αιθανόλης που μεταφερόταν στη μάζα του. Με τη βοήθεια ζυγού ακριβείας, παραλαμβάνονταν 1g από κάθε δείγμα και αναμειγνύονταν με 10 mL ddH<sub>2</sub>O, σε ειδικά φιαλίδια που κλείνονταν ερμητικά με πώματα από πολυπροπυλένιο και PTFE/ σέπτο σιλικόνης (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Το φιαλίδιο με το δείγμα εμβαπτιζόταν για 5 λεπτά σε αναδευόμενο νερό θερμοκρασίας 30°C ώστε να επιτευχθεί εξισορρόπηση. Στη συνέχεια γινόταν εισαγωγή της ίνας SPME, διαπερνώντας το σέπτο, στον εναέριο χώρο του δείγματος, όπου και παρέμενε για 15 λεπτά. Ακολουθούσε η μεταφορά της ίνας στον υποδοχέα του αέριου χρωματογράφου για 7 λεπτά.

Η ανάλυση GC-FID πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μηχανήματος HP 5890 Series II Gas Chromatograph και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Οι ουσίες διαχωρίστηκαν σε στήλη D8- WAX (μήκος: 30 m , διάμετρος: 0,320 μm), με το ακόλουθο θερμοκρασιακό πρόγραμμα: 5 λεπτά στους 40°C, στη συνέχεια αυξανόταν 12°C/ λεπτό μέχρι τους 150°C όπου συνέχισε να αυξάνεται με ρυθμό 15°C/ λεπτό έως τους 250°C όπου και παρέμεινε για 12 λεπτά. Ο συνολικός χρόνος του θερμοκρασιακού προγράμματος ήταν 32.9 λεπτά. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ήταν 250°C ενώ της θήρας του δείγματος (injector) 220°C και ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He). Όλο το πρόγραμμα διεξήχθη με μέθοδο split (1/60).

Η ταυτοποίηση της αιθανόλης πραγματοποιήθηκε μέσω πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης. Για τη δημιουργία της καμπύλης χρησιμοποιήθηκε καθαρή αιθανόλη (100% κ.ό) σε συγκεντρώσεις των 0.08% κ.ό, 0.05% κ.ό, 0.03% κ.ό, 0.01% κ.ό. και 0.005% κ.ό. Από τις συγκεντρώσεις αυτές καταγράφηκε το εμβαδόν των καμπυλών και δημιουργήθηκε εξίσωση της μορφής  $y=ax$  (Γράφημα 1), μέσω της οποίας έγινε η ποσοτικοποίηση της αιθανόλης στη μάζα των δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά. Ο χρόνος έκλουσης της αιθανόλης όπως έδειξαν τα πρότυπα υπολογίστηκε στα ~2.7-2.8 λεπτά.



Εικόνα 6: Ίνα SPME και τα φιαλίδια



Γράφημα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης (Πρότυπη καμπύλη)

## 2.9 Αξιολόγηση της οσμής

Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος για την εκτίμηση των μεταβολών της οσμής κατά τη διάρκεια της συντήρησης από ομάδα που απαρτιζόταν από τρία άτομα (μέλη του εργαστηρίου). Κάθε μέλος κλήθηκε να συμπληρώσει, για κάθε μεμονωμένο δείγμα, το ειδικό έντυπο για την αξιολόγηση της οσμής που αφορούσε: την ανίχνευση βουτυρώδους και όξινης οσμής με βαθμολογική κλίμακα από 1 έως 3. Οι βαθμολογίες ανώτερες του 2 χαρακτήριζαν το κρέας

απορριπτέο, υποδεικνύοντας το τέλος του χρόνου ζωής του. Ακόμη, οι κριτές κλήθηκαν στην ίδια φόρμα συμπλήρωσης να απαντήσουν στο εάν αντιλαμβανόταν την ύπαρξη ή μη αιθανόλης στο εκάστοτε δείγμα και να συμπληρώσουν πιθανές επιπλέον παρατηρήσεις. Παρόλο που οι κριτές δεν ήταν εκπαιδευμένοι γι' αυτό το σκοπό, το γεγονός ότι ήταν προσωπικό του εργαστηρίου ενίσχυσε την αξιοπιστία της οργανοληπτικής αξιολόγησης, καθώς ήταν όλοι εξοικειωμένοι με οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενδεικτικά της αλλοίωσης του κρέατος.

**ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ**

Ημέρα συντήρησης:  
Θερμοκρασία συντήρησης:

ΟΣΜΗ

1) ΒΟΥΤΥΡΩΔΗΣ

1	1,5	2	2,5	3
Καθόλου				Πολύ

2) ΟΞΙΝΗ

1	1,5	2	2,5	3
Καθόλου				Πολύ

3) ΑΙΘΑΝΟΛΗ: ΝΑΙ/ ΟΧΙ

Τσίπουρο 38% v/v:  
Αιθανόλη 38% v/v:  
Αιθανόλη 70% v/v:

\* >2: απορριπτέο

Παρατηρήσεις:

**Εικόνα 7:** Ενδεικτικό έντυπο οργανοληπτικής αξιολόγησης (οσμής)



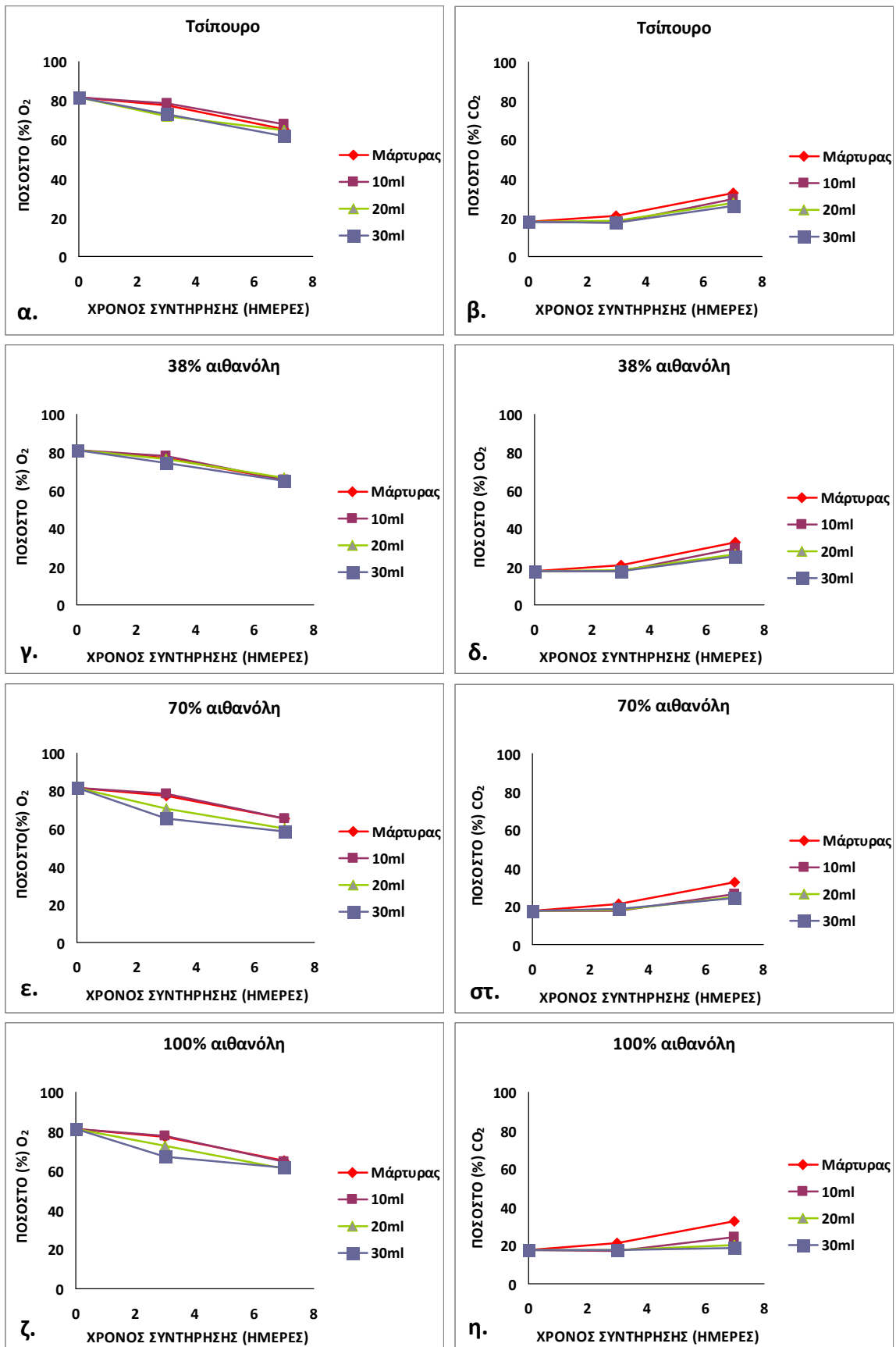
### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### **3.1 ΕΝΟΤΗΤΑ Α: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΟΥ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ, ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΟΥ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ**

##### **3.1.1 1<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία**

###### **3.1.1.1 Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας**

Η σύσταση των αερίων του υπερκείμενου χρόνου μεταβλήθηκε σημαντικά σε όλες τις μεταχειρίσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησης (Γράφημα 1). Τέτοιου είδους μεταβολές μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής αύξησης, της διαπερατότητας του υλικού συσκευασίας και της διαλυτότητας των αερίων στη μάζα του τροφίμου (Esmer et al., 2011). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 1, η συγκέντρωση του O<sub>2</sub> μειώθηκε ενώ η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> αυξήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις κατά την διάρκεια της συντήρησης. Οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στο κρέας, κατά τη φάση της ανάπτυξης τους χρησιμοποιούν το διαθέσιμο O<sub>2</sub> και παράγουν CO<sub>2</sub> ως μεταβολικό προϊόν (Nychas, 1994). Από το Γράφημα 1 φαίνεται ότι στο μάρτυρα, ο ρυθμός αύξησης της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub>, ήταν πιο μεγάλος σε σχέση με τα δείγματα στα οποία είχαν εφαρμοστεί τα αλκοολούχα αποστάγματα, αποτέλεσμα που πιθανόν οφείλεται στην αναστολή της μικροβιακής αύξησης και άρα και τη μικρότερη παραγωγή CO<sub>2</sub>.



**Γράφημα 1:** Μεταβολή της σύστασης των αερίων σε συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά με τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>, με εφαρμογή αλκοολούχων αποσταγμάτων σε απορροφητικό ύφασμα. Τσίπουρο (α. & β.), αιθανόλη 38% κ.ό (γ. & δ.), αιθανόλη 70% κ.ό (ε. & στ.) και αιθανόλη 100% (ζ. & η.) Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.1.1.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η εφαρμογή αλκοολούχων αποσταγμάτων στο απορροφητικό ύφασμα στο κάτω μέρος της συσκευασίας, επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε θερμοκρασία συντήρησης 7°C και τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> σε δείγματα μοσχαρίσιου κιμά (500 g). Από προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί τόσο η καλή αντιμικροβιακή δράση του τσίπουρου και της αιθανόλης όσο και η θετική τους επίδραση επί των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών σε χοιρινό κρέας που συσκευάστηκε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 40% CO<sub>2</sub>: 30% O<sub>2</sub>: 30% N<sub>2</sub> και 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκε στους 4 and 10°C, μέσω των πτητικών ουσιών τους που απελευθερώνονται στον υπερκείμενο χώρο (Karetanakou et al., 2014). Οι περισσότερες μελέτες και εμπορικές χρήσεις ωστόσο, στρέφονται προς την εφαρμογή αντιμικροβιακών παραγόντων μέσω εξάτμισης στον υπερκείμενο χώρο ώστε να αποφευχθούν πιθανές αρνητικές επιδράσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος που μπορεί να προκύψουν μέσω απευθείας επαφής με το τρόφιμο. Παρόλα αυτά, η δράση των αντιμικροβιακών (Τσίπουρο ~38% κ.ό. και αιθανόλη 38% κ.ό, 70% κ.ό και 100% κ.ό) και όλων των προστιθέμενων όγκων που μελετήθηκαν ήταν δραστικότερη στα δείγματα που έρχονταν σε επαφή με το εκάστοτε αντιμικροβιακό (κάτω στρώση) συγκριτικά με τα δείγματα που ελήφθησαν από την επιφάνεια του κιμά (Γράφημα 2). Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται στις αντιμικροβιακές ουσίες που δρουν μέσω εξάτμισης και μετανάστευσης στη μάζα του κιμά λόγω της επαφής. Αναφορικά με την OMX, ο μάρτυρας είχε φτάσει τους 8.2 log CFU/ g την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης (μικροβιολογικός χρόνος ζωής: 7- 7.5 log CFU/ g) στην πάνω στρώση του κιμά ενώ στα δείγματα με μεταχείριση οι διαφορές με το μάρτυρα ήταν ≤ 1.2 log CFU/ g. Την ίδια ημέρα, στην κάτω στρώση του κιμά οι διαφορές με το μάρτυρα κυμαινόταν από 1.2- 2.8 log CFU/ g (Γράφημα 2). Σύμφωνα με τα γραφήματα παρατηρείται μεγαλύτερη αναστολή, όσο αυξανόταν ο όγκος της αιθανόλης στις μεταχειρίσεις από 10 σε 30 mL, αλλά και όσο αυξανόταν το ποσοστό της αιθανόλης από 38% σε 100% κ.ό.. Πράγματι σε μικροβιολογικό επίπεδο η πιο δραστική εφαρμογή ήταν αυτή των 30mL καθαρής αιθανόλης (100% κ.ό) (Γράφημα 2, ζ., η.). Τα παραπάνω επιβεβαιώνουν οι μετρήσεις, της 3<sup>ης</sup> ημέρας συντήρησης όπου όταν εφαρμόστηκε όγκος 30 mL οι πληθυσμοί της OMX στην κάτω στρώση του κιμά, ακολούθησαν την εξής σειρά: μάρτυρας (8.2 log CFU/ g) >

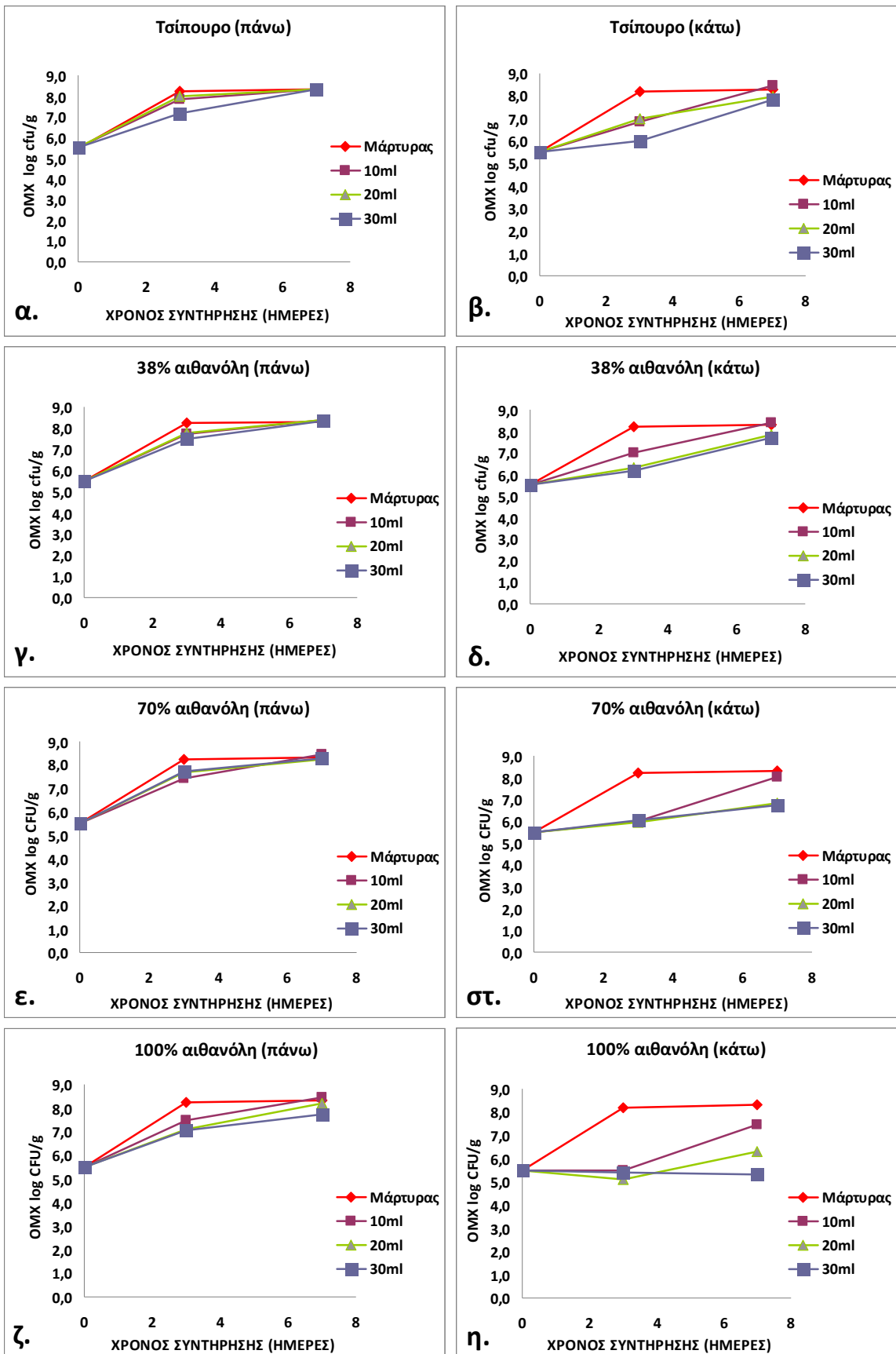
αιθανόλη 38% κ.ό.(6.2 log CFU/ g) > Τσίπουρο (6 log CFU/ g) > αιθανόλη 70% κ.ό (6 log CFU/ g) > αιθανόλη 100% κ.ό (5.4 log CFU/ g). (Γράφημα 2, β., δ., στ., η.).

Από τις 4 ομάδες μικροοργανισμών που μελετήθηκαν σε αυτή τη φάση, κυριάρχησαν σε όλες τις μεταχειρίσεις αλλά και το μάρτυρα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια μαζί με τον *B. thermosphacta*, φτάνοντας στο μάρτυρα σε πληθυσμούς της τάξης των 7.7 log CFU/ g και 7.1 log CFU/ g, αντίστοιχα την 7<sup>η</sup> μέρα συντήρησης (Γράφημα 3 και 4). Ακολουθούν οι ψευδομονάδες με πληθυσμούς της τάξης των περί τους 5.5 log CFU/ g την 7<sup>η</sup> συντήρησης (Γράφημα 5). Η κυριαρχία του *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο κρέας (βοδινό, χοιρινό, αρνί ή πουλερικά) που συντηρείται υπό κενό ή ατμόσφαιρες εμπλουτισμένες με CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες (Church et al. 1995, Nychas & Drosinos, 1998). Σε νωπό βοδινό κρέας, συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 40% CO<sub>2</sub>/30% N<sub>2</sub>/ 30% O<sub>2</sub> καθυστέρησε ή ανέστειλε την ανάπτυξη των ψευδομονάδων και ευνόησε την ανάπτυξη του *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Skandamis & Nychas, 2002). Κυριαρχία των δύο τελευταίων ομάδων παρατηρήθηκε και σε αρνί που συσκευάστηκε σε 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> στους 0°C (Sheridan et al. 1997) και τεμάχια χοιρινού κρέατος στην ίδια ατμόσφαιρα συσκευασίας στους 4°C (Karetanakou et al. 2014).

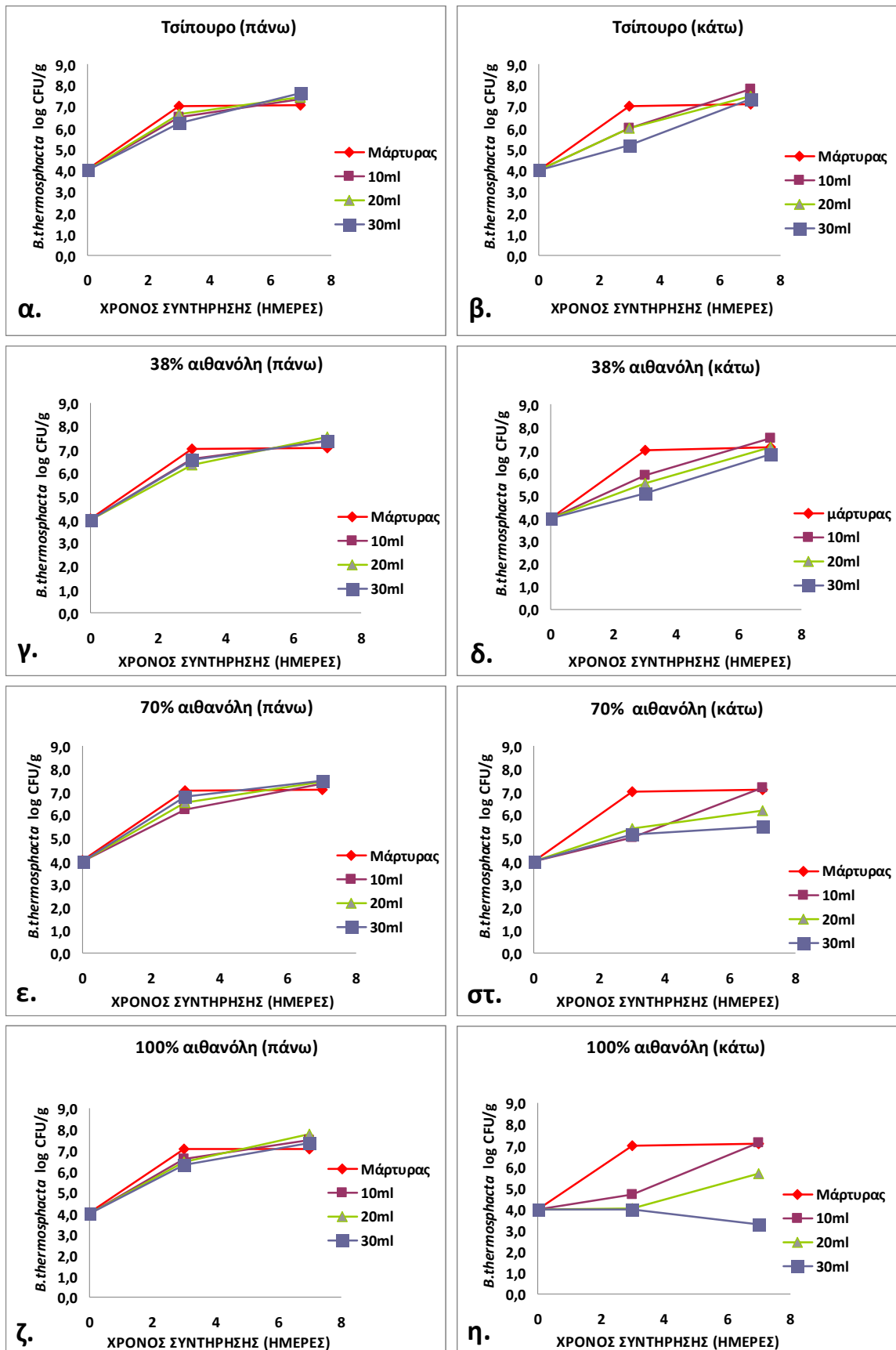
Στον *B. thermosphacta*, ο μάρτυρας έφτασε τους 7 log CFU/ g την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. Στο πάνω μέρος του κιμά, όλες οι μεταχειρίσεις, σε όλους τους όγκους έφτασαν τους 7 log CFU/ g περί την 7<sup>η</sup> μέρα συντήρησης (Γράφημα 3,α.,γ.,ε., ζ.) όπως και στο κάτω μέρος του κιμά, το τσίπουρο και η αιθανόλη 38% κ.ό σε όλους τους όγκους, την 7<sup>η</sup> μέρα είχαν φτάσει ή ξεπεράσει τους 7 log CFU/ g (Γράφημα 3, β., δ.). Εξάιρεση αποτέλεσαν οι εφαρμογές 70% αιθανόλης (20 και 30 mL) και 100% αιθανόλης (20 και 30 mL) που την ίδια μέρα είχαν φτάσει σε τιμές μόλις 6.2 log CFU/ g και 5.5 log CFU/ g για τους αντίστοιχους όγκους 70% αιθανόλης και 5.7 log CFU/ g και 3.3 log CFU/ g για τους αντίστοιχους όγκους 100% αιθανόλης (Γράφημα 3, στ., η.). Από τα γραφήματα φαίνεται ότι παρόμοια τάση με τον *B. thermosphacta*, είχαν και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, με μεταχειρίσεις να ξεχωρίζουν και εδώ λόγω της καλύτερης ανασταλτικής τους δράσης, αυτές των 70% αιθανόλης (20 και 30 mL) και 100% αιθανόλης (20 και 30 mL) (Γράφημα 4). Τα παραπάνω αποτελέσματα που αφορούν τους κυρίαρχους μικροοργανισμούς που ευθύνονται για την αλλοίωση, συμφωνούν με τα αποτελέσματα της OMX και υποδεικνύουν ότι όλες οι εφαρμογές αλκοολούχων αποσταγμάτων συμβάλλουν στην

αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης και κατ' επέκταση στην επέκταση του χρόνου ζωής. Οι εφαρμογές του τσίπουρου και της 38% αιθανόλης κ.ό., λόγω χαμηλότερου ποσοστού αιθανόλης χαρακτηρίστηκαν από πιο ήπια δράση, ενώ οι εφαρμογές της αιθανόλης (70% κ.ό και 100 κ.ό. ανέστειλαν ή και παρεμποδίζουν πλήρως την ανάπτυξη.

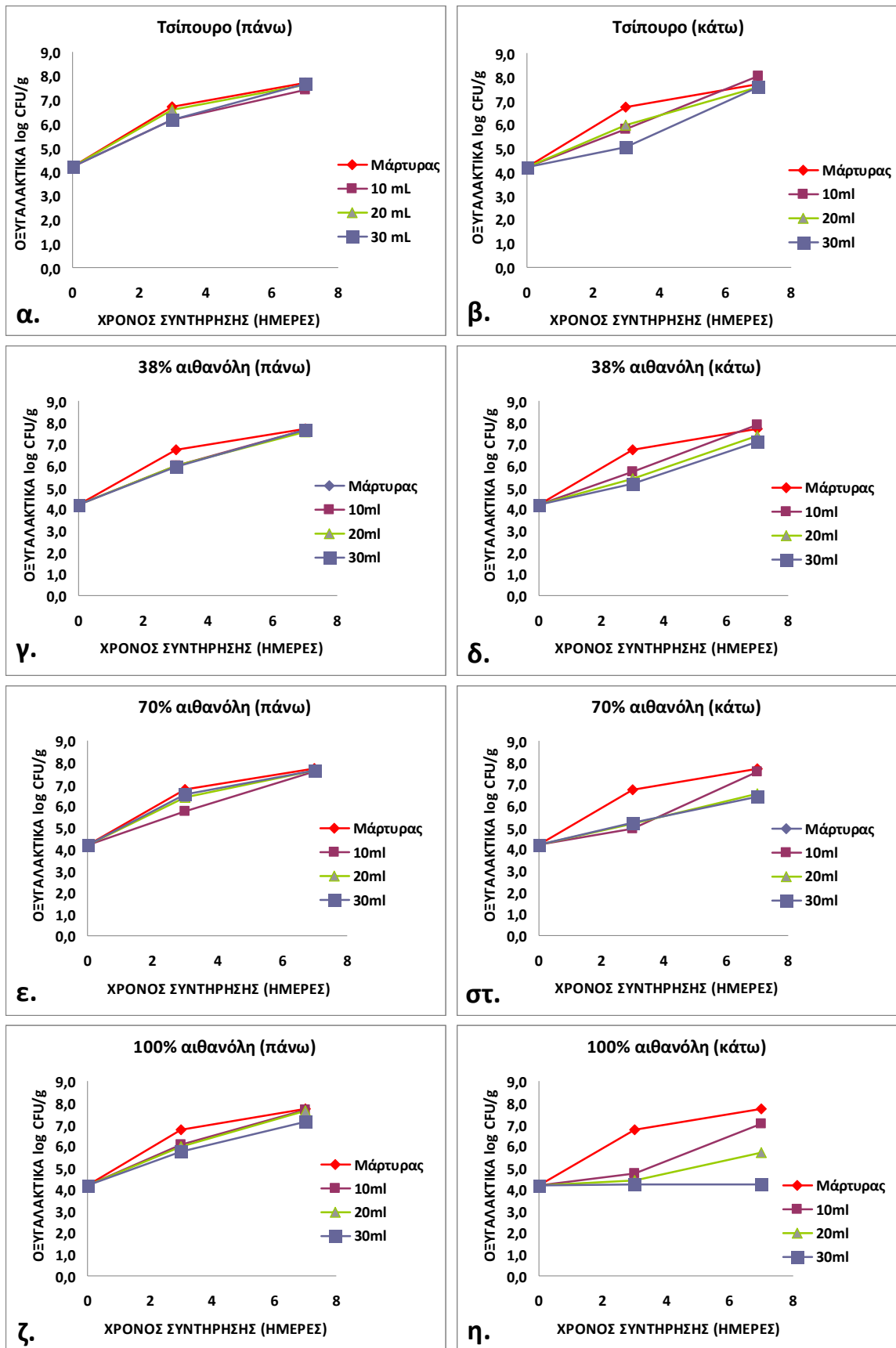
Οι ψευδομονάδες, κατά τη διάρκεια της συντήρησης (7 ημέρες) δεν ξεπέρασαν τους 5.5 log CFU/g ενώ η αναστολή στην ανάπτυξη των ψευδομονάδων ενισχύεται με την εφαρμογή των αλκοολούχων αποσταγμάτων σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Γράφημα 5). Συγκεκριμένα μετά από 7 μέρες συντήρησης στους 7°C στην TA 80% O<sub>2</sub> : 20% CO<sub>2</sub> παρατηρήθηκε πως το τσίπουρο και οι διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης που εφαρμόστηκαν διατήρησαν χαμηλά τα επίπεδα των ψευδομονάδων κυρίως στην κάτω στρώση του κιμά, σε 3 log CFU/ g έως 4.5 log CFU/ g την ίδια στιγμή που ο μάρτυρας παρουσίασε πληθυσμούς 5.3 log CFU/ g (Γράφημα 5, β., δ., στ. ,η.) Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της μεταβολής του pH, όπου η μείωση ήταν μικρή (από 5.83 έφτασε κατά τη διάρκεια της συντήρησης έως 5.34) και τον μάρτυρα να ξεχωρίζει από τα δείγματα που είχαν εφαρμοστεί αλκοολούχα αποστάγματα λόγω του ταχύτερου ρυθμού μείωσης του pH από 5.83 σε 5.36 (τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται).



**Γράφημα 2:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης της OMX σε μοσχαρίσιο κιμά (500g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (10, 20, 30 ml) τσίπουρου (α,β), 38% αιθανόλης κ.ό (γ,δ) 70% αιθανόλης κ.ό (ε,στ) και 100% αιθανόλης κ.ό (ζ,η). Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

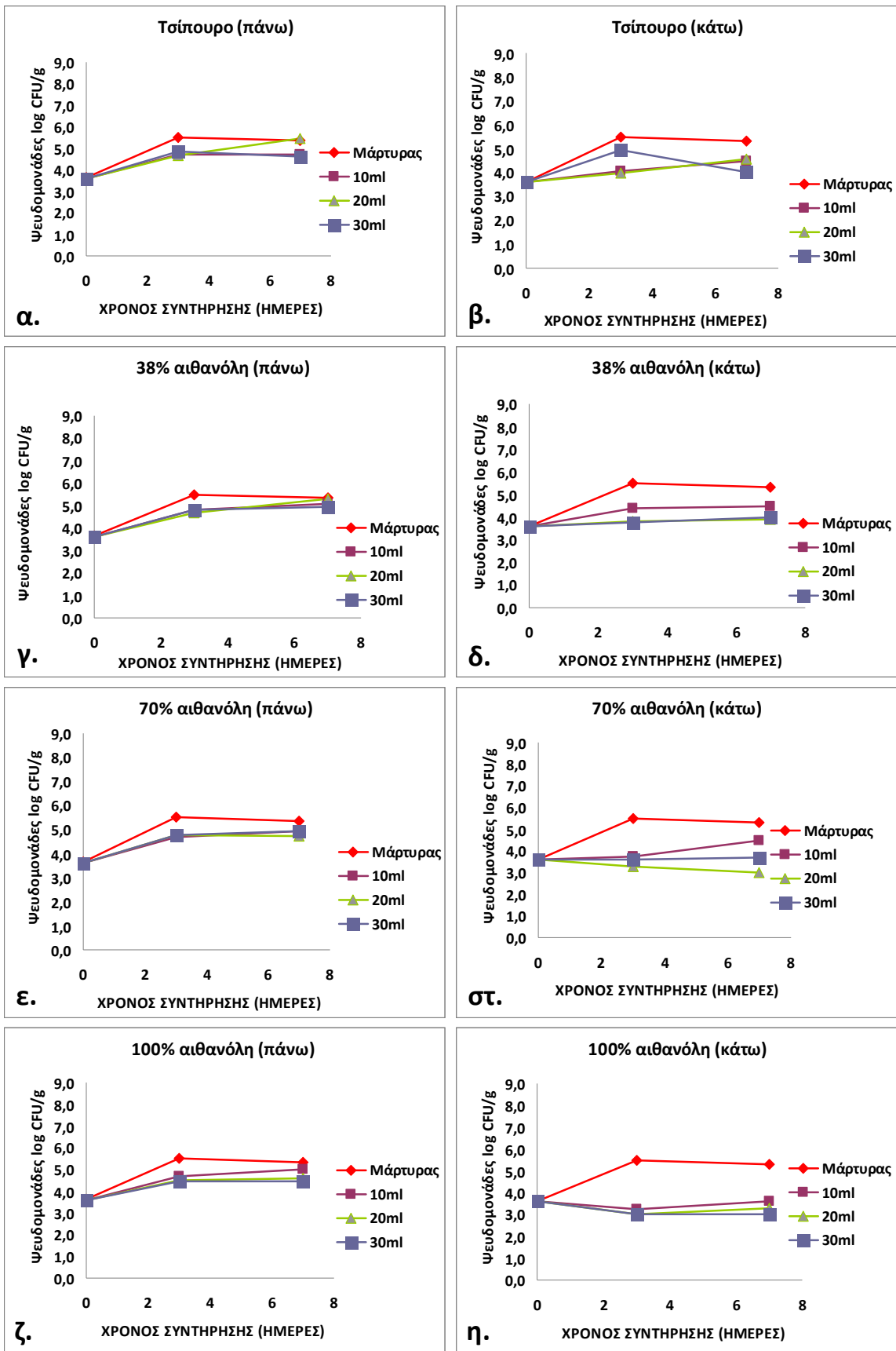


**Γράφημα 3:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης του *B. thermosphacta* σε μοσχαρίσιο κιμά (500g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (10, 20, 30 ml) τσίπουρου (α,β), 38% αιθανόλης κ.ό (γ,δ) 70% αιθανόλης κ.ό (ε, στ) και 100% αιθανόλης κ.ό (ζ, η). Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 4:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά (500g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (10, 20, 30 ml) τσίπουρου (α,β), 38% αιθανόλης κ.ό (γ,δ), 70% αιθανόλης κ.ό (ε,στ) και 100% αιθανόλης κ.ό (ζ,η). Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

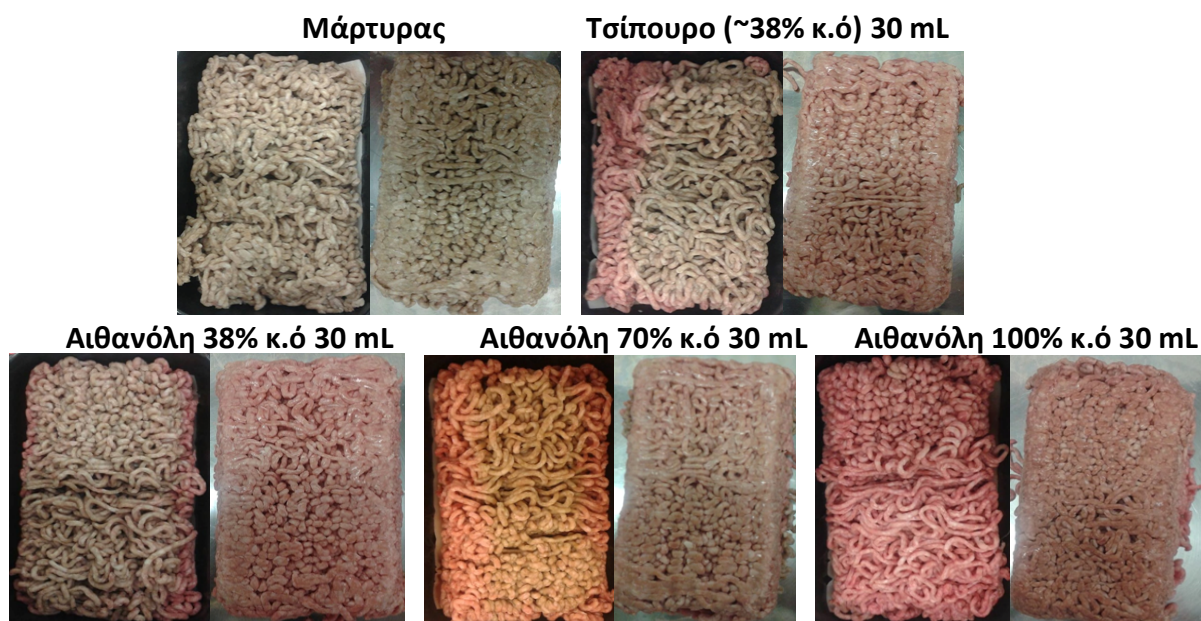




**Γράφημα 5:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των ψευδομονάδων σε μοσχαρίσιο κιμά (500g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (10, 20, 30 mL) τσίπουρου (α,β), 38% αιθανόλης κ.ό (γ,δ), 70% αιθανόλης κ.ό (ε, στ) και 100% αιθανόλης κ.ό (ζ, η). Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.1.1.3 Οπτική παρατήρηση δειγμάτων

Κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων η οπτική παρατήρηση, έδειξε αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που ερχόταν σε επαφή με το απορροφητικό ύφασμα στο οποίο είχαν εφαρμοστεί τα αλκοολούχα αποστάγματα και σε αυτά του μάρτυρα. Την 3<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης παρατηρήθηκε στην κάτω στρώση του κιμά, μια μικρή απώλεια της ερυθρότητας του. Ωστόσο την 7<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης όπου οι μάρτυρες ήταν απορριπτέοι οργανοληπτικά λόγω της συνολικής τους εμφάνισης, τα δείγματα με μεταχείριση διατηρούσαν ένα ροζ χρωματισμό στην κάτω στρώση. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την πιθανότητα ότι η άμεση επαφή με το απορροφητικό ύφασμα στο οποίο είχαν εφαρμοστεί τα αλκοολούχα αποστάγματα επέδρασε θετικά σε ότι αφορά το χρώμα, μέσω μετανάστευσης (διάχυσης) στη μάζα του προϊόντος. Επιπλέον στην άνω στρώση του κιμά, στα δείγματα του τσίπουρου και της αιθανόλης 38% και 70% κ.ό, παρατηρήθηκε ότι κυρίως τα πλαϊνά σημεία έφεραν ροζ χρωματισμό, που πιθανότατα οφείλεται σε πτητικές ουσίες των αλκοολούχων αποσταγμάτων που κατάφεραν να φτάσουν στο πάνω μέρος της συσκευασίας μέσω εξάτμισης (εικόνα 1). Η τελευταία παρατήρηση υπέδειξε ότι το χρώμα του κιμά θα μπορούσε να διατηρηθεί σε καλύτερα επίπεδα (στην πάνω στρώση του κιμά) με την ενίσχυση της δράσης των πτητικών της αιθανόλης.



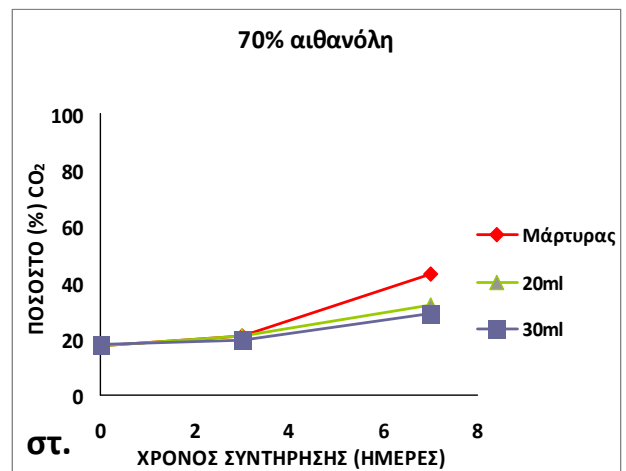
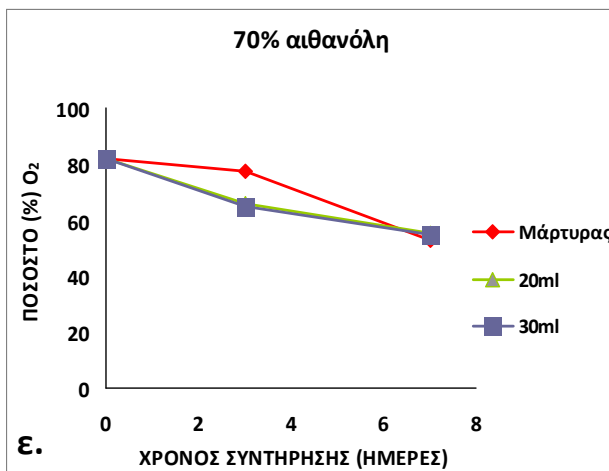
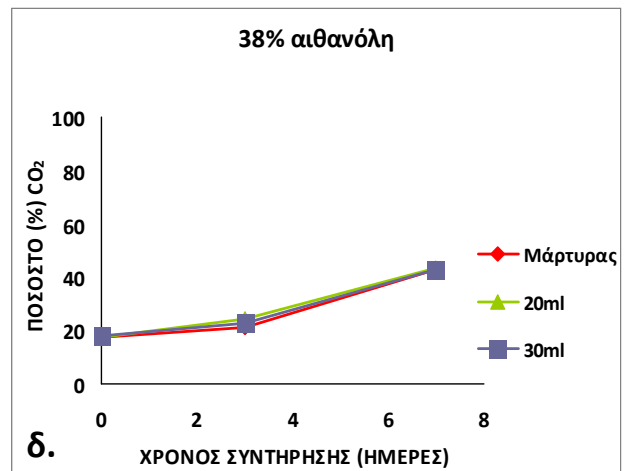
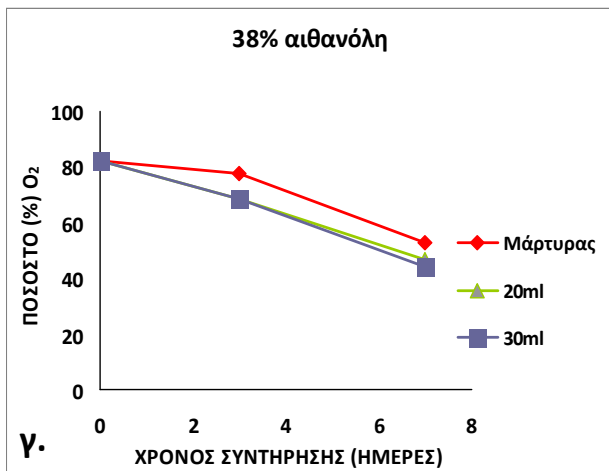
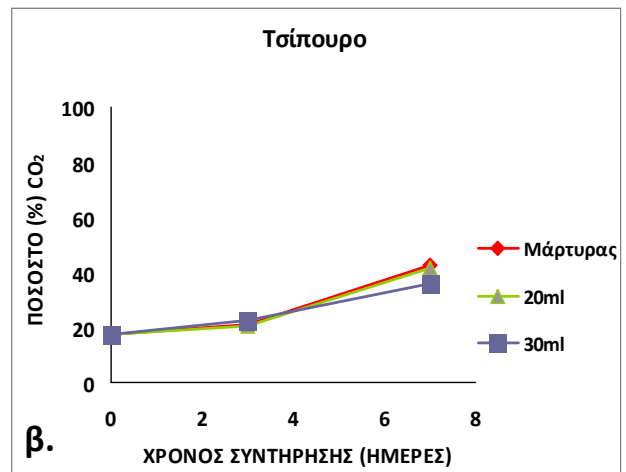
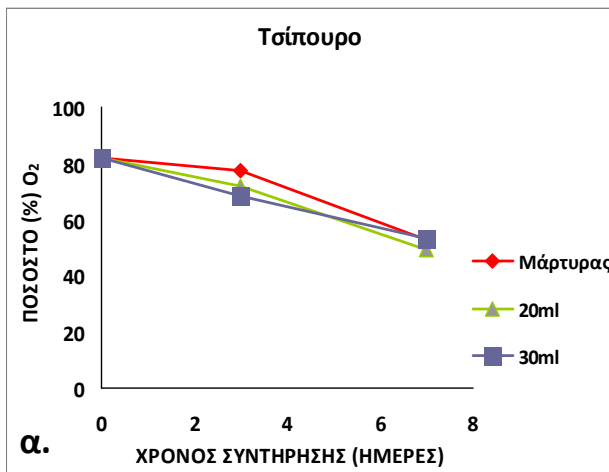
**Εικόνα 1:** Ενδεικτική οπτική παρατήρηση δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά (500 g), μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 7°C. Στην εικόνα φαίνεται ανά μεταχείριση η άνω (αριστερά) και κάτω (δεξιά) στρώση του συσκευασμένου κιμά. Στα δείγματα είχαν εφαρμοστεί 30 mL αντίστοιχου αλκοολούχου αποστάγματος σε απορροφητικό ύφασμα που τοποθετήθηκε στη βάση της συσκευασίας. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Συνολικά για την 1<sup>η</sup> μελετώμενη συσκευασία, η αιθανόλη 100% κ.ό. παρουσίασε την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση, και ακολούθησε η αιθανόλη 70% κ.ό, το τσίπουρο και η αιθανόλη 38% κ.ό. Οι δύο τελευταίες μεταχειρίσεις έδειξαν να έχουν παρόμοια επίδραση στο χρόνο ζωής του μοσχαρίσιου κιμά, με μικρές μόνο διαφοροποιήσεις οι οποίες μπορεί να οφείλονται στα επιπλέον συστατικά του τσίπουρου πέραν της αιθανόλης. Επίσης ο όγκος των 10 mL είχε τη μικρότερη επίδραση στην αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών εν συγκρίσει με τα 20 και 30 mL σε όλα ανεξαρτήτως τα αλκοολούχα αποστάγματα. Ωστόσο η προσθήκη καθαρής αιθανόλης (100% κ.ό) σε εμπορικές συσκευασίες μπορεί να αντιμετωπισθεί με καχυποψία από τους καταναλωτές. Μια εναλλακτική για τη βελτιστοποίηση της χρήσης της αιθανόλης είναι η επιλογή αραιότερων διαλυμάτων σε συνδυασμό με υψηλότερο εφαρμοζόμενο όγκο. Το τσίπουρο, το οποίο θεωρείται ηπιότερο αντιμικροβιακό και η 70% κ.ό. αιθανόλη παρουσίασαν ικανοποιητική επίδραση τόσο σε μικροβιολογικό επίπεδο, όσο και σε οργανοληπτικό (χρώμα) που θα μπορούσε να βελτιωθεί πιθανόν με τροποποίηση της συσκευασίας. Τα παραπάνω, οδήγησαν στο σχεδιασμό της 2<sup>ης</sup> μελετώμενης συσκευασίας, όπου χρησιμοποιήθηκαν ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, τσίπουρο, και αιθανόλη 38% και 70% κ.ό. σε όγκους 20 και 30 mL στο απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας και 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα σε απορροφητικό ύφασμα που επικολλήθηκε στη μεμβράνη συσκευασίας (κάτω από την ετικέτα) με απώτερο στόχο τη βελτίωση της διατήρησης της ερυθρότητας του συσκευασμένου μοσχαρίσιου κιμά και την αναστολή της μικροβιακής ανάπτυξης μέσω της επιπρόσθετης δράσης των πτητικών της αιθανόλης που θα απελευθερώνονται στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας και από την εφαρμογή του δεύτερου απορροφητικού υφάσματος.

### 3.1.2 2<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία

#### 3.1.2.1 Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας

Η σύσταση των αερίων του υπερκείμενου χρόνου, άλλαξε σημαντικά σε όλες τις συσκευασίες τροποποιημένης ατμόσφαιρας κατά τη διάρκεια της συντήρησης (Γράφημα 6). Πολλοί παράγοντες μπορεί να σχετίζονται και να επηρεάζουν τις μεταβολές αυτές στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας, όπως η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, οι ιδιότητες του υλικού συσκευασίας και η διαλυτότητα των αερίων (Esmer et al., 2011). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 6, η συγκέντρωση του O<sub>2</sub> μειώθηκε ενώ η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> αυξήθηκε σε όλες τις μεταχειρίσεις. Αντίστοιχες τάσεις μεταβολής των αερίων, έχουν αναφερθεί και σε άλλες μελέτες. Συγκεκριμένα, σε δείγματα χοιρινού κιμά που συσκευάστηκαν με μεμβράνη χαμηλής διαπερατότητας, και συντηρήθηκαν στους 0°C, το ποσοστό του CO<sub>2</sub> αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε το ποσοστό του O<sub>2</sub> και το φαινόμενο αυτό εξελισσόταν πιο γρήγορα όσο αυξανόταν η θερμοκρασία (Koutsoumanis et al. 2008). Μείωση της συγκέντρωσης του O<sub>2</sub> και αύξηση του CO<sub>2</sub> παρατηρήθηκε και σε δείγματα μοσχαρίσιου κιμά συσκευασμένου σε διαφορετικούς τύπους τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Esmer et al., 2011), σε πρόβειο κρέας που συσκευάστηκε σε διαφορετικές ατμόσφαιρες (Kennedy et al., 2004) ενώ όπως έχει αναφερθεί από τους O' Grady et al. (2000), οι σχετικές μεταβολές των αερίων εντός της συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας ήταν μεγαλύτερες σε χαμηλότερα επίπεδα O<sub>2</sub>. Στους μάρτυρες, η αύξηση του ποσοστού CO<sub>2</sub>, ήταν ταχύτερη και μεγαλύτερη σε σχέση με τα δείγματα στα οποία είχαν εφαρμοστεί τα αλκοολούχα αποστάγματα γεγονός που αναμφισβήτητα συνδέεται με την μικροβιακή ανάπτυξη η οποία αναστέλλεται με την εφαρμογή των τελευταίων. Οι Jakobsen & Bertelsen (2002) ανέφεραν ότι θα ήταν αναμενόμενη η παρατήρηση μείωσης του CO<sub>2</sub>, λόγω της απορρόφησης του από τη μάζα του κρέατος, ωστόσο δεν γίνεται φανερό λόγω της ανάπτυξης των μικροοργανισμών που καταναλώνουν το O<sub>2</sub> και παράγουν CO<sub>2</sub> ως μεταβολικό προϊόν. Τα παραπάνω αποτυπώνονται στο γράφημα 6 (στ.), όπου ο μάρτυρας την τελευταία μέρα συντήρησης έφτασε το 42% CO<sub>2</sub>, ενώ οι εφαρμογές των 20 και 30 mL έφτασαν το 32 και 28.8% αντίστοιχα (αιθανόλη 70% κ.ό.).



**Γράφημα 6:** Μεταβολή της σύστασης των αερίων σε συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά με τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>, με εφαρμογή αλκοολούχων αποσταγμάτων σε απορροφητικό ύφασμα στο κάτω μέρος της συσκευασίας και ένα επιπλέον απορροφητικό στρώμα με 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα που εφαρμόστηκε κάτω από την ετικέτα. Τσίπουρο (α. και β.), αιθανόλη 38% κ.ό (γ. και δ.), αιθανόλη 70% κ.ό (ε. και στ.). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.1.2.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η εφαρμογή αλκοολούχων αποσταγμάτων στο απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας επηρεάζει και στο συγκεκριμένο τύπο μελετώμενης συσκευασίας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε μοσχαρίσιο κιμά που συντηρήθηκε σε θερμοκρασία 7°C και τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Ωστόσο η προσθήκη 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα σε απορροφητικό ύφασμα που επικολλήθηκε στη μεμβράνη συσκευασίας κάτω από την ετικέτα, δε συνέβαλε σημαντικά στη μικροβιακή αναστολή στην πάνω στρώση του κιμά (Γράφημα 7).

Οι διαφορές στην αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και συγκεκριμένα της OMX μεταξύ της πάνω και της κάτω στρώσης του κιμά δεν ήταν τόσο εμφανείς σε αυτή τη φάση, στο τσίπουρο (~38% κ.ό) και την αιθανόλη 38% κ.ό. ενώ στην αιθανόλη 70% κ.ό. παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αναστολή στην κάτω στρώση του κιμά (Γράφημα 7). Συγκεκριμένα στην αιθανόλη 70% κ.ό., την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης, όταν ο μάρτυρας είχε φτάσει τους 7.7 log CFU/ g οι μετρήσεις από τα δείγματα της πάνω στρώσης ήταν 7.4 log CFU/ g (20 mL) και 6.7 log CFU/ g (30 mL), ενώ της κάτω στρώσης ήταν 6.3 (20 mL) και 5.7 (30 mL) αντίστοιχα (Γράφημα 7,ε.,στ.).

Και σε αυτή την πειραματική εφαρμογή, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανασταλτική δράση κατά την ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, όσο αυξανόταν ο όγκος του αλκοολούχου αποστάγματος που εφαρμοζόταν, ενώ η πιο ισχυρή εφαρμογή ήταν η αιθανόλη 70% κ.ό., η οποία έχει και το μεγαλύτερο ποσοστό αιθανόλης σε σχέση με τις άλλες δύο μεταχειρίσεις. Χαρακτηριστικά, στο γράφημα 7 (β., δ., στ.), φαίνονται οι μετρήσεις στην OMX, στην κάτω στρώση του κιμά, την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης να είναι: Μάρτυρας 7.6 log CFU/ g > αιθανόλη 38% κ.ό. (30 mL) 7 log CFU/ g > τσίπουρο (30 mL) 6,3 log CFU/ g > αιθανόλη 70% κ.ό. (30 mL) 7 log CFU/ g. Επιπλέον, στο γράφημα 7 (α.,β.,γ.,δ) καταγράφεται ότι το τσίπουρο είχε λίγο καλύτερη επίδραση στην αναστολή των βακτηρίων απ' ό τι η αιθανόλη 38% κ.ό. παρόλο που έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε αιθανόλη.

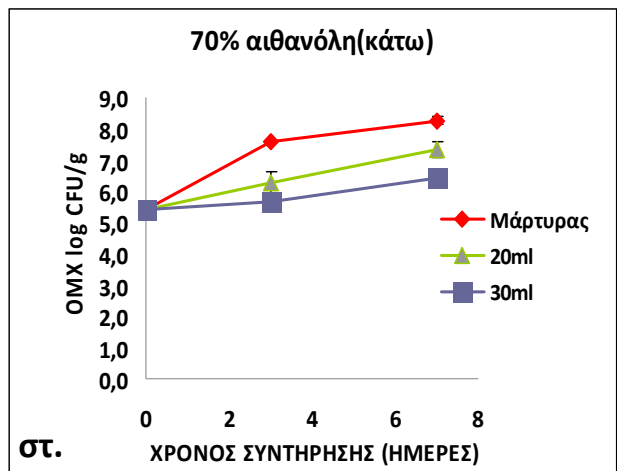
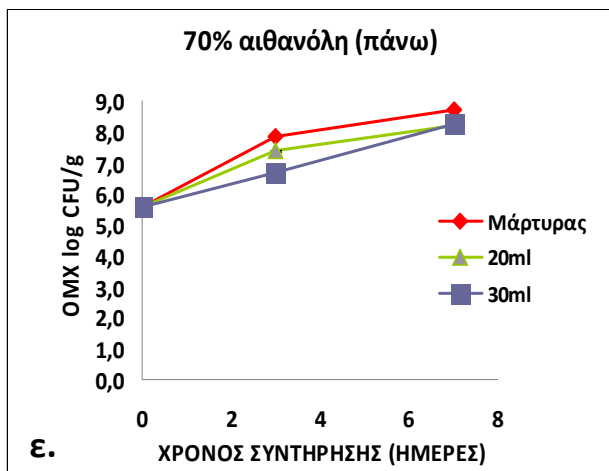
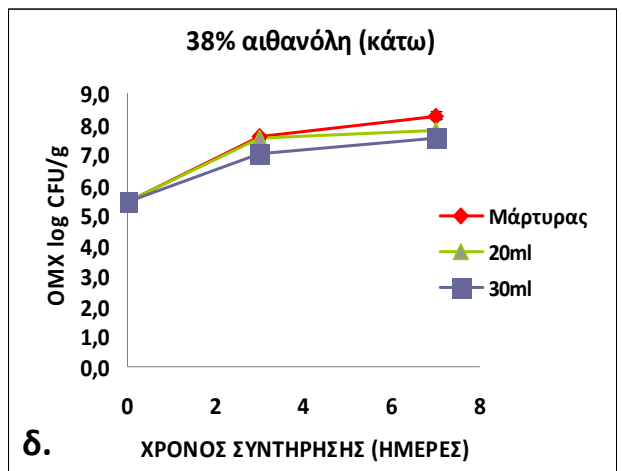
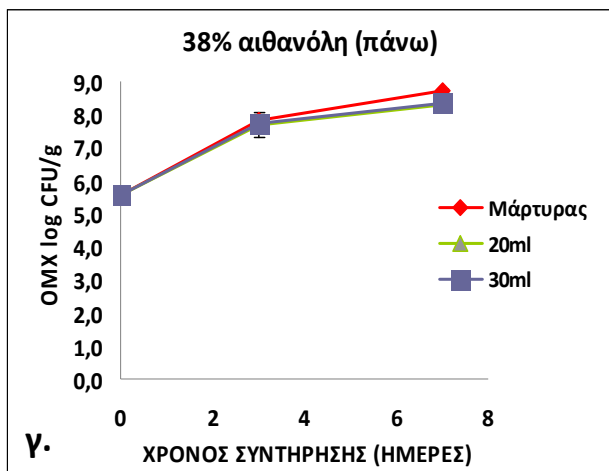
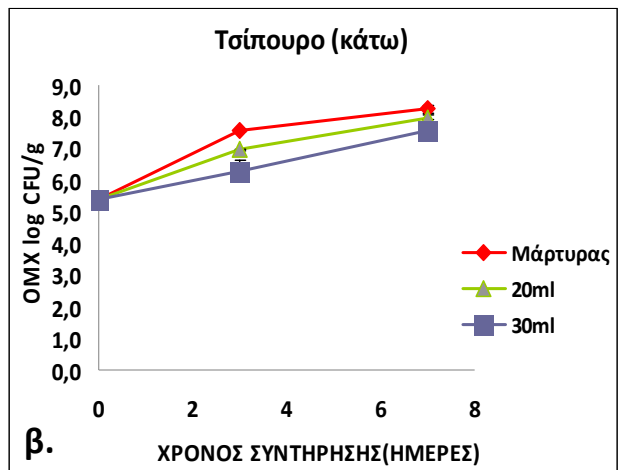
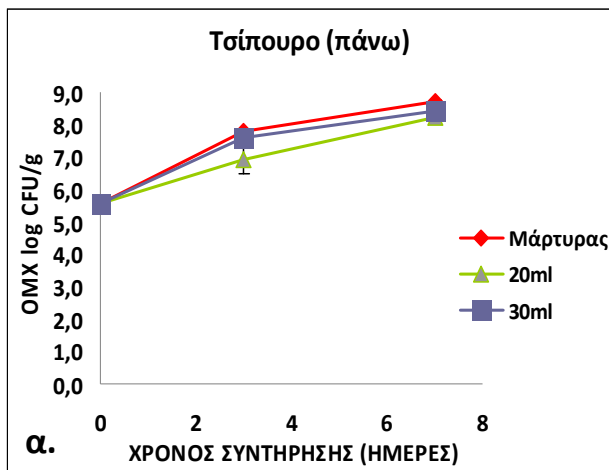
Από τις 4 ομάδες που μελετήθηκαν, κυρίαρχος μικροοργανισμός βρέθηκε να είναι όπως και στην 1<sup>η</sup> μελετώμενη συσκευασία ο *B.thermosphacta* και να ακολουθούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, με τους πληθυσμούς να φτάνουν την 7<sup>η</sup> μέρα τους 8- 8.4 log CFU/g (Γράφημα 8) και 6.8- 7.2 log CFU/g αντίστοιχα (Γράφημα 9). Τα αποτελέσματα της κινητικής της μικροβιακής αύξησης της OMX φαίνεται να επιβεβαιώνουν τα

παραπάνω. Σε χαμηλότερα επίπεδα και με μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης ακολουθούν οι ψευδομονάδες (Γράφημα 10). Αναφορικά με τον *B. thermosphacta*, ο μάρτυρας παρουσίασε πληθυσμούς περί τους 7.5 log CFU/ g την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης, ενώ στα δείγματα που υπήρχαν αλκοολούχα αποστάγματα παρουσίασε λογαρίθμους της τάξης των 7 log CFU/ g, την 7<sup>η</sup> μέρα συντήρησης ή και αργότερα (γράφημα 8). Συγκεκριμένα στον όγκο των 30 mL οι πληθυσμοί στην κάτω στρώση του κιμά την 3<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης ήταν οι εξής: 7.4 log CFU/ g (Μάρτυρας) > 6.9 log CFU/ g (αιθανόλη 38% κ.ό) > 6.1 log CFU/ g ,(τσίπουρο) > 5.3 log CFU/g (αιθανόλη 70%).

Οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων με την εφαρμογή τσίπουρου και αιθανόλης 38% κ.ό. δε σημείωσαν σημαντική αναστολή σε σχέση με το μάρτυρα (Γράφημα 9, α., β., γ., δ.). Εξαιρέση αποτέλεσε η εφαρμογή αιθανόλης 70% κ.ό. Συγκεκριμένα την 3<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης ο μάρτυρας είχε φτάσει τους 5,8 log CFU/g, ενώ τα δείγματα με αιθανόλη βρισκόταν στους 5 log CFU/g και 4.4 log CFU/g με την εφαρμογή 20 και 30 mL αντίστοιχα, στο απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας (Γράφημα 9, ε., στ.)

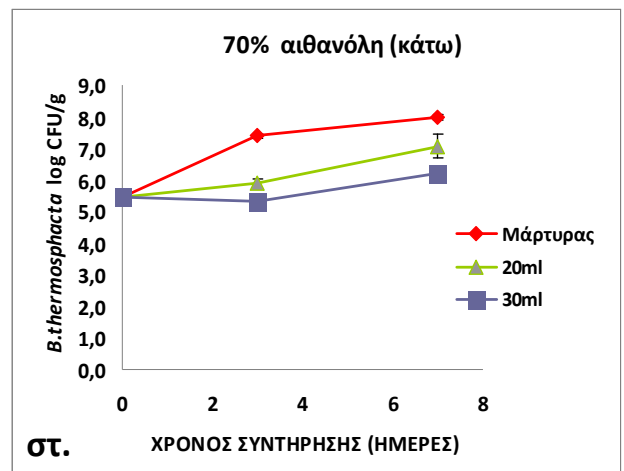
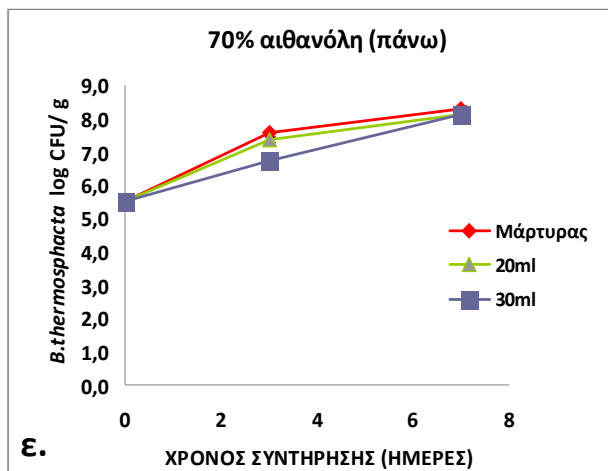
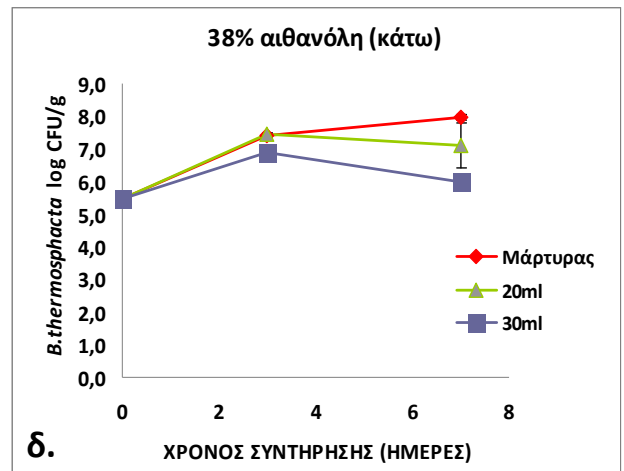
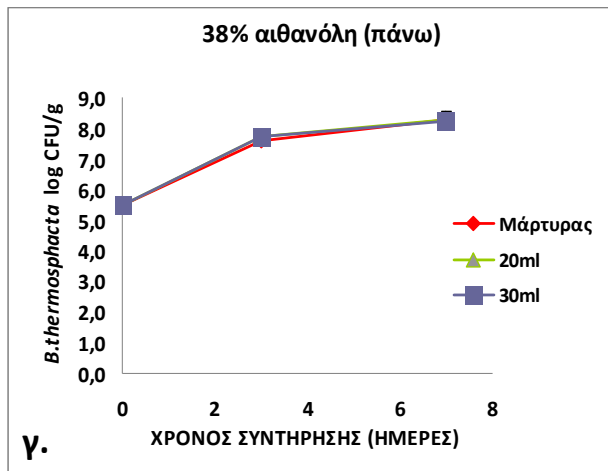
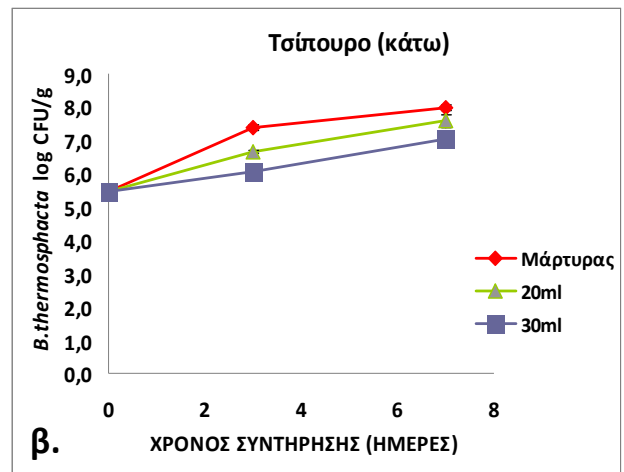
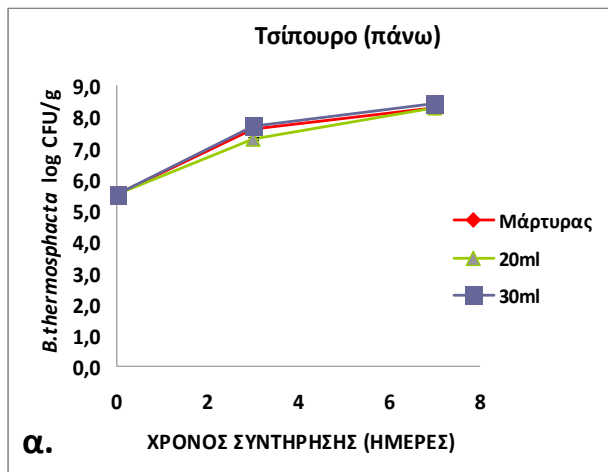
Ο αρχικός πληθυσμός των ψευδομονάδων σε αυτή την παρτίδα μοσχαρίσιου κιμά που παραλήφθηκε ήταν σχετικά υψηλός, με τιμή ~ 5 log CFU/g (Γράφημα 10). Μέχρι την 7<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης παρουσίασαν μια ανάπτυξη της τάξης του 1.5 log CFU/ g στο μάρτυρα (με μεγαλύτερους πληθυσμούς κυρίως στα δείγματα που παρελήφθησαν από την κάτω στρώση του κιμά). Στα δείγματα που είχαν εφαρμοστεί αλκοολούχα αποστάγματα, οι πληθυσμοί δεν ξεπέρασαν τους 5.8 log CFU/ g, πράγμα που επιβεβαιώνει ότι τα τελευταία επηρεάζουν και αναστέλλουν την ανάπτυξη των ψευδομονάδων (Γράφημα 10).

Τα αποτελέσματα της μεταβολής του pH έρχονται σε συμφωνία με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα. Η μείωση στο pH ήταν μικρή, ενδεικτικά αναφέρεται η μεταβολή από 5.89 έως 5.55 στην εφαρμογή 30 mL τσίπουρου κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ο μάρτυρας χαρακτηρίστηκε από ταχύτερο ρυθμό μείωσης του pH σε σχέση με τα δείγματα που είχαν εφαρμοστεί τα αλκοολούχα αποστάγματα, σε όλους τους όγκους, μέχρι την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης (Τα αποτελέσματα δεν παρατίθενται).

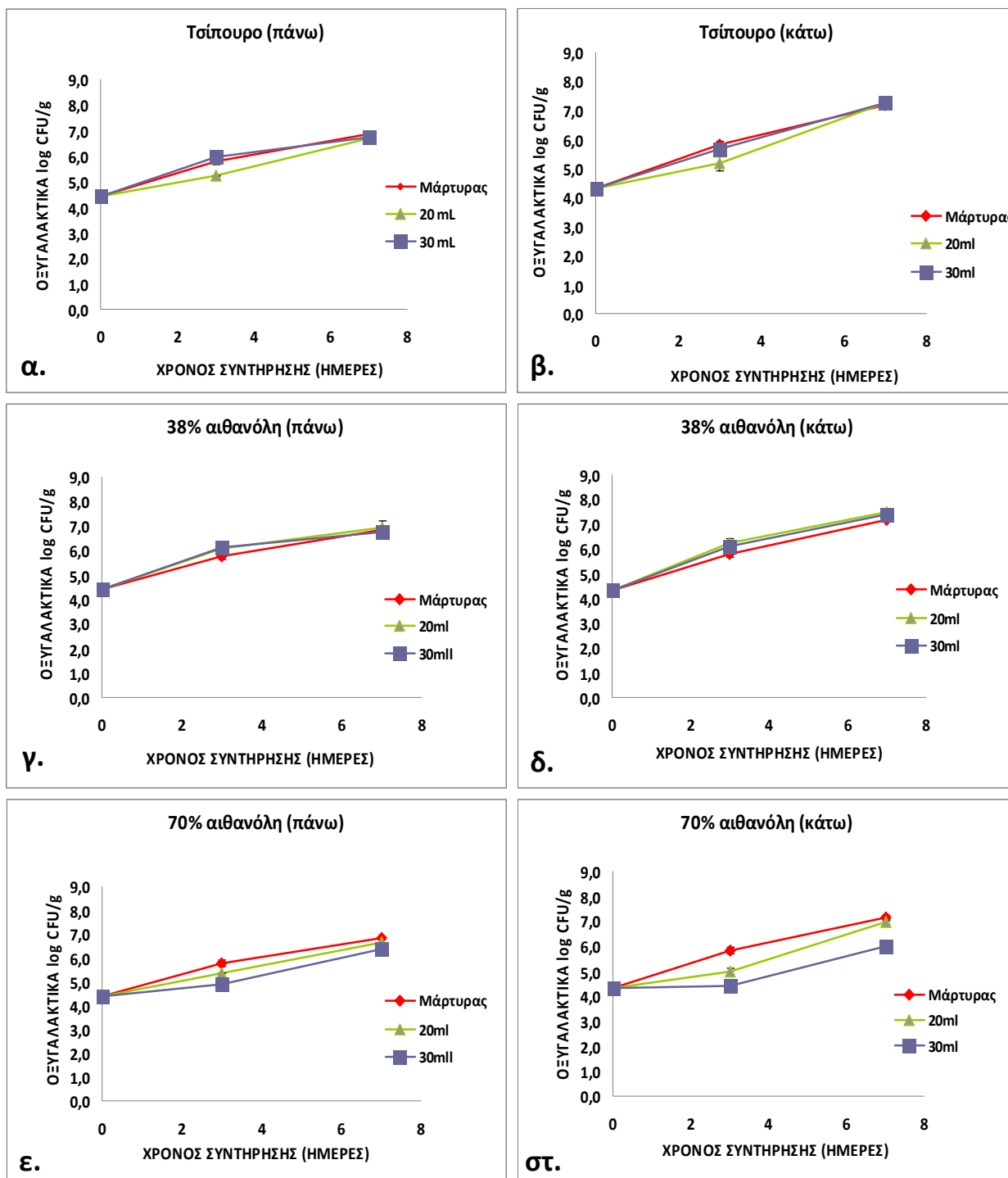


**Γράφημα 7:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης της Ολικής μικροβιακής χλωρίδας (OMX) σε μοσχάρισιο κιμά (500 g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (20, 30 mL) τσίπουρου (**α,β**), 38% αιθανόλης κ.ό (**γ,δ**) και αιθανόλης 70% κ.ό (**ε,στ**). Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχάρισιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

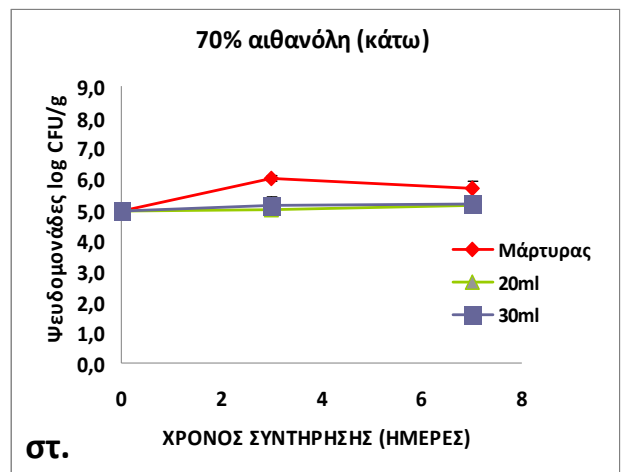
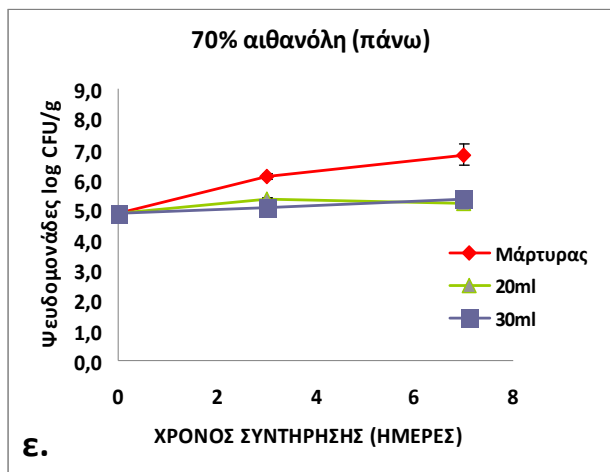
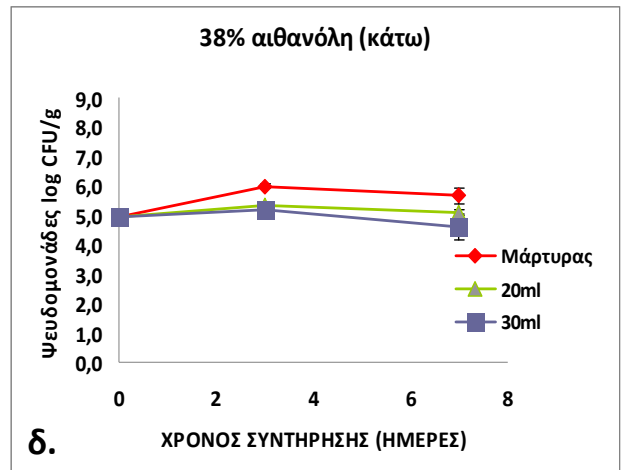
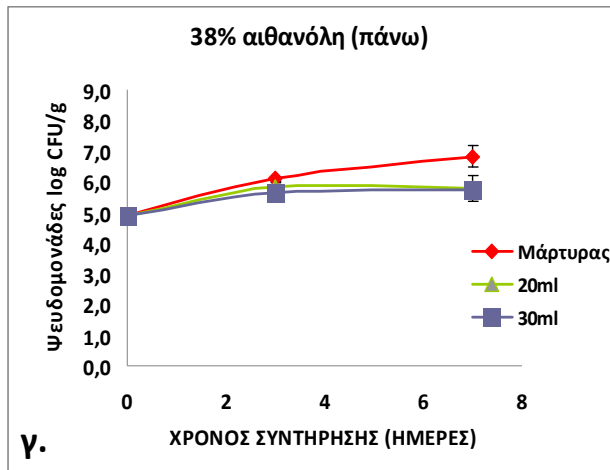
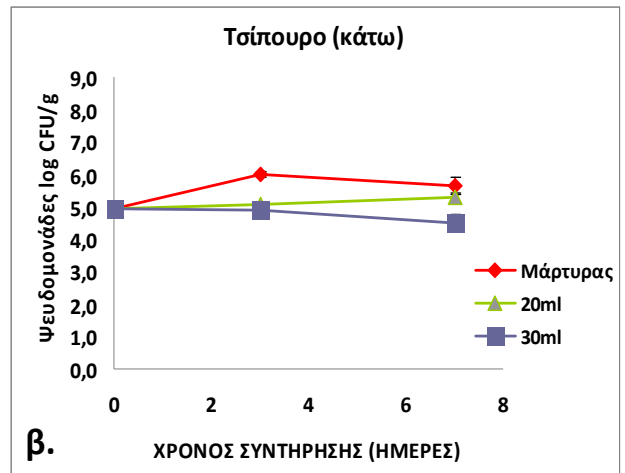
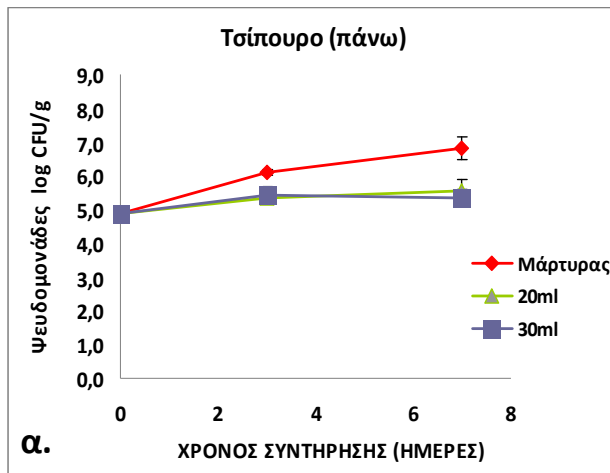




**Γράφημα 8:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης του *B. thermosphacta* σε μοσχάρισιο κιμά (500 g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (20, 30 mL) τσίπουρου (**α,β**), 38% αιθανόλης κ.ό (**γ,δ**) και 70% αιθανόλης κ.ό (**ε,στ**). Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχάρισος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 9:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά (500 g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (20, 30 mL) τσίπουρου (α,β), 38% αιθανόλης κ.ό (γ,δ) και αιθανόλης 70% κ.ό (ε,στ) . Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 10:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των ψευδομονάδων σε μοσχαρίσιο κιμά (500 g) με εφαρμογή σε απορροφητικό ύφασμα διαφορετικών όγκων (20, 30 mL) τσίπουρου (**α,β**), 38% αιθανόλης κ.ό (**γ,δ**) και 70% κ.ό αιθανόλης (**ε,στ**). Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 7 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (πάνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου του κιμά (κάτω στρώση). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.1.2.3 Οπτική παρατήρηση δειγμάτων

Κατά τη διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων η οπτική παρατήρηση, έδειξε αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που ερχόταν σε επαφή με το απορροφητικό ύφασμα στο οποίο είχαν εφαρμοστεί τα αλκοολούχα αποστάγματα και σε αυτά του μάρτυρα. Την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης παρατηρήθηκε στην κάτω στρώση του κιμά, και πάλι μια μικρή απώλεια της ερυθρότητας του, κυρίως στους χειρισμούς με αιθανόλη 38% κ.ό. και 70% κ.ό. Το τσίπουρο είχε την πιο ήπια δράση αναφορικά με την μεταβολή της ερυθρότητας του κιμά, η οποία και διατηρήθηκε σε καλά επίπεδα μέχρι και την τελευταία μέρα συντήρησης (7<sup>η</sup>). Παρατηρήθηκε επίσης ότι στο μάρτυρα, η ερυθρότητα στην πάνω στρώση του κιμά είχε διατηρηθεί σε καλύτερα επίπεδα συγκριτικά με την οπτική εικόνα των δειγμάτων της 1<sup>ης</sup> μελετώμενης συσκευασίας, την 7<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. Αυτό πιθανότητα οφείλεται στο ότι τα δείγματα ήταν από διαφορετικές παρτίδες κρέατος. Ωστόσο τα δείγματα με μεταχειρίσεις είχαν διατηρήσει σε ικανοποιητικό βαθμό την ερυθρότητα τους και στις 2 στρώσεις του κιμά, γεγονός που οφείλεται στις πτητικές ουσίες που αναδύονται μέσα στη συσκευασία, αυτή τη φορά και από το δεύτερο απορροφητικό ύφασμα που βρίσκεται κάτω από την ετικέτα. Ακόμα, η κάτω στρώση των δειγμάτων όλων των μεταχειρίσεων είχε ροζ χρωματισμό, σε αντίθεση με τον μάρτυρα που είχε μη αποδεκτό χρώμα (καστανό).

**Μάρτυρας**



**38% κ.ό. Αιθανόλη**



**Τσίπουρο (~38% κ.ό.)**



**70% κ.ό. Αιθανόλη**



**Εικόνα 2:** Συγκριτική απεικόνιση πάνω και κάτω στρώσης μοσχαρίσιου κιμά (500 g) χωρίς μεταχείριση και με εφαρμογή αλκοολούχων αποσταγμάτων (τσίπουρο, αιθανόλη 38% κ.ό και 70% κ.ό.) σε απορροφητικά υφάσματα (συνολικός όγκος 40 mL) μετά από 7 ημέρες συντήρησης στους 7°C. Τα δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

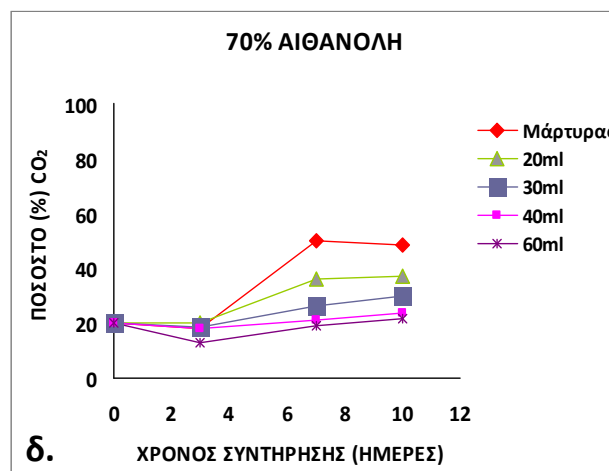
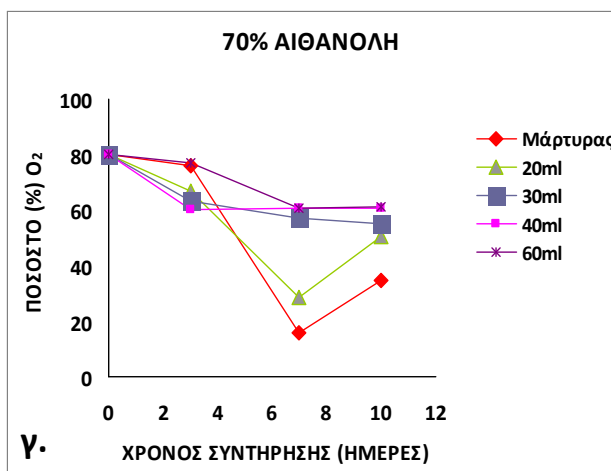
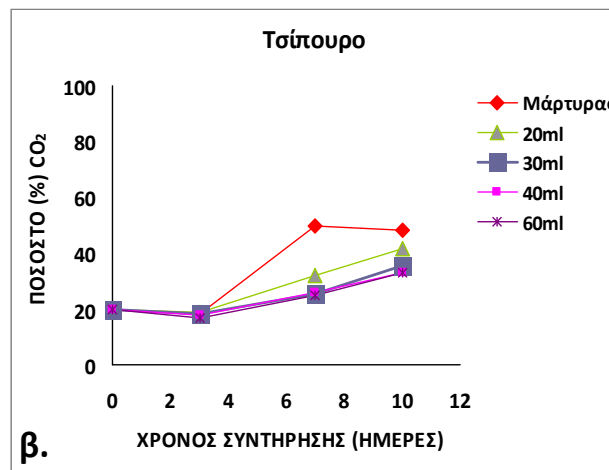
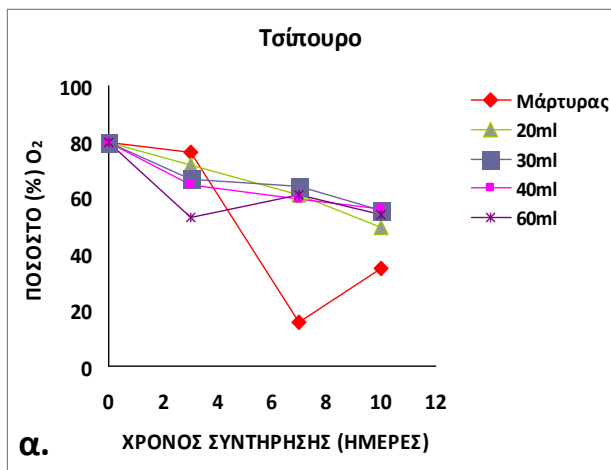
Συνοψίζοντας, στη 2<sup>η</sup> μελετώμενη συσκευασία η καλύτερη μεταχείριση σε μικροβιολογικό επίπεδο ήταν η αιθανόλη 70% κ.ό. και πιο δραστικός όγκος τα 30 mL. Το απορροφητικό ύφασμα που επικολλήθηκε στη μεμβράνη συσκευασίας κάτω από την ετικέτα δε φάνηκε να συμβάλλει δυναμικά στην αναστολή των μικροοργανισμών στην επάνω επιφάνεια του κιμά, ωστόσο είναι πιθανόν να συνέβαλλε στη διατήρηση της ερυθρότητας σε καλύτερα επίπεδα. Το τσίπουρο και η αιθανόλη 38% κ.ό είχαν παρόμοια δράση με το πρώτο να είναι πιο δραστικό, ίσως λόγω των πρόσθετων ουσιών που περιέχει σε σχέση με την αιθανόλη. Συγκεκριμένα μπορεί να οφείλεται σε άλλες πτητικές ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση οι οποίες περιέχονται στο τσίπουρο μετά την απόσταξη, όπως η ακεταλδεΐδη, ο οξικός αιθυλεστέρας και η αμυλική αλκοόλη (Apostolopoulou et al., 2005).

Τα παραπάνω οδήγησαν στο σχεδιασμό της επόμενης μελετώμενης συσκευασίας (3<sup>η</sup>), όπου ως αντιμικροβιακοί παράγοντες επιλέχθηκαν το τσίπουρο και η αιθανόλη 70% κ.ό. λόγω της συνολικά καλής δράσης που είχαν σε μικροβιολογικό και οργανοληπτικό επίπεδο (χρώμα). Ωστόσο αυξήθηκαν οι όγκοι των αντιμικροβιακών αποσταγμάτων, με στόχο τη βελτιστοποίηση της επίδρασης τους.

### 3.1.3 3<sup>η</sup> Μελετώμενη συσκευασία

#### 3.1.3.1 Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας

Η σύσταση των αερίων του υπερκείμενου χρόνου, άλλαξε και αυτή τη φορά σημαντικά σε όλες τις μεταχειρίσεις κατά τη διάρκεια της συντήρησης (Γράφημα 11), γεγονός που συμφωνεί και με τις τάσεις στις δύο προηγούμενες μελετώμενες συσκευασίες (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup>). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 11, η συγκέντρωση του O<sub>2</sub> μειώθηκε ενώ η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> αυξήθηκε σε όλα τα δείγματα. Στους μάρτυρες, ο ρυθμός και το μέγεθος αύξησης της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub>, ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τα δείγματα στα οποία είχαν εφαρμοστεί τα αλκοολούχα αποστάγματα. Επίσης, όσο αυξανόταν ο όγκος, τόσο πιο μεγάλη ήταν η μεταβολή. Η παρατήρηση αυτή αποτυπώνεται χαρακτηριστικά στο γράφημα 11 (δ.), όπου ο μάρτυρας την τελευταία μέρα συντήρησης (10<sup>η</sup> ημέρα) έφτασε το 48.4% CO<sub>2</sub>, ενώ οι εφαρμογές των 20, 30, 40 και 60 mL έφτασαν το 37%, 29.7%, 23,9% και 21.4% CO<sub>2</sub> αντίστοιχα. Οι μεταβολές των αερίων (μείωση O<sub>2</sub> και αύξηση του CO<sub>2</sub>) της συσκευασίας σε αυτή τη μελετώμενη συσκευασία ήταν μεγαλύτερες σε σχέση με τις προηγούμενες δύο είτε αναφορικά με το μάρτυρα είτε με τις μεταχειρίσεις. Οι διαφορές στη μεταβολή των αερίων που παρουσίασαν οι μάρτυρες πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές παρτίδες κιμά που παραλήφθηκαν σε κάθε ξεχωριστή μελέτη συσκευασίας, ενώ οι εντονότερες μεταβολές που παρουσιάζονται μεταξύ μεταχειρίσεων και μάρτυρα μπορεί να οφείλονται στην μεγαλύτερη αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και τον μεταβολισμό τους λόγω της ισχυρότερης δράσης των αντιμικροβιακών ουσιών που φάνηκε να ενισχύεται με το συγκεκριμένο τρόπο εφαρμογής.



**Γράφημα 11:** Μεταβολή της σύστασης των αερίων σε συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά (500 g) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>, με εφαρμογή αλκοολούχων αποσταγμάτων διαφορετικών όγκων (20, 30, 40, 60 mL) σε απορροφητικό ύφασμα στο κάτω μέρος της συσκευασίας και ένα επιπλέον απορροφητικό στρώμα με 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα που εφαρμόστηκε στη μεμβράνη συσκευασίας κάτω από την ετικέτα. Τσίπουρο (**α.** και **β.**), αιθανόλη 70% **κ.ό** (**γ.** και **δ.**). Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.1.3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η εφαρμογή αλκοολούχων αποσταγμάτων σε απορροφητικό ύφασμα στο κάτω μέρος της συσκευασίας (διπλάσιου μεγέθους σε αυτή τη φάση, που “αγκάλιαζε” περιφερειακά τον κιμά) και σε ένα ακόμη απορροφητικό ύφασμα που επικολλήθηκε στο πάνω μέρος της μεμβράνης συσκευασίας (κάτω από την ετικέτα), επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε θερμοκρασία 7°C και τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες (Τσίπουρο, ~38% κ.ό. και 70% κ.ό αιθανόλη), σε όλους των προστιθέμενους όγκους αυτών, είχαν πολύ δραστικά αποτελέσματα αναστολής τόσο στα δείγματα που έρχονταν σε επαφή με το εκάστοτε αντιμικροβιακό (κάτω στρώση) όσο και με τα δείγματα που ελήφθησαν από την επιφάνεια του κιμά (πάνω στρώση) (Γράφημα 12). Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στις πτητικές ουσίες που απελευθερώνονται από τα δύο πλέον απορροφητικά υφάσματα στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας, μεταναστεύουν στη μάζα του κιμά μέσω διάχυσης και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία όπως προαναφέρθηκε, έχουν καλή αντιμικροβιακή δράση (Karetanakou et al., 2014). Από το γράφημα 12, παρατηρείται μεγαλύτερη μικροβιακή αναστολή όσο αυξανόταν ο όγκος της αλκοόλης, ενώ η πιο δραστική εφαρμογή ήταν αυτή της 70% κ.ό. αιθανόλης (60 mL) (Γράφημα 12, γ.,δ.). Συγκεκριμένα στην OMX, η μεταχείριση των 60 mL 70% κ.ό. αιθανόλης παρέμεινε περί τους 5-5.7 log CFU/g τη 10<sup>η</sup> μέρα συντήρησης, όταν ο μάρτυρας κυμαινόταν σε λογαρίθμους της τάξης των 7- 7.5 log CFU/g από την 3<sup>η</sup> κιόλας μέρα συντήρησης (Γράφημα 12, γ.,δ.). Η κλιμάκωση στην αναστολή όσο αυξανόταν ο όγκος του αλκοολούχου αποστάγματος φαίνεται και στην εφαρμογή με τσίπουρο (Γράφημα 12, α.,β.). Στο δείγμα που είχε ληφθεί από την κάτω στρώση του κιμά, την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης οι πληθυσμοί της OMX ήταν: 7.3 log CFU/g (μάρτυρας) > 7 log CFU/g (20 mL) > 6.2 log CFU/g (30 mL) > 6.2 log CFU/g (40 mL) > 5.8 log CFU/g (60 mL) (Γράφημα 12, β.).

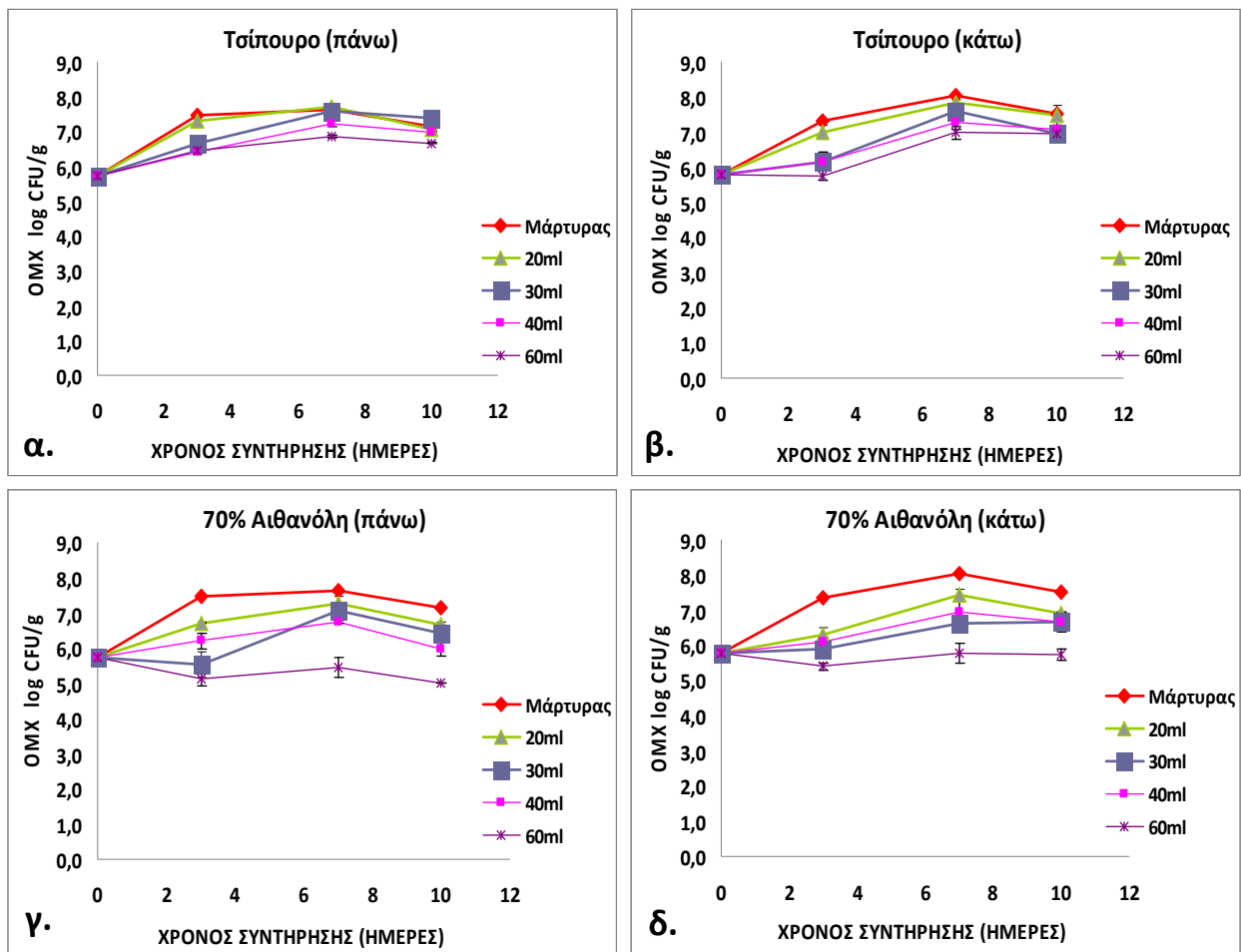
Από τις 4 ομάδες μικροοργανισμών που μελετήθηκαν σε αυτή τη φάση, κυριάρχησε και αυτή τη φορά ο *B. thermosphacta* φτάνοντας σε πληθυσμούς 7.3 log CFU/g, και τα οξυγαλακτικά βακτήρια φτάνοντας τους 6.4 log CFU/g, κατά τη διάρκεια της συντήρησης (Γράφημα 13 και 14). Η εφαρμογή του τσίπουρου, δεν επηρέασε σημαντικά στην αναστολή της ανάπτυξης του *B.thermosphacta* στην πάνω στρώση του κιμά (Γράφημα 13, α.). Αντίθετα, στα δείγματα που παραλήφθηκαν από την κάτω



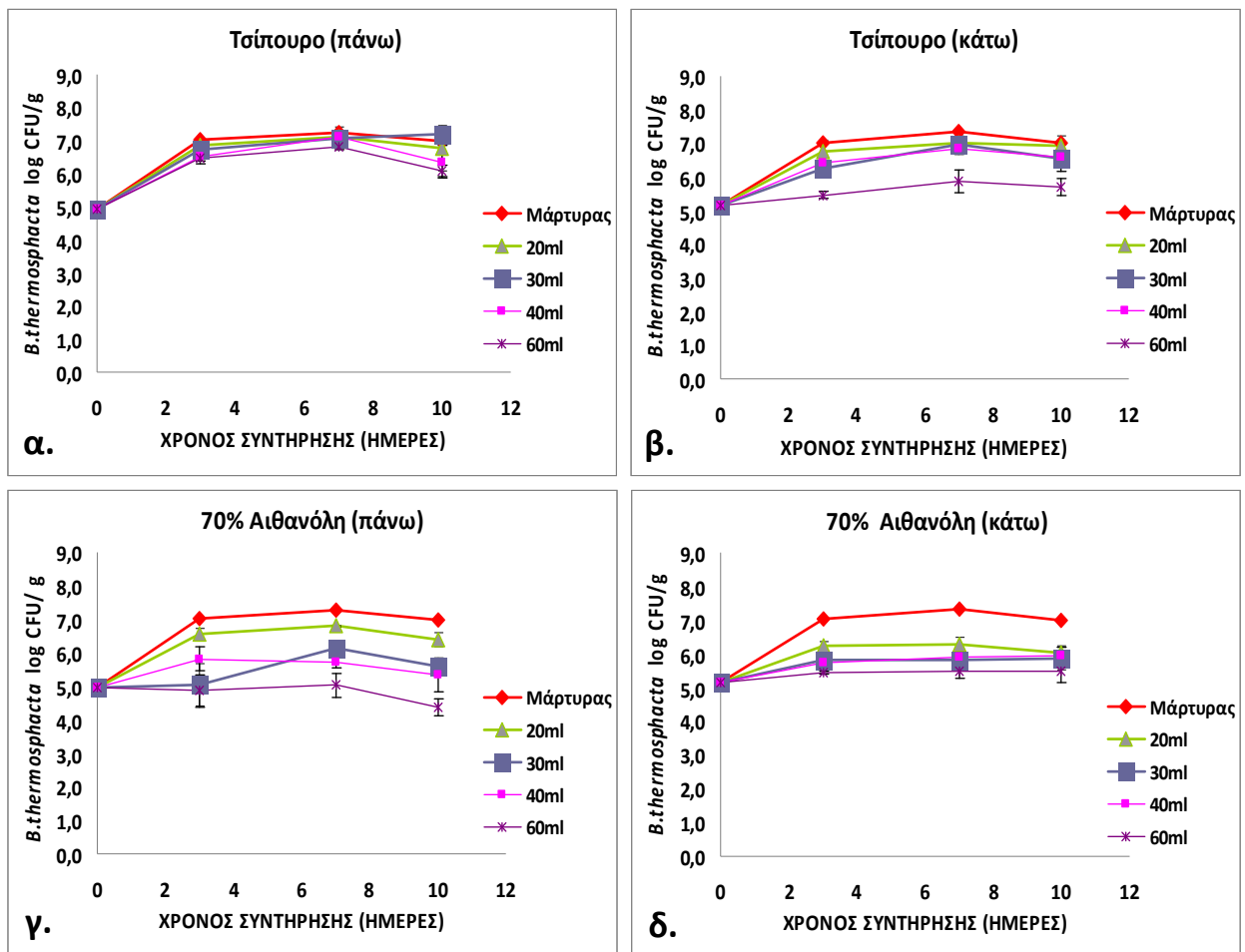
στρώση, ξεχώρισε η εφαρμογή των 60 mL που διατηρήθηκε στους 5.7 log CFU/ g μέχρι και την τελευταία μέρα (10<sup>η</sup>) συντήρησης, ενώ ο μάρτυρας είχε φτάσει τους 7 log CFU/ g από την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. Οι εφαρμογές των υπολοίπων όγκων τσίπουρου έφτασαν περί τους 7 log CFU/ g την 7<sup>η</sup> μέρα συντήρησης (Γράφημα 13, β.). Η εφαρμογή 70% κ.ό. αιθανόλης επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη του *B. thermosphacta*, τόσο στα δείγματα που παραλήφθηκαν από την πάνω όσο και από την κάτω στρώση του κιμά. Από τα γραφήματα διακρίνεται η κλιμακούμενη δράση ανάλογα με τον όγκο που εφαρμόστηκε. Ξεχωρίζουν οι όγκοι των 60 και 40 mL (διπλάσιες ποσότητες) που φαίνεται να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη του *B. thermosphacta* μέχρι και το τέλος της συντήρησης, τη 10<sup>η</sup> μέρα. (Γράφημα 13, γ.,δ.)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν έδειξαν μεγάλη ευαισθησία στην εφαρμογή του τσίπουρου. Ωστόσο, από τις μετρήσεις της κάτω στρώσης του κιμά την 3<sup>η</sup> ημέρα : (Μάρτυρας ) 5.3 log CFU/ g, (20 mL) 5.2 log CFU/ g, (30 mL) 4.8 log CFU/ g, (40 mL) 5.0 log CFU/ g και (60 mL) 4.4 log CFU/ g , φαίνεται ότι οι όγκοι τσίπουρου που εφαρμόστηκαν, επέκτειναν σε κάποιες περιπτώσεις (60 mL) τη φάση προσαρμογής, ενώ σε άλλες (20, 30 και 40 mL) μείωσαν το ρυθμό ανάπτυξης των βακτηρίων (Γράφημα 14).

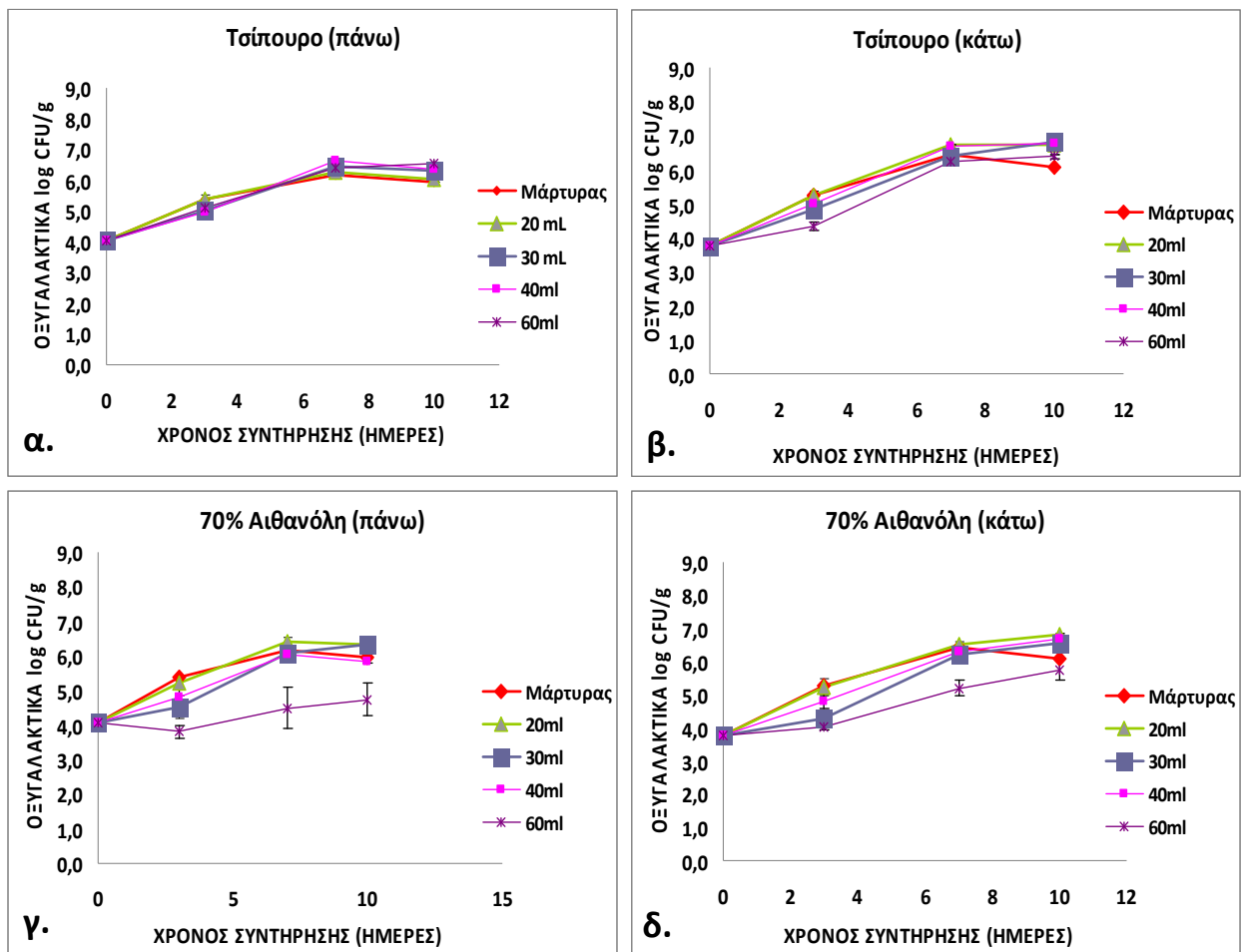
Η εφαρμογή τσίπουρου και 70% αιθανόλης κ.ό. φάνηκε να έχει μεγάλη επίδραση επί της ανάπτυξης των ψευδομονάδων. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης οι ψευδομονάδες έφτασαν περί τους 6 log CFU/ g στο μάρτυρα, ενώ όλες οι μεταχειρίσεις με αλκοολούχα αποστάγματα παρεμπόδισαν ή και ακόμα ανέστειλαν την αύξησή τους. Ισχυρότερη δράση είχε η εφαρμογή των 60 mL 70% κ.ό. αιθανόλης, που διατήρησε χαμηλούς πληθυσμούς της τάξης των 3.5 log CFU/ g τη 10<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης (Γράφημα 15.α.,β.,γ.,δ.). Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της μεταβολής του pH, όπου σε όλες τις μεταχειρίσεις μειώθηκε πολύ λίγο (από 5,74 έφτασε κατά τη διάρκεια της συντήρησης έως 5,27) και τον μάρτυρα να ξεχωρίζει από τα δείγματα που είχαν εφαρμοστεί αλκοολούχα αποστάγματα λόγω του ταχύτερου ρυθμού μείωσης του pH μέχρι την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. (δεν παρατίθενται αποτελέσματα.)



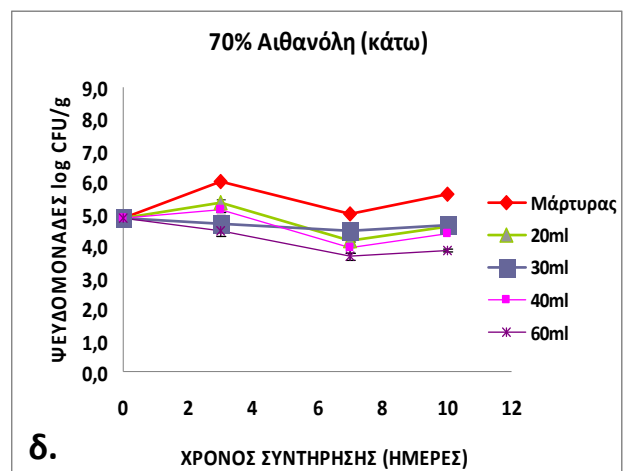
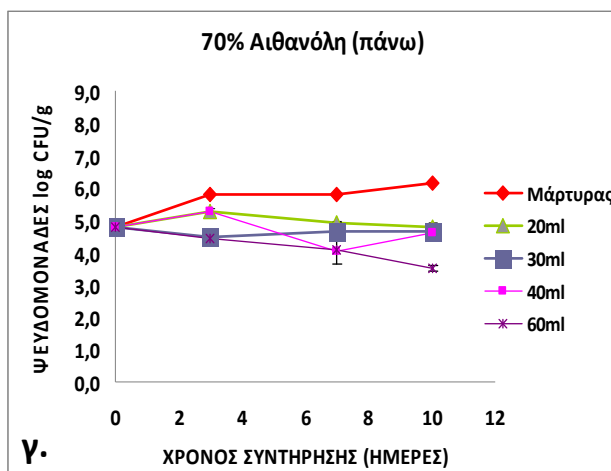
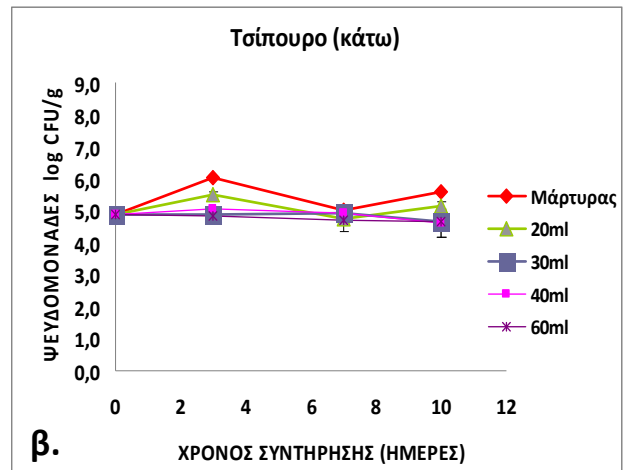
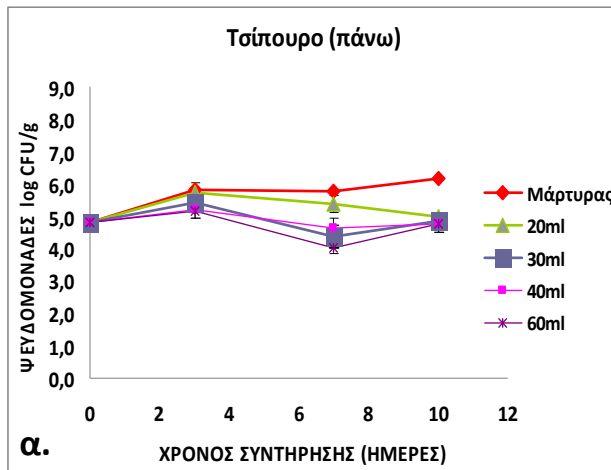
**Γράφημα 12:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης της ΟΜΧ σε μοσχαρίσιο κιμά (500 g) που είχαν εφαρμοστεί διαφορετικοί όγκοι (20, 30, 40, 60 mL) τσίπουρου (α, β) και 70% αιθανόλης κ.ό (γ,δ) σε απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας. Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 10 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 13:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης του *B. thermosphacta* σε μοσχάρισιο κιμά (500 g) που είχαν εφαρμοστεί διαφορετικοί όγκοι (20, 30, 40, 60 mL) τσίπουρου (α, β) και 70% αιθανόλης κ.ό (γ,δ) σε απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας. Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχάρισος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 10 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 14:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά (500 g) που είχαν εφαρμοστεί διαφορετικοί όγκοι (20, 30, 40, 60 mL) τσίπουρου (**α, β**) και 70% αιθανόλης κ.ό (**γ,δ**) σε απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας. Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 10 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 15:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των ψευδομονάδων, σε μοσχάρισιο κιμά (500 g) που είχαν εφαρμοστεί διαφορετικοί όγκοι (20, 30, 40, 60 mL) τσίπουρου (**α, β**) και 70% αιθανόλης κ.ό (**γ,δ**) σε απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας. Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχάρισιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 10 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

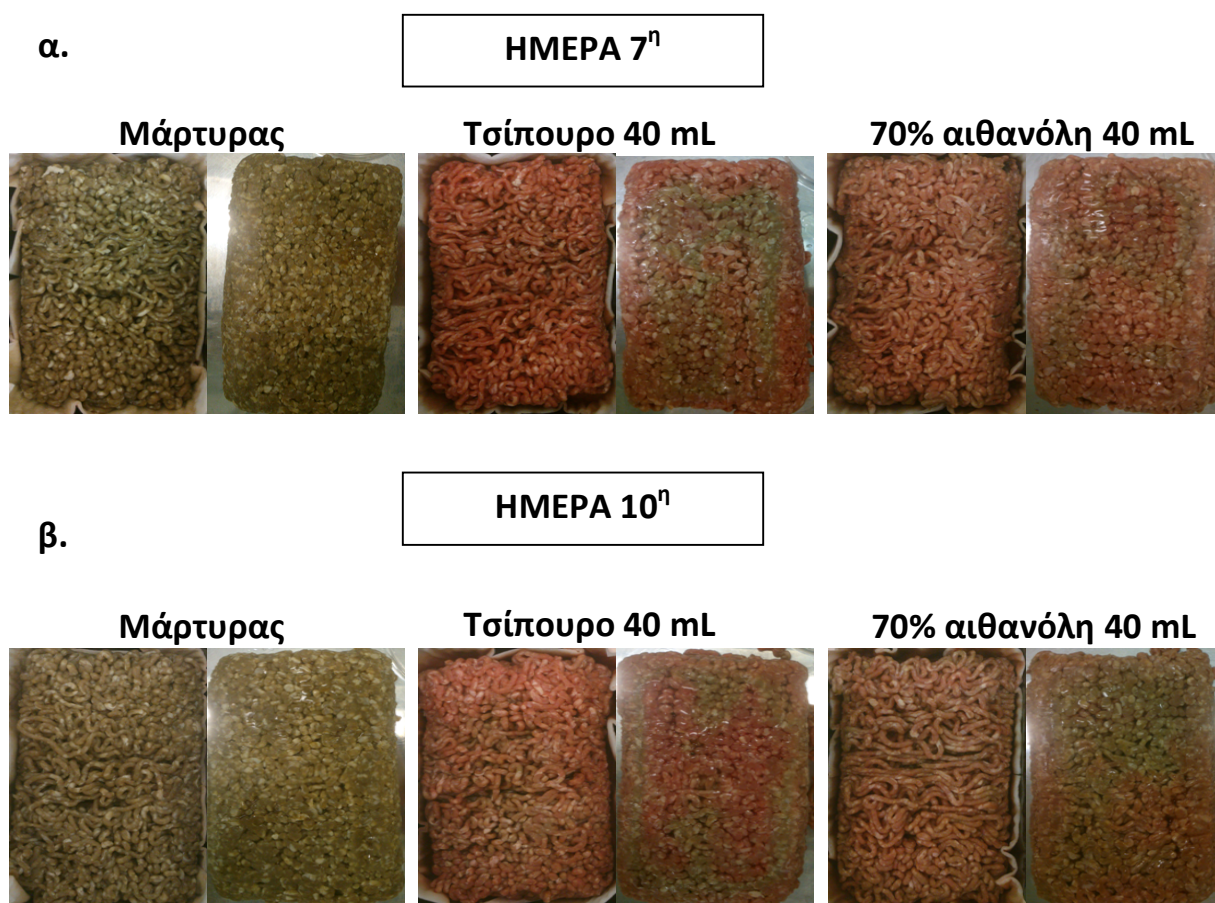
### 3.1.3.3 Οπτική παρατήρηση των δειγμάτων και μέτρηση της μεταβολής του χρώματος

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές στο χρώμα των δειγμάτων με μεταχείριση σε σχέση με τους μάρτυρες. Τα γραφήματα 16 και 17 αναπαριστούν τη μεταβολή των παραμέτρων  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  που καθορίζουν τη μεταβολή του χρώματος σύμφωνα με την εξίσωση 2, για τα δείγματα μοσχαρίσιου κιμά που συσκευάστηκε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% CO<sub>2</sub>: 20% O<sub>2</sub>. Τα δείγματα με αντιμικροβιακή μεταχείριση παρουσίασαν αύξηση της παραμέτρου  $L^*$  κατά τη συντήρηση στους 7°C, ενώ οι μάρτυρες παρουσίασαν πιο αργή αύξηση (Γράφημα 16, α.,β. και Γράφημα 17 α.,β.) Η αύξηση της φωτεινότητας μέσω των πτητικών ουσιών αλκοολούχων αποσταγμάτων αναφέρθηκε και σε χοιρινό κρέας (Karetanakou et al., 2014) το οποίο ωστόσο δεν παρουσιάζει τόσο ερυθρό χρώμα όσο ο μοσχαρίσιος κιμάς. Αντιθέτως κατά την οπτική παρατήρηση, τα δείγματα που συσκευάστηκαν με τσίπουρο και αιθανόλη 70% κ.ό., ήταν πιο ελκυστικά ως προς το χρώμα και τη συνολική εμφάνιση, δείχνοντας έτσι ότι η αλλαγή αυτή δε θεωρείται ως αρνητικό χαρακτηριστικό.

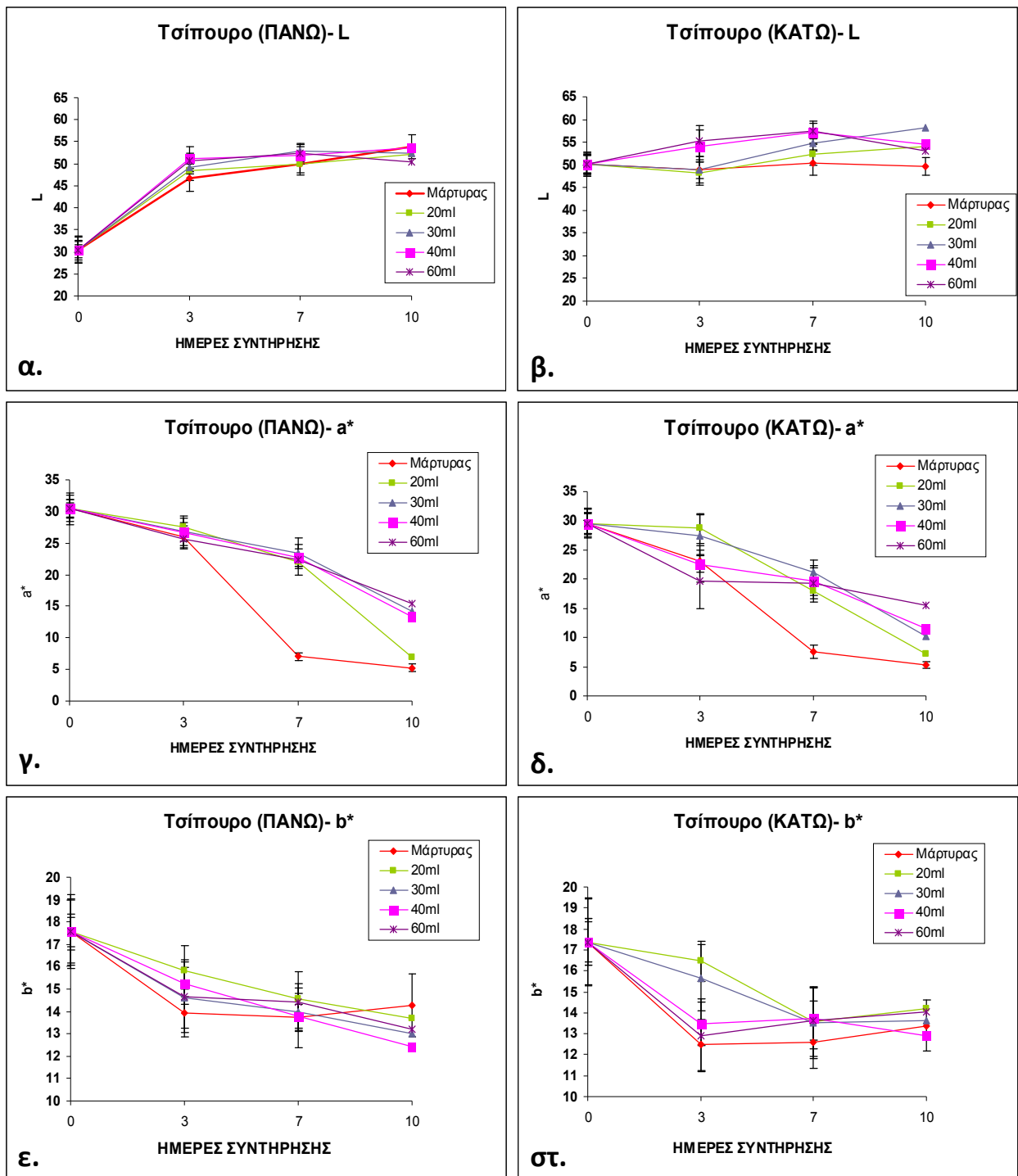
Κατά την οπτική παρατήρηση των δειγμάτων, η σύγκριση μεταξύ των αλκοολούχων αποσταγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, ανέδειξε το τσίπουρο σε όλους τους όγκους που μελετήθηκαν, ως την καλύτερη μεταχείριση ως προς τη διατήρηση του ερυθρού χρώματος του κιμά. Παρόλο που η εφαρμογή αιθανόλης 70% κ.ό ήταν αποτελεσματικότερη όσον αφορά στη μικροβιολογική δράση, προκαλούσε ορατή μεταβολή στο κόκκινο χρώμα συγκριτικά με το μάρτυρα που διατηρούσε το ελκυστικό κόκκινο χρώμα κατά την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης. Τα φαινόμενα αυτά συνδέονται με τις μετρήσεις της παραμέτρου  $a^*$  στα γραφήματα 16 (γ.,δ.) και 17 (γ.,δ.). Σε αντίθεση με τη φωτεινότητα ( $L$ ), η τιμή της παραμέτρου  $a^*$ , που σχετίζεται με την ερυθρότητα, παρουσίασε μειούμενη τάση σε όλα τα δείγματα καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης. Ωστόσο η ερυθρότητα μειώθηκε ταχύτερα στους μάρτυρες σε σχέση με τα δείγματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα αλκοολούχα αποστάγματα. Η απώλεια της ερυθρότητας αντιστοιχεί σε μια μεταβολή του χρώματος από κόκκινο σε καφέ. Αυτό γίνεται μέσω της μετατροπής της οξυμυοσφαιρίνης (κύρια χρωστική του κρέατος-

ερυθρού χρώματος σε μεταμυογλοβίνη (καφέ χρώματος) (Kropf, 1993), η οποία οδηγεί και σε μείωση της τιμής της παραμέτρου  $b^*$  (O'Sullivan et al. 2003).

Ενδεικτικά ακολουθεί η Εικόνα 3 (α. και β.) στην οποία έχει καταγραφεί το χρώμα των δειγμάτων, όπως παρατηρήθηκαν κατά την 7<sup>η</sup> και 10<sup>η</sup> μέρα συντήρησης με εφαρμογή τσίπουρου και αιθανόλης 70% κ.ό. (40 mL).

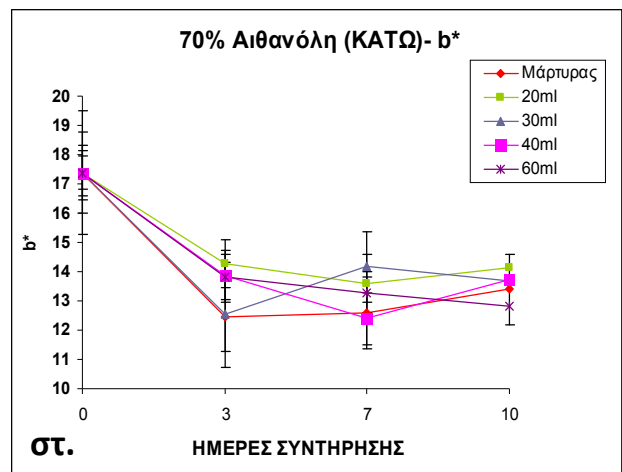
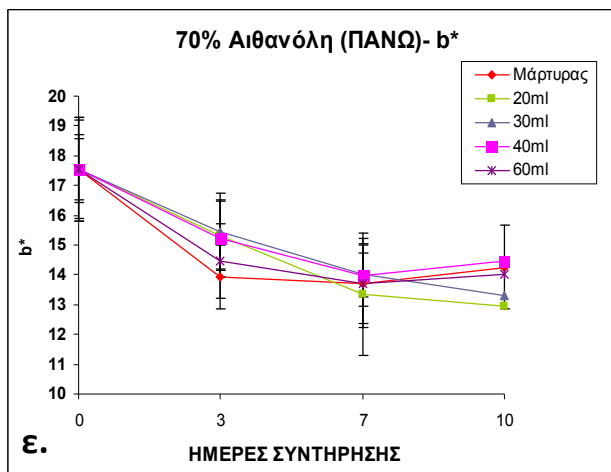
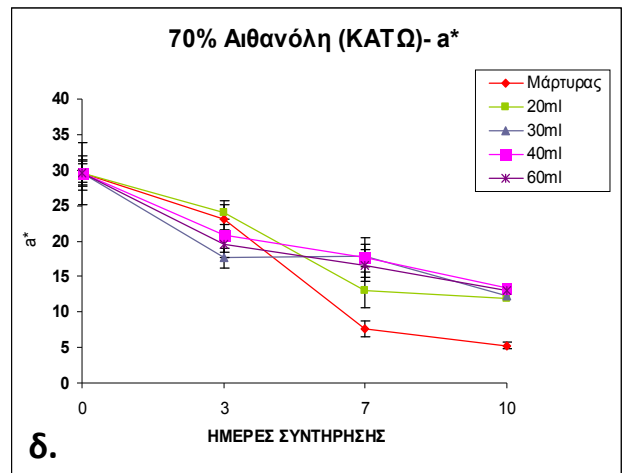
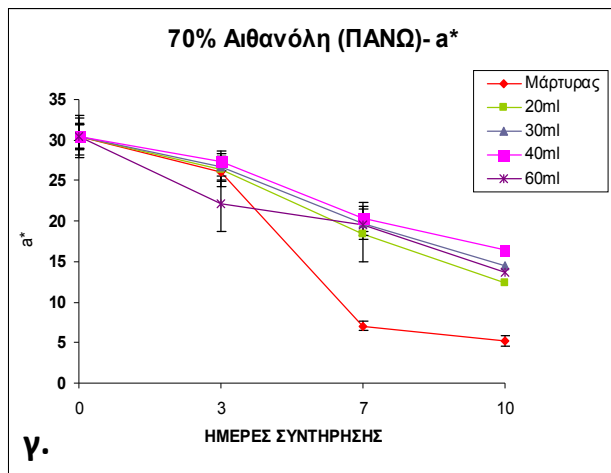
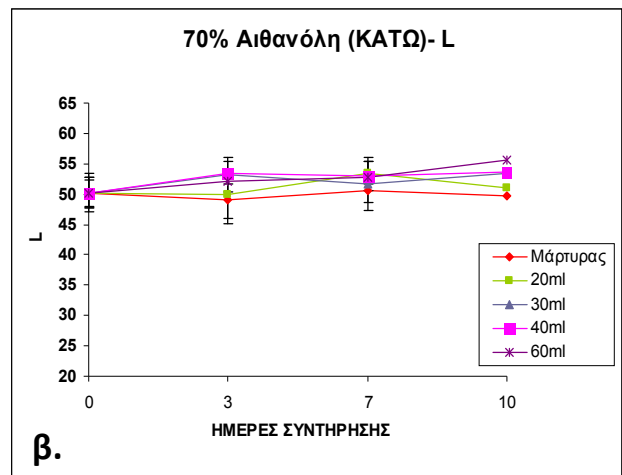
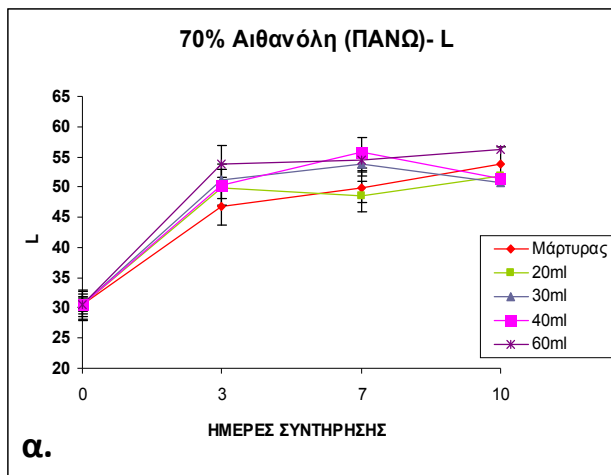


**Εικόνα 3:** Ενδεικτική απεικόνιση δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά (500 g) την 7<sup>η</sup> ημέρα (α.) και την 10<sup>η</sup> ημέρα (β.) συντήρησης στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Στην εικόνα φαίνεται ανά μεταχείριση η άνω (αριστερά) και κάτω (δεξιά) επιφάνεια του συσκευασμένου κιμά. Στα δείγματα είχαν εφαρμοστεί 40 mL αντίστοιχου αλκοολούχου αποστάγματος σε απορροφητικό ύφασμα που τοποθετήθηκε στη βάση της συσκευασίας και 10 mL επιπλέον από το εκάστοτε αλκοολούχο απόσταγμα σε απορροφητικό ύφασμα που επικολλήθηκε στο υλικό συσκευασίας κάτω από την μεμβράνη. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 16:** Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής των παραμέτρων L\* (α. και β.), a\* (γ. και δ.), b\* (ε. και στ.), μοσχαρίσιου κιμά (500 g) που είχαν εφαρμοστεί διαφορετικοί όγκοι (20, 30, 40, 60 mL) τσίπουρου σε απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας. Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 10 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.





**Γράφημα 17:** Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής των παραμέτρων L\* (α. και β.), a\* (γ. και δ.), b\* (ε. και στ.), μοσχαρίσιου κιμά (500 g) που είχαν εφαρμοστεί διαφορετικοί όγκοι (20, 30, 40, 60 mL) αιθανόλης 70% κ.ό σε απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας. Στη συσκευασία είχε τοποθετηθεί ένα ακόμα απορροφητικό ύφασμα με ποσότητα 10 mL από το αντίστοιχο αλκοολούχο απόσταγμα. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 7°C, σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> για 10 ημέρες. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

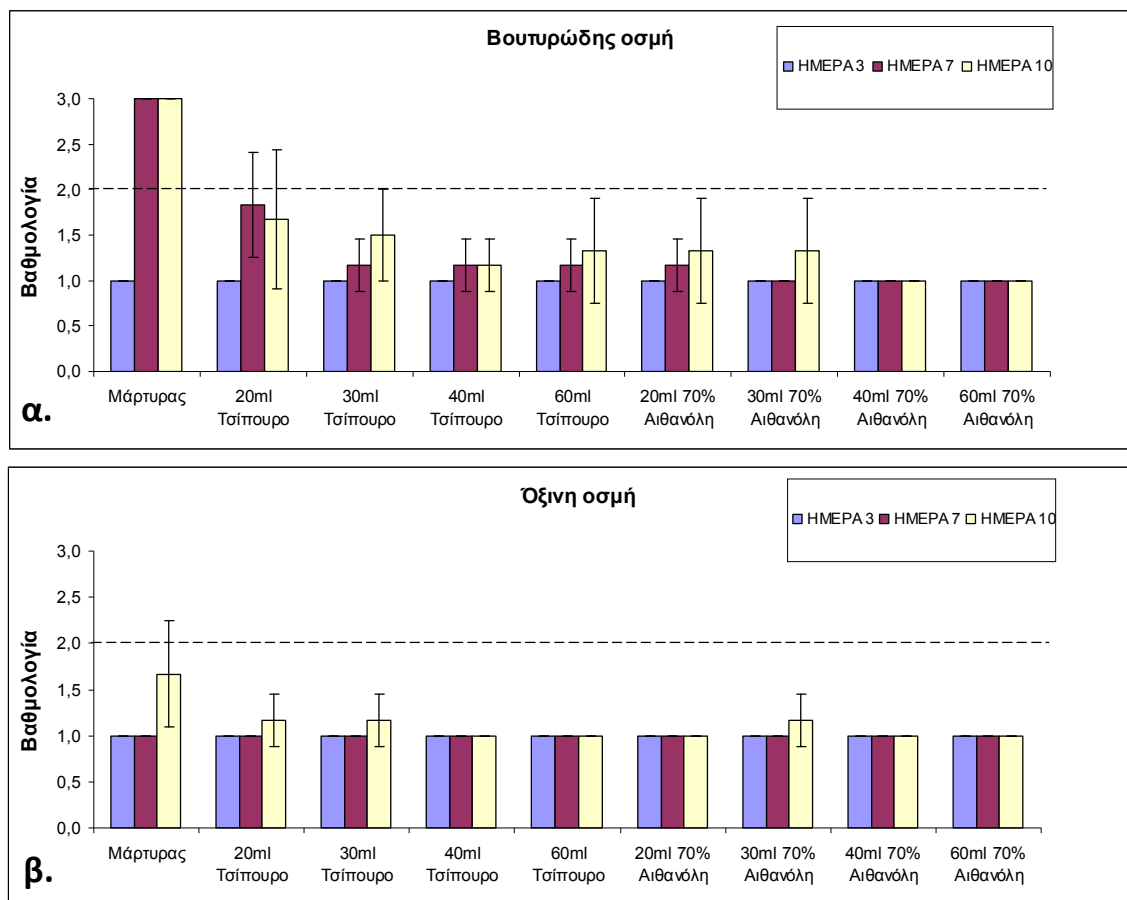
### 3.1.3.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση- Οσμή

Η κυριαρχία του *B. thermospracta* προκαλεί μια βουτυρώδη δυσάρεστη οσμή από την παραγωγή ακετοΐνης μέσω της διάσπασης της γλυκόζης, ενώ όταν επικρατούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανιχνεύονται όξινες δυσάρεστες οσμές (Soncin et al., 2007; Sun and Holley, 2012). Εφόσον οι δύο αυτές ομάδες μικροοργανισμών κυριαρχούν σύμφωνα με τη μικροβιολογική ανάλυση, τα δείγματα κρίθηκαν ως προς τις μεταβολές στην οσμή (βουτυρώδης και όξινη οσμή) με βαθμολογική κλίμακα από 1 μέχρι 3. Οι βαθμολογίες ανώτερες του 2, χαρακτήριζαν το κρέας απορριπτέο, υποδεικνύοντας το τέλος του χρόνου ζωής του.

Ο μάρτυρας κρίθηκε οργανοληπτικά μη αποδεκτός σε ότι αφορά την βουτυρώδη οσμή από την 3<sup>η</sup> κιόλας μέρα συντήρησης. Η αύξηση του όγκου των αλκοολούχων αποσταγμάτων βελτίωνε τη βαθμολογία των δειγμάτων κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Η εφαρμογή της αιθανόλης 70% κ.ό. σημείωσε καλύτερο σκορ από το τσίπουρο, με τους όγκους των 40 και 60 mL να ξεχωρίζουν σημειώνοντας μηδενικό σκορ βουτυρώδους οσμής, καθ' όλη την διάρκεια συντήρησης (Γράφημα 18,α.).

Η όξινη οσμή, δεν αποτέλεσε σημαντικό χαρακτηριστικό αλλοίωσης για τα δείγματα μοσχαρίσιου κιμά καθώς όλα τα δείγματα βαθμολογήθηκαν με βαθμολογίες κατώτερες του 2.

Τα δείγματα στα οποία είχε εφαρμοστεί τσίπουρο, ήταν πιο εύκολα αναγνωρίσιμα σε σχέση με τους μάρτυρες και τις μεταχειρίσεις με αιθανόλη 70% κ.ό.. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην ιδιαίτερη οσμή που χαρακτηρίζει το τσίπουρο σε αντίθεση με την ήπια οσμή της αιθανόλης. Ωστόσο δεν αποτελούσαν έντονο ή απωθητικό χαρακτηριστικό. Αντίθετα οι αξιολογητές στην ερώτηση αντίληψης ύπαρξης αιθανόλης στα δείγματα, απάντησαν αρνητικά στην παρουσία αιθανόλης στις μεταχειρίσεις με 70% κ.ό αιθανόλη σχεδόν στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Αυτό συνεπάγεται ότι από άποψη οσμής, η αιθανόλη είναι ηπιότερη σε σχέση με το τσίπουρο που ήταν πιο εύκολα αναγνωρίσιμο.



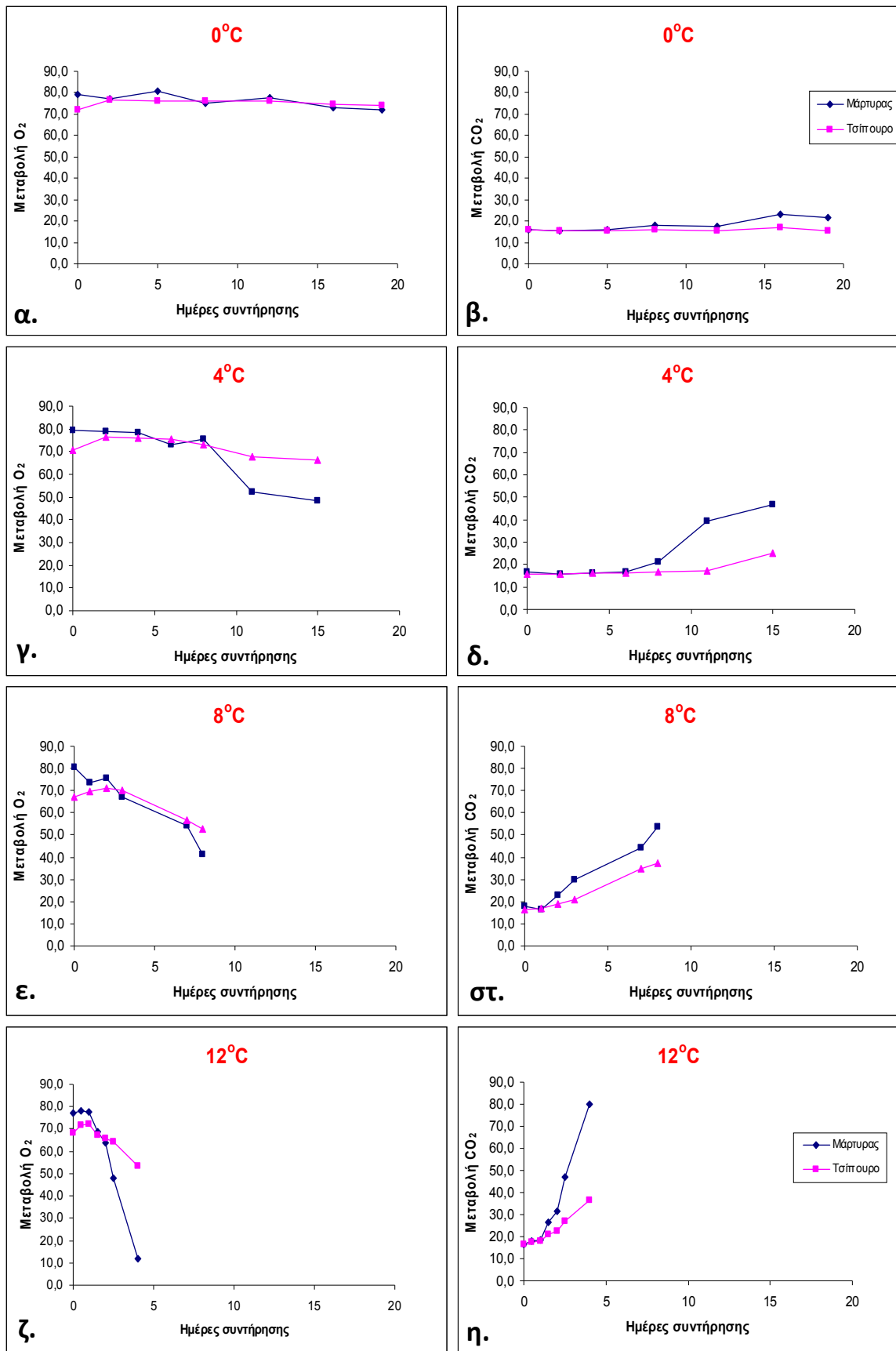
**Γράφημα 18:** Διαγράμματα οργανοληπτικής αξιολόγησης ως προς την οσμή δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκαν στους 7°C. Οι αξιολογητές βαθμολογούσαν ως προς την βουτυρώδη (**α.**) και όξινη (**β.**) οσμή που αναπτυσσόταν κατά τη συντήρηση των δειγμάτων. Η βαθμολογία που ξεπερνάει το όριο 2 καθιστά το δείγμα οργανοληπτικά μη αποδεκτό. Βαθμολογία 1: Καθόλου και βαθμολογία 3: Πολύ.

Συνοψίζοντας, η μέθοδος εφαρμογής των αλκοολούχων αποσταγμάτων στην 3<sup>η</sup> μελετώμενη συσκευασία, κρίθηκε η καταλληλότερη για τη συντήρηση μοσχαρίσιου κιμά σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> καθώς εξασφάλιζε αντιμικροβιακή δράση μέσω : α) άμεσης επαφής (κάτω στρώση) με το απορροφητικό ύφασμα στη βάση της συσκευασίας β) διάχυσης και διαμερισματοποίησης των αλκοολούχων αποσταγμάτων στο εσωτερικό της μάζας του κιμά και γ) εξάτμισης και διάχυσης, μέσω των πτητικών ουσιών που αναδύονταν από το απορροφητικό ύφασμα που είχε επικολληθεί στη μεμβράνη συσκευασίας (κάτω από την ετικέτα) αλλά και από το απορροφητικό ύφασμα που είχε τοποθετηθεί στη βάση (λόγω της αυξημένης διάστασης). Η αιθανόλη 70% κ.ό ήταν η πιο ισχυρή μεταχείριση ως προς την αναστολή της ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών, ωστόσο υστερούσε στην αξιολόγηση του χρώματος, όπου μείωνε από την αρχή της συντήρησης την ερυθρότητα του μοσχαρίσιου κιμά. Το τσίπουρο είχε ικανοποιητική δράση, τόσο σε ότι αφορά την επέκταση του χρόνου ζωής του μοσχαρίσιου κιμά που συντηρήθηκε σε μια θερμοκρασία όχι ιδανική (7°C), αλλά επέδρασε θετικά και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος (χρώμα και οσμή). Ο όγκος των 60 mL, και στα δύο αλκοολούχα αποστάγματα είχε την μεγαλύτερη επίδραση ως προς την αναστολή των μικροβιακών πληθυσμών, ωστόσο η ποσότητα αυτή φάνηκε να είναι μεγάλη ώστε να συγκρατηθεί από το απορροφητικό ύφασμα και σημειώθηκε υπερχειλίση στα δείγματα αυτά. Το γεγονός αυτό δε θα είχε θετική επιρροή στα μάτια των καταναλωτών. Ο αμέσως πιο δραστικός όγκος ήταν αυτός των 40 mL που έδειξε σημαντική μικροβιακή αναστολή. Από τα παραπάνω διαμορφώθηκε ο πειραματικός σχεδιασμός για την Ενότητα Β και την ανάπτυξη της τελικής συσκευασίας, όπου επιλέχθηκε ως μεταχείριση το τσίπουρο και ως καταλληλότερος όγκος τα 40 mL, ώστε να γίνει η μοντελοποίηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε σχέση με τη θερμοκρασία, σε μοσχαρίσιο κιμά που συσκευάζεται σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>.

## 3.2 ΕΝΟΤΗΤΑ Β: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΕΛΙΚΗΣ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ

### 3.2.1 Μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας

Όπως ειπώθηκε στο πρώτο μέρος, το αέριο περιβάλλον εντός μιας συσκευασίας τροποποιημένης ατμόσφαιρας, μεταβάλλεται συνεχώς κυρίως λόγω του μεταβολισμού των μικροβίων, της διαπερατότητας του υλικού συσκευασίας και ή την απορρόφηση του αερίου από το τρόφιμο (Zhao et al, 1994, Esmer et al. 2011). Η μεταβολή στη σύσταση των αερίων στις συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά με τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>, διέφερε ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης, με την τάση όμως να παραμένει ίδια, δηλαδή μείωση του O<sub>2</sub> και ταυτόχρονη αύξηση του CO<sub>2</sub> κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί και από άλλες μελέτες (Koutsoumanis et al, 2008) ότι η μεταβολή αυτή στα αέρια είναι πιο έντονη και γρήγορη όσο αυξάνεται η θερμοκρασία. Πράγματι στους 0°C και 4°C η μεταβολή των CO<sub>2</sub> και του O<sub>2</sub> ήταν πολύ μικρή όπως φαίνεται στο Γράφημα 19 (α., β., γ., δ.). Μεγαλύτερη μεταβολή στη σύσταση των αερίων παρατηρήθηκε στις υψηλές θερμοκρασίες των 8°C και 12°C (Γράφημα 19, ε., στ., ζ., η., θ.). Όπως φαίνεται στο Γράφημα 19, η συγκέντρωση του O<sub>2</sub> μειώθηκε ενώ η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> αυξήθηκε σε όλα τα δείγματα. Στους μάρτυρες, ο ρυθμός και ο βαθμός αύξησης της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub>, και μείωσης του O<sub>2</sub>, ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με τα δείγματα στα οποία είχαν εφαρμοστεί τσίπουρο. Αναφορικά με το O<sub>2</sub>, οι μεταβολές που σημειώθηκαν είχαν ως εξής: στο μάρτυρα, 12°C, 65.4 > 8°C, 39.4 > 4°C, 31.4 > 0°C, 7.5 ενώ στα δείγματα με τσίπουρο, 12°C, 15 > 8°C 14.3, 4°C, 4.4 > 0°C, 2.3. (Γράφημα 26, α., γ., ε., ζ.). Στο CO<sub>2</sub> οι μεταβολές που σημειώθηκαν ήταν οι εξής: στο μάρτυρα, 12°C, 64.1 > 8°C, 36.1 > 4°C, 30.3 > 0°C, 5.7, ενώ στα δείγματα με τσίπουρο, ήταν 20.3 και 21.2 για τους 12°C και 8°C αντίστοιχα, 9.6 στους 4°C και μόλις 0.4 στους 0°C (Γράφημα 19, β., δ., στ., η.).



**Γράφημα 19:** Μεταβολή της σύστασης των αερίων σε συσκευασίες μοσχάριστου κιμά (500 g) με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 0°C (α.,β.), 4°C (γ.,δ.), 8°C (ε., στ.) και 12°C (ζ.,η.) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.2.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Η θερμοκρασία θεωρείται ο πιο σημαντικός εξωγενής παράγοντας που επηρεάζει την αλλοίωση του κρέατος (Koutsoumanis et al., 2006) καθώς και έχει μεγάλη επίδραση στο χρόνο ζωής, την ασφάλεια και την ποιότητα του προϊόντος (Church et al. 1995, Koutsoumanis & Taoukis, 2005). Ο χρόνος ζωής του μοσχαρίσιου κιμά σε συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας 80% CO<sub>2</sub>:20 %O<sub>2</sub>, με εφαρμογή 50 mL (40 mL στο κάτω απορροφητικό ύφασμα και 10 mL στο απορροφητικό ύφασμα κάτω από την ετικέτα) τσίπουρου ως αντιμικροβιακό επηρεάστηκε από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές συντήρησης (0, 4, 8 και 12°C) (Γράφημα 20). Ο ρυθμός ανάπτυξης των μικροοργανισμών εξαρτάται και από το αρχικό μικροβιακό φορτίο που εμφανίζονται στον κιμά, καθώς υψηλοί πληθυσμοί οδηγούν σε ταχύτερη αλλοίωση (Kraft, 1986).

Ο *B. thermosphacta* κυριάρχησε σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Ακολούθησαν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι ψευδομονάδες και τέλος οι ζύμες-μύκητες με αρκετά χαμηλότερους πληθυσμούς από τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί σε τεμάχια χοιρινού κρέατος που είχαν συσκευασθεί σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα με τη δράση πτητικών ουσιών από αλκοολούχα αποστάγματα (Karetanakou et al., 2014). Όπως φαίνεται και στο γράφημα 20, η μεγαλύτερη αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών (ΟΜΧ) παρατηρήθηκε στους 0°C και εν συνεχεία στους 4°C ενώ στις υψηλότερες θερμοκρασίες ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν αισθητά μεγαλύτερος. Η ανασταλτική δράση του CO<sub>2</sub> αυξάνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, λόγω αύξησης της διαλυτότητας του αερίου με τη μείωση της θερμοκρασίας (La Storia et al, 2012). Το γεγονός αυτό μπορεί να συνδέεται με την αναστολή των αερόβιων Gram<sup>-</sup> βακτηρίων, όπως είναι οι ψευδομονάδες και την ενίσχυση της ανάπτυξης των Gram<sup>+</sup> όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ο *B. thermosphacta* (Koutsoumanis et al., 2006).

Το τσίπουρο ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του *B. thermosphacta*. Συγκεκριμένα στους 4°C όταν στο μάρτυρα ο πληθυσμός είχε φτάσει τους 8 log CFU/g την 8<sup>η</sup> μέρα συντήρησης, οι αντίστοιχοι πληθυσμοί στα δείγματα με τσίπουρο ήταν 6.5 log CFU/g (Γράφημα 21,β.). Στους 0°C, τη μέρα που ο μάρτυρας έφτασε το σημείο της μικροβιολογικής του απόρριψης (8<sup>η</sup> μέρα), ο πληθυσμός του *B. thermosphacta* ήταν

μόλις 4.6 log CFU/g (Γράφημα 21,α.). Η αναστολή στους 8°C ήταν φανερά μικρότερη, ενώ στους 12°C δεν υπήρξε αξιόλογη αναστολή (Γράφημα 21, γ., δ.).

Η αναστολή της ανάπτυξης των ψευδομονάδων ενισχύεται με την εφαρμογή του τσίπουρου σε σύγκριση με τους μάρτυρες είτε στις χαμηλές είτε στις υψηλές θερμοκρασίες (Γράφημα 23). Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μετά από 15 ημέρες συντήρησης στους 4°C, ότι το τσίπουρο διατήρησε σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα τις ψευδομονάδες με πληθυσμούς της τάξης των 3.8 log CFU/g (100% αναστολή), ενώ ο μάρτυρας ήταν στους 6.8 log CFU/g (Γράφημα 23,β.) Η αναστολή ανάπτυξης των ψευδομονάδων επιβεβαιώνεται και από τις μη σημαντικές μεταβολές του pH σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης στα δείγματα με τσίπουρο ενώ στους μάρτυρες η τιμή στο pH έλαβε μια μικρή αύξηση κυρίως προς τις τελευταίες ημέρες συντήρησης. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στους 8°C το pH του μάρτυρα ξεκίνησε από 5.79 και την 8<sup>η</sup> ημέρα ήταν 6.66, ενώ στο τσίπουρο η μεταβολή ήταν από 5.81 σε 5.47. Στους 0°C όπου η ανάπτυξη των ψευδομονάδων είχε παρεμποδιστεί πλήρως και κυρίαρχοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί ήταν ο *B.thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια, το pH σημείωσε μείωση κατά τις 19 ημέρες συντήρησης από 5.70 σε 5.59 στα δείγματα με μεταχείριση ενώ ο μάρτυρας από 5.79 σε 5.46. Στη μείωση του pH συμβάλλει και η ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων. Στους 4°C ομοίως με τους 0°C δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στο pH.

Κατά τη συντήρηση στους 12°C παρατηρήθηκε η μικρότερη αναστολή της ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων από την επίδραση του τσίπουρου σε σχέση με τις χαμηλές θερμοκρασίες (Γράφημα 22). Αυτό ίσως είναι αποτέλεσμα της επίδρασης της τεχνολογίας των πολλαπλών εμποδίων διότι προφανώς η ψύξη δρα συνεργιστικά με τον αντιμικροβιακό παράγοντα και σε συνδυασμό με την συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, βελτιστοποιείται το αποτέλεσμα. Στους 4°C την 11<sup>η</sup> μέρα συντήρησης, ο μάρτυρας βρισκόταν σε πληθυσμούς της τάξης των 6.4 log CFU/g, ενώ τα δείγματα με τσίπουρο στους 4.2 log CFU/g (Γράφημα 22,β.).

Οι ζύμες και οι μύκητες παρουσίασαν τη μικρότερη ανάπτυξη από όλους τους μικροοργανισμούς σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Στους μάρτυρες οι χαμηλές θερμοκρασίες των 0°C και 4°C δεν επέτρεψαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης ανάπτυξη μεγαλύτερη από 3.5 log CFU/g και 4.3 log CFU/g αντίστοιχα, ενώ στα δείγματα με τσίπουρο οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί ήταν 3.1 log CFU/g και 3.3 log CFU/g



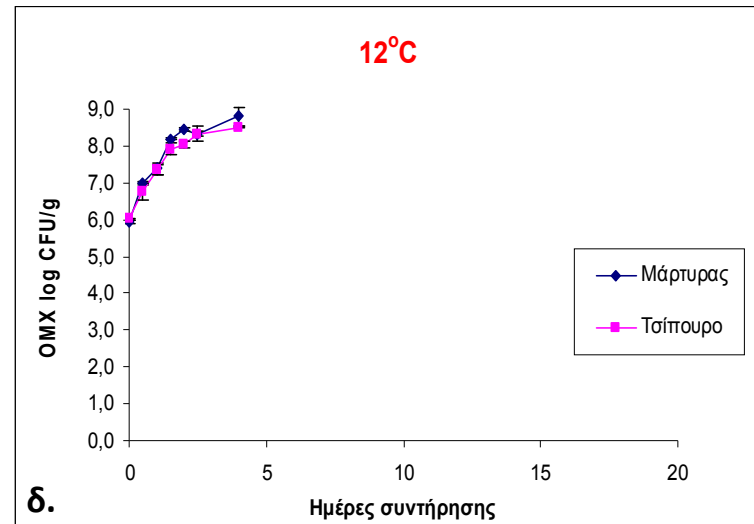
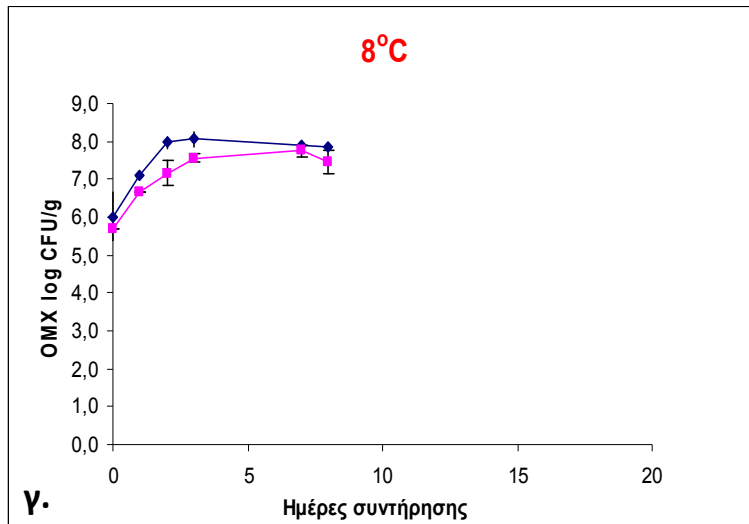
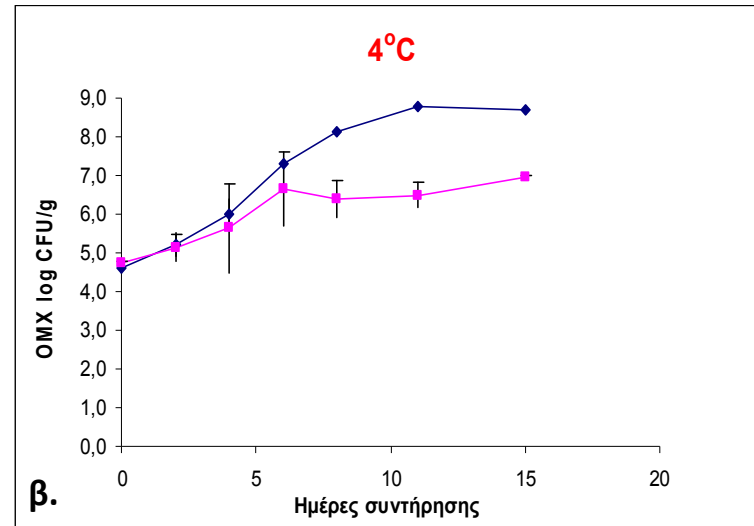
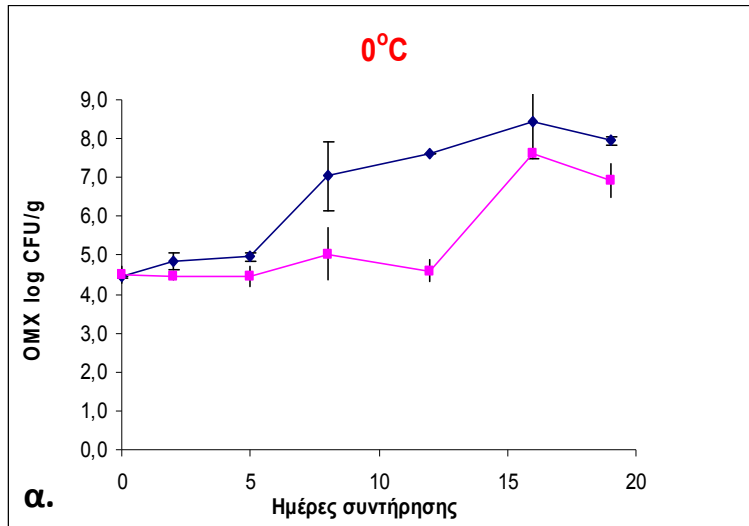
αντίστοιχα (Γράφημα 24,α.,β.). Στις υψηλότερες θερμοκρασίες, 8°C και 12°C, η συμβολή των ζυμών και των μυκήτων στην αλλοίωση του κιμά αυξήθηκε αλλά όχι σε σημαντικό βαθμό. Πιο συγκεκριμένα οι μάρτυρες έφτασαν τους 5.4 log CFU/g και 4.9 log CFU/g, ενώ η ανάπτυξη στα δείγματα με τσίπουρο τους 4.3 log CFU/g και 4.9 log CFU/g στους 8 και 12°C αντίστοιχα (Γράφημα 24,γ.,δ.). Οι σημαντικά χαμηλότεροι πληθυσμοί των ζυμών και των μυκήτων σε σύγκριση με τις αντίστοιχες μετρήσεις της ΟΜΧ δείχνουν την ελάχιστη συμβολή τους στην αλλοίωση των δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά, συσκευασμένου υπό την παρούσα ενεργό αντιμικροβιακή συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Ωστόσο η εφαρμογή του τσίπουρου στις συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά, έδειξε να συμβάλλει σημαντικά στην αναστολή της αύξησης των ζυμών και μυκήτων σε όλες τις θερμοκρασίες (πλην των 12°C). Χαρακτηριστικά στο γράφημα 24, απεικονίζεται η διαφορά που είχαν τα δείγματα με μεταχείριση, στους πληθυσμούς και τον ρυθμό ανάπτυξης σε σχέση με το μάρτυρα. Το γεγονός αυτό μπορεί να θεωρηθεί αναμενόμενο, καθώς η αντιμικροβιακή δραστηριότητα της αιθανόλης έχει αποδειχθεί να παρατείνει το χρόνο ζωής σε προϊόντα αρτοποιίας, όπως το ψωμί, κέικ, κα. εμποδίζοντας την ανάπτυξη μυκήτων και ζυμών (Daifas et al. 2000, Kalathenos & Russell, 2003, Suprakul et al.2003).

Η εφαρμογή 50 mL τσίπουρου και η συσκευασία σε 80% CO<sub>2</sub>:20 %O<sub>2</sub> επέκτειναν το μικροβιολογικό χρόνο ζωής στα δείγματα μοσχαρίσιου κιμά από 8 και 6 ημέρες στους 0°C και 4°C αντίστοιχα σε >14 ημέρες χρόνου ζωής. Στους 8°C ο χρόνος ζωής επεκτάθηκε κατά μερικές ώρες, όμως πρέπει να σημειωθεί ότι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του κιμά ήταν υψηλός (6log CFU/g). Στους 12°C δεν υπήρξε επέκταση του χρόνου ζωής του μοσχαρίσιου κιμά (Γράφημα 20), γεγονός που επιβεβαιώνει τη σημασία που έχει η τήρηση των προτεινόμενων θερμοκρασιών κατά τις μεταχειρίσεις, τη διανομή, τη συντήρηση κτλ. στο χρόνο ζωής των προϊόντων.

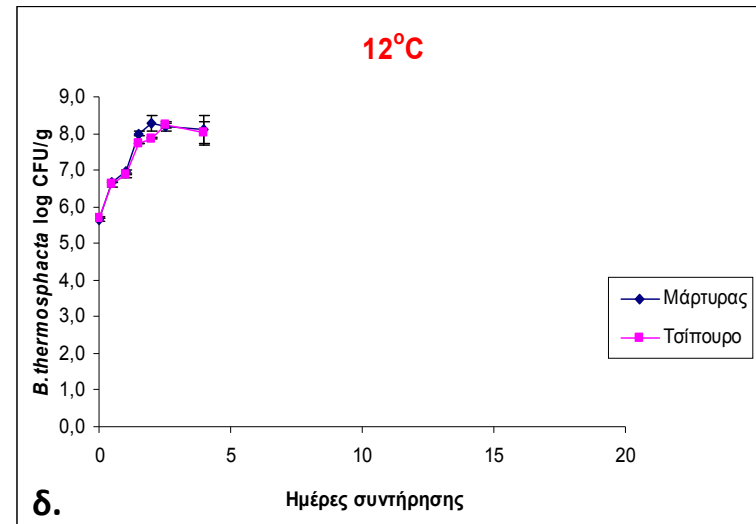
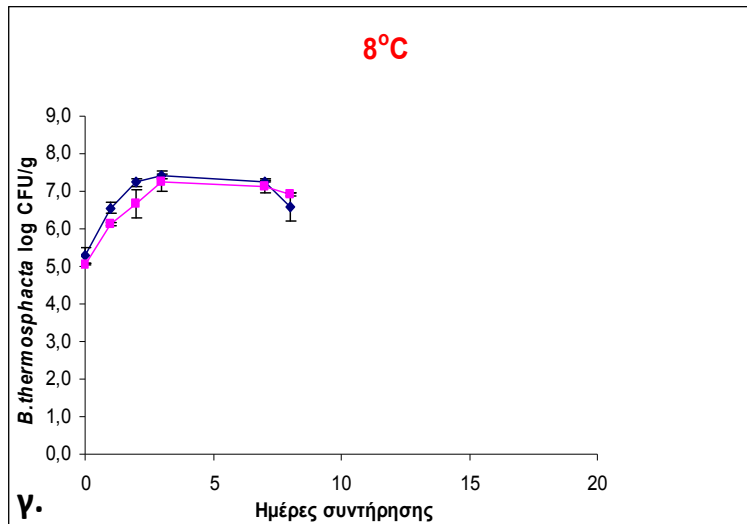
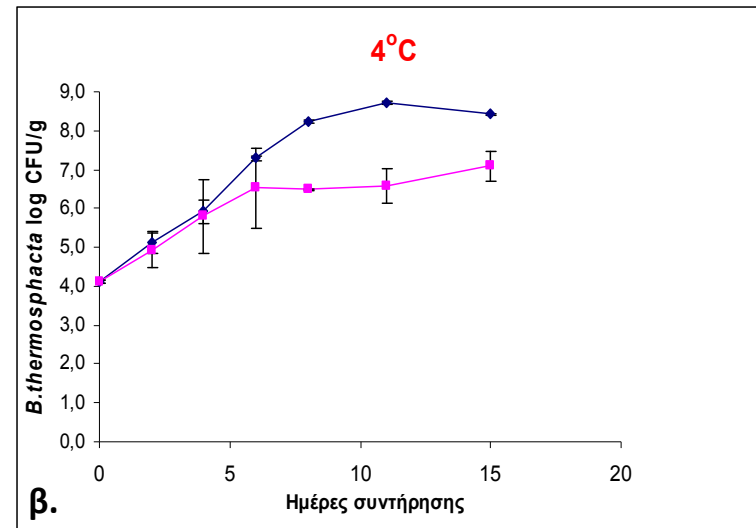
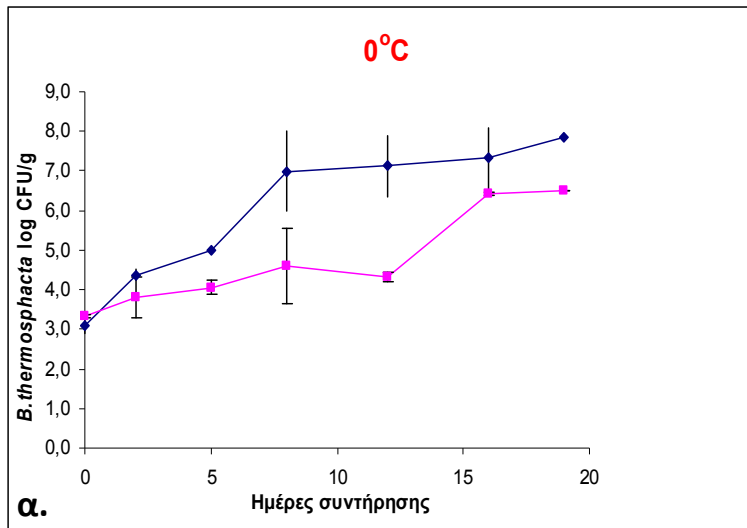
Η παράταση του χρόνου ζωής κρέατος ως συνδυασμένο αποτέλεσμα, τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασίας και αντιμικροβιακής συσκευασίας έχει αποδειχθεί με διάφορες φυσικές πτητικές ή μη πτητικές ουσίες όπως αιθέρια έλαια (Skandamis & Nychas, 2001, 2002), εφαρμογή νισίνης σε μεμβράνες (Ercolini et al., 2010; 2011; La Storia et al., 2012). Η αιθανόλη συγκεκριμένα, έχει βρεθεί να συνεισφέρει στην πρόληψη μικροβιακής αλλοίωσης σε τρόφιμα όπως, ποικιλία προϊόντων αρτοποιίας, τυριά και φρούτα, κυρίως λόγω της ανασταλτικής δράσης που

έχει κατά των ζυμών και μυκήτων (Salminen et al. 1996, Giavendonni et al. 1994, Black et al., 1993, Suprakul et al 2003, Kalathenos & Russell 2003, Daifas et al. 2000). Όταν εφαρμόστηκε με ψεκασμό σε επιφάνειες προϊόντων (πχ. ψωμί, πίτσα, κέικ) παρατάθηκε ο χρόνος ζωής των προϊόντων (Suprakul et al, 2003) ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και σε πολλές εφαρμογές ενθηλάκωσης σε θήκες (sachets) είτε σε φιλμ όπου οι πτητικές ουσίες που αναδύονται στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας, βελτιστοποιούσαν τα αποτελέσματα συντήρησης (Seiler 1989, Labuza and Breene 1989, Seiler & Russel 1991, Smith et al. 1995 Floros et al. 1997). Η εφαρμογή της ενθηλάκωσης αιθανόλης σε συσκευασίες μήλων που συντηρήθηκαν είτε σε αέρια είτε τροποποιημένης ατμόσφαιρας συσκευασία, σε θεμιτή θερμοκρασία, προκάλεσε επέκταση του χρόνου ζωής του προϊόντος από 14 σε 21 ημέρες (Smith et al., 1987). Η βιβλιογραφία ωστόσο για την εφαρμογή αιθανόλης στη συντήρηση του κρέατος είναι αρκετά περιορισμένη παρόλο που οι Hall & Spencer (1964) παρατήρησαν μια αύξηση 3-5 ημερών στο χρόνο ζωής, κοτόπουλου που είχε εμβαπτισθεί σε αιθανόλη. Όπως αποδείχθηκε από πρόσφατη μελέτη (Karetanakou et al, 2014), οι πτητικές ουσίες αλκοολούχων αποσταγμάτων μπορεί να έχουν ανασταλτική δράση είτε σε Gram<sup>-</sup> είτε σε Gram<sup>+</sup> μικροοργανισμούς, πράγμα που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

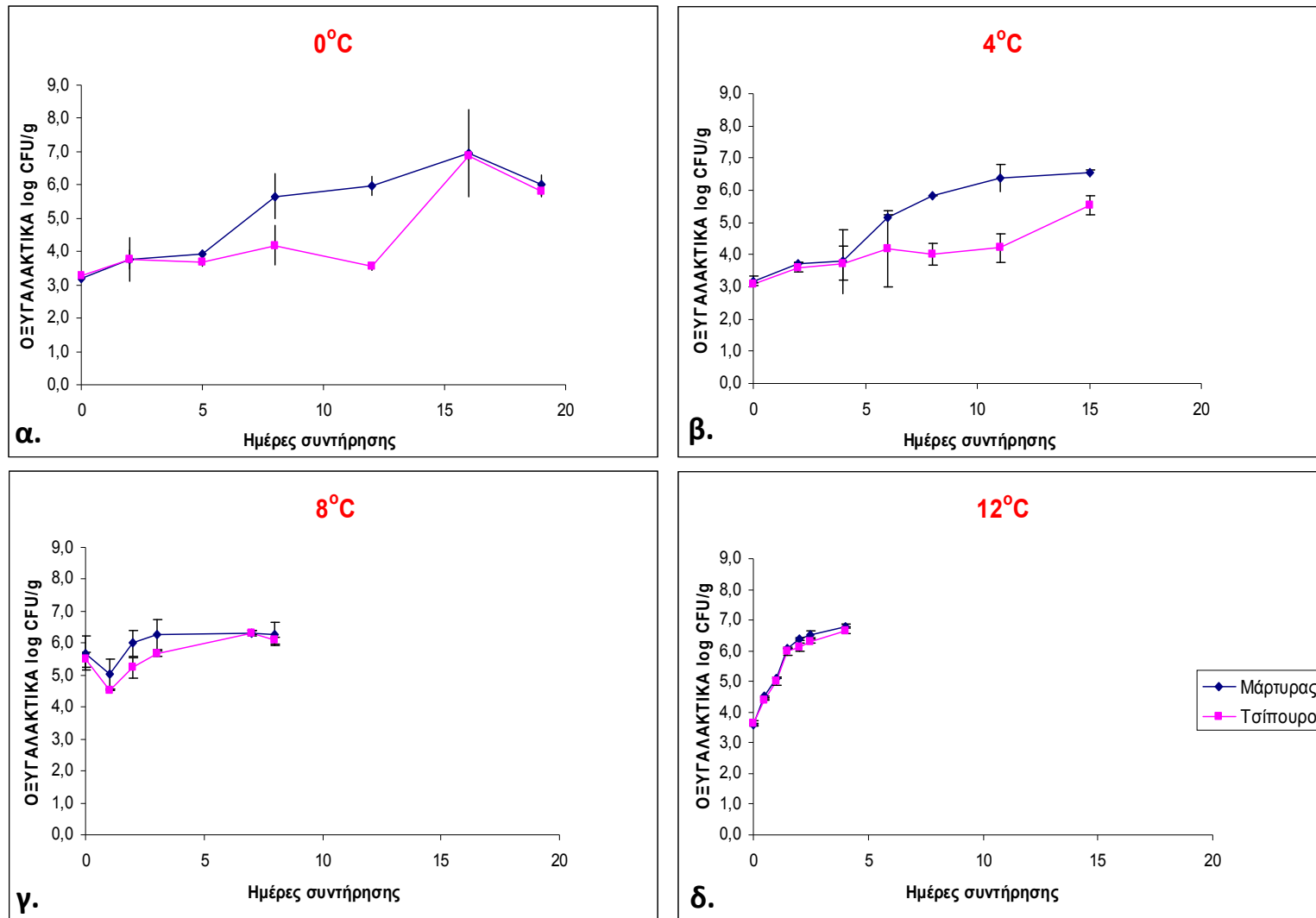
Έτσι η προτεινόμενη συσκευασία που συνδυάζει την τροποποιημένη ατμόσφαιρα με την αντιμικροβιακή δράση του τσίπουρου είτε μέσω διάχυσης (πτητικές ουσίες), είτε μέσω επαφής, είναι μια υποσχόμενη τεχνολογία συσκευασίας για την επέκταση του χρόνου ζωής βόειου κιμά.



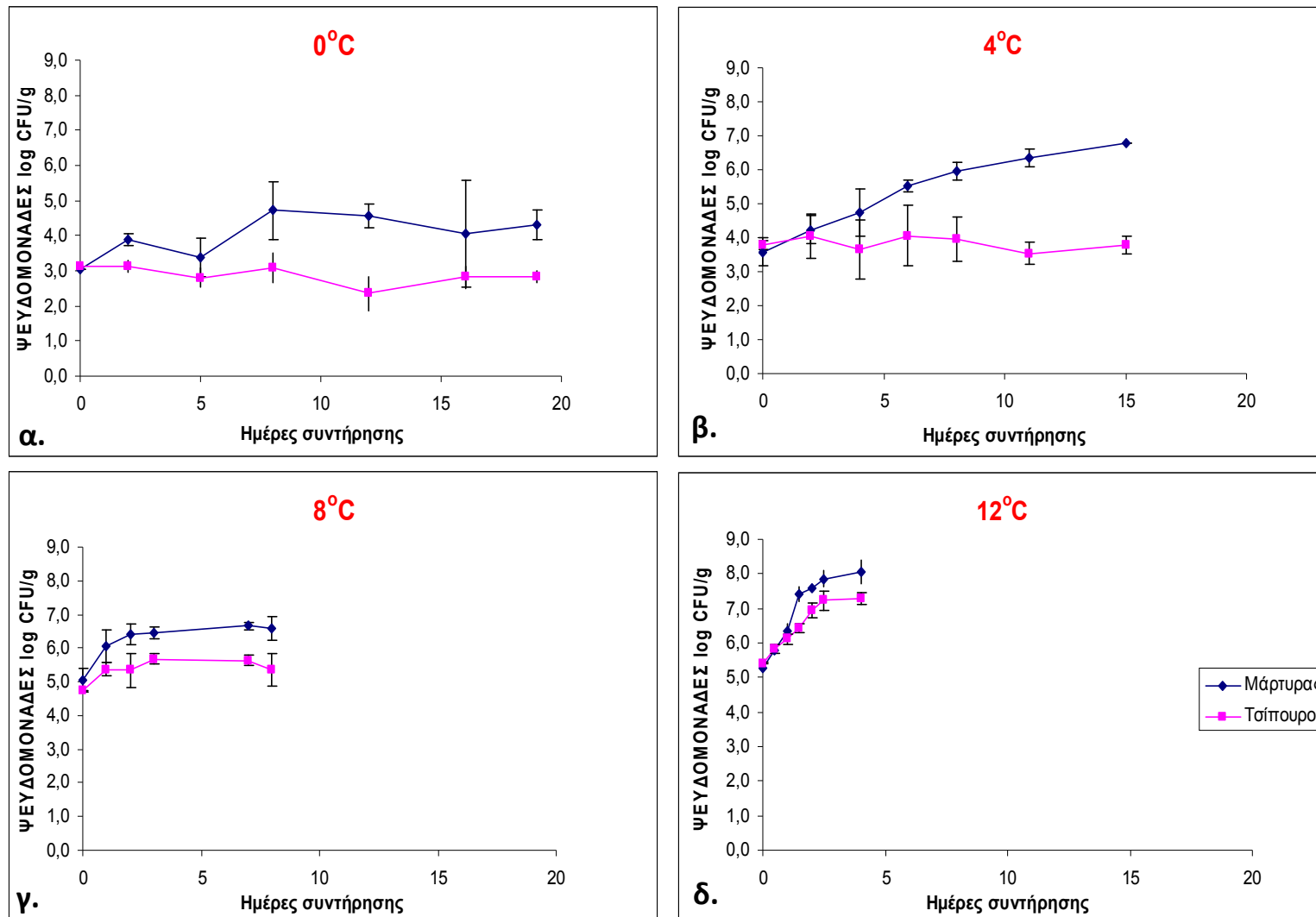
**Γράφημα 20:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης της OMX σε μοσχαρίσιο κιμά (500 g), με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 0°C(α.), 4°C(β.), 8°C(γ.) και 12°C(δ.), σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με εγκάρσια τομή. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



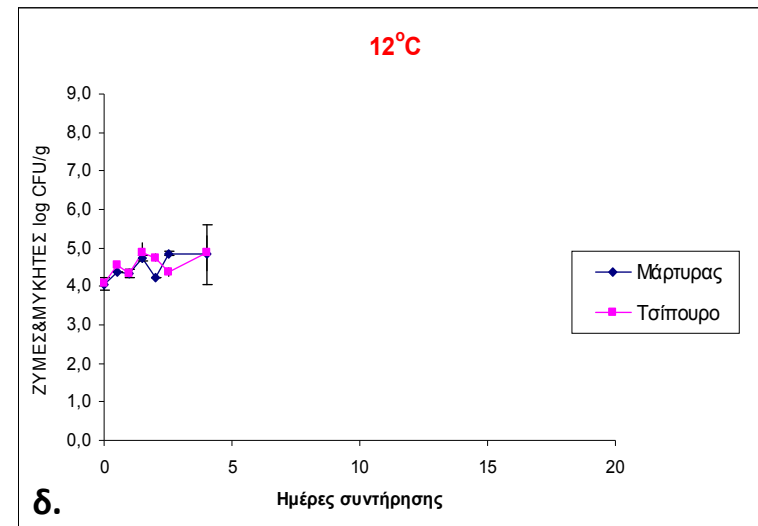
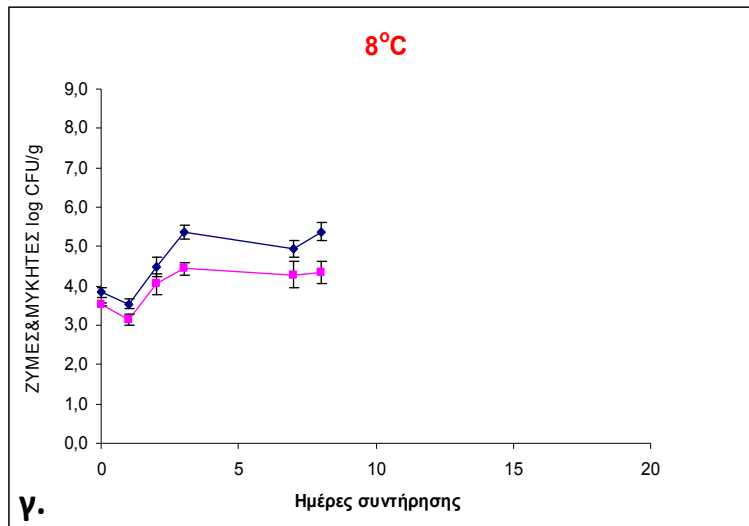
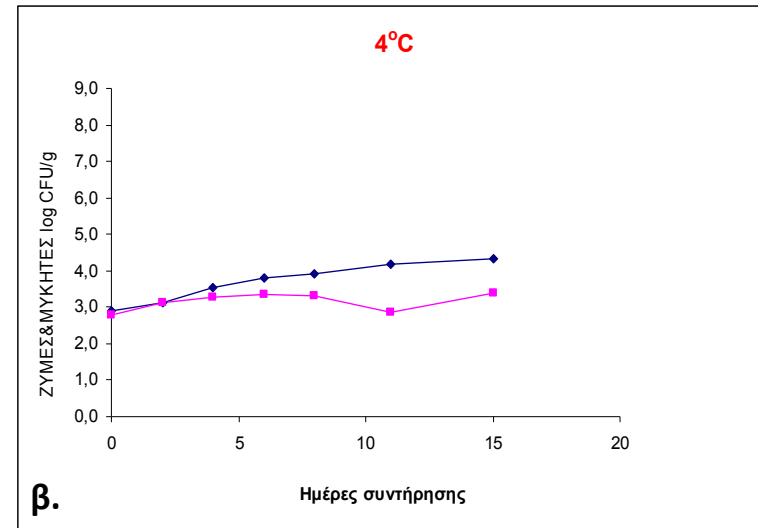
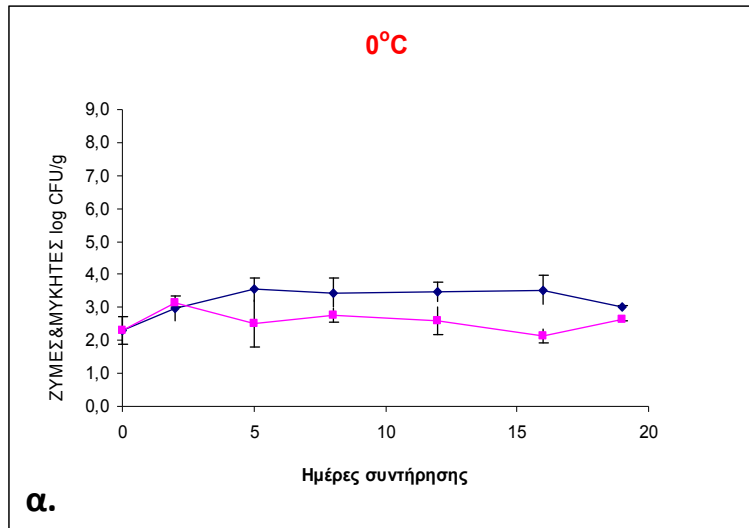
**Γράφημα 21:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης του *B. thermosphacta* σε μοσχάρισιο κιμά (500 g), με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 0°C(α.), 4°C(β.), 8°C(γ.) και 12°C(δ.), σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με εγκάρσια τομή. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 22:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοσχάρισιο κιμά (500 g), με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 0°C(α.), 4°C(β.), 8°C(γ.) και 12°C(δ.), σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με εγκάρσια τομή. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 23:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των ψευδομονάδων σε μοσχάρισιο κιμά (500 g), με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 0°C(α.), 4°C(β.), 8°C(γ.) και 12°C(δ.), σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με εγκάρσια τομή. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 24:** Γραφική αναπαράσταση της αύξησης των ζυμών και μυκήτων σε μοσχαρίσιο κιμά (500 g), με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Τα δείγματα συντηρήθηκαν στους 0°C(**α.**), 4°C(**β.**), 8°C(**γ.**) και 12°C(**δ.**), σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν με εγκάρσια τομή. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.2.3 Μέτρηση της μεταβολής του χρώματος

Το χρώμα αποτελεί την πιο σημαντική συνιστώσα στην οπτική παρατήρηση του κρέατος και επηρεάζει τόσο την εκτίμηση του καταναλωτή για τη φρεσκάδα του προϊόντος, όσο και την απόφαση αγοράς (O'Grady et al., 2000). Το γράφημα 25 αναπαριστά τη μεταβολή τη χρώματος των δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά, η οποία περιγράφεται από τις παραμέτρους  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , σύμφωνα με την εξίσωση 2. Η τάση που ακολούθησαν οι παράμετροι, ήταν παρόμοια σε όλες τις θερμοκρασίες ωστόσο όσο αυξανόταν η θερμοκρασία, τόσο πιο γρήγορα εξελισσόταν οι μεταβολές. Το γεγονός αυτό συνδέεται άρρηκτα και με τις μεταβολές στα αέρια της ατμόσφαιρας συσκευασίας, όπου το  $O_2$  μειώνεται πιο γρήγορα με την αύξηση της θερμοκρασίας, και οδηγεί σε σχηματισμό μεταμυογλοβίνης και κατ'επέκταση καστανού χρώματος στο προϊόν (Kropf, 1993). Στις υψηλές θερμοκρασίες ( $8^\circ\text{C}$ ,  $12^\circ\text{C}$ ) ο ρυθμός μεταβολής του χρώματος ήταν αισθητά μεγαλύτερος από εκείνον που καταγράφηκε στις θερμοκρασίες των  $0^\circ\text{C}$  και  $4^\circ\text{C}$  ωστόσο ο ρυθμός μεταβολής στο μάρτυρα ήταν μεγαλύτερος από τα δείγματα με τσίπουρο. Το γεγονός αυτό μαρτυρά, ότι πτητικές ουσίες που υπάρχουν στο τσίπουρο πέραν της αιθανόλης επιδρούν θετικά στο χρώμα. Στους  $0^\circ\text{C}$  και  $4^\circ\text{C}$ , ο ρυθμός μεταβολής στα δείγματα με τσίπουρο ήταν μεγαλύτερος σε σχέση με το μάρτυρα, μέχρι την 8<sup>η</sup> μέρα συντήρησης στους  $4^\circ\text{C}$  και την 12<sup>η</sup> ημέρα στους  $0^\circ\text{C}$ , όπου ο ρυθμός μεταβολής του μάρτυρα άρχισε να αυξάνεται ταχύτερα και η τελική τιμή ξεπέρασε τα δείγματα με τσίπουρο. Η παρατήρηση ότι στους 8 και  $12^\circ\text{C}$  η μεταβολή του χρώματος του τσίπουρου ήταν πιο αργή σε σχέση με αυτή του μάρτυρα, μπορεί να οφείλεται στη μεγαλύτερη πτητικότητα του τσίπουρου όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και το γρήγορο κορεσμό της ατμόσφαιρας που έχει σαν αποτέλεσμα τη θετική επίδραση στις χρωματικές παραμέτρους ακόμα και εάν οι θερμοκρασίες συντήρησης δεν είναι οι ιδανικές.

Μετά την επεξεργασία των μετρήσεων παρατηρήθηκε σε όλες τις θερμοκρασίες αυξημένη φωτεινότητα ( $L^*$ ) στα δείγματα με εφαρμογή τσίπουρου σε σύγκριση με το μάρτυρα, τόσο στην κάτω όσο και στην επάνω επιφάνεια του κιμά. Στους  $0^\circ\text{C}$  και  $4^\circ\text{C}$ , στο πάνω μέρος του κιμά, το τσίπουρο έδειξε να προκαλεί μικρές μεταβολές στην τιμή της παραμέτρου  $L^*$  κατά τη διάρκεια της συντήρησης και την τελευταία μέρα κατέληξε να έχει την ίδια τιμή με τη μηδενική μέρα ενώ ο μάρτυρας στο τέλος της συντήρησης αυξήθηκε κατά 1,5 στους  $4^\circ\text{C}$  και μειώθηκε κατά 1 στους  $0^\circ\text{C}$ . Στους  $8^\circ\text{C}$  και  $12^\circ\text{C}$ , ο

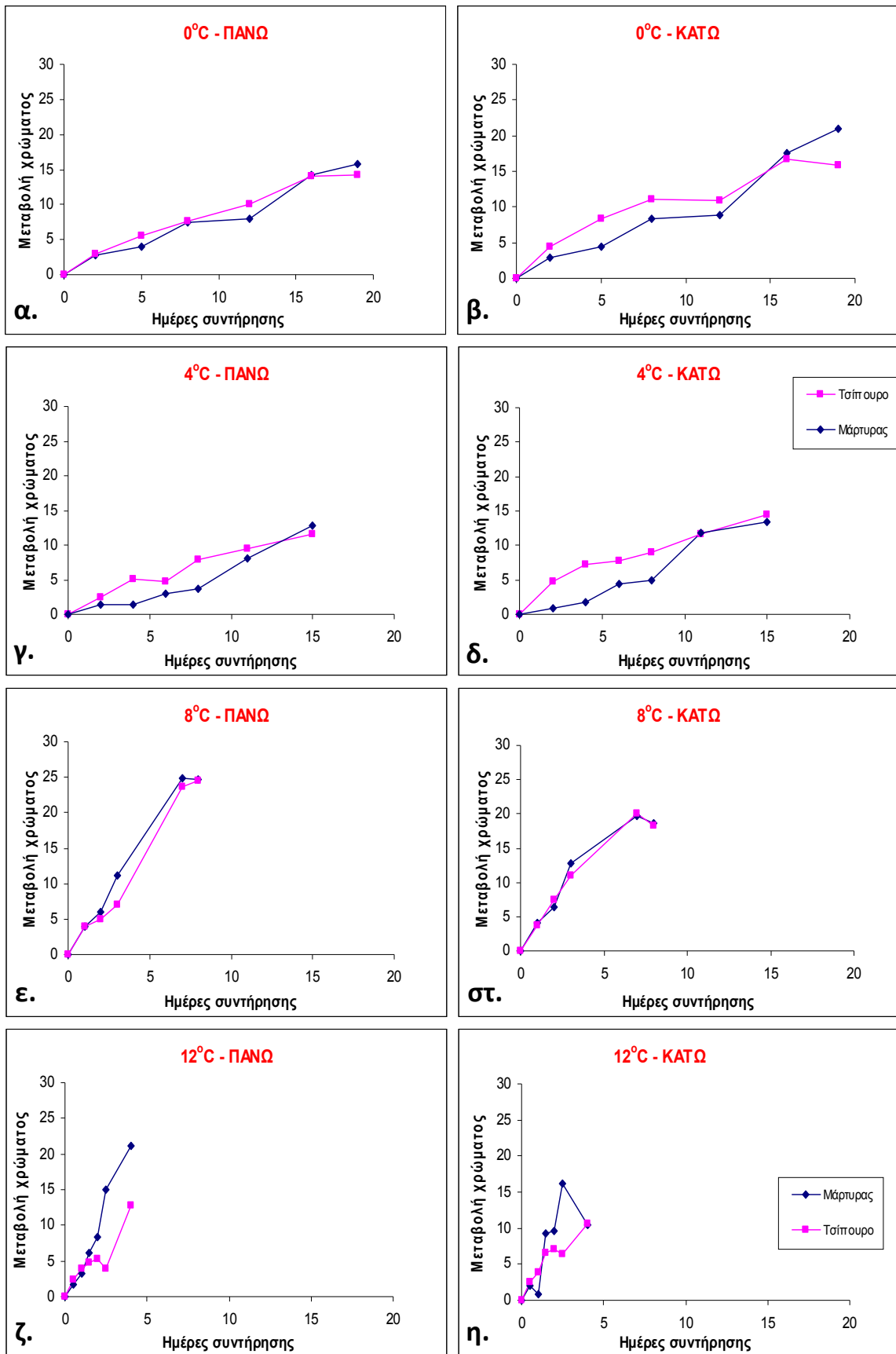


ρυθμός μεταβολής ήταν μεγαλύτερος από τις χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ στους 8°C παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση της τιμής της παραμέτρου  $L^*$ . Η διαφορά μεταξύ της φωτεινότητας του μάρτυρα και των δειγμάτων με τσίπουρο είναι πιο ευδιάκριτη στο κάτω μέρος του κιμά που ήταν σε άμεση επαφή με το απορροφητικό ύφασμα στο οποίο είχε εφαρμοστεί το τσίπουρο (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ, Γράφημα 1).

Όσο αφορά την παράμετρο της ερυθρότητας  $a^*$ , από τις πρώτες κιόλας ημέρες παρατηρούνται διαφορές στα δείγματα που συντηρήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Στους 12°C συγκεκριμένα, μετά από 1.5 ημέρα συντήρησης παρατηρήθηκε μειωμένη ερυθρότητα του μάρτυρα σε σχέση με το τσίπουρο και στις 2 επιφάνειες του κιμά. Η μεγαλύτερη μείωση της ερυθρότητας καταγράφηκε στους 8°C, όπου την 7<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, το τσίπουρο και ο μάρτυρας έφτασαν περί το ~4.5 στο πάνω μέρος και περί τις 9 μονάδες στο κάτω μέρος του κιμά. Το τσίπουρο στους 8°C δε φάνηκε να προκαλεί αξιοσημείωτη αναστολή απώλειας της ερυθρότητας. Ο ρυθμός μείωσης της παραμέτρου  $a^*$  στους 0°C και 4°C ήταν πιο σταθερός, με το μάρτυρα να παρουσιάζει υψηλότερες τιμές ερυθρότητας. Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο ότι στους 0°C τα δείγματα με τσίπουρο από την 16<sup>η</sup> ημέρα και μετά δείχνουν να σταθεροποιούν την ερυθρότητα, ενώ η τιμή στον μάρτυρα συνεχίζει να μειώνεται (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ, Γράφημα 2).

Η τιμή της παραμέτρου  $b^*$ , μειώθηκε σε πολύ μικρό βαθμό και σε καμία θερμοκρασία δεν έπεσε κάτω από την τιμή ~13. Η επίδραση το τσίπουρου δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τη μεταβολή της παραμέτρου  $b^*$  καθώς η μεταβολή της κινητικής της, δε διαφοροποιήθηκε αισθητά από εκείνη του μάρτυρα (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ, Γράφημα 3).

Η οπτική παρατήρηση των δειγμάτων σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της ανάλυσης χρώματος έδειξαν ότι το τσίπουρο έχει καλή επίδραση στη διατήρηση του χρώματος του κιμά σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>, ακόμη και σε υψηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης. Άλλες μελέτες έχουν αναφέρει επίσης τη διατήρηση του συνολικού χρώματος (ΔΕ) σε προϊόντα κρέατος με εφαρμογή τροποποιημένης ατμόσφαιρας, ή/και αντιμικροβιακών ουσιών, όπως μπαχαρικά και αιθέρια έλαια (Skandamis & Nychas 2001). Ωστόσο, η πρακτική εφαρμογή τους είναι περιορισμένη κυρίως λόγω περιορισμών που παρουσιάζονται λόγω της έντονης γεύσης και οσμής που παρουσιάζουν και αλλάζουν τα φυσικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.



**Γράφημα 25** Γραφική αναπαράσταση της μεταβολής του χρώματος μοσχαρίσιου κιμά (500 g) με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 0°C (α.,β.), 4°C (γ.,δ.), 8°C (ε.,στ.) και 12°C (ζ.,η.) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

### 3.2.4 Οργανοληπτική αξιολόγηση (Οσμή)

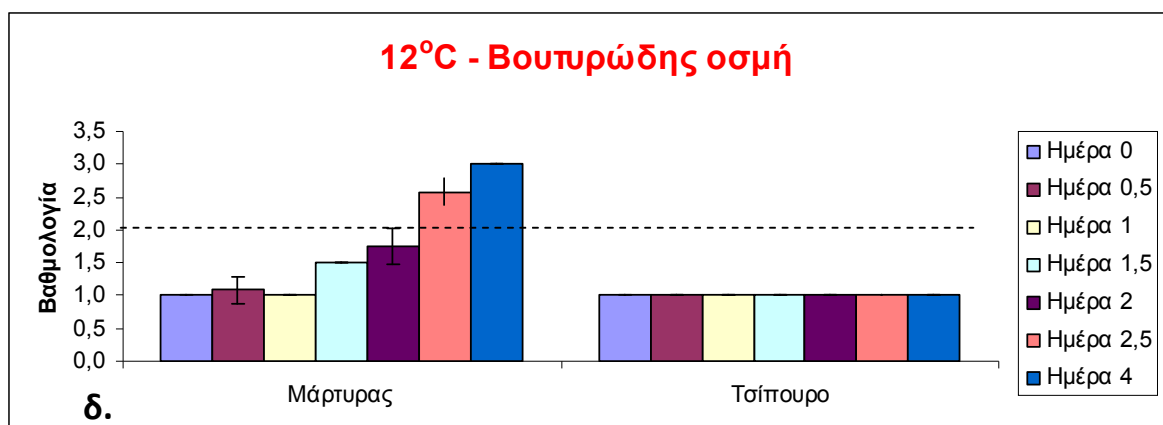
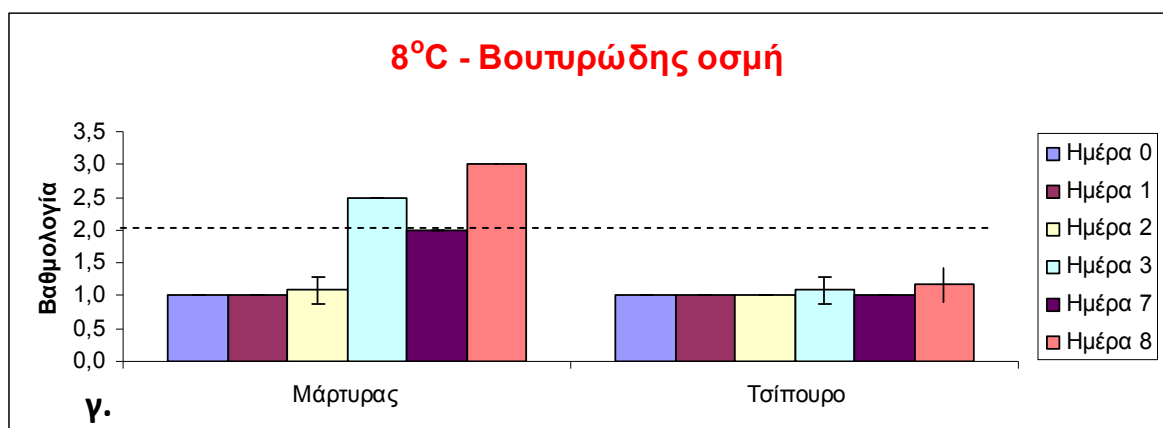
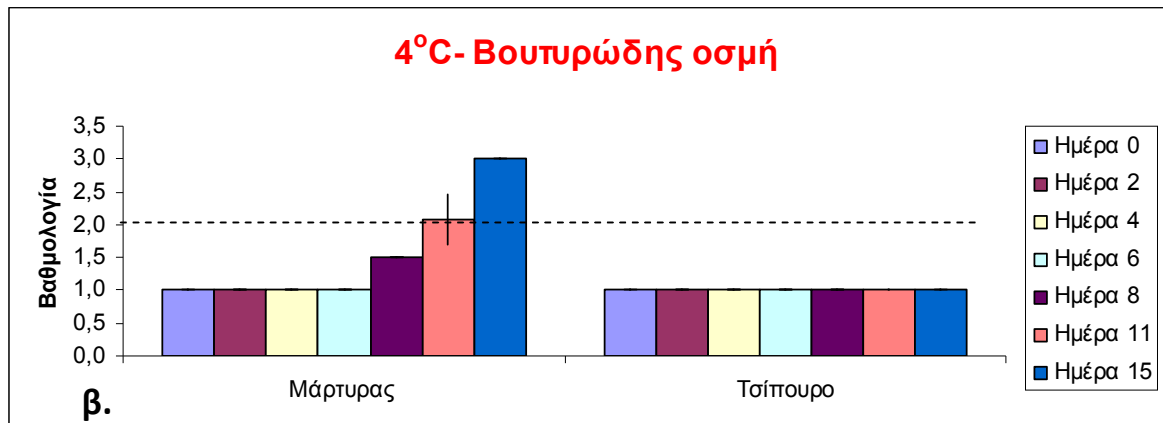
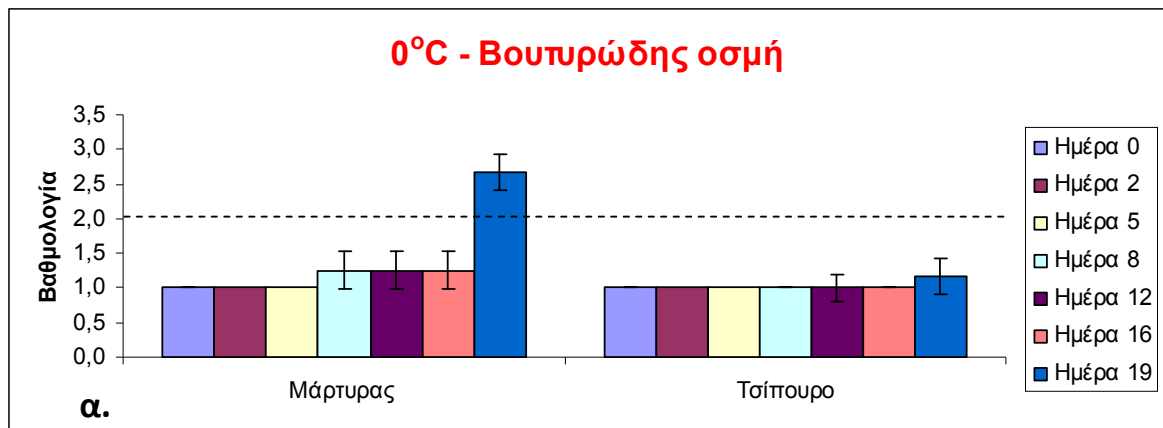
Η εφαρμογή τσίπουρου στα δείγματα μοσχαρίσιου κιμά, έδειξε να επηρεάζει και τα οργανοληπτικά αποτελέσματα που αφορούν την οσμή. Όπως προαναφέρθηκε κυριαρχία του *B.thermospacta* προκαλεί μια βουτυρώδη δυσάρεστη οσμή από την παραγωγή ακετοΐνης μέσω της διάσπασης της γλυκόζης, ενώ όταν επικρατούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανιχνεύονται όξινη δυσάρεστες οσμές (Soncin et al., 2007; Sun and Holley, 2012). Όσο αυξάνονται οι πληθυσμοί των μικροβίων οι οσμές αυτές μπορεί να μετατραπούν σε “φρουτώδεις” και τελικά σε έντονες δυσάρεστες οσμές σήψης (Ercolini et al, 2006). Εφόσον οι δύο αυτές ομάδες μικροοργανισμών κυριαρχούν σύμφωνα με τη μικροβιολογική ανάλυση, τα δείγματα κρίθηκαν ως προς τις μεταβολές στην οσμή (βουτυρώδης και όξινη οσμή) με βαθμολογική κλίμακα από 1 μέχρι 3. Οι βαθμολογίες ανώτερες του 2, χαρακτήριζαν το κρέας απορριπτέο, υποδεικνύοντας το τέλος του χρόνου ζωής του.

Στο μάρτυρα φάνηκε ότι η βουτυρώδης οσμή αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό αλλοίωσης που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε όλες τις θερμοκρασίες. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο πιο γρήγορα ο μάρτυρας φτάνει σε βαθμολογίες μεγαλύτερες του ορίου 2, γεγονός που έχει σαν αποτέλεσμα την οργανοληπτική απόρριψη των δειγμάτων, λόγω της έντονης βουτυρώδους οσμής. Χαρακτηριστικά όπως φαίνεται και στο γράφημα 26, ο μάρτυρας παρουσίασε ανάπτυξη βουτυρώδους οσμής πιο γρήγορα στους 8°C και 12°C. Αντιθέτως το τσίπουρο επέδρασε στην εμφάνιση δυσάρεστων βουτυρωδών οσμών ακόμα και στις τελευταίες ημέρες συντήρησης που τα δείγματα μπορεί να ήταν απορριπτέα είτε από μικροβιολογικά κριτήρια είτε λόγω συνολικής εμφάνισης. Σε όλες τις θερμοκρασίες, τα δείγματα στα οποία είχε εφαρμοστεί τσίπουρο, όλα σημείωσαν βαθμολογίες κατώτερες του ορίου και κανένα δεν κρίθηκε απορριπτέο. Αυτό ίσως να οφείλεται και στην πιο χαρακτηριστική οσμή του τσίπουρου που πιθανά να εμπλέκεται ή να επικαλύπτει τη βουτυρώδη οσμή.

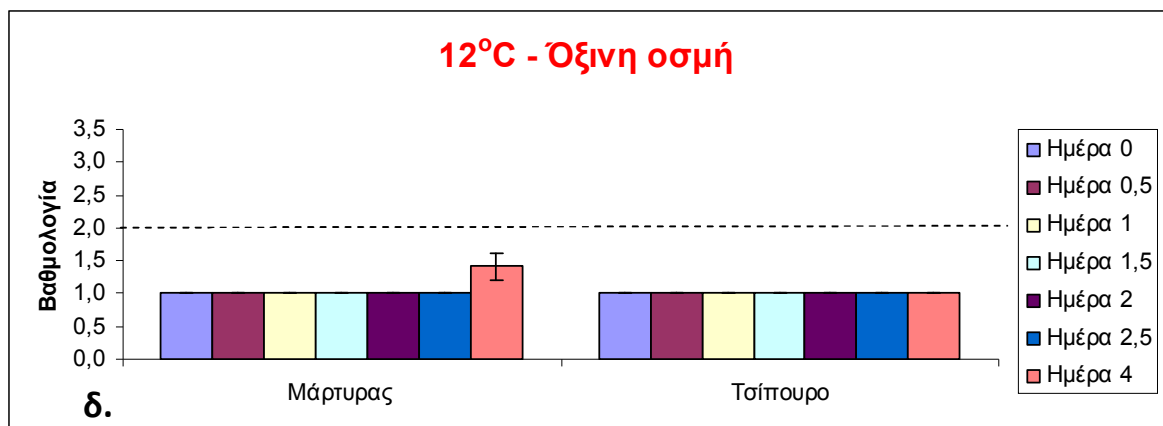
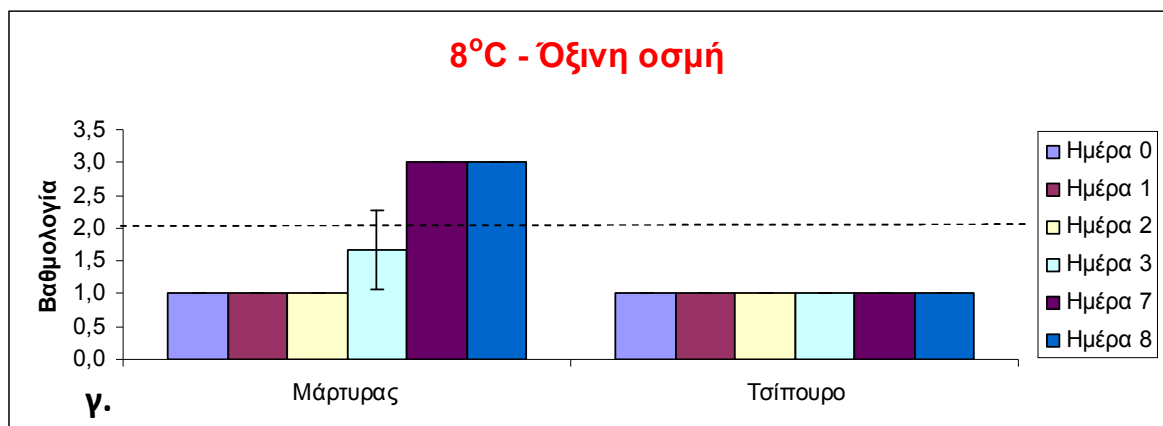
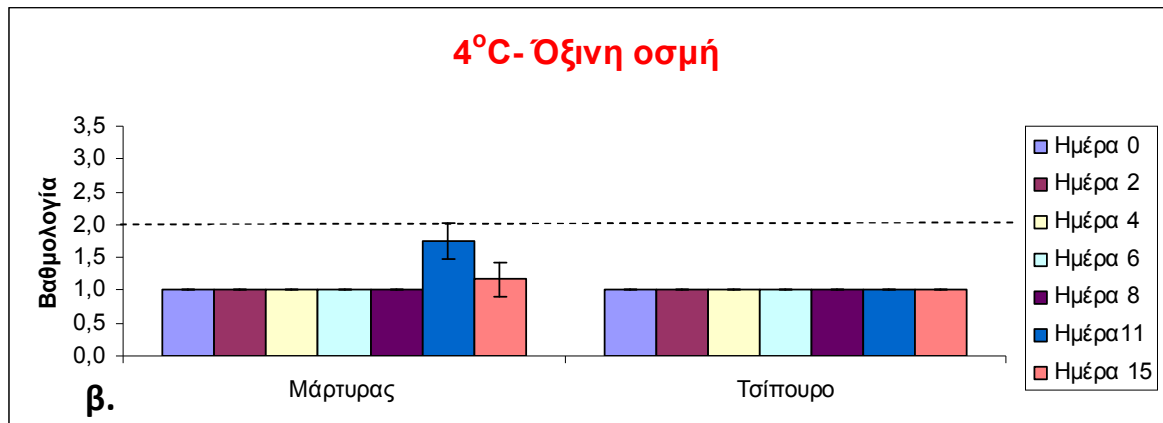
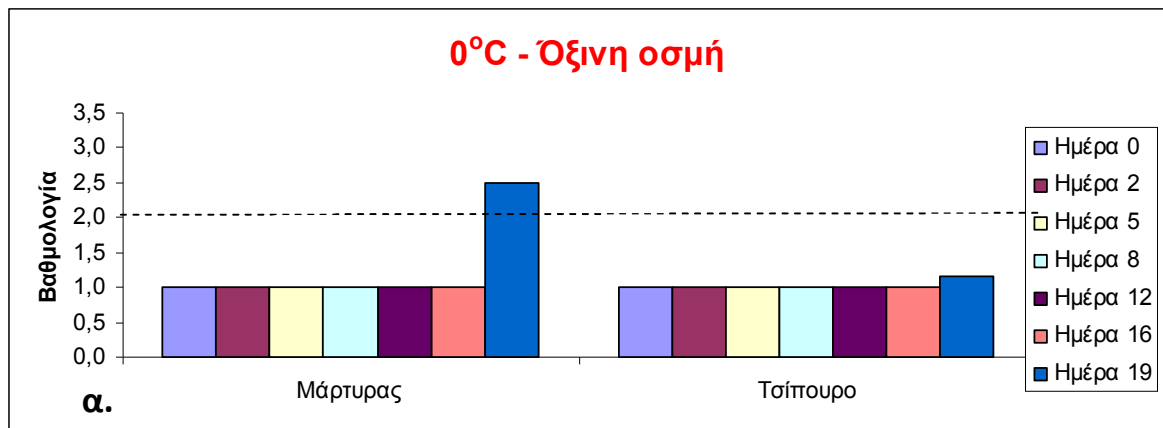
Η όξινη οσμή, δεν αποτέλεσε σημαντικό χαρακτηριστικό αλλοίωσης για τα δείγματα μοσχαρίσιου κιμά καθώς τα περισσότερα δείγματα στο μάρτυρα βαθμολογήθηκαν με βαθμολογίες κατώτερες του 2 (Γράφημα 27). Μοναδικές περιπτώσεις όπου παρουσιάστηκε απορριπτέα βαθμολογία ήταν την 19<sup>η</sup> μέρα

συντήρησης στους 0°C, και στις τελευταίες μέρες συντήρησης στους 8°C. Στα δείγματα τσίπουρου δεν υπήρξε εμφάνιση όξινων οσμών σε καμία θερμοκρασία συντήρησης.

Οι αξιολογητές ήταν σε θέση τις περισσότερες φορές να ξεχωρίσουν τους μάρτυρες από τα δείγματα με τσίπουρο. Χαρακτηριστικά, όπως ανέφεραν στις παρατηρήσεις τους, δεν αντιλαμβάνονταν σε αυτά τόσο οσμή αιθανόλης όσο μια “γλυκιά” οσμή, η οποία δεν ήταν έντονη ή απωθητική.



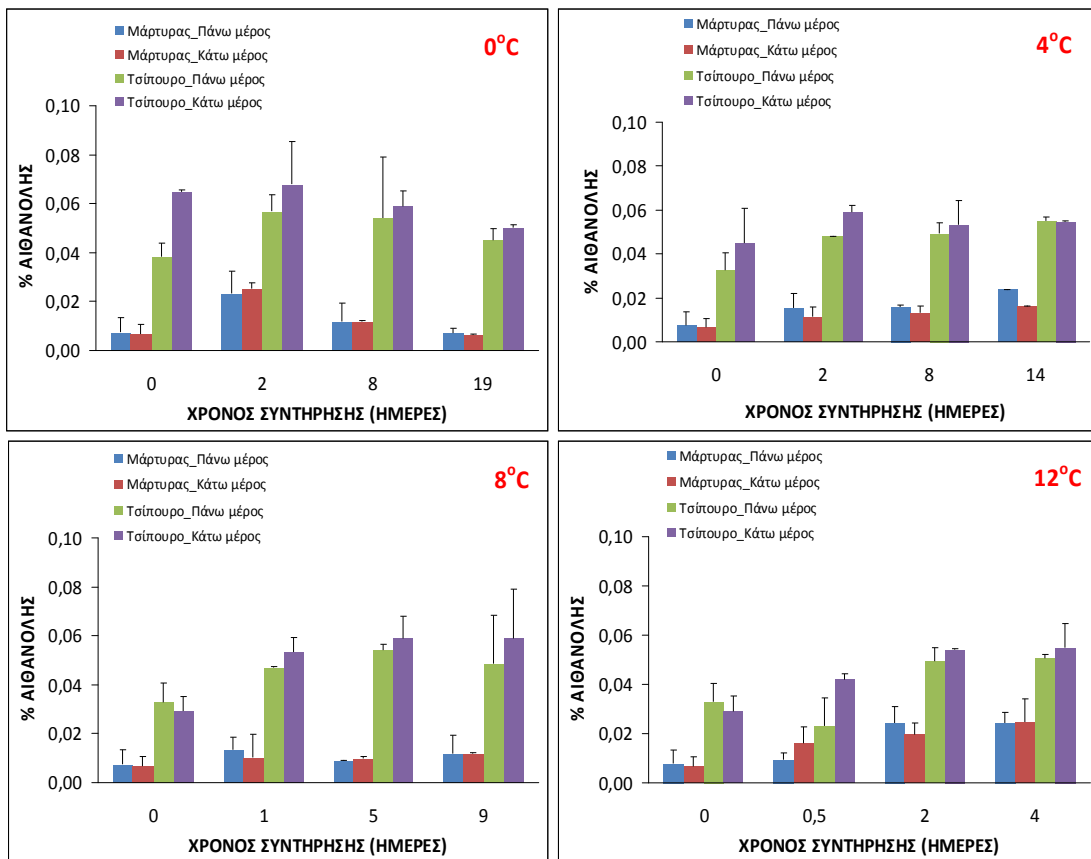
**Γράφημα 26:** Διαγράμματα οργανοληπτικής αξιολόγησης ως προς τη βουτυρώδη οσμή δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά (500 g) με εφαρμογή 50 mL τσίπουρου, που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκαν στους 0°C (α.), 4°C(β.), 8°C(γ), 12°C(δ.). Η βαθμολογία που ξεπερνάει το όριο 2 καθιστά το δείγμα οργανοληπτικά μη αποδεκτό. Βαθμολογία 1: Καθόλου βουτυρώδης οσμή και 3: Πολύ βουτυρώδης οσμή.



**Γράφημα 27:** Διαγράμματα οργανοληπτικής αξιολόγησης ως προς την όξινη οσμή δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά (500 g) με εφαρμογή 50 mL τσίπουρου, που συσκευάστηκαν σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκαν στους 0°C (α.), 4°C(β.), 8°C(γ), 12°C(δ.). Η βαθμολογία που ξεπερνάει το όριο 2 καθιστά το δείγμα οργανοληπτικά μη αποδεκτό. Βαθμολογία 1: Καθόλου όξινη οσμή και 3: Πολύ όξινη οσμή.

### 3.2.5 Αέρια Χρωματογραφία (GC-FID)

Κατά τη διάρκεια της συντήρησης φρέσκου νωπού κρέατος είναι δυνατό να παραχθούν διάφορες πτητικές οργανικές ενώσεις. Η αλκοόλη αποτελεί μια από αυτές και παράγεται από τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν και αναπτύσσονται στο κρέας κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό ψύξη, είτε σε αερόβιες συνθήκες είτε σε συσκευασίες κενού ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Casaburi et al., 2014). Η παραγόμενη αιθανόλη είναι αποτέλεσμα μεταβολικών δραστηριοτήτων που λαμβάνουν χώρα κατά την αλλοίωση. Ωστόσο στη συγκεκριμένη μελέτη αποτελούσε κρίσιμο ερώτημα το ποσοστό της αιθανόλης που περιεχόταν στα δείγματα μετά την εφαρμογή του τσίπουρου και πόσο αυξανόταν το ήδη υπάρχον ποσοστό. Στο Γράφημα 28 παρουσιάζονται τα ποσοστά (%) αιθανόλης που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα χωρίς μεταχείριση (μεταβολικό προϊόν μικροοργανισμών) και η αιθανόλη που μετανάστευσε από την εφαρμογή του τσίπουρου στον κιμά, σε συνδυασμό με την ποσότητα που παράγεται ως μεταβολικό προϊόν των μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τα δεδομένα που ελήφθησαν από την αέρια χρωματογραφία, τα ποσοστά αιθανόλης που ανιχνεύθηκαν στη μάζα των δειγμάτων με μεταχείριση ήταν μόλις 2-4 φορές υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά στους μάρτυρες. Επίσης δεν ανιχνεύθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές αιθανόλης μεταξύ των δειγμάτων που παρελήφθησαν από την επιφάνεια (άνω στρώση) και τη βάση του κιμά (κάτω στρώση). Σε καμία περίπτωση το ποσοστό της αιθανόλης που ανιχνεύθηκε δεν ξεπέρασε το 0.03% στο μάρτυρα και το 0.06-0.07% στα δείγματα με μεταχείριση. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιεκτικότητα σε αλκοόλη κ.ό του εφαρμοζόμενου τσίπουρου ήταν ~38%, το ποσοστά αυτά κρίνονται ιδιαίτερα χαμηλά και αποδεικνύουν ότι η προτεινόμενη συσκευασία ενδείκνυται για βιομηχανική χρήση και από την οπτική του μάρκετινγκ. Πρέπει να σημειωθεί ακόμα, ότι πρόκειται για ένα προϊόν το οποίο δεν είναι έτοιμο για κατανάλωση και απαιτεί θερμική επεξεργασία για να καταναλωθεί, γεγονός που θα μειώσει ή ακόμα και θα εξαλείψει αυτά τα μικρά ποσοστά αιθανόλης.



**Γράφημα 28:** Ποσοστά αιθανόλης που ανιχνεύθηκαν σε μοσχαρίσιο κιμά (n=4) που συσκευάστηκε με απορροφητικά υφάσματα στα οποία είχε εφαρμοστεί τσίπουρο 50ml, κατά τη διάρκεια της συντήρησης στους 0°C (α.), 4°C (β.), 8°C (γ.) και 12°C (δ.). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την επιφάνεια (άνω στρώση) και τη βάση του τεμαχίου μοσχαρίσιου κιμά (κάτω στρώση). Τα δείγματα χωρίς μεταχείριση εκπροσωπούν τους μάρτυρες.



### 3.2.6 Πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης

Όπως έχει προαναφερθεί η αύξηση της εμφάνισης κρουσμάτων τροφιμογενών ασθενειών παρά το γεγονός της καθιέρωσης του HACCP και κανονισμών σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων (McMeekin et al., 1997), πάντα σε συνδυασμό με τις αυστηρές απαιτήσεις των καταναλωτών οδήγησε στην ανάπτυξη ταχέων και με ακρίβεια μεθόδων που θα παρέχουν την εγγύηση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων. Καθώς η θερμοκρασία μπορεί να παρουσιάζει διακυμάνσεις στην αλυσίδα παραγωγής και διανομής των τροφίμων (Nychas et al., 2008), δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μία μαθηματική έκφραση για να περιγράψει την παραλλακτικότητα χρόνου- θερμοκρασίας (Koutsoumanis, 2001). Μία μέθοδος για την εκτίμηση του χρόνου ζωής των τροφίμων είναι η μικροβιολογία πρόβλεψης ή ποσοτική μικροβιολογία, η οποία εμπλέκει τη γνώση απόκρισης της μικροβιακής ανάπτυξης σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και εκφράζεται σε ποσοτικούς όρους μέσω μαθηματικών εξισώσεων (μοντέλων) (Koutsoumanis et al., 2006). Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες σχετικά με την πρόβλεψη της μικροβιακής ανάπτυξης σε μεταβαλλόμενες συνθήκες (Baranyi et al. 1995, Koutsoumanis 2001, Koutsoumanis et al. 2006) ενώ η ποσοτική μικροβιολογία έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και στην πρόβλεψη επίδρασης της σχέσης χρόνου- θερμοκρασίας κατά τη συντήρηση στο χρόνο ζωής κιμά (Mc Meekin & Ross 1996, Shimoni and Labuza 2000). Ο χρόνος ζωής του κιμά μπορεί να οριστεί ως ο χρόνος που απαιτείται από τις δύο κυρίαρχες ομάδες βακτηρίων να αυξηθούν από τον αρχικό τους πληθυσμό και να φτάσουν σε επίπεδα  $7 \log \text{CFU/g}$  το οποίο έχει αναφερθεί να είναι το μέσο επίπεδο αλλοίωσης (Dainty & Mackey, 1992). Στη συγκεκριμένη μελέτη οι προβλέψεις της μικροβιακής ανάπτυξης βασίστηκε σε μαθηματικά μοντέλα για την κινητική απόκριση του *B. thermosphacta* (πρώτος κυρίαρχος μικροοργανισμός) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (δεύτερα στην κυριαρχία), σε μοσχαρίσιο κιμά σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και σταθερές θερμοκρασίες συντήρησης.

Αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα ότι τα δεδομένα που απαριθμήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi and Roberts (1994) με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος DMFit. Από τις καμπύλες ανάπτυξης που προέκυψαν από το πρωτογενές μοντέλο συλλέχθηκαν σημαντικές

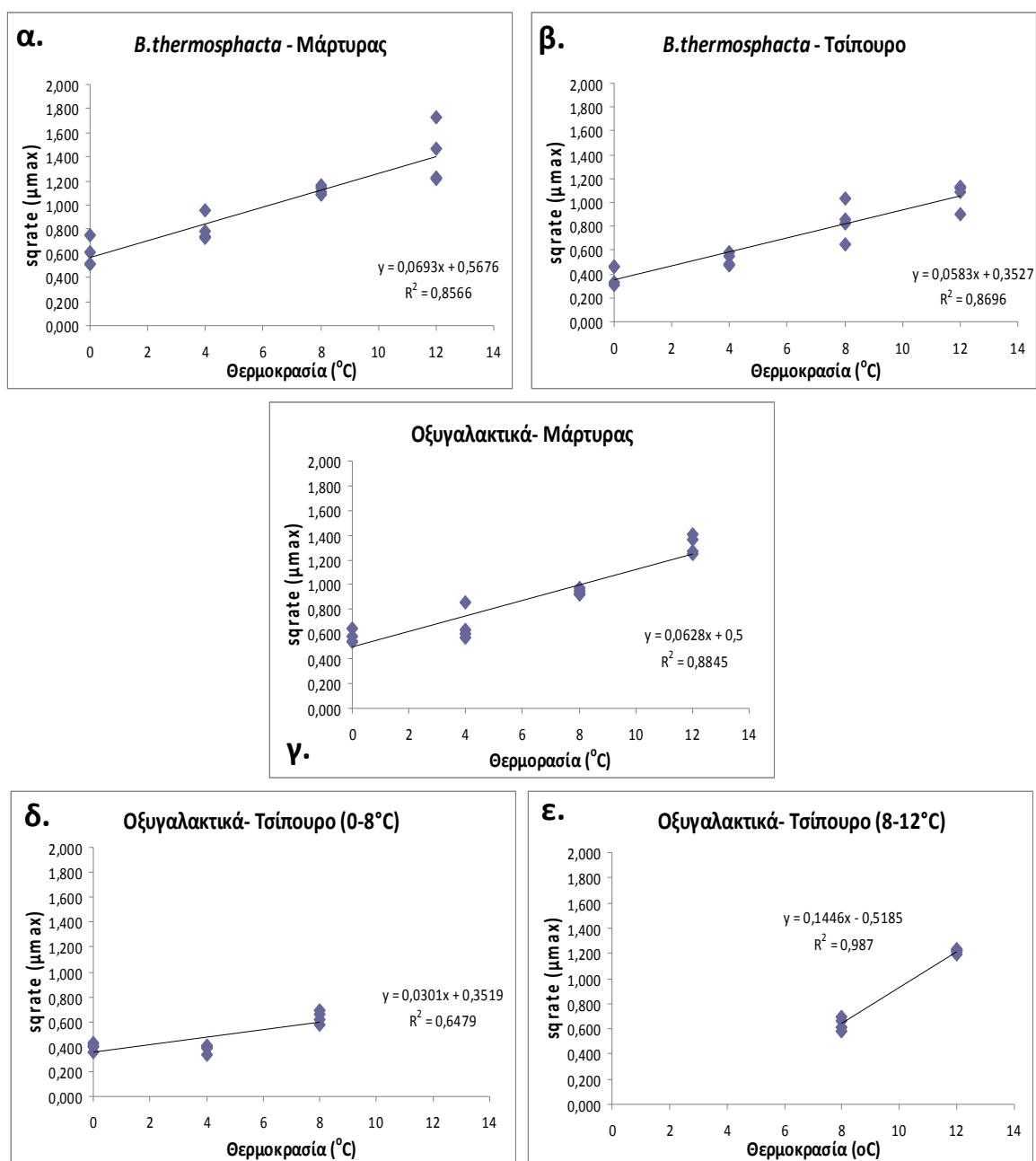
πληροφορίες (κινητικές παράμετροι για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών όπως είναι ο μέγιστος ειδικός αύξησης, η φάση προσαρμογής και ο τελικός μικροβιακός πληθυσμός) οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για τις φάσεις ανάπτυξης και την απόκριση των μικροοργανισμών στις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες συντήρησης. Όπως είναι φανερό στον πίνακα 1, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης είναι μεγαλύτερος όσο αυξάνεται η θερμοκρασία συντήρησης, τόσο στα δείγματα χωρίς μεταχείριση, όσο και σε εκείνα που έχει γίνει η εφαρμογή τσίπουρου, κάτι που επιβεβαιώνει τον καθοριστικό ρόλο που έχει η θερμοκρασία συντήρησης στο χρόνο ζωής των τροφίμων. Είναι πολύ σημαντικό επίσης να σημειωθεί το γεγονός ότι οι μέγιστοι ειδικοί ρυθμοί αύξησης ήταν χαμηλότεροι στις μεταχειρίσεις τις οποίες είχε γίνει εφαρμογή του τσίπουρου σε σχέση με τους μάρτυρες, αποτέλεσμα που αποδεικνύει την αντιμικροβιακή δράση του τσίπουρου, ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας συντήρησης. Η μεγαλύτερη επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξης συγκριτικά με τους μάρτυρες παρατηρείται όπως είναι αναμενόμενο στις χαμηλές θερμοκρασίες των 0 και 4°C ενώ αξιόλογη διαφορά παρατηρείται και στις υψηλές θερμοκρασίες των 8 και 12°C. Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων.

**Πίνακας 1:** Τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ( $\mu_{max}$ ) του *B.thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, ανά θερμοκρασία συντήρησης όπως προέκυψαν από το πρωτογενές μοντέλο του Baranyi and Roberts (1994).

<i>B.thermosphacta</i>			Οξυγαλακτικά βακτήρια		
<b>Μάρτυρας</b>			<b>Μάρτυρας</b>		
Θερμοκρασία (°C)	$\mu_{max}$	stdev	Θερμοκρασία (°C)	$\mu_{max}$	stdev
0	0,363	0,141	0	0,335	0,060
4	0,652	0,176	4	0,455	0,190
8	1,266	0,069	8	0,891	0,048
12	2,037	0,707	12	1,748	0,202
<b>Τσίπουρο</b>			<b>Τσίπουρο</b>		
Θερμοκρασία (°C)	$\mu_{max}$	stdev	Θερμοκρασία (°C)	$\mu_{max}$	stdev
0	0,156	0,066	0	0,258	0,067
4	0,275	0,057	4	0,146	0,026
8	0,723	0,262	8	0,410	0,064
12	1,132	0,223	12	1,482	0,049

Ο ειδικός ρυθμός αύξησης των δύο κυρίαρχων βακτηρίων αλλοίωσης μοντελοποιήθηκε συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης με τη χρήση του δευτερογενούς μοντέλου τύπου τετραγωνικής ρίζας. Οι εξισώσεις που περιγράφουν το παραπάνω ήταν της μορφής  $y = ax+b$  και παριστάνονται στο Γράφημα 29. Τα αποτελέσματα από το πείραμα που πραγματοποιήθηκε σε σταθερές θερμοκρασιακές συνθήκες συντήρησης έδειξε ότι

το δευτερογενές μοντέλο τετραγωνικής ρίζας περιγράφει επιτυχώς την επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του *B.thermosphacta* αλλά και των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε ένα εύρος από 0°C έως 12°C. Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν από αυτό το μέρος της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για την πρόβλεψη του χρόνου ζωής του μοσχαρίσιου κιμά σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες. Στο δευτερογενές μοντέλο τύπου τετραγωνικής ρίζας, οι τιμές του ειδικού ρυθμού αύξησης ενσωματώνονται στο μοντέλο υπό τη μορφή της τετραγωνικής τους ρίζας. Από το γράφημα 29 και την εξίσωση 1, προκύπτουν οι τιμές του πίνακα 2 που ακολουθεί.



**Γράφημα 29:** Διαγράμματα του δευτερογενούς μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας για την επίδραση της θερμοκρασίας στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (μmax) του *B.thermosphacta* (α. χωρίς μεταχείριση, β. με εφαρμογή τσίπουρου) και των οξυγαλακτικών βακτηρίων (γ. χωρίς μεταχείριση, δ. και ε. με εφαρμογή τσίπουρου) σε μοσχαρίσιο κιμά που συντηρήθηκε σε

τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Τα σημεία αντιπροσωπεύουν τις παρατηρούμενες τιμές (observed) ενώ οι ευθείες γραμμές αναπαριστούν την ευθεία γραμμική παλινδρόμησης. Τα διαγράμματα δ. και ε. αναπαριστούν την προσαρμογή του μοντέλου (δείγματα με εφαρμογή τσίπουρου) σε δύο θερμοκρασιακά διαστήματα υπό και υπέρ των 8°C.

**Πίνακας 2:** Εκτιμώμενες τιμές των παραμέτρων *b* και  $T_{min}$ , όπως προκύπτουν από το δευτερογενές μοντέλο τύπου τετραγωνικής ρίζας και την εξίσωση 1 σε συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά με την εφαρμογή 50 mL τσίπουρου σε απορροφητικά υφάσματα. Τα δείγματα χωρίς μεταχείριση θεωρούνται ως μάρτυρες.

Παράμετροι	<i>B. thermosphacta</i>		Οξυγαλακτικά βακτήρια		
	Μάρτυρας	Τσίπουρο	Μάρτυρας	Τσίπουρο (0-8°C)	Τσίπουρο (8-12°C)
<b>b</b>	0.069	0.058	0.063	0.030	0.145
<b>T<sub>min</sub></b>	-8.190	-6.050	-7.962	-11.691	3.586

Όπως έχει αναφερθεί σε άλλα σημεία της ενότητας των αποτελεσμάτων, ένας πολύ σημαντικός παράγοντας σχετικά με το χρόνο ζωής των τροφίμων, είναι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός που εμφανίζεται στο τρόφιμο. Η σχέση αυτών των δύο είναι αντιστρόφως ανάλογη αφού όπως είναι αναμενόμενο όσο υψηλότερος είναι ο αρχικός πληθυσμός, τόσο πιο γρήγορα θα επέλθει η αλλοίωση. Στο συγκεκριμένο πείραμα, τα δείγματα προέρχονταν από διαφορετικές παρτίδες μοσχαρίσιου κιμά και πολλές φορές σημειώνονταν σημαντικές διαφορές στους αρχικούς πληθυσμούς της OMX και κατ' επέκταση των κυρίαρχων αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Η σημασία που έχει ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός στο χρόνο ζωής, φαίνεται και από τα υποθετικά σενάρια υψηλής και χαμηλής αρχικής επιμόλυνσης στην πρόβλεψη του χρόνου ζωής που ακολουθούν, για τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος σε συσκευασίες μοσχαρίσιου κιμά και είναι αναφορικά με τους κυρίαρχους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς (*B. thermosphacta* και οξυγαλακτικά βακτήρια).

- ***B.thermosphacta***

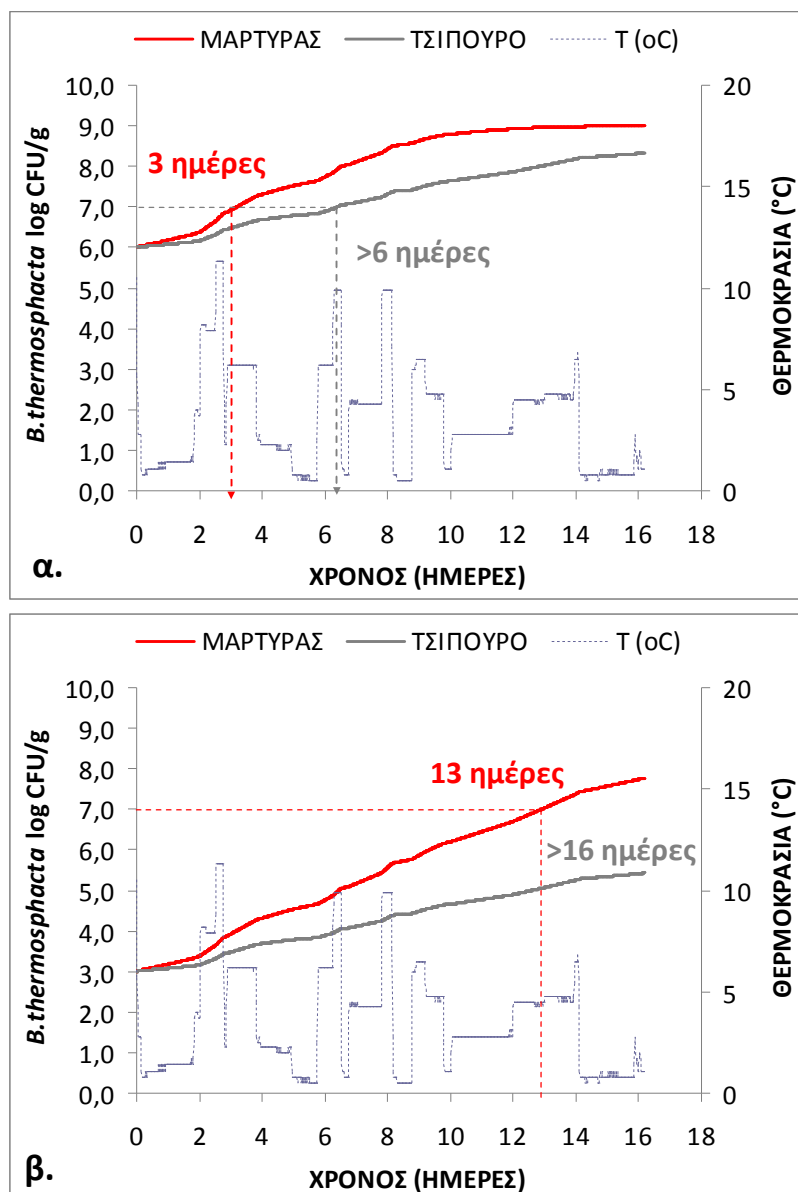
1<sup>ο</sup> Σενάριο: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός της τάξης των 6 log CFU/ g.

Το πρώτο σενάριο αφορά την περίπτωση κατά την οποία ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του *B.thermosphacta* στο μοσχαρίσιο κιμά που συντηρείται υπό μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% CO<sub>2</sub>: 20% O<sub>2</sub> βρίσκεται να είναι 6 log CFU/ g. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 30 (α.), ο μάρτυρας φτάνει το μικροβιολογικό όριο των 7 log CFU/g περί την 3<sup>η</sup> μέρα συντήρησης,

ενώ το δείγμα με την εφαρμογή του τσίπουρου φαίνεται να έχει χρόνο ζωής > από 6 ημέρες.

2<sup>ο</sup> Σενάριο: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός της τάξης των 3 log CFU/ g.

Σε αυτή την περίπτωση ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του *B.thermosphacta* βρέθηκε να είναι της τάξης των 3 log CFU/ g. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 30 (β.) ο μάρτυρας φτάνει το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης την 13<sup>η</sup> μέρα συντήρησης ενώ η μεταχείριση με τσίπουρο έχει χρόνο ζωής > από 16 ημέρες.



**Γράφημα 30:** Γραφική αναπαράσταση πρόβλεψης της ανάπτυξης του *B.thermosphacta* σε μοσχαρίσιο κινά που συντηρείται σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας. Στο διάγραμμα α. ο πληθυσμός του βακτηρίου ξεκινά από τους 6 log CFU/g ενώ στο β. ο αρχικός πληθυσμός είναι 3 log CFU/g.

- **Οξυγαλακτικά βακτήρια**

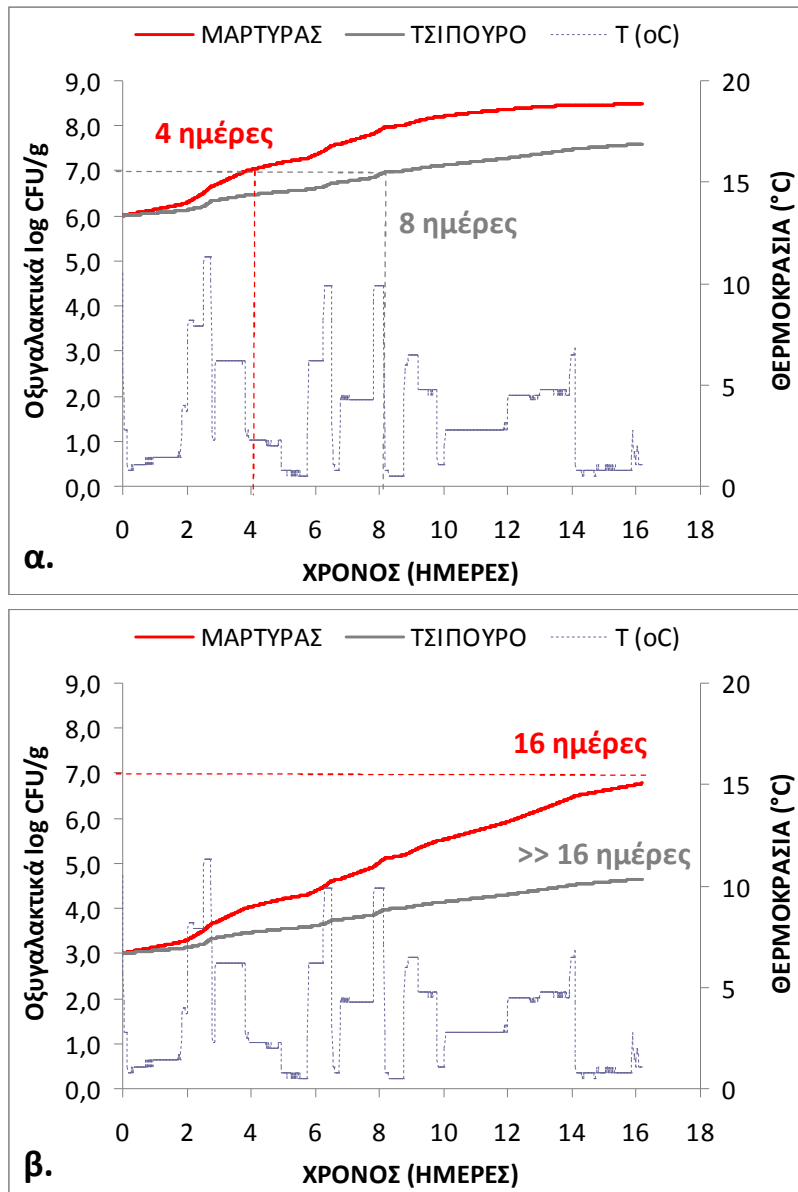
1<sup>ο</sup> Σενάριο: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός της τάξης των 6 log CFU/ g.

Υποθέτοντας ότι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά βρέθηκε να είναι 6 log CFU/g, ο προβλεπόμενος χρόνος στον οποίο ο μάρτυρας θα φτάσει τους 7 log CFU/g είναι 4 ημέρες. Οι μεταχειρίσεις με εφαρμογή τσίπουρου παρουσιάζουν στην περίπτωση αυτή εκτιμώμενο χρόνο ζωής ~ 8 ημέρες συντήρησης σε μεταβαλλόμενες συνθήκες (Γράφημα 31, α.).

2<sup>ο</sup> Σενάριο: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός της τάξης των 3 log CFU/ g.

Σε αυτή την περίπτωση ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων βρέθηκε να είναι της τάξης των 3 log CFU/ g. Όπως φαίνεται στο Γράφημα 31 (β.) ο μάρτυρας φτάνει το μικροβιολογικό όριο αλλοίωσης περί την 16<sup>η</sup> μέρα συντήρησης ενώ η μεταχείριση με τσίπουρο έχει μικροβιολογικό χρόνο ζωής πολύ περισσότερο από 16 ημέρες αφού την τελευταία ημέρα συντήρησης (16<sup>η</sup>) ο πληθυσμός προβλέπεται να βρίσκεται στους ~4.6 log CFU/g.

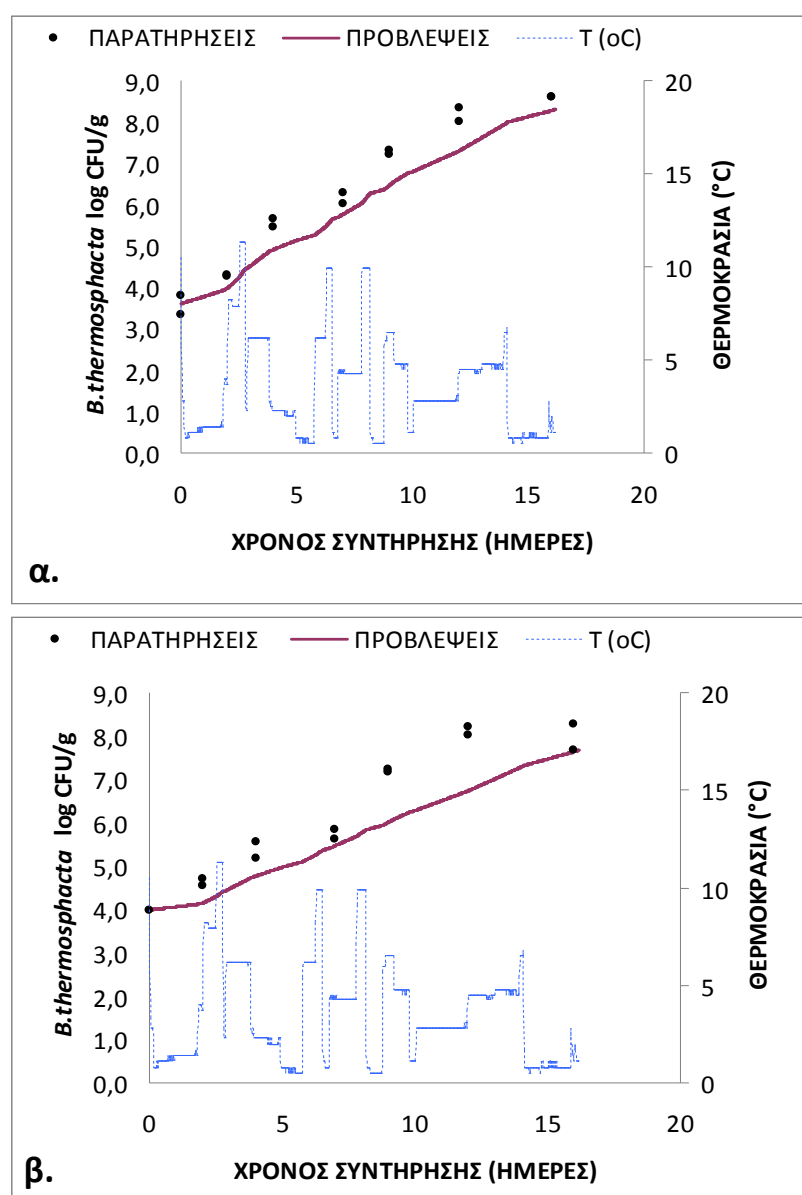
Από τα παραπάνω υποθετικά σενάρια, γίνεται φανερό, ότι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός ενός τροφίμου και συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη, μοσχαρίσιου κιμά, είναι υψίστης σημασίας για το χρόνο ζωής του και δύναται να μεταβάλλει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Ανεξάρτητα από το μάρτυρα, του οποίου ο χρόνος ζωής παρατείνεται όταν οι αρχικοί μικροβιακοί πληθυσμοί του κιμά είναι χαμηλοί, και η επίδραση του αντιμικροβιακού παράγοντα (τσίπουρο) είναι πιο έντονη, δραστική και αποτελεσματική σε χαμηλές αρχικές τιμές μικροβιακού πληθυσμού ακόμα και στις μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες συντήρησης.



**Γράφημα 31:** Γραφική αναπαράσταση της πρόβλεψης ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά που συντηρείται σε μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας. Στο διάγραμμα **α.** ο πληθυσμός του των βακτηρίων ξεκινά από τους 6 log CFU/g ενώ στο **β.** ο αρχικός πληθυσμός είναι 3 log CFU/g.

Η επικύρωση των μοντέλων ανάπτυξης των κυρίαρχων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν παραπάνω πραγματοποιήθηκε σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες με εύρος από 0°C- 10°C. Ωστόσο δεν πρέπει να αγνοούμε το γεγονός ότι η επιβίωση και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών εκτός από τις συνθήκες συντήρησης που επικρατούν επηρεάζεται και από τη σύσταση του τροφίμου (Wilson et al., 2002) η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση του μοσχαρίσιου κιμά, χαρακτηρίζεται ως πολύπλοκη. Η σύγκριση των πραγματικών τιμών ανάπτυξης της μικροβιακής αλλοίωσης (παρατηρήσεις) και η πρόβλεψη των μοντέλων ανάπτυξης για το συγκεκριμένο προφίλ θερμοκρασιών αναπαριστάται στο γράφημα 32 για τον *B.thermosphacta* (πρώτος σε

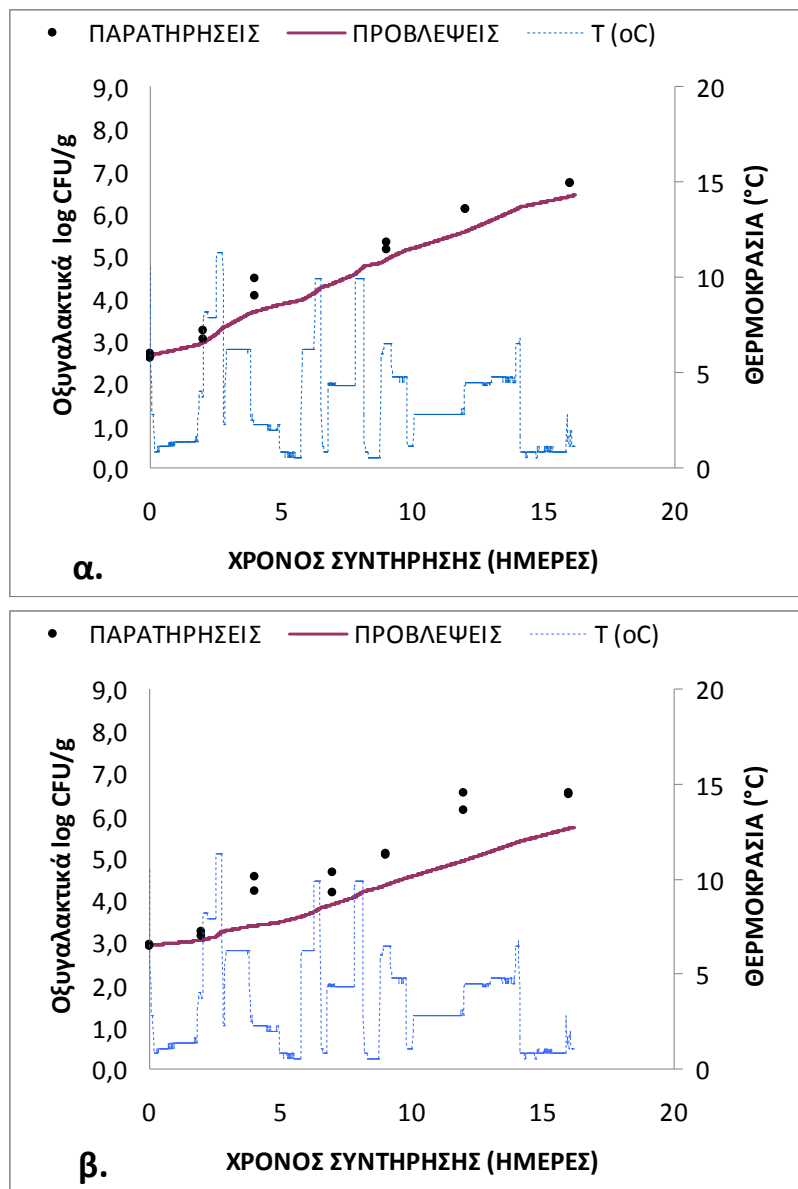
κυριαρχία μικροοργανισμός) και στο γράφημα 33 για τα οξυγαλακτικά βακτήρια (δεύτερη ομάδα σε κυριαρχία). Φάνηκε να υπάρχει καλή συσχέτιση μεταξύ των παρατηρούμενων τιμών και των προβλέψεων. Αποκλίσεις που μπορεί να προκύπτουν από τις προβλέψεις δεν συνεπάγεται ότι το μοντέλο δεν είναι αποτελεσματικό αλλά πιθανότατα ότι και άλλοι παράγοντες εκτός από αυτούς που χρησιμοποιούνται στο μοντέλο, έχουν επίδραση στη μικροβιακή συμπεριφορά (McMeekin et al.,1997). Ωστόσο υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης της επικύρωσης του μοντέλου σε επόμενα ερευνητικά εγχειρήματα, ενσωματώνοντας στο μοντέλο διαφορετικούς παράγοντες (π.χ. pH, αλατότητα, ποσοστό λίπους) που θα επιφέρουν ακόμα καλύτερο αποτέλεσμα.



**Γράφημα 32:** Παρατηρήσεις και προβλέψεις ανάπτυξης του κυρίαρχου μικροοργανισμού *B. thermosphacta* σε μοσχαρίσιο κιμά (500g) που συσκευάστηκε με την εφαρμογή τσίπουρου σε απορροφητικά υφάσματα (50mL) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκε σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες. Η κόκκινη συνεχής γραμμή



αναπαριστά τις προβλέψεις, τα μαύρα σημεία τις παρατηρήσεις και η διακεκομμένη μπλε γραμμή τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Γράφημα **α.**) χωρίς μεταχείριση (μάρτυρας) , **β.**) με εφαρμογή τσίπουρου.



**Γράφημα 33:** Παρατηρήσεις και προβλέψεις ανάπτυξης των οξυγαλακτικών βακτηρίων (δεύτερα σε κυριαρχία) σε μοσχαρίσιο κιμά (500g) που συσκευάστηκε με την εφαρμογή τσίπουρου σε απορροφητικά υφάσματα (50mL) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub> και συντηρήθηκε σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες. Η κόκκινη συνεχής γραμμή αναπαριστά τις προβλέψεις, τα μαύρα σημεία τις παρατηρήσεις και η διακεκομμένη μπλε γραμμή τις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας. Γράφημα **α.**) χωρίς μεταχείριση (μάρτυρας) , **β.**) με εφαρμογή τσίπουρου.

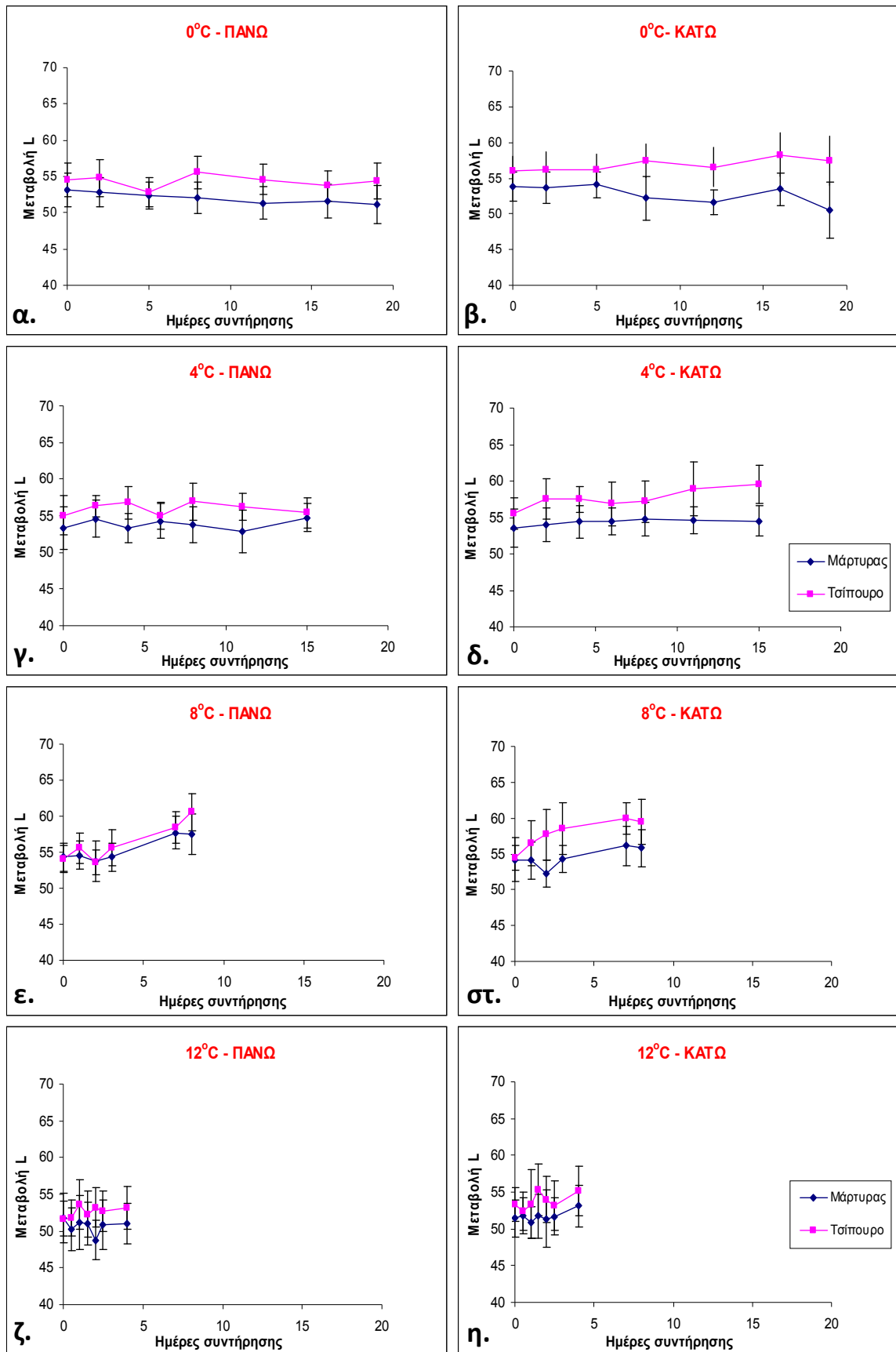
## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα διαδοχικά πειραματικά στάδια κατά την Ενότητα 1, όπου σκοπός ήταν να γίνει η επιλογή του καταλληλότερου συνδυασμού αντιμικροβιακής ουσίας, προστιθέμενου όγκου και επιτυχούς εφαρμογής αυτών ώστε να αναπτυχθεί η τελική συσκευασία, ανέδειξαν την εφαρμογή του τσίπουρου (50 mL συνολικός όγκος) με προσθήκη σε απορροφητικό ύφασμα που τοποθετήθηκε στο κάτω μέρος της συσκευασίας αλλά και στην μεμβράνη συσκευασίας (κάτω από την ετικέτα) ως την ιδανικότερη μεταχείριση για την επέκταση του χρόνου ζωής μοσχαρίσιου κιμά (500g). Το τσίπουρο, ως αντιμικροβιακός παράγοντας, παρουσίασε συνολικά την πιο ικανοποιητική και ήπια δράση σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις, σε όλες τις εξεταζόμενες παραμέτρους που σχετίζονται με την αλλοίωση (μικροβιολογικές αναλύσεις, διατήρηση ελκυστικού χρώματος σε σχέση με τους μάρτυρες, οργανοληπτική αξιολόγηση της οσμής και συνολικής εικόνας, μεταβολή pH και μεταβολή στη σύσταση των αερίων εντός της συσκευασίας). Επιπλέον η επιλογή του τσίπουρου είναι πιο εύκολο να καλύψει και άλλες πτυχές αναφορικά με ηθικά διλήμματα που μπορεί να αναδυθούν σχετικά με τη χρήση αλκοολούχων αποσταγμάτων σε τρόφιμα, καθώς τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας έδειξαν ότι τα ποσοστά αιθανόλης που υπάρχουν στον κιμά με την εφαρμογή του τσίπουρου είναι κατώτερα του 0,1% κ.ό.. Είναι σημαντικό επίσης να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι πρόκειται για ένα τρόφιμο το οποίο δεν είναι έτοιμο για κατανάλωση (οπότε και τα ποσοστά θα μειωθούν περαιτέρω μετά το ψήσιμο) αλλά και ότι διάφορα αλκοολούχα αποστάγματα (π.χ. κρασί, μπύρα) χρησιμοποιούνται ευρύτατα και πολλά χρόνια σε πολλές εθνικές κουζίνες, για να βελτιώσουν την γεύση κατά τη διάρκεια του μαγειρέματος. Η προοπτική της εφαρμογής μιας τέτοιας τεχνολογίας από τη βιομηχανία τροφίμων ενισχύεται από το γεγονός ότι πολλές εφαρμογές συσκευασίας με εφαρμογή αιθανόλης ως αντιμικροβιακό, έχουν κατοχυρωθεί και διατίθενται ήδη στο εμπόριο πχ. φιλμ από τα οποία απελευθερώνονται πτητικές ουσίες, θήκες ενθυλάκωσης ή αυτοκόλλητες ταινίες που προσκολλώνται στο υλικό συσκευασίας (Floros et al. 1997, Labuza & Breene 1989, Smith et al. 1995). Ωστόσο, πριν την εμπορευματοποίηση από τη βιομηχανία απαιτείται να εκτιμηθεί και το περιεχόμενο ποσοστό αιθανόλης μετά το μαγείρεμα, προκειμένου να ενσωματωθεί στην εμπορική ετικέτα και να διασφαλιστεί ότι πρόκειται για ένα

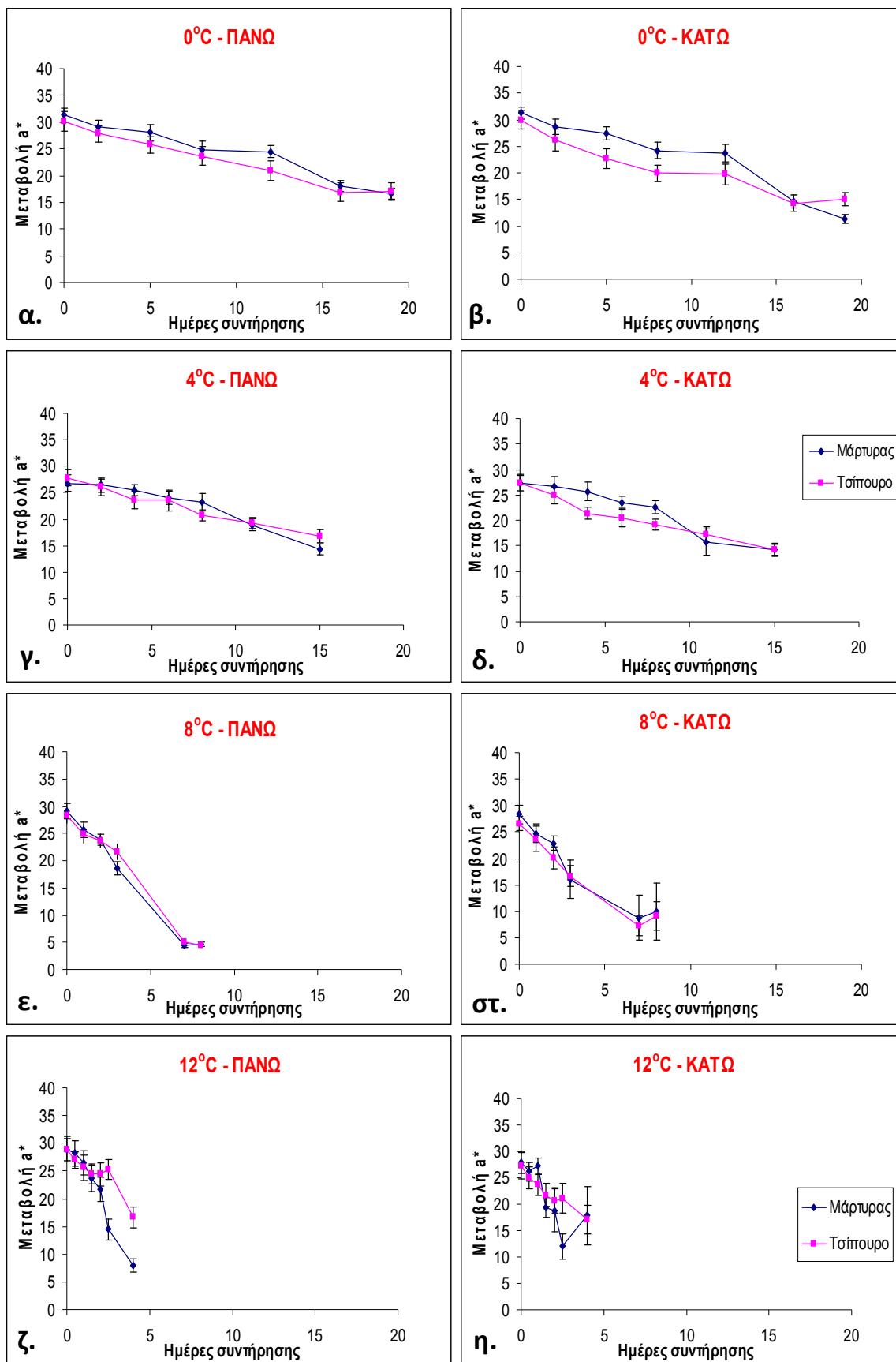
προϊόν που απευθύνεται στο γενικό πληθυσμό. Ακόμα τα αποτελέσματα της επικύρωσης των μοντέλων ανάπτυξης των κυρίαρχων μικροοργανισμών που αναπτύχθηκαν σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες παρουσίασαν καλή συσχέτιση μεταξύ των παρατηρούμενων τιμών και των προβλέψεων ειδικά αν ληφθεί υπόψη ότι αναφερόμαστε σε ένα φρέσκο προϊόν με πολύπλοκη δομή όπως είναι το κρέας. Ωστόσο υπάρχουν προοπτικές βελτίωσης σε μελλοντικές ερευνητικές μελέτες που θα ενσωματώνουν διαφορετικούς παράγοντες στο μοντέλο, όπως το pH ή την αλατότητα θα οδηγήσουν σε ακόμα καλύτερα αποτελέσματα.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν πως η εφαρμογή των αλκοολούχων αποσταγμάτων και συγκεκριμένα του τσίπουρου σε απορροφητικά υφάσματα σε συνδυασμό με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασίας είναι μια υποσχόμενη, αποτελεσματική και ήπια εναλλακτική αντιμικροβιακή τεχνολογία συσκευασίας για την παράταση του χρόνου ζωής μοσχαρίσιου κιμά κατά τη διάρκεια της συντήρησης στην ψυκτική αλυσίδα. Ωστόσο πρέπει να γίνει κατανοητό ότι η τήρηση των ορίων θερμοκρασίας κατά την διανομή και τη συντήρηση, καθώς και η καλή μεταχείριση του προϊόντος από τον καταναλωτή, είναι υψίστης σημασίας για το χρόνο ζωής. Η προσοχή της βιομηχανίας τροφίμων από την πλευρά της πρέπει να στραφεί σε θέματα, όπως ο προσδιορισμός του χρόνου ζωής του προϊόντος, τη συνολική εμφάνιση του, τη σχέση κόστους- αποτελεσματικότητας και την εμπορευματοποίηση ενός νέου προϊόντος πριν την κυκλοφορία του στην αγορά. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης μπορεί να βοηθήσουν να απαντηθούν τα δύο πρώτα θέματα, αφού έδειξαν ότι η εφαρμογή του τσίπουρου παρατείνει σημαντικά το χρόνο ζωής του μοσχαρίσιου κιμά ενώ ταυτόχρονα συνέβαλλε με τη συνέργεια της τροποποιημένης ατμόσφαιρας, στο καλύτερο χρώμα και οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος σε σύγκριση με τα δείγματα χωρίς μεταχείριση.

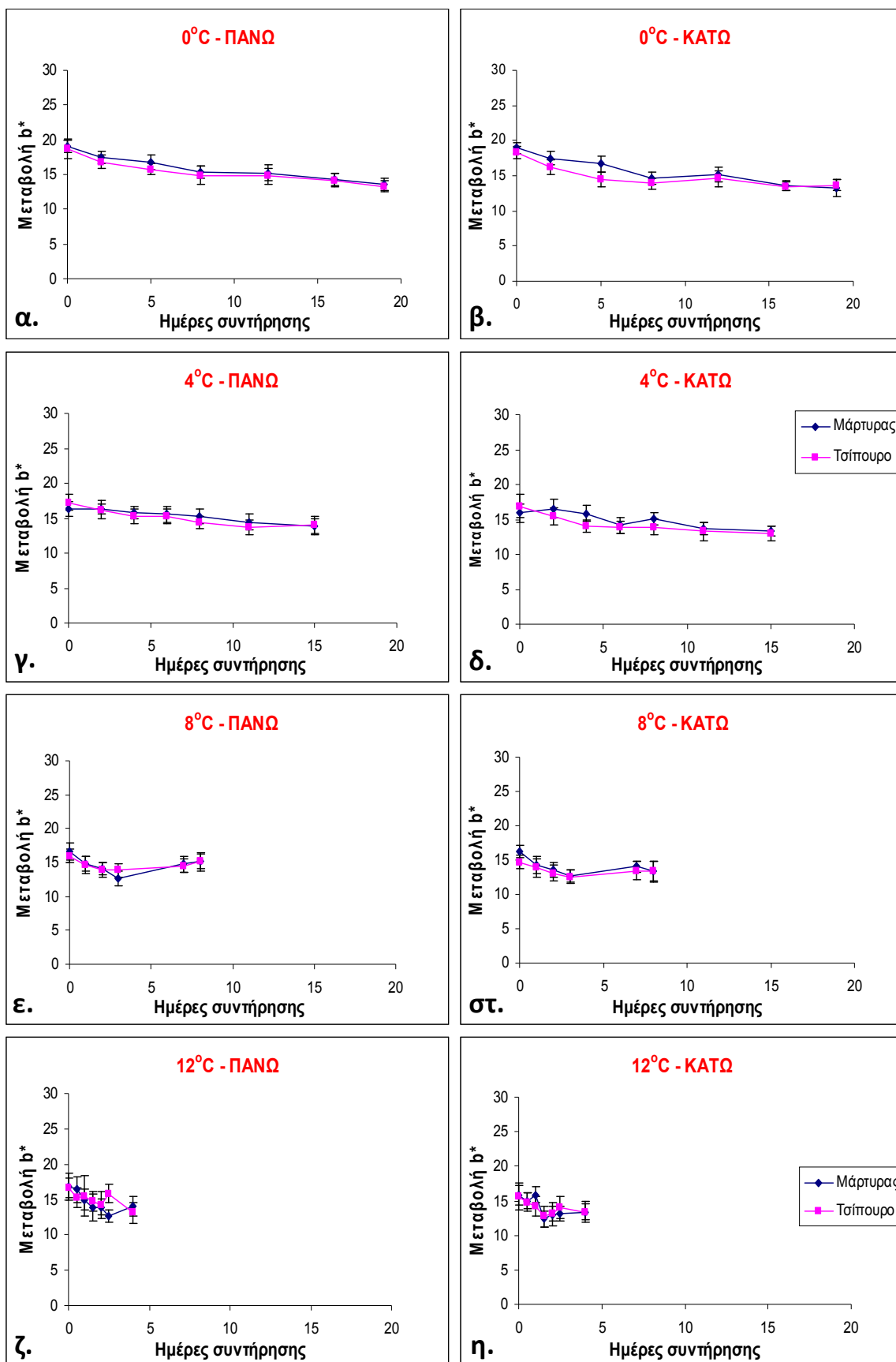
## 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



**Γράφημα 1:** Γραφική αναπαράσταση μεταβολής της παραμέτρου L\* μοσχάρισιου κιμά (500 g) με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Ο μοσχάρισιος κιμάς συντηρήθηκε στους 0°C (α.,β.), 4°C (γ.,δ.), 8°C (ε.,στ.) και 12°C (ζ.,η.) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 2:** Γραφική αναπαράσταση μεταβολής της παραμέτρου  $a^*$  μοσχारीσιου κιμά (500 g) με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Ο μοσχάρισιος κιμάς συντηρήθηκε στους 0°C (α.,β.), 4°C (γ.,δ.), 8°C (ε.,στ.) και 12°C (ζ.,η.) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.



**Γράφημα 3:** Γραφική αναπαράσταση μεταβολής της παραμέτρου  $b^*$  μοσχαρίσιου κιμά (500 g) με εφαρμογή τσίπουρου (50 mL) σε απορροφητικά υφάσματα στη βάση και κάτω από την ετικέτα της συσκευασίας. Ο μοσχαρίσιος κιμάς συντηρήθηκε στους 0°C (α.,β.), 4°C (γ.,δ.), 8°C (ε.,στ.) και 12°C (ζ.,η.) σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα 80% O<sub>2</sub>: 20% CO<sub>2</sub>. Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε βάθος 1 cm από την πάνω και την κάτω στρώση του κιμά. Δείγματα χωρίς μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Ammor** Mohammed Salim, Argyri Anthoula, Nychas G.-J. E. Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Science* 81 (2009) 507–514.
- **Anbalagan**, M., Ganesh Prabu, P., Krishnaveni, R.E and Manivannan, S. Effect of Low Temperature on the Bacterial Load in Chicken, Mutton and Beef Meat in Relation to Meat Spoilage. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* 2014; 4(1): 1-6
- **Apostolopoulou**, A.A., Flouros, A.I., Demertzis, P.G., Akrida-Demertzi, K., 2005. Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek beverages. *Food Control* 16, 157–164.
- **Appendini** Paola, Joseph H. Hotchkiss. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 3 (2002). 113-126
- **Argyri**, A., Doulgeraki, A.I., Blana, V., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2011. Potential of a simple HPLC-based approach for the identification of the spoilage status of minced beef stored at various temperatures and packaging systems. *Int. J. Food Microbiol.* 150 (1), 25–33.
- **Arvanitoyannis** S. Ioannis & Alexandros Ch. Stratakos. Application of Modified Atmosphere Packaging and Active/Smart Technologies to Red Meat and Poultry:A Review. *Food Bioprocess Technol* (2012) 5:1423–1446.
- **Baranyi**, J., and T. A. Roberts. 1994 . A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* **23**:277–294.
- **Baranyi**, J., Roberts, T.A., McClure, P., 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiol.* 10, 43– 59.
- **Baranyi**, J., T. A. Robinson, A. Kaloti, and B. M. Mackey. 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *Food Microbiol.*27:61–75.

- **Berkel**, B.M., B.V. Boogaard and C. Heijnen, 2004. Preservation of fish and meat. Agromisa Foundation, Wageningen, The Netherlands, pp: 8:78-80. ISBN: 90-72746-01-9.
- **Black**, R.G., Quail, K.J., Reyes, V., Kuzym, M. and Ruddick, L. 1993. Shelf-life extension of pita bread by modified atmosphere packaging. *Food Austral.* 4,387-391.
- **Boakye**, K., & Mittal, G. S. (1996). Changes in color of beef *M. longissimus dorsi* muscle during ageing. *Meat Science*, 42, 347–354
- **Borch** Elisabeth, Marie- Louise Kant- Muermans, Ylva Blixt. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 33 (1996) 103-120.
- **Brody** AL. 2005. Active packaging becomes more active. *Food Tech* 59: 89-4.
- **Casaburi**, A., Piombino, P., Nychas, G.-J., Villani, F., Ercolini, D., Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage, *Food Microbiology* (2014), doi: 10.1016/j.fm.2014.02.002.
- **Cassens**, R.G., 1994. Meat Preservation, Preventing Losses And Assuring Safety, 1st Edn., Food and Nutrition Press, Inc. Trumbull, Connecticut, USA, pp: 79-92. ISBN: 0917678346.
- **Cha** DS, Chinnan MS. 2004. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:223–37
- **Chiavaro**, E., Zanardi, E., Bottari, E., & Ianieri, A. (2008). Efficacy of different storage practices in maintaining the physicochemical and microbiological properties of fresh pork sausage. *Journal of Muscle Foods*, 19, 157–174.
- **Church** J Ivor and Anthony L Parsons. Modified Atmosphere Packaging Technology : A Review. *J Sci Food Agric* 1995, 67,143-152.
- **Church**, N. (1994). Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 345–352.
- **COMA** Véronique. Review. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science* 78 (2008) 90–103. CRC/Woodhead Publishing, Limited.
- **Daeschul**, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43(1), 164-167.



- **Daifas** Daphne Phillips, James P. Smith, Ilsemarie Tarte and Burke Blanchfield, John W. Austin. Effect of Ethanol vapour on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in a high moisture bakery product. *Journal of Food Safety* 20 (2000) 11 1-125.
- **Dainty**, R.H., Mackey, B.M., (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 73, 1035- 1145.
- **Dalgaard** P, Gram L, Huss HH. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int J Food Microbiol.* 1993 Sep;19(4):283-94.
- **Dave** D. and A.E. Ghaly. Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6 (4): 486-510, 2011
- **Davidson** P. Michael, *Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds.* In: Doyle, M.P., Buechat, L.R., Montville, T.J. (Eds.) *Food Microbiology- Fundamentals and Frontiers.* 1997 American Society for Microbiology (ASM) press, Washington DC, pp. 520-556.
- **Doulgeraki** Agapi I., Danilo Ercolini, Francesco Villani, George-John E. Nychas. Review: Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* 157 (2012) 130–141
- **Doulgeraki** Agapi. I., Paramithiotis, S., & Nychas, G. J. E. (2011). Characterization of the *Enterobacteriaceae* community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 77–83.
- **Emiroğlu**, Z.K., Yemiş, G.P., Coşkun, B.K., Candoğan, K., 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.* 86 (2), 283–288.
- **Ercolini**, D., Ferrocino, I., La Stora, A., Mauriello, G., Gigli, S., Masi, P., Villani, F., 2010. Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiol.* 27 (1), 137–143.
- **Ercolini**, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., La Stora, A., Laghi, L., Gianluigi, M., Elisabetta Guerzoni, M., Villani, F., 2011. Monitoring of microbial

metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (20), 7372–7381.

- **Esmer** O.K., R. Irkin, N. Degirmencioglu, A. Degirmencioglu. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, colour and oxidation values of minced beef meat. *Meat Science*, 88 (2011), pp. 221–226
- **Farkas** Jozsef, *Physical Methods of Food Preservation*. In: Doyle, M.P., Buechat, L.R., Montville, T.J. (Eds.) *Food Microbiology- Fundamentals and Frontiers*. 1997 American Society for Microbiology (ASM) press, Washington DC, pp. 497-519.
- **Floros** John D., Konstantinos I. Matsos. Introduction to modified atmosphere packaging. *Innovations in Food Packaging*, 2005, Pages 159-172.
- **Floros**, J.D., Dock, L.L., Han, J.H., 1997. Active packaging technologies and applications. *Food Cosmet. Drug Packag.* 20 (1), 10–17.  
*Foods*, 13, 143–168.
- **Giavedoni** P., Rodel W. and Dresel, J. 1994. Betrag zur sicherheit und haltbarket von frischen gefullten teigwaren, abgepackt in modifizierter und in einer athanol-gas-atmosphare. *Fleischwirtsch.* 74,639-646.
- **Gould** G.W. (2000). Emerging thechnologies in food preservation and processing in the last 40 years. In *Innovations in Food Processing* (eds G.V. Barbosa- Canovas and G.W. Gould), Technomic Publishing Co., Lancaster, PA,pp. 1-11
- **Gould** Grahame W., *Methods for preservation and extension of shelf life*. *International Journal of Food Microbiology* 33 (1996) 51-64.
- **Güçbilmez**, Çiğdem Mecitoğlu, Yemenicioğlu, Ahmet, & Arslanoğlu, Alper (2007). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40, 80–91.
- **Hall**, K.N. and Spencer, J.V. 1964. The effect of ethanol on shelf-life and flavor of chicken meat. *Poultry Sci.* 47,573-576.
- **Han**, J. H. (2005). Antimicrobial packaging systems. In Jung H. Han (Ed.), *Innovations in food packaging* (pp. 81–107). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- **Hansen** R., Rippl C., Midkiff D., & Neuwirth J. (1989). Antimicrobial absorbent food pad. US Patent 4 865 855.

- **Holzappel, W. H.** (1998). The Gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 35–84). London, UK: Blackie Academic and Professional, London.
- **Huis in't Velt Jos H.J.** Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33 (1996) 1-18
- **Jakobsen, M., & Bertelsen, G.** (2002). The use of CO<sub>2</sub> in packaging of fresh red meats and its effects on chemical quality of changes in the meat: A review. *Journal of Muscle*
- **Kalathenos P. and N.J Russell.** Ethanol as a food preservative. In *Food Preservatives*. 2<sup>nd</sup> Edition, Edited by Russell N.J. and Gould G.W. ,2003 Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York. pp 196-212
- **Kapetanakou A.E., E.I. Agathaggelou, P.N. Skandamis.** Storage of pork meat under modified atmospheres containing vapors from commercial alcoholic beverages. *International Journal of Food Microbiology* 178 (2014) 65–75
- **Kenedy, C., Buckley, D. J., & Kerry, J. P.** (2004). Display life of sheep meats retail packaged under atmospheres of various volumes and compositions. *Meat Science*, 68, 649–658.
- **Kennedy, C., Buckley, D. J., & Kerry, J. P.** (2004). Display life of sheep meats retailpackaged under atmospheres of various volumes and compositions. *Meat Science*,68, 649–658.
- **Kerry J.P., M.N. O'Grady, S.A. Hogan.** Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science* 74 (2006) 113–130.
- **Kim Y.H., E. Huff-Lonergan, J.G. Sebranek, S.M. Lonergan.** High-oxygen modified atmosphere packaging system induces lipid and myoglobin oxidation and protein polymerization. *Meat Science*, 85 (2010), pp. 759–767
- **Koutsoumanis K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H., & Nychas, G.-J. E.** (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology*, 25, 915–921.
- **Koutsoumanis K., Stamatiou A., Skandamis P. and G.-J. E. Nychas.** Development of a Microbial Model for the Combined Effect of Temperature and pH on Spoilage of Ground Meat, and Validation of the Model under Dynamic Temperature Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72(1):124.

- **Koutsoumanis** Konstantinos. Predictive Modeling of the Shelf Life of Fish under Nonisothermal Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 2001, Vol. 67, No. 4 pp. 1821–1829
- **Koutsoumanis**, K. P., & Sofos, J. N. (2004). Microbial contamination of carcasses and cuts. In W. K. Janssens (Ed.), *Encyclopedia of Meat Sciences* (pp. 727–737). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- **Koutsoumanis**, K. P., & Taoukis, P. (2005). Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (pp. 503–561). Cambridge, UK: Woodhead/Publishing, Ltd.
- **Koutsoumanis**, K., Taoukis, P. S., & Nychas, G.-J. E. (2003). Development of a safety monitoring and assurance system (SMAS) for chilled food products. In J. F. M. Van Impe, A. H. Geeraerd, I. Leguirinel, & P. Mafart (Eds.), *Proceedings of the fourth international conference on predictive modeling of foods* (pp. 244–246). Quimper: France.
- **Kraft** A A. 1986 Meat microbiology. In: *Muscle as Food*, ed Bechtel P J. Academic Press, London, UK, pp 239-278.
- **Kropf** D.H. Colour stability: factors affecting the colour of fresh meat. *Meat Focus International*, 1 (1993), pp. 269–275
- **La Storia** Antonietta, Ilario Ferrocino , Elena Torrieri, Rossella Di Monaco, Gianluigi Mauriello, Francesco Villani, Danilo Ercolini. A combination of modified atmosphere and antimicrobial packaging to extend the shelf-life of beefsteaks stored at chill temperature. *International Journal of Food Microbiology* 158 (2012) 186–194.
- **Labuza**, T.P., Breene, W.M., 1989. Applications of “active packaging” for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *J. Food Process. Preserv.* 13 (1), 1–69.
- **Laird**, K., Phillips, C., 2011. Vapor phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? *Lett. Appl. Microbiol.* 54, 169–174.
- **Lawrie**, R. A., & Ledward, D. A. (2006). *Lawrie's Meat Science*. Seventh English, edition ed. Cambridge England: Woodhead Publishing Limited
- **Limbo** S., Torri L., Sinelli N., Franzetti L., Casiraghi E. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science* 84 (2010) 129–136

- **Lund**, M. N., Hviid, M. S., & Skibsted, L. H. (2007). The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage. *Meat Science*, 76, 226–233.
- **Matan**, N., Rimkeeree, H., Mawson, J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M., 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 107 (2), 180–185.
- **McMeekin**, T. A., & Ross, T. (1996). Shelf life prediction: Status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 65–83.
- **McMeekin**, T. A., Baranyi, J., Bowman, J., Dalgaard, P., Kirk, M., Ross, T., et al. (2006). Information systems in food safety management. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 181–194.
- **McMeekin**, T. A., J. L. Brown, K. Krist, D. Miles, K. Neumeyer, D. S. Nichols, J. Olley, K. Presser, D. A. Ratkowsky, T. Ross, M. Salter, and S. Soontranon. 1997. Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerg. Infect. Dis.* Vol: 3 No. 4: 541–550.
- **McMeekin**, T.A., Chandle, R.F., Doe, P. E., Garland, C.D., Olley, J., Putro, S., Ratkowsky, D.A. (1987). Model of Combined effect of temperature and salt concentration / water activity on the growth rate of *Staphylococcus xylosum*. *Journal of Applied Bacteriology* 62, 543-550.
- **McMillin**, K. W. (2008). Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80(1), 43–65.  
*Microbiol* 4(4):329-37.
- **Nychas** George-John E., Panos N. Skandamis, Chrysoula C. Tassou, Konstantinos P. Koutsoumanis. Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78 (2008) 77–89.
- **Nychas**, G. J. E. (1994). Modified atmosphere packaging of meats. In R. P. Singh, & F. A. R. Oliveira (Eds.), *Minimal processing of foods and process optimization* (pp. 417–436). London: An Interface CRC Press.
- **Nychas**, G.-J. E., & Skandamis, P. (2005). Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In J. N. Sofos (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Meat* (pp. 461–502). Cambridge, UK: CRC/Woodhead Publishing Limited
- **Nychas**, G.-J. E., Douglas, L. M., & Sofos, J. N. (2007). Meat poultry and seafood. In M. P. Doyle & L. R. Beuchat (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (3rd ed., pp. 105–140). Washington, DC: ASM Press.

- **Nychas**, G.-J. E., Drosinos, E. H., & Board, R. G. (1998). Chemical changes in stored meat. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), *The Microbiology of Meat and Poultry* (pp. 288–326). London, UK: Blackie Academic and Professional.
- **O'Grady** M.N, F.J Monahan, R.M Burke, P. Allen. The effect of oxygen level and exogenous  $\alpha$ -tocopherol on the oxidative stability of minced beef in modified atmosphere packs. *Meat Science* Volume 55, Issue 1, May 2000, Pages 39–45
- **O'Sullivan**, M. G., Byrne, D. V., Martens, H., Gidskehaug, G. H., Andersen, H. J., & Martens, M. (2003). Evaluation of pork colour: Prediction of visual sensory quality of meat from instrumental and computer vision methods of colour analysis. *Meat Science*, 65(2), 909–918.
- **Paramithiotis**, S., Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2009). Insights into fresh meat spoilage. In F. Toldra (Ed.), *Safety of meat and processed meat* (pp. 55–82). New York: Springer.
- **Psomas** N. Antonios, George- John Nychas, Serkos A. Haroutounian, Panagiotis N. Skandamis. Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the growth of the food microorganisms under dynamic and static temperature conditions. *Computers and Electronics in Agriculture* 76 (2011). 119-129.
- **Quintavalla** Stefania, Loredana Vicini. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* 62 (2002) 373–380
- **Russell** N.J. and Gould G.W. Major preservation technologies. In *Food Preservatives*. 2<sup>nd</sup> Edition, Edited by Russell N.J. and Gould G.W. ,2003 Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York. pp 14-25
- **Salminen**, A., Latva- Kala, K., Randell, K., Hurme, E., Linkot, P. and Ahwnainen, R. 1996. The effect of ethanol and oxygen absorption on the shelf-life of packed sliced rye bread. *Packaging Technol. Sci.* 9, 29-42.
- **Sandhya**. Modified atmosphere packaging of fresh produce: Current status and future needs. Review. *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 381–392.
- **Seiler** DAL. 1989. Modified atmosphere packaging of bakery products. In: Brody AL, editor. *Controlled/ modified atmosphere/vacuum packaging of foods*. Trumbull, Conn.: Food and Nutrition Press, Inc. p119-34.
- **Seiler**, D.A.L. and Russell, N.J. 1991. Ethanol as a food preservative. In *Food Preservation*, (N.J. Russell and G.W. Gould, eds.) pp. 153-171, Blackie, London.

- **Sheridan** J. J., Alice M. Doherty, P. Allen, D. A. McDowell, I. S. Blair & D. Harrington. The Effect of Vacuum and Modified Atmosphere Packaging on the Shelf-life of Lamb Primals, Stored at Different Temperatures. *Meat Science*, Vol. 45, No. 1. 107-117, 1997.
- **Shimoni**, E., & Labuza, T. P. (2000). Modeling pathogen growth in meat products: Future challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 394–402.
- **Singh** Preeti, Ali Abas Wani, Sven Saengerlaub, (2011) "Active packaging of food products: recent trends", *Nutrition & Food Science*, Vol. 41 Iss: 4, pp.249 – 260
- **Skandamis** N. Panagiotis, George-John Nychas. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology* 79 (2002) 35– 45.
- **Skandamis P.N. and Nychas** G.-J.E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico- chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *Journal of Applied Microbiology* 2001, 91, 1011-1022.
- **Smith** JP, Ooraikul B, Koersen WJ, van de Voort FR, Jackson ED, Lawrence RA. 1987. Shelf-life extension of a bakery product using ethanol vapor. *Food*
- **Smith**, J.P., Hoshino, J., Abe, Y., 1995. Interactive packaging involving sachet technology. In: Rooney, M.L. (Ed.), *Active Food Packaging*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, pp. 143–173.
- **Smith**, J.P., Ramaswamy, H.S. and Simpson, B.K. (1990), "Developments in food packaging technology. Part II: storage aspects", *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 5 No. 2, pp. 111-18.
- **Sofos**, J. N. (2005). *Improving the safety of fresh meat*. Cambridge, UK: CRC/Woodhead Publishing Limited
- **Soncin**, S., Chiesa, L.M., Cantoni, C., Biondi, P.A., 2007. Preliminary study of the volatile fraction in the raw meat of pork, duck and goose. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 436-439.
- **Stanbridge**, L. H., & Davis, A. R. (1998). The microbiology of chill-stored meat. In R. G. Board & A. R. Davies (Eds.), *The microbiology of meat and poultry* (pp. 174–219). London, UK: Blackie Academic and Professional.
- **Stubbs** R.L., J.B. Morgan, F.K. Ray, H.G. Dolezal. Effect of supplemental vitamin E on the color and case-life of top loin steaks and ground chuck patties in modified atmosphere case-ready retail packaging systems. *Meat Science*, 61 (2002), pp. 1–5

- **Sun, X.D., Holley, R.** 2012. Antimicrobial and Antioxidative Strategies to Reduce Pathogens and Extend the Shelf-life of Fresh Red Meats. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 11 (4), 340-354.
- **Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. and Bigger, S. W.** (2003). Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci. Vol - 68(2)*, 408-20.
- **Warris P.D.** (2000). *Meat Science-An Introductory Text*. CABI Publishing, U.K.
- **Wilson P.D.G., T.F. Brocklehurst , S. Arino , D. Thuault , M. Jakobsen , M. Lange, J. Farkas , J.W.T. Wimpenny , J.F. Van Impe.** Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* 73 (2002) 275– 289.
- **Zhao Y., J.H. Wells, K.W. McMillin.** Applications of dynamic modified atmosphere packaging systems for fresh red meats: review. *Journal of Muscle Foods*, 5 (1994), pp. 299–328
- **Zhou, G.H., X.L. Xu and Y. Liu,** 2010. Preservation technologies for fresh meat-A review. *Meat Sci.*,86: 119-128. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.04.033.
- **Zink, D.L.,** 1997. The impact of consumer demands and trends on food processing. *Emerg. Infect. Dis.* 3 (4), 467–469.
- **Zinoviadou, K.G., Koutsoumanis, K.P., Biliaderis, C.G.,** 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Sci.* 82 (3), 338–345.
- **Ρόδης Παναγιώτης Σ.** 1995. Μέθοδοι Συντήρησης Τροφίμων. Εκδόσεις Α. Σταμούλης.
- **Τσακαλίδου Ε.** (2001). Μαθήματα Βιοχημείας Τροφίμων Ι. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- **Ψωμάς Ν.** Αντώνιος. Συσχετισμός φυσικοχημικών και περιβαλλοντικών παραμέτρων με την αύξηση του μικροβιακού φορτίου στα τρόφιμα: Ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων πρόβλεψης αλλοίωσης της ποιότητας. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2012.