

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ**  
**ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**  
**ΠΜΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ**  
**ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**



*«Μελέτη της αποτελεσματικότητας της συνδυαστικής εφαρμογής Υπερουψηλής Πίεσης και εδώδιμων μεμβρανών με αιθέριο έλαιο ρίγανης στην υπό κενό συντήρηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες και στον έλεγχο της *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν» .*

**Ιωάννα Κ. Κωβαίου**

**Υπεύθυνος καθηγητής: Γ.Γ. Νυχάς**

**Εξεταστική επιτροπή: Ε. Πανάγου,**

**Π. Σκανδάμης**

**Αθήνα, 2016**

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*«Μελέτη της αποτελεσματικότητας της συνδυαστικής εφαρμογής Υπερουψηλής Πίεσης και εδώδιμων μεμβρανών με αιθέριο έλαιο ρίγανης στην υπό κενό συντήρηση σε διαφορετικές θερμοκρασίες και στον έλεγχο της *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν» .*

Ιωάννα Κ. Κωβαίου

Υπεύθυνος καθηγητής: Γ.Γ. Νυχάς

Εξεταστική επιτροπή: Ε. Πανάγου,

Π. Σκανδάμης

## Περίληψη

Η αυξανόμενη ζήτηση των σύγχρονων καταναλωτών για ασφαλή και ποιοτικά προϊόντα, με φυσικά αντί για χημικά πρόσθετα και επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών τόσο στην επεξεργασία όσο και στη συσκευασία των προϊόντων.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η διάρκεια ζωής και να αξιολογηθεί το επίπεδο ασφάλειας ως προς τη *Listeria monocytogenes* ενός προϊόντος θερμικής επεξεργασίας (ζαμπόν), σε συσκευασία υπό κενό με εδώδιμες μεμβράνες που περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης ως αντιμικροβιακό παράγοντα, σε συνδυασμό με την εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης και ακολούθως συντηρημένο σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η αξιολόγηση της ποιότητας και της ασφάλειας του προϊόντος (μικροβιολογικά και ποιοτικά) επιτεύχθηκε τόσο με κλασικές (καταμέτρηση αποικιών, οργανοληπτικός έλεγχος, pH, χρώμα), όσο και με σύγχρονες μεθόδους (PFGE, FTIR).

Εδώδιμες μεμβράνες παρασκευάστηκαν με συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης (1% v/w) και εφαρμόστηκαν σε ζαμπόν (δύο διαφορετικές παρτίδες από διαφορετικές εταιρείες) που εμβολιάσθηκε με 3 στελέχη *Listeria monocytogenes* (B129, B131, B133). Στη συνέχεια εφαρμόστηκε υπερυψηλή πίεση 500 MPa για δύο λεπτά και το προϊόν συντηρήθηκε σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες: 4, 8 και 12 °C, αφού είχε συσκευασθεί υπό κενό. Οι περιπτώσεις προς εξέταση είχαν ως εξής: α) Ζαμπόν χωρίς μεμβράνες, χωρίς πίεση (Z), β) Ζαμπόν χωρίς μεμβράνες, με πίεση (ZP), γ) Ζαμπόν με μεμβράνες 0% αιθ. έλαιο, χωρίς πίεση (Z0%), δ) Ζαμπόν με μεμβράνες 0% αιθ. έλαιο, με πίεση (ZP0%), ε) Ζαμπόν με μεμβράνες και 1% αιθ. έλαιο χωρίς πίεση (Z1%), στ) Ζαμπόν με μεμβράνες και 1% αιθ. έλαιο με πίεση (ZP1%). Οι δειγματοληψίες διεξάγονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα καλύπτοντας όλο το εύρος του χρόνου ζωής του προϊόντος για κάθε θερμοκρασία. Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιούνταν μικροβιολογικές, φυσικοχημικές και οργανοληπτικές αναλύσεις. Η παραλλακτικότητα των στελεχών *L. monocytogenes* καθορίστηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική Ηλεκτροφόρησης Αγαρόζης Εναλλασσόμενου Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE). Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων και της οργανοληπτικής αξιολόγησης συνδυάστηκαν με τη Φασματοσκοπία Υπερύθρου (Fourier Transform InfraRed – FTIR spectroscopy).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στα δείγματα που είχαν υποστεί υπερυψηλή πίεση ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* βρισκόνταν μειωμένος κατά 1-2 λογάριθμους, σε σύγκριση με τα μη πιεσμένα, καθόλη τη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος στους 4 °C, με τη μείωση αυτή να είναι μεγαλύτερη στις θερμοκρασίες συντήρησης 8 και 12 °C. Η προσθήκη του αιθέριου ελαίου ρίγανης μείωσε τον πληθυσμό *L. monocytogenes* κατά 1,5 επιπλέον λογάριθμο στα μη πιεσμένα δείγματα, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (Z) και κατά 1 επιπλέον λογάριθμο στα πιεσμένα δείγματα. Απουσία του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*

παρατηρήθηκε από την 18η ημέρα συντήρησης στους 4°C, την 25<sup>η</sup> ημέρα στους 8°C και την 20<sup>η</sup> ημέρα στους 12°C υπό το συνδυασμό υπερυψηλής πίεσης και αιθέριου ελαίου. Όσον αφορά στην αλλοίωση του προϊόντος, η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης έδειξε να καθυστερεί την αλλοίωση σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης, ενώ τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου ήταν καλύτερα στα πιεσμένα δείγματα σε σύγκριση με τα μη πιεσμένα, με πιο εμφανή τη διαφορά στους 8° και 12°C. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο χρώμα μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων. Η μέτρηση του pH έδειξε ότι η εφαρμογή πίεσης είχε ως αποτέλεσμα μια αύξηση της τιμής του pH των δειγμάτων, με την διαφορά μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων να μειώνεται με την πάροδο των ημερών συντήρησης. Η τεχνική PFGE έδειξε μια διαφοροποίηση στην παραλλακτικότητα των στελεχών μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων, με το στέλεχος B129 να είναι το κυρίαρχο στα απίεστα και το στέλεχος B131 στα πιεσμένα δείγματα. Τέλος, τα φάσματα που προέκυψαν από τη Φασματοσκοπία FTIR αναλύθηκαν κατά ομάδες, αρχικά όλα τα δείγματα μαζί, μετά μόνο τα πιεσμένα και στη συνέχεια μόνο τα απίεστα. Αυτός ο διαχωρισμός δεν έδωσε καλά αποτελέσματα βάσει των δεικτών R<sup>2</sup> και RMSE, γι' αυτό τα φάσματα αναλύθηκαν στη συνέχεια κατά περίπτωση (Z, Z0%, Z1%, ZP, ZP0%, ZP1%) και κατασκευάστηκαν μοντέλα με καλύτερη συγκριτικά επίδοση. Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor-Bf) για όλες τις μικροβιακές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στην τιμή 1, αποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική, υπό ή υπερ-εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού.

Με την τεχνολογία να αναπτύσσεται συνεχώς και να ανοίγει νέους ορίζοντες, εμφανίζονται καινούργιες προκλήσεις στον κλάδο της τεχνολογίας και μικροβιολογίας των τροφίμων, που ζητούν διερεύνηση. Η σημαντικότητα της παρούσας μελέτης έγκειται στην δημιουργία ενός προϊόντος, στο οποίο συνδυάστηκε η τεχνολογία της Υπερυψηλής Πίεσης με τις εδώδιμες μεμβράνες που περιέχουν φυσικά αντιμικροβιακά, ώστε να παραταθεί η διάρκεια ζωής του, χωρίς εκπτώσεις στην ασφάλεια και την ποιότητά του. Αν και πολλά υποσχόμενες, οι νέες αυτές τεχνολογίες χρήζουν περαιτέρω έρευνας, ώστε να αξιοποιηθούν στο έπακρο οι δυνατότητές τους, αλλά και για να μπορέσουν στο μέλλον να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα.

*Λέξεις- κλειδιά:* ζαμπόν, μεμβράνες, υπερυψηλή πίεση, *Listeria monocytogenes*, αιθέριο έλαιο ρίγανης, κενό.

## ***Abstract***

The increasing demand of consumers for safe and quality products with natural instead of chemical additives and organoleptic properties unaffected / close to those of the fresh product, has led to the development of new technologies that concern both the processing and packaging of the products.

The purpose of this study was to determine the shelf-life and the safety level of ham ,as far as *Listeria monocytogenes* is concerned, vacuum packaged with antimicrobial edible films, in combination with the ultra-high pressure treatment, during storage at different temperatures. The measurement of the product quality and safety was achieved using both classical (colonies counting, organoleptic testing, pH, color) and up-to-date techniques (FTIR, PFGE).

Edible films were prepared with 1% v/w concentration of oregano essential oil and were applied to ham packaging and replicated twice using samples from two different companies. Ham was inoculated with three different *Listeria monocytogenes* strains (B129, B131, B133). Subsequently, high-pressure of 500 MPa was applied for two minutes and the product was stored at three different temperatures: 4, 8 and 12°C, after being packaged in vacuum. Six cases were implemented: Ham no films - no pressure, (Z), Ham no films - with pressure, (ZP), Ham with films 0% EO – no pressure, Ham with films 0% EO – with pressure, (ZP0%), Ham with films 1% EO – no pressure, (Z1%), Ham with films 1% EO – with pressure, (ZP1%). Hams were sampled periodically for each temperature during the self-life of the product. At each sampling, microbiological, chemical and sensory analyzes were carried out. The variability of *L. monocytogenes* strains was determined using Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The results of microbiological analysis and organoleptic evaluation were combined with Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy (FTIR).

The results showed that ultra-high hydrostatic pressure reduced the counts of *Listeria monocytogenes* by approximately 1-2 logs, compared to the non-pressed samples at 4°C, with this reduction being more obvious during storage at 8 and 12°C. The addition of oregano essential oil reduced *L. monocytogenes* counts by 1.5 logs for the non-pressed samples, compared to those of control (Z) and by 1 log at the samples treated with ultra-high pressure. The combined effect of ultra-high pressure and 1% concentration of essential oil resulted in the death of *L. monocytogenes* from the 18<sup>th</sup> day at 4°C, the 25<sup>th</sup> day at 8°C and the 20<sup>th</sup> day at 12°C. Regarding the spoilage of the product, the application of ultra-high pressure delayed spoilage at all storage temperatures, while the results of the organoleptic evaluation were better in pressed samples than the non-pressed ones, with this difference to be more noteworthy at 8° and 12°C. No significant differences were observed in the color of pressed and non-pressed samples. The pH measurement showed that the application of high-pressure resulted in an increase of the pH value, but the difference between pressed and non-pressed samples decreased over storage days. PFGE showed a difference in the variability of strains between pressed and non-pressed samples, with

the strain B129 being the dominant in non-pressed samples and the strain B131 in the respective pressed ones. Finally, the spectra obtained by FTIR spectroscopy were analyzed in groups, initially all samples together, followed by the group of samples treated with high pressure and the group of samples not treated with high pressure. This separation did not give good results based on the factors  $R^2$  and RMSE, so we proceeded by analyzing spectra of each treatment separately (Z, Z0%, Z1%, ZP, ZP0%, ZP1%). The bias factor (Bf) for all microbial groups tested had a value close to 1, indicating that the models showed no systematic under or over-estimation of the microbial population.

With technology constantly being progressed, new challenges appear in the field of food technology and microbiology, requesting exploration. The significance of the current study was the creation of a new product, with the combined effect of high-pressure technology and edible films with natural antimicrobials, to extend shelf life without compromising safety and quality. Despite the promising results, these new technologies require further research in order to establish their application on an industrial scale.

*Key-words:* ham, edible films, high pressure, *Listeria monocytogenes*, origanum essential oil, vacuum.

## ***Ευχαριστίες***

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο μικροβιολογίας τροφίμων, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός ΔΗΜΗΤΡΑ, (ΕΘΙΑΓΕ) σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντά μου, καθηγητή Γ.-Ι. Νυχά για τις πολύτιμες συμβουλές του. Η καθοδήγησή του και η υποστήριξή του ήταν καθοριστικές για την διεξαγωγή αυτής της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον επίκουρο καθηγητή Ε. Πανάγου για τη συμμετοχή του στην επιτροπή και το χρόνο που αφιέρωσε στη μελέτη του παρόντος κειμένου, αλλά και τον επίκουρο καθηγητή Π. Σκανδάμη ο οποίος εκτός των παραπάνω συνέβαλλε με τις συμβουλές του και την παροχή τεχνογνωσίας στην διεξαγωγή μέρους των εργαστηριακών πειραμάτων.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον ερευνητή Ν. Χωριανόπουλο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της εργασίας μου στο ΕΘΙΑΓΕ και την συνεχή καθοδήγησή του. Η συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας μελέτης ήταν καθοριστική.

Ευχαριστώ το προσωπικό του εργαστηρίου του ΕΘΙΑΓΕ και ιδιαίτερα την ερευνήτρια Σ. Τάσσου και την μεταδιδάκτορα Α. Αργύρη για τις πολύτιμες συμβουλές τους, που με βοήθησαν καθοριστικά σε πολλά στάδια της εργαστηριακής μου πορείας, αλλά και στη συγγραφή της παρούσας μελέτης. Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Φ. Παυλή για την πολύτιμη βοήθειά της στην εκπόνηση των εργαστηριακών πειραμάτων. Ακόμα ευχαριστώ την φοιτήτρια Γ. Αποστολακοπούλου, για την βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που υπήρξε ο στυλοβάτης μου και με εμπύχωνε όλα τα χρόνια των σπουδών μου και τον Δ. Γαλάνη για την υποστήριξη και την κατανόησή του τα τελευταία δύο χρόνια.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	II
Abstract .....	IV
Ευχαριστίες.....	VI
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Ζαμπόν, ένα προϊόν Έτοιμο Προς Κατανάλωση.....	1
1.1.1. Μικροβιακή χλωρίδα κρέατος.....	1
1.1.2. Μικροβιακή χλωρίδα του ζαμπόν.....	3
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	3
1.2.1. Κρούσματα λιστερίωσης στις Η.Π.Α. και στην Ε.Ε.....	4
1.2.2. Μικροβιολογικά κριτήρια / Κανονισμός Ε.Ε. 2073/2005.....	5
1.2.3. Μη-συμμόρφωση σε RTE τρόφιμα.....	5
1.2.4. Μεταβλητότητα μεταξύ στελεχών <i>Listeria monocytogenes</i> .....	7
1.2.4.1. Μεταβλητότητα ως προς την παθογένεια.....	7
1.2.4.2. Μεταβλητότητα ως προς την ανάπτυξη.....	7
1.2.4.3. Μεταβλητότητα ως προς την αναστολή ανάπτυξης (inactivation).....	7
1.3. Η θεωρία των εμποδίων.....	8
1.4. Υπερυψηλή πίεση.....	8
1.4.1. Εφαρμογή ΥΥΠ για την αδρανοποίηση της <i>Listeria monocytogenes</i> σε προϊόντα κρέατος και σε πουλερικά.....	9
1.4.2. Εφαρμογή ΥΥΠ σε ζαμπόν.....	10
1.4.3. Αλλαγές που επιφέρει η εφαρμογή ΥΥΠ στα τρόφιμα.....	10
1.4.4. Στοιχεία μονάδας υπερυψηλής πίεσης.....	11
1.4.5. Επίδραση της ΥΥΠ στους μικροοργανισμούς.....	12
1.5. Αιθέρια έλαια: ιδιότητες και χρήση.....	13
1.5.1. Μηχανισμός δράσης αιθερίων ελαίων.....	13
1.5.2. Αιθέρια έλαια σε τρόφιμα.....	14
1.5.3. Αιθέριο έλαιο ρίγανης.....	15
1.5.3.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης για καταπολέμηση της <i>L. monocytogenes</i> σε τρόφιμα.....	16
1.6. Ενεργή συσκευασία – Εδώδιμες μεμβράνες.....	16
1.7. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) Φασματοσκοπία Υπερύθρου.....	17
1.7.1. Αρχές λειτουργίας φασματοσκοπίας υπερύθρου FTIR.....	17
1.7.2. Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας FTIR.....	18
1.7.3. Βασικά στοιχεία του φασματόμετρου FTIR.....	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1. Προκαταρκτικά Πειράματα για την επιλογή κατάλληλου προϊόντος κρέατος και συνθηκών μεταχείρισης.....	20
2.1.1. Α: Εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης-χρόνου σε μοσχαρίσιο κιμά και χοιρινά σουβλάκια.....	20
2.1.2. Β: Κιμαδοποίηση μοσχαρίσιου κρέατος και εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 2 min.....	21



2.1.3. Γ: Επιλογή της κατάλληλης συνθήκης πίεσης-χρόνου για εφαρμογή σε ζαμπόν και γαλοπούλα.....	23
2.1.4. Δ: Προσθήκη υδρολύματος ρίγανης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και εφαρμογή σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένων με <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
2.1.5. Ε: Προσθήκη αιθερίου ελαίου ρίγανης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και εφαρμογή σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένων με <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
2.2. Εφαρμογή ΥΥΠ σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένες με <i>Listeria monocytogenes</i> και συσκευασία σε κενό σε διαφορετικές θερμοκρασίες με την προσθήκη εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου εμπλουτισμένες με αιθέριο έλαιο ρίγανης.....	29
2.2.1. Παρασκευή μεμβρανών με αιθέριο έλαιο 1%.....	29
2.2.2. Εμβολιασμός με <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
2.2.3. Καταμέτρηση.....	32
2.2.4. Μέτρηση pH.....	33
2.2.5. Οργανοληπτικός έλεγχος.....	33
2.2.6. Ανάλυση FTIR.....	33
2.2.6.1. Προετοιμασία των δειγμάτων.....	33
2.2.6.2. Φασματοσκοπία FTIR.....	34
2.2.6.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	36
2.2.7. Χρωματομετρία.....	37
2.2.8. Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης Εναλλασσόμενου Πεδίου (PFGE).....	38
2.3. Ποσοτική Ανάλυση Δεδομένων.....	38
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
3.1. Αποτελέσματα Προκαταρκτικών Πειραμάτων για την επιλογή κατάλληλου προϊόντος κρέατος και συνθηκών μεταχείρισης.....	39
3.1.1. Αποτελέσματα Α πειράματος.....	39
3.1.2. Αποτελέσματα Β Πειράματος.....	46
3.1.3. Αποτελέσματα Γ Πειράματος.....	49
3.1.4. Αποτελέσματα Δ Πειράματος.....	52
3.1.5. Αποτελέσματα Ε Πειράματος.....	54
3.2. Αποτελέσματα εφαρμογής ΥΥΠ σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένες με <i>Listeria monocytogenes</i> και συσκευασία σε κενό σε διαφορετικές θερμοκρασίες με την προσθήκη εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου εμπλουτισμένες με αιθέριο έλαιο ρίγανης.....	57
3.2.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων.....	57
3.2.1.1. Αποτελέσματα καταμέτρησης <i>Listeria monocytogenes</i> .....	57
3.2.1.2. Αποτελέσματα καταμέτρησης- υπόλοιπα μικροβιολογικά.....	59
3.3. Αποτελέσματα κινητικής αύξησης των μικροοργανισμών.....	71
3.4. Αποτελέσματα pH.....	71
3.5. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου.....	73
3.6. Αποτελέσματα FTIR.....	76
3.6.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας.....	81
3.7. Αποτελέσματα Χρωματομετρίας.....	83
3.8. Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης Αγαρόζης Εναλλασσόμενου Πεδίου (PFGE).....	85
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88

Επίλογος.....	95
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	96
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Αποτελέσματα Στατιστικής Ανάλυσης (Κεφάλαιο 3.3).....	109
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Αποτελέσματα FTIR (Κεφάλαιο 3.5).....	114
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. Αποτελέσματα Αξιολόγησης της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας (Κεφάλαιο 3.5.1).....	120
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4. Πρωτόκολλο PFGE για την <i>Listeria monocytogenes</i> (Κεφάλαιο 2.2.8).....	126

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Ποσοστά θετικών στην <i>L.monocytogenes</i> RTE τροφίμων από διάφορες κατηγορίες κρέατος στην Ε.Ε., 2013( EFSA, 2015).....	6
Εικόνα 2: Βασικά στοιχεία φασματομέτρου FTIR.....	19
Εικόνα 3: Κιμαδοποίηση κρέατος.....	23
Εικόνα 4: Μεμβράνες με διαφορετική συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης (0, 0,1, 0,5 και 1% αντίστοιχα).....	27
Εικόνα 5: Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών με αλγινικά.....	30
Εικόνα 6: Παραμονή των μεμβρανών στο Laminar μέχρι να στεγνώσουν.....	30
Εικόνα 7: Μηχάνημα δημιουργίας κενού.....	31
Εικόνα 8: Απομάκρυνση εδώδιμης μεμβράνης κατά τη δειγματοληψία σε φέτα ζαμπόν.....	32
Εικόνα 9: Φασματόμετρο FTIR.....	34
Εικόνα 10: Τοποθέτηση δείγματος πάνω στον κρύσταλλο του FTIR.....	35
Εικόνα 11: Άσκηση πίεσης με το ειδικό έμβολο για βέλτιστη επαφή δείγματος-κρυστάλλου.....	35
Εικόνα 12: Το φάσμα ενός δείγματος ζαμπόν, όπως εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή κατά τη μέτρηση.....	36
Εικόνα 13: Χρωματόμετρο Minolta.....	37
Εικόνα 14: Μέτρηση χρώματος σε δείγματα ζαμπόν.....	38
Εικόνα 15: μεταβολή χρώματος στο χοιρινό σουβλάκι με την πίεση. 1) control, 2) 300MPa/2min, 3) 300MPa/5min, 4) 400MPa/2min, 5) 500MPa/5min.....	42
Εικόνα 16: μεταβολή χρώματος στον μοσχαρίσιο κιμά με την πίεση. 1) control, 2) 300MPa/2min, 3) 300MPa/5min, 4) 400MPa/2min, 5) 500MPa/5min.....	46
Εικόνα 17: Κιμαδοποίηση μοσχαρίσιου κρέατος, μετά από την εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 2 λεπτά.....	47

Εικόνα 18: Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς δειγμάτων ζαμπόν χωρίς (μάρτυρας Z) και με την εφαρμογή πίεσης και εδώδιμων μεμβρανών με έλαιο (ZP1%), στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης στους 4°C.....	76
Εικόνα 19: Φωτογραφία gel αγαρόζης όπου διακρίνονται τα τρία στελέχη <i>L.monocytogenes</i> (B129, B131,B133).....	85
Εικόνα 20: Γέμισμα εκμαγείου για σχηματισμό plug.....	127
Εικόνα 21: Κόψιμο plug.....	129
Εικόνα 22: Προσεκτική απομάκρυνση plug με σπάτουλα.....	129
Εικόνα 23: Φόρτωμα των plugs.....	131
Εικόνα 24: Τοποθέτηση του gel στη συσκευή PFGE.....	131
Εικόνα 25: Συσκευή PFGE.....	132

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Γένη βακτηρίων που συναντώνται συχνά στο κρέας και στα πουλερικά (Nychas et al. 2007).....	2
Πίνακας 2: Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (4, 8, 12°C).....	75
Πίνακας 3: . Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά και τα φυσικοχημικά δεδομένα με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα ζαμπόν (κάθε περίπτωση αναλύθηκε ξεχωριστά).....	78
Πίνακας 4: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση του μάρτυρα (Z), όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	82
Πίνακας 5: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση του μάρτυρα (Z), όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	82
Πίνακας 6: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση του μάρτυρα (Z), όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	82
Πίνακας 7: Αποτελέσματα χρωματομετρίας για τα δείγματα ζαμπόν σε τρεις θερμοκρασίες συντήρησης.....	84
Πίνακας 8: Ποσοστά παρουσίας των 3 στελεχών <i>L. monocytogenes</i> (129, 131, 133) σε δείγματα ζαμπόν, στην αρχή, μέση και το τέλος συντήρησης στους 4°C.....	86
Πίνακας 9: Ποσοστά παρουσίας των 3 στελεχών <i>L.monocytogenes</i> (129, 131, 133) σε δείγματα ζαμπόν, στην αρχή, μέση και το τέλος συντήρησης στους 8°C.....	87
Πίνακας 10: Ποσοστά παρουσίας των 3 στελεχών <i>L.monocytogenes</i> (129, 131, 133) σε δείγματα ζαμπόν, στην αρχή, μέση και το τέλος συντήρησης στους 12°C.....	87

Πίνακας 11: Αποτελέσματα DMFit για τα μικροβιολογικά στους 4°C.....	109
Πίνακας 12: Αποτελέσματα DMFit για τα μικροβιολογικά στους 8°C.....	110
Πίνακας 13: Αποτελέσματα DMFit για τα μικροβιολογικά στους 12°C.....	111
Πίνακας 14: Αποτελέσματα DMFit για τη <i>Listeria monocytogenes</i> στους 4, 8 και 12°C.....	113
Πίνακας 15: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά και τα φυσικοχημικά δεδομένα με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα ζαμπόν (η ανάλυση έγινε ανά κατηγορίες: ALL για όλα τα δείγματα, NON PRESSED για τα μη πιεσμένα και PRESSED για τα πιεσμένα).....	114
Πίνακας 16: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση Z0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	120
Πίνακας 17: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση Z0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	120
Πίνακας 18: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση Z0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	120
Πίνακας 19: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση Z1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	120
Πίνακας 20: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση Z1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	121
Πίνακας 21: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση Z1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	121
Πίνακας 22: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση ZP, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	121
Πίνακας 23: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση ZP, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	121
Πίνακας 24: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση ZP, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	122
Πίνακας 25: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση ZP0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	122
Πίνακας 26: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση ZP0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	122
Πίνακας 27: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση ZP0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	122

Πίνακας 28: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση ZP1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	123
Πίνακας 29: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση ZP1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	123
Πίνακας 30: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση ZP1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	123
Πίνακας 31: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην κατηγορία ALL SAMPLES, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	123
Πίνακας 32: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην κατηγορία ALL SAMPLES, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	124
Πίνακας 33: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην κατηγορία ALL SAMPLES, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	124
Πίνακας 34: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην κατηγορία NON PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	124
Πίνακας 35: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην κατηγορία NON PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	124
Πίνακας 36: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην κατηγορία NON PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	125
Πίνακας 37: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην κατηγορία PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	125
Πίνακας 38: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην κατηγορία PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	125
Πίνακας 39: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην κατηγορία PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.....	125

## **ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ**

Διάγραμμα 1: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα στο χοιρινό σουβλάκι.....	39
---	----

Διάγραμμα 1: Πληθυσμός ψευδομονάδων σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	40
Διάγραμμα 2: Πληθυσμός εντεροβακτηρίων σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	40
Διάγραμμα 3: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	41
Διάγραμμα 4: Πληθυσμός <i>Brochothrix thermosphacta</i> σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	41
Διάγραμμα 5: Διακύμανση του pH σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	42
Διάγραμμα 7: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα στον μοσχαρίσιο κιμά.....	43
Διάγραμμα 8: Πληθυσμός ψευδομονάδων σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	43
Διάγραμμα 9: Πληθυσμός εντεροβακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	44
Διάγραμμα 10: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	44
Διάγραμμα 11: Πληθυσμός <i>Brochothrix thermosphacta</i> σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	45
Διάγραμμα 12: Διακύμανση pH σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.....	45
Διάγραμμα 13: Μικροβιακοί πληθυσμοί σε πιεσμένο μοσχαρίσιο κιμά, μετά από συντήρηση στους 4°C.....	48
Διάγραμμα 14: Μικροβιακοί πληθυσμοί σε πιεσμένο μοσχαρίσιου κιμά, μετά από συντήρηση στους 12°C.....	48
Διάγραμμα 15: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου.....	49
Διάγραμμα 16: Γαλακτικά βακτήρια σε φέτες ζαμπόν, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου.....	50
Διάγραμμα 17: Διακύμανση pH σε φέτες ζαμπόν, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου.....	50
Διάγραμμα 18: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες γαλοπούλας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου.....	51
Διάγραμμα 19: Γαλακτικά βακτήρια σε φέτες γαλοπούλας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου.....	51
Διάγραμμα 20: Διακύμανση pH σε φέτες γαλοπούλας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου.....	52

Διάγραμμα 21: Πληθυσμός <i>Listeria monocytogenes</i> σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετική συγκέντρωση υδρολύματος ρίγανης.....	52
Διάγραμμα 6: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετική συγκέντρωση υδρολύματος ρίγανης.....	53
Διάγραμμα 7: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετική συγκέντρωση υδρολύματος ρίγανης.....	53
Διάγραμμα 24: Πληθυσμός <i>Listeria monocytogenes</i> σε φέτες ζαμπόν, υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθέριου ελαίου ρίγανης (0%, 0,10%, 0,50%, 1%) ενσωματωμένου σε εδώδιμες μεμβράνες.....	54
Διάγραμμα 25: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης.....	55
Διάγραμμα 26: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης.....	55
Διάγραμμα 27: Διακύμανση του pH σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης.....	56
Διάγραμμα 28: Πληθυσμός <i>Listeria monocytogenes</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4 <sup>0</sup> C.....	58
Διάγραμμα 29: Πληθυσμός <i>Listeria monocytogenes</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8 <sup>0</sup> C.....	58
Διάγραμμα 30: Πληθυσμός <i>Listeria monocytogenes</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12 <sup>0</sup> C.....	59
Διάγραμμα 31: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4 <sup>0</sup> C.....	60
Διάγραμμα 32: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8 <sup>0</sup> C.....	60
Διάγραμμα 33: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12 <sup>0</sup> C.....	61
Διάγραμμα 34: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4 <sup>0</sup> C.....	62
Διάγραμμα 35: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8 <sup>0</sup> C.....	62
Διάγραμμα 36: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12 <sup>0</sup> C.....	63
Διάγραμμα 37: Πληθυσμός στρεπτόκοκκων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4 <sup>0</sup> C.....	64

Διάγραμμα 38: Πληθυσμός στρεπτόκοκκων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C.....	65
Διάγραμμα 39: Πληθυσμός στρεπτόκοκκων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C.....	65
Διάγραμμα 40: <i>Staphylococcus aureus</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C...65	65
Διάγραμμα 41: <i>Staphylococcus aureus</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C...66	66
Διάγραμμα 42: <i>Staphylococcus aureus</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C.66	66
Διάγραμμα 43: Ψευδομονάδες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C.....67	67
Διάγραμμα 44: Εντεροβακτήρια σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C.....67	67
Διάγραμμα 45: Ζύμες- μύκητες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C.....68	68
Διάγραμμα 46: Ζύμες- μύκητες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C.....68	68
Διάγραμμα 47: Ζύμες- μύκητες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C.....69	69
Διάγραμμα 48: Πληθυσμός <i>Brochothrix thermosphacta</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C.....69	69
Διάγραμμα 49: Πληθυσμός <i>Brochothrix thermosphacta</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C.....70	70
Διάγραμμα 50: Πληθυσμός <i>Brochothrix thermosphacta</i> σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C.....70	70
Διάγραμμα 51: pH σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C.....72	72
Διάγραμμα 52: pH σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C.....72	72
Διάγραμμα 53: pH σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C.....73	73
Διάγραμμα 54: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της ολικής μικροβιακής χλωρίδας του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS.....79	79
Διάγραμμα 55: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των γαλακτικών βακτηρίων του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS.79	79
Διάγραμμα 56: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των στρεπτόκοκκων του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS.....80	80
Διάγραμμα 57: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των ζυμών-μυκήτων του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS.....80	80
Διάγραμμα 58: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS.....81	81



## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αυξανόμενη ζήτηση των σύγχρονων καταναλωτών για ασφαλή και ποιοτικά προϊόντα, με φυσικά αντί για χημικά πρόσθετα και επιθυμητές οργανοληπτικές ιδιότητες, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων τεχνολογιών τόσο στην επεξεργασία όσο και στη συσκευασία των προϊόντων.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιοριστεί η διάρκεια ζωής και να αξιολογηθεί το επίπεδο ασφάλειας ως προς τη *Listeria monocytogenes* ενός προϊόντος θερμικής επεξεργασίας (ζαμπόν), σε συσκευασία υπό κενό με εδωδιμες μεμβράνες που περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης ως αντιμικροβιακό παράγοντα, σε συνδυασμό με την εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης και ακολούθως συντηρημένο σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

### 1.1.Ζαμπόν, ένα προϊόν Έτοιμο Προς Κατανάλωση

Το ζαμπόν, ή βραστό χοιρομέρι (ham), ανήκει στα προϊόντα θερμικής επεξεργασίας από αυτοτελή κομμάτια κρέατος (κατηγορία A1α). Σύμφωνα με το άρθρο 91 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, η μεταποιητική επεξεργασία εξυγίανσης των προϊόντων αυτής της κατηγορίας επιτυγχάνεται με τη θερμική τους επεξεργασία. Η θέρμανσή τους έχει ως αποτέλεσμα την μετουσίωση των πρωτεϊνών του κρέατος, με συνέπεια τη σταθεροποίηση της δομής τους και την δυνατότητα να κόβονται σε φέτες. Η θερμική επεξεργασία μπορεί να είναι υγρή, ξηρή ή και συνδυασμός αυτών των δύο ή/και να συνδυάζεται και με άλλες επεξεργασίες.

Στις ειδικές απαιτήσεις του Άρθρου αναφέρεται ότι στα προϊόντα αυτά επιτρέπεται η παρουσία, λόγω επεξεργασίας, λειοτριβέντος κρέατος σε μικρό ποσοστό (10% max) σε προϊόντα που έχουν υποστεί μάλαξη (TUMBLING) κατά τη διαδικασία παρασκευής τους. Το ζαμπόν θα πρέπει να αποτελείται τουλάχιστον από 12% μυϊκές πρωτεΐνες.

#### 1.1.1.Μικροβιακή γλωρίδα κρέατος

Το ωμό φρέσκο κρέας αποτελεί το ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, τόσο λόγω ενδογενών παραγόντων, όσο και λόγω της άμεσης έκθεσής του στο περιβάλλον. Οι υψηλές τιμές ενεργότητας νερού ( $a_w > 0.99$ ), το κατάλληλο για μικροβιακή ανάπτυξη pH (5.5-6.5) και η πληθώρα μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών στοιχείων (γλυκόζη, αμινοξέα, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία κ.ά.) διαμορφώνουν το προφίλ ενός προϊόντος με μικρή διάρκεια ζωής (Pothakos et al., 2015).

Η αρχική μικρογλωρίδα του κρέατος είναι ετερογενής και εξαρτάται αρχικά από το ζώο και τις εγκαταστάσεις του σφαγείου και στη συνέχεια από την επεξεργασία του, τη μεταφορά και τη διανομή του (Nychas et al., 2008). Η αλλοίωση του κρέατος προκαλείται κυρίως από Gram-αρνητικά βακτήρια (*Pseudomonads*, *Enterobacteriaceae*, *Shewanella putrefaciens*) και αρκετά Gram-θετικά (γαλακτικά

βακτήρια, *Brochothrix thermosphacta*, clostridia), τα οποία ευδοκιμούν κάτω από διαφορετικές συνθήκες (Casaburi et al., 2015, Doulgeraki et al., 2012).

Σύμφωνα με τους Nychas et al. (2007), μερικά από τα κυριότερα είδη βακτηρίων που συναντώνται στο επεξεργασμένο κρέας είναι τα: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Micrococcus* και *Staphylococcus* (πίνακας 1). Σύμφωνα με την ίδια μελέτη, σε κρέας που συσκευάστηκε υπό κενό, βρέθηκαν κυρίως τα είδη: *Pseudomonas spp.*, *B. Thermosphacta* και *Sh. putrefaciens*.

Πίνακας 2: Γένη βακτηρίων που συναντώνται συχνά στο κρέας και στα πουλερικά (Nychas et al. 2007).

Μικροοργανισμοί	Αντίδραση κατά Gram	Νωπό	Επεξεργασμένο
<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	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	

X: γνωστό ότι συναντάται, XX: απομονώνεται πιο συχνά.

### 1.1.2. Μικροβιακή χλωρίδα του ζαμπόν

Για τη μικροβιακή χλωρίδα του ζαμπόν λίγα βιβλιογραφικά στοιχεία είναι διαθέσιμα. Η θερμική επεξεργασία κατά την παρασκευή του ουσιαστικά εξουδετερώνει την φυσιολογική μικροχλωρίδα, αλλά το προϊόν δεν μπορεί να θεωρηθεί σε καμία περίπτωση στείρο. Η κοπή σε φέτες, η συσκευασία και οι συνολικοί χειρισμοί κατά μήκος της γραμμής παραγωγής και διανομής, δίνουν την δυνατότητα επαναμόλυνσης του προϊόντος (Steele and Stiles, 1980). Επιπλέον, συσκευασία υπό κενό, όπως αυτή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, δίνει ένα πιο επιλεκτικό αποτέλεσμα όσον αφορά στα είδη των μικροοργανισμών που επικρατούν.

Οι Surkiewicz et al. το 1977, αναφέρουν ως κυρίαρχους μικροοργανισμούς, σε φέτες ζαμπόν συσκευασμένες υπό κενό, τους enterococci και lactobacilli. Ακόμα, σύμφωνα με μελέτη των Steele and Stiles, σε φέτες ζαμπόν συσκευασμένες υπό κενό στους 4°C, η κυρίαρχη μικροχλωρίδα ήταν τα γαλακτικά βακτήρια, ενώ οι γαλακτοβάκιλλοι βρέθηκαν σε χαμηλά ποσοστά, όπως και οι μικρόκοκκοι, οι στρεπτόκοκκοι (group D), τα κολοβακτηρίδια και η *Escherichia coli* (Steele and Stiles, 1980).

### 1.2. *Listeria monocytogenes*

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* είναι ένα σημαντικό παθογόνο ανθρώπων και ζώων. Προκαλεί την ασθένεια λιστερίωση, μια δυνητικά θανατηφόρο τροφιμογενή μόλυνση που προσβάλει κυρίως εγκύους και άτομα με ανοσοκαταστολή (YOPIs). Τα συμπτώματα ποικίλουν από αυτά μιας απλής ίωσης έως μηνιγγίτιδα, μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, αποβολές ή σοβαρές μολύνσεις στα νεογέννητα (Ryan et al., 2008). Περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Murray το 1926 και έκτοτε έχει μελετηθεί διεξοδικά (Adams and Moss, 2000).

Τα ποσοστά θνησιμότητας από *Listeria monocytogenes* αγγίζουν το 30% σε άτομα με χαμηλό ανοσοποιητικό σύστημα (Ryan et al., 2008). Η σοβαρότητα της μόλυνσης έχει οδηγήσει σε αυξημένη επαγρύπνηση από τη βιομηχανία τροφίμων για την πρόληψη των μολύνσεων και στην διεξαγωγή μελετών για την ταυτοποίηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου στα τρόφιμα καθώς και την παθογένεση του βακτηρίου.

Στους τύπους τροφίμων που εμπλέκονται με τη μετάδοση της λιστερίωσης περιλαμβάνονται τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE), όπως χοτ-ντογκ, μαλακά τυριά, απαστερίωτο γάλα και ωμά λαχανικά (Hof, 2003, Kathariou, 2002, Tompkin, 2002). Η ασθένεια μπορεί να πάρει τη μορφή επιδημίας, αλλά πιο συχνά εκδηλώνεται ως μεμονωμένα περιστατικά, όπου η πηγή της μόλυνσης δύσκολα εντοπίζεται (Gahan and Hill, 2005).

Το βακτήριο έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε συνθήκες χαμηλού pH και να επιβιώνει σε όξινα τρόφιμα, στον γαστρεντερικό σωλήνα και κατά την είσοδο στα φαγосώματα του ξενιστή. Αναπτύσσεται σε ένα εύρος pH 4,6-9,5 (Carpentier and Cerf, 2011). Είναι ψυχρότροπο και μπορεί να αναπτυχθεί κάτω από ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών 0 -42°C με άριστο τους 30-35°C (Adams and Moss, 2000). Κάτω από τους 5°C η ανάπτυξη είναι εξαιρετικά αργή, εντούτοις έχει παρατηρηθεί πολλαπλασιασμός του βακτηρίου και σε μερικούς βαθμούς υπό το μηδέν.

Ο μικροοργανισμός είναι ευρέως διαδεδομένος στο περιβάλλον. Έχει απομονωθεί από γλυκό και αλμυρό νερό, χόμα, ενσίρωμα, βλάστηση σε αποσύνθεση και λασπώδη λύματα. Η διάσπαρτη παρουσία του παθογόνου υποδηλώνει ότι η ανθρώπινη έκθεση σε αυτό είναι συχνή, αλλά η πιθανότητα εκδήλωσης λιστερίωσης είναι χαμηλή, δεδομένου ότι ένα ευαίσθητο άτομο πρέπει να εκτεθεί σε μια αρκετά υψηλή δόση κάποιου στελέχους. Η περίοδος επώασης κυμαίνεται από 1-90 ημέρες, γεγονός που καθιστά τον εντοπισμό των μολυσμένων τροφίμων ιδιαίτερα δύσκολο.

### **1.2.1. Κρούσματα λιστερίωσης στις Η.Π.Α. και στην Ε.Ε..**

Στις Η.Π.Α. από το 1998 έως το 2014, σύμφωνα με στοιχεία του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών (CDC), έχουν καταγραφεί 58 περιστατικά εμφάνισης λιστερίωσης, με 766 νοσούντες, 521 νοσηλευθέντες (68%) και 116 αποθανόντες (15,1%). Από αυτά τα περιστατικά, τα 5 οφείλονταν σε κατανάλωση προϊόντων κρέατος. Το CDC εκτιμά ότι περίπου 1,600 περιστατικά ασθενειών και 260 θάνατοι ετησίως στις Η.Π.Α. οφείλονται σε λιστερίωση (Scallan et al., 2011). Το 2013 η μέση ετήσια εμφάνιση λιστερίωσης ήταν 0,26 περιπτώσεις ανά 100,000 άτομα (CDC, 2014). Η μεγαλύτερη έξαρση λιστερίωσης στην ιστορία των Η.Π.Α. καταγράφηκε το 2011, όταν σημειώθηκαν 147 περιπτώσεις ασθενειών, 33 θάνατοι και 1 αποβολή, σε κατοίκους από 28 διαφορετικά κράτη (CDC, 2011). Το περιστατικό σχετίστηκε με κατανάλωση πεπονιού από μία συγκεκριμένη φάρμα.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 2013 καταγράφηκαν 1,763 επιβεβαιωμένες περιπτώσεις λιστερίωσης σε ανθρώπους από 27 Κράτη Μέλη, με ποσοστό θνησιμότητας 15,6%, σύμφωνα με στοιχεία της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA, 2015). Παρατηρήθηκε επίσης μια στατιστικά σημαντική αύξηση των κρουσμάτων κατά τα έτη 2009-2013. Τα υψηλότερα ποσοστά αναφοράς κρουσμάτων παρατηρήθηκαν στην Φιλανδία, την Ισπανία, την Σουηδία και τη Δανία. Στην πλειοψηφία τους, τα περιστατικά λιστερίωσης αναφέρεται ότι προκλήθηκαν από οικιακούς παράγοντες.

Κατά μέσο όρο, το 99,1% των περιστατικών λιστερίωσης που καταγράφηκαν νοσηλεύτηκαν. Το ποσοστό νοσηλείας για λιστερίωση είναι υψηλότερο από τα

ποσοστά για οποιαδήποτε άλλη ζωονόσο υπό την επίβλεψη της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και αντανakλά την ιδιαίτερη μέριμνα της Ε.Ε. για τα συστηματικά περιστατικά λιστερίωσης. Επιπλέον, το 2013 αναφέρθηκαν 191 περιπτώσεις θανάτων, οι 64 εκ των οποίων στη Γαλλία.

### **1.2.2. Μικροβιολογικά κριτήρια / Κανονισμός Ε.Ε. 2073/2005**

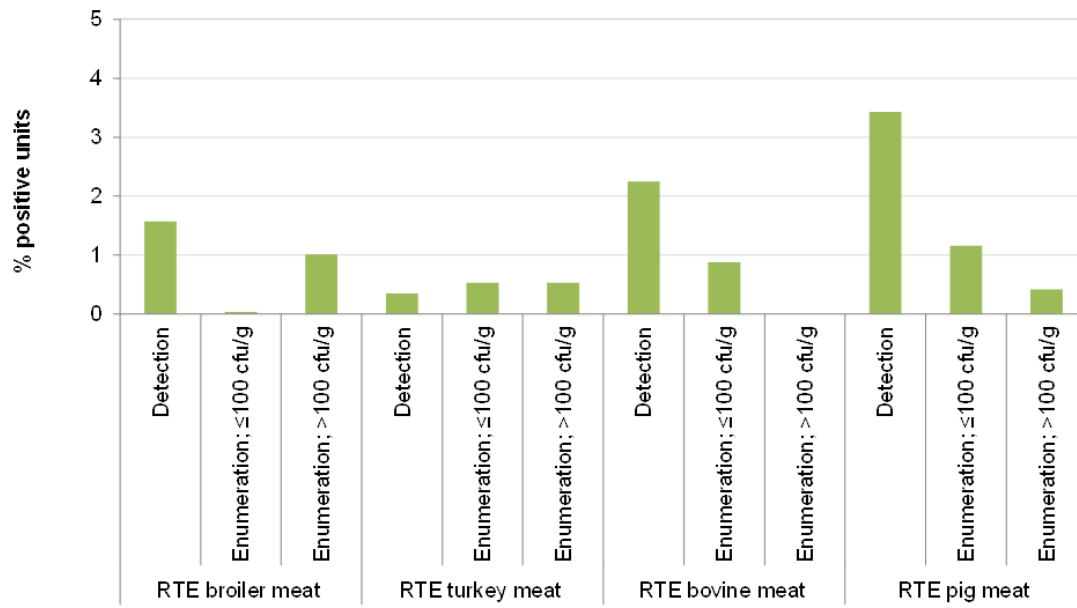
Η Ευρωπαϊκή Ένωση, με τον Κανονισμό 2073/2005, ο οποίος τέθηκε σε ισχύ τον Ιανουάριο του 2006, θεσπίζει κριτήρια ασφάλειας τροφίμων όσον αφορά στη *Listeria monocytogenes* στα Έτοιμα Προς Κατανάλωση τρόφιμα (RTE). Ισχύουν οι ακόλουθες απαιτήσεις:

- Σε RTE προϊόντα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς, απαιτείται απουσία *L. monocytogenes* σε 25g δείγματος.
- Η *L. monocytogenes* δεν πρέπει να υπερβαίνει το όριο των 100 CFU/g κατά τη διάρκεια ζωής άλλων RTE προϊόντων.
- Σε τρόφιμα RTE ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη του βακτηρίου, απαιτείται απουσία της *L. monocytogenes* σε 25g δείγματος κατά την έξοδο από τη γραμμή παραγωγής. Ωστόσο, αν ο παραγωγός μπορεί να αποδείξει, σε επίπεδα ικανοποιητικά για την ελέγχουσα αρχή, ότι το προϊόν δεν θα υπερβεί το όριο των 100 CFU/g καθόλη την διάρκεια ζωής του, το κριτήριο αυτό δεν εφαρμόζεται.

### **1.2.3. Μη-συμμόρφωση σε RTE τρόφιμα**

Μικρά ποσοστά εταιρειών που διαθέτουν Έτοιμα Προς Κατανάλωση Τρόφιμα (RTE) στην αγορά βρέθηκαν να μη συμμορφώνονται με τα μικροβιολογικά κριτήρια, σύμφωνα με στοιχεία της EFSA για το 2013. Τα υψηλότερα ποσοστά μη-συμμόρφωσης αναφέρθηκαν σε RTE προϊόντα στο στάδιο της επεξεργασίας. Η κατηγορία τροφίμων με τα υψηλότερα ποσοστά αποκλίσεων ήταν τα RTE προϊόντα αλιείας, κυρίως το καπνιστό ψάρι, και ακολουθούν τα ακαθόριστα τυριά και τα RTE προϊόντα κρέατος

Όσον αφορά στα RTE προϊόντα κρέατος, το χοιρινό κρέας παρουσίασε τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης *Listeria*. Η *Listeria monocytogenes* ανιχνεύθηκε σε 3,4 % στα 36.511 δείγματα RTE προϊόντων χοίρειου κρέατος, τα οποία εξετάστηκαν με μέθοδο καταμέτρησης. Μεταξύ των 19.926 προϊόντων, το 0,4% βρέθηκε να υπερβαίνει τα 100 CFU/g *L. monocytogenes*, ενώ η πλειοψηφία των δειγματοληψιών έγινε σε δείγματα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας (EFSA, 2015).



Εικόνα 4: Ποσοστά θετικών στην *L. monocytogenes* RTE τροφίμων από διάφορες κατηγορίες κρέατος στην Ε.Ε., 2013 (EFSA, 2015).

#### **1.2.4. Μεταβλητότητα μεταξύ στελεχών *Listeria monocytogenes***

Τα διάφορα στελέχη της *Listeria monocytogenes* μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, τόσο ως προς την παθογένεια και την ικανότητα ανάπτυξης, όσο και ως προς την αδρανοποίησή τους υπό την πίεση διαφόρων παραγόντων (Lianou and Koutsoumanis, 2013). Η επιλογή στελεχών είναι σημαντική κατά την διεξαγωγή πειραμάτων που αφορούν τη μελέτη της συμπεριφοράς παθογόνων βακτηρίων σε τρόφιμα. Ακόμα, προτείνεται η χρησιμοποίηση συνδυασμού στελεχών (3-5 μαζί), ώστε να ληφθεί υπόψιν η μεταβλητότητα στην ανάπτυξη και την επιβίωση μεταξύ των στελεχών, σε μελέτες ασφάλειας τροφίμων (NACMCF, 2005, Scott et al., 2005). Ιδανικά, τα στελέχη που χρησιμοποιούνται κατά τη μελέτη ασφάλειας τροφίμων, είναι καλό να έχουν απομονωθεί από το υπό μελέτη τρόφιμο, το περιβάλλον επεξεργασίας του ή να είναι κλινικά στελέχη από κρούσματα που σχετίζονται με το υπό μελέτη προϊόν (Scott et al., 2005).

##### **1.2.4.1. Μεταβλητότητα ως προς την παθογένεια**

Στο παρελθόν επικρατούσε η αντίληψη ότι το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, ως είδος, είναι παθογόνο, ανεξαρτήτως στελέχους, και ικανό να προκαλέσει ασθένεια (Mc Lauchlin et al., 2004). Οι μελέτες κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν δείξει πως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα ως προς την παθογένεια και τη λοιμογόνο δύναμη μεταξύ των διάφορων στελεχών του βακτηρίου, με άλλα στελέχη να είναι ισχυρά παθογόνα και ικανά να επιφέρουν το θάνατο και άλλα να έχουν πολύ μικρότερη ικανότητα πρόκλησης λοιμώξεων (κυρίως στελέχη απομονωμένα από το περιβάλλον ή από τρόφιμα, Velge and Roche, 2010).

##### **1.2.4.2. Μεταβλητότητα ως προς την ανάπτυξη**

Οι πρώτες αναφορές για την μεταβλητότητα μεταξύ στελεχών *L. monocytogenes* ως προς την ικανότητα ανάπτυξης, χρονολογούνται ήδη από τη δεκαετία του 1980 (Junttila et al., 1988, Rosenow and Marth, 1987, Walker et al., 1990). Οι διαφορές εντοπίζονται στην διάρκεια της φάσης προσαρμογής, στην εκθετική φάση αύξησης και στον χρόνο υποδιπλασιασμού (Barbosa et al., 1994). Γενικά, τα ευρήματα από πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η μεταβλητότητα ανάπτυξης μεταξύ των στελεχών *Listeria monocytogenes*, αυξάνεται όσο απομακρυνόμαστε από τις άριστες συνθήκες ανάπτυξης, ειδικά από την ιδανική θερμοκρασία (Barbosa et al., 1994, Begot et al., 1997, De Jesus and Whiting, 2003, , Lebert et al., 1998, Lianou et al., 2006).

##### **1.2.4.3. Μεταβλητότητα ως προς την αναστολή ανάπτυξης (inactivation)**

Οι διαφορές μεταξύ διάφορων στελεχών *Listeria* όσον αφορά την αντίδραση στην όξινη και θερμική καταπόνηση έχουν μελετηθεί διεξοδικά (Lianou and Koutsoumanis, 2013). Οι διαφορές αποδίδονται σε ιδιαιτερότητες του κάθε

στελέχους σε μοριακό επίπεδο, όσο και σε χαρακτηριστικά της κυτταρικής μεμβράνης που καθορίζουν την ροή ιόντων υδρογόνου διαμέσου της μεμβράνης (Cotter et al., 2005, Olier et al., 2004, Phan-Thanh et al., 2000).

Όσον αφορά στην υπερυψηλή πίεση, ως εναλλακτικό τρόπο για μείωση του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού των τροφίμων και επέκταση του χρόνου ζωής των προϊόντων, έρευνες έχουν δείξει ότι μετά την εφαρμογή πίεσης, η μείωση της ζωτικότητας μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως και 9 λογαριθμικούς κύκλους κατά προσέγγιση (Alpas et al., 1999, Tay et al., 2003). Συγκεκριμένα, οι Alpas et al., βρήκαν ότι η μείωση της ζωτικότητας μετά την εφαρμογή πίεσης (σε διάλυμα πεπτόνης) στα 345 MPa στους 25°C, κυμαινόταν από 0,9 έως 3,5 λογαριθμικούς κύκλους μεταξύ 9 στελεχών *L. monocytogenes*. Επίσης, οι Tay et al., μελετώντας 9 στελέχη *Listeria*, παρατήρησαν μείωση της ζωτικότητας 1,4-4,3 λογάριθμους σε πίεση 400 MPa, και 3,9 έως πάνω από 8 λογάριθμους μείωση μετά την εφαρμογή πίεσης 500 MPa.

### 1.3. Η θεωρία των εμποδίων

Η θεωρία των εμποδίων (hurdle technology) διατυπώθηκε πρώτη φορά από τον Leistner (1978) για τον περιορισμό της αύξησης των μικροοργανισμών σε μη αποστειρωμένα (θερμικώς επεξεργασμένα) τρόφιμα. Τα πιο σημαντικά εμπόδια στην συντήρηση των τροφίμων είναι η θερμοκρασία, η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ), το pH, το δυναμικό οξειδοαναγωγής (Eh), τα συντηρητικά (π.χ. νιτρικά και θειώδη άλατα, σορβικό) και οι ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί (π.χ. γαλακτικά βακτήρια). Πέρα όμως από αυτά, ένας μεγάλος αριθμός εμποδίων έχει περιγραφεί, τα οποία βελτιώνουν την σταθερότητα ή και την ποιότητα των τροφίμων (Leistner, 1999).

Ο Leistner αναφέρει ότι η συνδυαστική επίδραση των μεθόδων συντήρησης έχει καλύτερο αποτέλεσμα από την επίδραση κάθε μεθόδου ξεχωριστά ή από την εφαρμογή υψηλής έντασης μίας μεθόδου. Επομένως, η τεχνολογία των εμποδίων (Leistner, 1985) στοχεύει στην βελτίωση της συνολικής ποιότητας των τροφίμων μέσω της εφαρμογής του κατάλληλου συνδυασμού εμποδίων.

Στις μέρες μας, οι καταναλωτές στις αναπτυγμένες χώρες ζητάνε τρόφιμα υψηλής ποιότητας, εύκολα στην μεταχείριση, ασφαλή και με φυσικά χρώματα και αρώματα, και ταυτόχρονα με μεγάλη διάρκεια ζωής. Η ανάπτυξη και εφαρμογή νέων τεχνολογιών, όπως οι μη-θερμικές μέθοδοι, που θα καλύπτουν όλες τις παραπάνω απαιτήσεις, είναι από τα κύρια αντικείμενα μελέτης σήμερα (Kourkoutas et al., 2016).

### 1.4. Υπερυψηλή πίεση

Η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης (ή αλλιώς υψηλης πίεσης), είναι γνωστή ως εναλλακτική, μη θερμική μέθοδος συντήρησης των τροφίμων ήδη από τη δεκαετία του '90 (Yaldagard et al., 2008). Την τελευταία δεκαετία, η αύξηση της ζήτησης για προϊόντα ασφαλή, χωρίς χημικά συντηρητικά, με μεγάλη διάρκεια ζωής και



οργανοληπτικά χαρακτηριστικά κοντά σε αυτά του νωπού προϊόντος, έχουν οδηγήσει σε αυξανόμενο ενδιαφέρον για νέες τεχνολογίες που θα μπορούν να επιτύχουν όλα τα ανωτέρω. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η εφαρμογή της ΥΥΠ, δηλαδή η εφαρμογή πιέσεων από 100 έως 600 MPa, μπορεί να καταστρέψει ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς και να αδρανοποιήσει ένζυμα ικανά να προκαλέσουν ποιοτική υποβάθμιση του τροφίμου (Aymerich et al., 2008, De Angelis and Gobbetti, 2004, Hereu et al., 2011). Τα προτερήματα της εφαρμογής ΥΥΠ σε τρόφιμα, έναντι της θερμικής επεξεργασίας (παστερίωση, αποστείρωση), είναι η επιμήκυνση του χρόνου ζωής του προϊόντος, η διατήρηση του χρώματος, του αρώματος και της υφής, καθώς και η διατήρηση της θρεπτικής και διατροφικής του αξίας (Clariana et al., 2011). Επιπλέον, καταργεί την ανάγκη χρήσης συντηρητικών και άλλων ανεπιθύμητων για τους καταναλωτές παρεμβάσεων.

Παρά τα πλεονεκτήματα της νέας τεχνολογίας και τις ολοένα και αυξανόμενες μελέτες πάνω στο αντικείμενο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών διεργασίας, ώστε να γεφυρωθεί το κενό μεταξύ εργαστηριακής εφαρμογής και εφαρμογής σε βιομηχανική κλίμακα.

#### **1.4.1. Εφαρμογή ΥΥΠ για την αδρανοποίηση της *Listeria monocytogenes* σε προϊόντα κρέατος και σε πουλερικά.**

Η ΥΥΠ, ως μέθοδος «ψυχρής παστερίωσης», παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως λιστεριοκτόνα μεταχείριση μετά το στάδιο της επεξεργασίας, σε Έτοιμα Προς Κατανάλωση Προϊόντα (RTE) κρέατος που βρίσκονται ήδη στην συσκευασία τους (CAC, 2007, HHS, 2008). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται και από την σύσταση του τροφίμου. Έχει βρεθεί ότι ιδιαίτερα οι χαμηλές τιμές ενεργότητας νερού ( $a_w$ ) ή και η υψηλή συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών, μειώνουν την βακτηριοκτόνα δράση της υπερυψηλής πίεσης, καθώς δρουν ως προστατευτικοί φραγμοί (Patterson, 2005).

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα της εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης στην αδρανοποίηση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Οι Alba et al., (2015) έδειξαν ότι πίεση 450 MPa για 10 λεπτά σε επεξεργασμένο κρέας μείωσε σημαντικά τα επίπεδα *Listeria monocytogenes*. Σύμφωνα με τους Bravo et al., (2014) πίεση 450 MPa για 5 λεπτά, μείωσε τους πληθυσμούς *L. monocytogenes* και *Salmonella Enteritidis* κατά 1-3 λογάριθμους σε μοσχαρίσιο καρπάτσιο. Ακόμα, οι Stratakos et al., (2015) βρήκαν μείωση στον πληθυσμό *L. monocytogenes* όταν εφάρμοσαν πίεση 500 MPa για 1 λεπτό με ή χωρίς συνδυασμό με ενεργή συσκευασία που περιείχε αιθέριο έλαιο κόλιαντρου, σε στήθος κοτόπουλου. Επίσης, οι Balamurungan et al., (2016) σε πείραμά τους σχετικό με την επίδραση των αλάτων και των συγκεντρώσεών τους στην αποτελεσματικότητα της πίεσης έναντι της *L. monocytogenes* σε κοτόπουλο, έδειξαν ότι πιέσεις της τάξης των 600 MPa για 1 ή για 3 λεπτά μείωσαν σημαντικά τον πληθυσμό του παθογόνου. Βρήκαν επίσης ότι υψηλές συγκεντρώσεις NaCl ή KCl δρούσαν προστατευτικά, εμποδίζοντας τη

λιστεριοκτόνο δράση της πίεσης, ενώ αύξηση του  $\text{CaCl}_2$  είχε συνεργιστική δράση με την πίεση.

#### **1.4.2. Εφαρμογή ΥΥΠ σε ζαμπόν**

Μελέτες έχουν δείξει ότι με την εφαρμογή της ΥΥΠ στο ζαμπόν, αυξάνεται η αλμυρή γεύση του τροφίμου (Clariana et al., 2011, Picouet et al., 2012, Serra et al., 2006). Θα μπορούσε επομένως η εφαρμογή της ΥΥΠ να είναι μια εναλλακτική μέθοδος για της μείωση της συγκέντρωσης αλατιού στα RTE προϊόντα κρέατος, και την δημιουργία πιο υγιεινών και εύληπτων προϊόντων.

Σύμφωνα με άλλες μελέτες, η εφαρμογή ΥΥΠ (600 MPa) σε φέτες ζαμπόν, συσκευασμένες υπό κενό, έδειξε να επιφέρει μια αλλαγή στο χρώμα του προϊόντος, ανοίγοντας τον χρωματικό τόνο (L παράμετρος), ενώ επηρέασε και αρκετά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Αυξήθηκε η σκληρότητα, η αντίσταση στη μάσηση, η φωτεινότητα, η ένταση της οσμής και η αλμυρή γεύση στο ζαμπόν, ενώ μειώθηκε η ένταση του χρώματος (Clariana et al., 2011). Τα αποτελέσματα που αφορούν την επίδραση της ΥΥΠ στην οξείδωση επεξεργασμένων κρεάτων, είναι πολλές φορές αντικρουόμενα, καθώς η οξείδωση εξαρτάται από το προϊόν, το βαθμό πίεσης (MPa), το χρόνο εφαρμογής πίεσης και τη θερμοκρασία, το στάδιο επεξεργασίας στο οποίο εφαρμόζεται η πίεση και τις συνθήκες συντήρησης (Andres et al., 2006, Cava et al., 2009, Clariana et al., 2011, Serra et al., 2007). Έτσι, άλλες φορές παρατηρείται οξείδωση και άλλες όχι.

#### **1.4.3. Αλλαγές που επιφέρει η εφαρμογή ΥΥΠ στα τρόφιμα**

Γενικά, η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης επηρεάζει οποιαδήποτε φαινόμενα σε συστήματα τροφίμων, που σχετίζονται με τον όγκο, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση αυτού. Επίσης επηρεάζει μη-ομοιοπολικούς δεσμούς (π.χ. δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβους δεσμούς) πράγμα που σημαίνει ότι συστατικά τροφίμων μικρού μοριακού βάρους (υπεύθυνα για τα θρεπτικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά) δεν επηρεάζονται, ενώ συστατικά υψηλού μοριακού βάρους (των οποίων η δομή είναι τριτοταγής και είναι σημαντικά για τον προσδιορισμό της λειτουργικότητας του τροφίμου) είναι ευαίσθητα. Τέλος, ορισμένοι ειδικοί ομοιοπολικοί δεσμοί τροποποιούνται επίσης από την πίεση. Γενικά, η φυσική συμπίεση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας τροφίμων με εφαρμογή πίεσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου και την αύξηση της θερμοκρασίας και της ενέργειας (Yaldagard et al., 2008).

Κατά την εφαρμογή πίεσης, η θερμοκρασία των συστατικών των τροφίμων αυξάνει ως αναπόφευκτο θερμοδυναμικό αποτέλεσμα της συμπίεσης. Το μέγεθος μεταβολής της θερμοκρασίας εξαρτάται από την ικανότητα συμπίεσης της ουσίας, τις θερμικές ιδιότητες, την αρχική θερμοκρασία, και την πίεση-στόχο που πρέπει να επιτευχθεί. Ανάλογα με τον συνδυασμό πίεσης-θερμοκρασίας και τη διάρκεια της έκθεσης στην πίεση, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και να αποδώσει μια ποικιλία αποτελεσμάτων στους τρόπους επεξεργασίας των τροφίμων. Επομένως, η

υπερυψηλή πίεση μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική μέθοδο της: παστερίωσης, αποστείρωσης, ζεματίσματος, κατάψυξης και απόψυξης των τροφίμων.

#### **1.4.4. Στοιχεία μονάδας υπερυψηλής πίεσης**

Μία μονάδα υψηλών υδροστατικών πιέσεων αποτελείται από 4 βασικά στοιχεία:

- το δοχείο υψηλών πιέσεων με το κάλυμμά του, μέσα στο οποίο τοποθετείται το προϊόν,
- το υγρό μέσο μεταβίβασης των πιέσεων στο προϊόν,
- το σύστημα δημιουργίας υψηλών πιέσεων και
- τα όργανα ελέγχου θερμοκρασίας.

Το δοχείο υψηλών πιέσεων με το κάλυμμά του, είναι κατασκευασμένο από ανοξείδωτο χάλυβα και περιβάλλεται από ειδικό πλαίσιο, ενισχυμένο με ασάλινο σύρμα, ώστε να παραμένει ανθεκτικό στις υψηλές υδροστατικές πιέσεις. Το πάχος του τοιχώματος του καθορίζει το μέγιστο επίπεδο πίεσης του συστήματος. Ανάλογα με την εσωτερική διάμετρο του δοχείου ρυθμίζεται και το εύρος πίεσης που μπορεί να παρέχει το σύστημα που συνήθως είναι μεταξύ 100 και 800 MPa. Σε περίπτωση που απαιτούνται υψηλότερες πιέσεις, χρησιμοποιούνται δοχεία με πολυστρωματικά τοιχώματα ή με ειδικές κατασκευές από σύρμα (Yaldagard et al., 2008, Benet, 2005).

Το υγρό μέσο μεταβίβασης των πιέσεων στο προϊόν μπορεί να είναι ορυκτέλαιο χαμηλού ιξώδους, φυτικό έλαιο ή νερό στο οποίο έχει προστεθεί μικρή ποσότητα λιπαντικού ελαίου και αντιδιαβρωτικού μέσου. Εκτός από το νερό, χρησιμοποιούνται ακόμα διαλύματα γλυκόζης-ύδατος, έλαιο σιλικόνης, γλυκερόλη, διαλύματα βενζοϊκού νατρίου, διαλύματα αιθανόλης, αδρανή αέρια και καστορέλαιο (Yaldagard et al., 2008). Το υγρό μέσο εισάγεται στο δοχείο υψηλών πιέσεων, ενώ παράλληλα απομακρύνεται ο εγκλωβισμένος αέρας από ειδική βαλβίδα με τη βοήθεια αντλίας.

Υπάρχουν τρεις τρόποι ανάπτυξης υδροστατικών πιέσεων:

1. Με άμεση συμπίεση του υγρού στο δοχείο υψηλών πιέσεων με ειδικό έμβολο. Η μέθοδος αυτή, αν και είναι ταχεία, δεν εφαρμόζεται στη βιομηχανική παραγωγή αλλά σε μικρές πιλοτικές μονάδες
2. Με έμμεση συμπίεση του υγρού με τη βοήθεια ειδικής αντλίας. Εφαρμόζεται στη βιομηχανία, για επεξεργασία προϊόντων σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος.
3. Με θέρμανση του υγρού, όταν η εφαρμογή υψηλών πιέσεων συνδυάζεται με ήπια θέρμανση του προϊόντος (Benet, 2005).

### 1.4.5. Επίδραση της ΥΥΠ στους μικροοργανισμούς

Η υπερυψηλή πίεση μπορεί να καταστρέψει μικροοργανισμούς που υπάρχουν στο τρόφιμο, επιδρώντας στην κυτταρική τους μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα, τις βιοχημικές αντιδράσεις και τα ένζυμα του κυττάρου. Όπως συμβαίνει και με άλλες συνθήκες καταπόνησης, μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους μικροοργανισμού είναι δυνατόν να παρατηρηθούν μεγάλες διαφορές στην αντοχή στην πίεση (Alpas et al., 1999, Benet, 2005, Yaldagard et al., 2008).

- Η κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών είναι η πρώτη που υφίσταται βλάβες από την εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης. Τα κύτταρα που βρίσκονται στην στατική φάση είναι συνήθως πιο ανθεκτικά στην πίεση από αυτά που βρίσκονται στην εκθετική φάση (Paterson, 2005). Επιπλέον, η ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης παίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία των μικροοργανισμών σε επεξεργασίες υπερυψηλής πίεσης. Οι μικροοργανισμοί με λιγότερο ρευστές μεμβράνες είναι πιο ευαίσθητοι (Yaldagard et al., 2008).

- Το κυτταρικό τοίχωμα επηρεάζεται λιγότερο σε σχέση με την κυτταρική μεμβράνη, ενώ οι μορφολογικές αλλαγές δεν είναι ορατές με τη χρήση κοινού μικροσκοπίου σε προκαρυωτικά και κατώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ωστόσο, η ενδοκυτταρική βλάβη μπορεί να παρατηρηθεί με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ως άδειες κοιλότητες μεταξύ κυτταροπλασματικής μεμβράνης και κυτταρικού τοιχώματος (Cheftel, 1995).

- Η επεξεργασία με υπερυψηλή πίεση ευνοεί τις βιοχημικές αντιδράσεις που οδηγούν σε μείωση του όγκου, ενώ μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει αντιδράσεις που οδηγούν σε αύξηση του όγκου. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί παραμένουν γενικά ανεπηρέαστοι από τις πιέσεις που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία τροφίμων. Αυτό έχει ως συνέπεια πολλά από τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τη διατροφική αξία των τροφίμων, όπως συστατικά γεύσης και βιταμίνες, να μην καταστρέφονται από τις υψηλές πιέσεις, γεγονός που αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τη βιομηχανία τροφίμων.

- Όσον αφορά την επίδραση της ΥΥΠ στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών, τα νουκλεϊκά οξέα είναι σχετικά ανθεκτικά σε υψηλές πιέσεις και δεδομένου ότι η δομή της έλικας του DNA είναι σε μεγάλο βαθμό αποτέλεσμα του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, είναι επίσης σταθερή υπό την επίδραση πίεσης. Ωστόσο, τα στάδια στα οποία εμπλέκονται ένζυμα για την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA υφίστανται διαταραχές (Benet, 2005, Paterson, 2005). Τέλος οι Chilton et al., (1997), διαπίστωσαν ότι σε υψηλές πιέσεις, το DNA έρχεται σε επαφή με ενδονουκλεάσες που το διασπούν.

## **1.5. Αιθέρια έλαια: ιδιότητες και χρήση**

Τα μπαχαρικά και τα βότανα χρησιμοποιούνταν από την αρχαιότητα για να προσδώσουν γεύση, αλλά και ως φυσικά συντηρητικά των τροφίμων (Burt, 2004, Kalemba et al., 2012). Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά προϊόντα με έντονη οσμή, που προέρχονται από διάφορα μέρη των φυτών, ως δευτερογενείς μεταβολίτες (Franz and Novak, 2010). Έχουν μεγάλο εύρος εφαρμογών τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και στην αρωματοποιία, ως γευστικοί και αρωματικοί παράγοντες (Burt, 2004, Tassou et al., 2012). Ωστόσο, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθερίων ελαίων τα καθιστούν επίσης σημαντικά για την συντήρηση τροφίμων και καλλυντικών και για τον έλεγχο ασθενειών μικροβιακής προέλευσης (Kalemba et al., 2012). Τα αιθέρια έλαια με τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες μπορούν να αποτελέσουν ακόμα πιθανές εναλλακτικές στη χρήση των αντιβιοτικών (Chaves et al., 2008).

Η αυξανόμενη ζήτηση των καταναλωτών για φυσικά πρόσθετα στα τρόφιμα είναι άλλος ένας παράγοντας που έχει εγείρει το ενδιαφέρον για τη χρήση και τις ιδιότητες των αιθερίων ελαίων (Fisher and Philips, 2008, Solorzano-Santos and Miranda-Novales, 2012, Tassou et al., 2012). Ως φυσικά αντιμικροβιακά ορίζονται οι ουσίες που προκύπτουν φυσικά και προέρχονται άμεσα από βιολογικά συστήματα, χωρίς οποιαδήποτε αλλαγή ή τροποποίηση σε εργαστηριακή εγκατάσταση (Li et al., 2011). Ο έλεγχος της μικροβιακής αλλοίωσης των τροφίμων στη βιομηχανία επιτυγχάνεται κυρίως με χημικά μέσα. Οι συνέπειες της μακρόχρονης χρήσης τους όμως, όπως καρκινογένεση, οξεία τοξικότητα, τερατογένεση και η βραδεία αποδόμησή τους επιβάλλουν την αντικατάστασή τους με φυσικά πρόσθετα, τα οποία θα πρέπει να έχουν ένα ευρύ φάσμα αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων, ενώ παράλληλα θα μπορούν να βελτιώνουν την ποιότητα και τη διάρκεια ζωής των ευπαθών τροφίμων (Faleiro, 2011, Sofos et al., 1998).

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την δράση διάφορων αιθερίων ελαίων απέναντι σε βακτήρια, ζύμες και μύκητες (Kalemba et al., 2012, Tassou et al., 2012). Οι αντιμικροβιακές και οι άλλες βιολογικές ιδιότητές τους σχετίζονται άμεσα με την παρουσία των βιοενεργών πτητικών συστατικών τους (Mahmoud and Croteau, 2002). Χημικά, τα αιθέρια έλαια αποτελούνται από ενώσεις τερπενίων (μόνο-, δι- και σεσκιτερπένια), αλκοόλες, οξέα, εστέρες, εποξειδία, αλδεΐδες, κετόνες, αμίνες και σουλφίδια (Burt, 2004). Τα συστατικά των αιθερίων ελαίων μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, τις ενώσεις τερπενίων και τις αρωματικές ενώσεις (Bakkali et al., 2008).

### **1.5.1. Μηχανισμός δράσης αιθερίων ελαίων**

Ο μηχανισμός δράσης των αιθερίων ελαίων κατά των μικροοργανισμών δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Burt, 2004, Rivera Calo et al., 2015). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα έλαια αποτελούνται από πολλές διαφορετικές ενώσεις και οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες δεν μπορούν να αποδοθούν μεμονωμένα σε μία από αυτές (Bajrai et al., 2012). Ωστόσο, πολλοί ερευνητές έχουν προτείνει ότι η

αντιμικροβιακή δράση των ελαίων μπορεί να οφείλεται στην ικανότητά τους να διεισδύουν μέσω της βακτηριακής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου αναστέλλουν τις λειτουργίες του κυττάρου, αλλά και στις λιποφιλικές τους ιδιότητες (Bajpai et al., 2012, Fisher and Phillips, 2009, Guinoiseau et al., 2010).

Τα έλαια που περιέχουν φαινόλες, όπως θυμόλη, καρβακρόλη και ευγενόλη, έχουν την μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι όλων των ειδών μικροοργανισμών (Burt, 2004). Οι φαινολικές ενώσεις διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη και προκαλούν τελικά διαρροή του περιεχομένου του κυττάρου (Bajpai et al., 2012, Skandamis et al., 2001, Ultee et al., 2002). Ο μηχανισμός δράσης μπορεί να σχετίζεται επίσης με την ικανότητα των φαινολών να τροποποιούν την κυτταρική διαπερατότητα, να προκαλούν βλάβη στην κυτοπλασματική μεμβράνη, να εμπλέκονται στο σύστημα παραγωγής ATP και να διαταράσσουν την κίνηση των πρωτονίων (Bajpai et al., 2012, Burt, 2004, Denyer and Hugo, 1991, Friedly et al., 2009, Li et al., 2011).

Τα αιθέρια έλαια είναι ενώσεις υδρόφοβες, χαρακτηριστικό που τους επιτρέπει να διαχωρίζουν τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων και τα μιτοχόνδρια, αυξάνοντας έτσι την διαπερατότητα του κυττάρου (Burt, 2004, Friedly et al., 2009, Sikkema et al., 1994). Η αλληλεπίδραση των αιθερίων ελαίων με τις μικροβιακές κυτταρικές μεμβράνες αναστέλλει την ανάπτυξη μερικών Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων (Calsamiglia et al., 2007). Τα Gram-θετικά βακτήρια, όπως η *Listeria monocytogenes*, ο *Staphylococcus aureus* και ο *Bacillus cereus* είναι πιο επιρρεπή στα έλαια από τα Gram-αρνητικά, όπως οι *Escherichia coli* και *Salmonella Enteritidis* (Burt, 2004, Chorianoopoulos et al., 2004). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο υδρόφιλο κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων, που αποτρέπει την διείσδυση των υδρόφοβων ενώσεων (Calsamiglia et al., 2007, Kim et al., 2011, Ravichandram et al., 2011).

### **1.5.2. Αιθέρια έλαια σε τρόφιμα**

Πέρα από τους μηχανισμούς δράσης που αναφέρθηκαν, η αντιμικροβιακή δράση των αιθερίων ελαίων στα τρόφιμα εξαρτάται και από την συγκέντρωσή τους σε αυτά. Ωστόσο, η έντονη οσμή και γεύση που αποδίδουν περιορίζουν τη χρήση τους ως συντηρητικά των τροφίμων (Bajpai et al., 2012, Solorzano-Santos and Miranda-Novales, 2012). Επομένως, στη βιομηχανία τροφίμων δύναται να χρησιμοποιηθεί η ελάχιστη συγκέντρωση αιθερίου ελαίου στην οποία δεν παρατηρείται βακτηριακή ανάπτυξη (Chorianoopoulos et al., 2006).

Ένας ακόμη παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψιν πριν τη χρήση των αιθερίων ελαίων σε τρόφιμα, είναι η αλληλεπίδρασή τους με τα συστατικά των τροφίμων. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι τρόφιμα με χαμηλό pH αυξάνουν την διαλυτότητα και τη σταθερότητα των ελαίων, ενισχύοντας την αντιμικροβιακή τους δράση (Burt, 2004). Αντίθετα, τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος απαιτούσαν προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης ελαίου, ώστε αυτό να εκφράσει την αντιμικροβιακή του δράση (Smith et al., 1998).

Πολλά πειράματα έχουν διεξαχθεί για τη μελέτη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των αιθερίων ελαίων σε διάφορα τρόφιμα. Όσον αφορά τα προϊόντα κρέατος, οι μελέτες έχουν δείξει μείωση του μικροβιακού πληθυσμού στο τρόφιμο κατά 1,5-3 λογάριθμους, ενώ παρατηρείται ενίοτε και πλήρης αναστολή της μικροβιακής αύξησης, χωρίς δυνατότητα ανάκαμψης των ζωντανών κυττάρων, πάντοτε σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του ελαίου (Bukvicki et al., 2014, Hayouni et al., 2008, Nannapaneni et al., 2009, Silveira et al., 2014).

### 1.5.3. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Η ρίγανη (*Origanum* spp.) είναι αρωματικό, ποώδες και πολυετές φυτό της Μεσογείου και της Κεντρικής Ασίας. Ανήκει στο γένος *Origanum* της οικογένειας Lamiaceae. Η ρίγανη είναι γνωστή από τα αρχαία χρόνια για τα θεραπευτικά οφέλη της, στα οποία περιλαμβάνονται αντιδιαρροϊκές, αντισηπτικές, αντισπασμωδικές και τονωτικές ιδιότητες, και χρησιμοποιείται στην εναλλακτική ιατρική και την ομοιοπαθητική σε όλο τον κόσμο (Souza et al., 2007).

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης χρησιμοποιείται ως γευστικός παράγοντας σε φαγητά και αναψυκτικά, σε αρώματα, σε μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα, φαρμακευτικά, κτηνιατρικά και βιομηχανικά προϊόντα (Rehder et al., 2004). Βρίσκει ακόμα εφαρμογή σε καλλυντικά, είδη προσωπικής περιποίησης, στην αρωματοθεραπεία κ.ά. (Kintzios, 2004).

Τα περισσότερα είδη *Origanum* φύονται στην περιοχή της Μεσογείου, αλλά το *Origanum vulgare* L. συναντάται ακόμη σε περιοχές μεταξύ Ευρώπης- Σιβηρίας και Ιράν-Τουράν. Στην Ελλάδα, η ρίγανη είναι αυτοφυής και βρίσκεται σε ορεινές και βραχώδεις περιοχές. Η ποιότητά της θεωρείται από τις καλύτερες παγκοσμίως (Asensio et al., 2014). Τα είδη *Origanum* spp. μοιράζονται ένα κοινό αρωματικό προφίλ, που συχνά περιγράφεται ως πικάντικο, με οσμή δυόσμου, καθώς πολλά από αυτά περιέχουν διάφορα ποσοστά θυμόλης και καρβακρόλης (Meyers, 2005).

Η σύσταση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης διαφέρει από είδος σε είδος, αλλά εξαρτάται επίσης από τη γεωγραφική περιοχή και το φαινολογικό στάδιο του φυτού κατά τη συγκομιδή (Bejaoui et al., 2013, Burt, 2004). Πάνω από 60 βασικά συστατικά του ελαίου έχουν ταυτοποιηθεί, μερικά από τα οποία είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη, η  $\beta$ -φαινυλ-αλκοόλη, το  $\gamma$ -τερπινένιο, το  $p$ -κυμένιο κ.ά. (Chorianopoulos et al., 2004, Teixeira et al., 2013).

### **1.5.3.1. Αιθέριο έλαιο ρίγανης για καταπολέμηση της *L. monocytogenes* σε τρόφιμα**

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αιθερίου ελαίου της ρίγανης είναι γνωστές εδώ και πολλά χρόνια. Σήμερα, οι ερευνητές προσπαθούν να χρησιμοποιήσουν τα οφέλη του φυσικού αυτού αντιμικροβιακού για να διασφαλίσουν την ασφάλεια των τροφίμων. Η αποτελεσματικότητα του ελαίου έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes* έχει μελετηθεί διεξοδικά, με ενθαρυντικά αποτελέσματα (Burt, 2004, Skandamis and Nychas, 2001). Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Barbosa et al., (2016), οι οποίοι έδειξαν ότι η εφαρμογή αιθερίου ελαίου ρίγανης, κάτω του ορίου που προκαλεί αδρανοποίηση του παθογόνου, οδήγησε σε μείωση του πληθυσμού *L. monocytogenes* σε φυλλώδη λαχανικά μέσα στο πρώτο 24ωρο.

Ακόμα, οι Mazzarrino et al., (2015) μελετώντας 10 διαφορετικά αιθέρια έλαια έναντι των βακτηρίων *Listeria monocytogenes* και *Salmonella enterica*, βρήκαν πως το αιθέριο έλαιο της ρίγανης είχε την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα, ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις της τάξης των 0.15–5.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Επίσης, οι Pesavento et al., (2015) βρήκαν ότι συγκέντρωση 1% αιθερίου ελαίου ρίγανης παρεμπόδισε την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*, αλλά επηρέασε την γεύση σε κεφτέδες από βόειο κρέας, ενώ συγκέντρωση 0,5% μείωσε τον πληθυσμό του βακτηρίου και παράλληλα διατήρησε τα επιθυμητά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Και αυτή η ομάδα ερευνητών συμφωνεί πως το αιθέριο έλαιο ρίγανης επέδειξε τις καλύτερες αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι άλλων τριών που εξετάστηκαν.

## **1.6. Ενεργή συσκευασία – Εδώδιμες μεμβράνες**

Η ενεργή συσκευασία είναι μια αναπτυσσόμενη και πολλά υποσχόμενη τεχνολογία στην συντήρηση των τροφίμων, η οποία στοχεύει στον έλεγχο της αλλοίωσης των τροφίμων και την παραγωγή υψηλής ποιότητας προϊόντων με βελτιωμένες οργανοληπτικές ιδιότητες (Zinoviadou et al., 2011). Επίσης, η χρήση ανανεώσιμων, διασπώμενων υλικών, που μπορούν να μειώσουν το πρόβλημα της διαχείρισης των απορριμάτων, και τα οποία είναι εκτός των άλλων εδώδιμα, κάνουν ακόμα πιο ενδιαφέρουσα τη μελέτη της χρήσης εδώδιμων μεμβρανών και επιστρώσεων στην τεχνολογία τροφίμων (Tavassoli-Kafrani et al., 2016).

Οι εδώδιμες μεμβράνες δρουν ως επιλεκτικοί φραγμοί για την ανταλλαγή υγρασίας, αερίων και διαλυμένων ουσιών μεταξύ περιβάλλοντος – τροφίμου, αλλά μπορούν να λειτουργήσουν και ως φορείς λειτουργικών συστατικών, όπως τα αντιοξειδωτικά, οι αντιμικροβιακοί παράγοντες, τα χρώματα και τα αρώματα, και τα καρυκεύματα. Μπορεί να παρασκευάζονται από κυτταρίνη, αλγινικά, ζεΐνη, πρωτεΐνες ορού γάλακτος ή πηκτίνη που βασίζεται σε μήλα, καρότα και ιβίσκο (Karpetanakou et al., 2015). Οι μεμβράνες από Na-αλγινικά, είναι φραγμοί για το οξυγόνο και την υγρασία, ενώ παράλληλα αποτρέπουν την οξείδωση των λιπών. Η εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών σε στερεά ή ημιστερεά τρόφιμα, μπορεί να ελέγξει αποτελεσματικά τον μικροβιακό πληθυσμό, εμποδίζοντας την ανάπτυξη



αλλοιογόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών στην επιφάνεια του τροφίμου. Σε αντίθεση με τον ψεκάσμο αντιμικροβιακών παραγόντων (π.χ. αιθέρια έλαια) απευθείας στο τρόφιμο, η ενσωμάτωσή τους σε μεμβράνες οδηγεί στην βραδεία απελευθέρωσή τους, συμβάλλοντας στην διατήρηση υψηλών συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας, όπου χρειάζεται .

### **1.7. Συσκευασία υπό κενό**

Συσκευασία υπό κενό (vacuum packaging) είναι η απομάκρυνση όλου του αέρα της συσκευασίας του τροφίμου, χωρίς μετά να αντικατασταθεί από άλλο αέριο. Η συσκευασία υπό κενό δημιουργεί μια διαφορά πίεσης μεταξύ του εξωτερικού και του εσωτερικού της συσκευασίας, η οποία οδηγεί σε συμπίεση του προϊόντος. Αν το τρόφιμο αναπνέει, η μικρή ποσότητα οξυγόνου που βρίσκεται στους ιστούς καταναλώνεται, με αποτέλεσμα την αύξηση του κενού και την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα και νερού.

Σκοπός της εφαρμογής κενού κατά τη συσκευασία των τροφίμων είναι ο έλεγχος της αναπνοής και της ωρίμανσης των προϊόντων, ο έλεγχος της ανάπτυξης αλλοιογόνων μικροοργανισμών και η επιβράδυνση ή η αναστολή των ενζυμικών αντιδράσεων που έχουν ως αποτέλεσμα τη διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του προϊόντος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και επιμήκυνση του χρόνου ζωής του.

### **1.8. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) Φασματοσκοπία Υπερύθρου**

Η χρήση μικροβιακών μεταβολιτών ως δείκτες αλλοίωσης των τροφίμων προτοεισήχθη σαν ιδέα την δεκαετία του 1970 και έκτοτε επεκτάθηκε (Nychas et al., 1998, Gill, 1986). Τα *metabolomics*, όπως και οι αναλυτικές μέθοδοι (FTIR φασματοσκοπία, φασματοσκοπία φθορισμού) πήγαν την ιδέα αυτή ένα βήμα παρακάτω (Ellis et al., 2005). Η φασματοσκοπία FTIR είναι μία οικονομική, εύκολη στη χρήση, γρήγορη και μη-καταστροφική μέθοδος για την απόκτηση πληροφοριών για τη σύνθεση δειγμάτων τροφίμων και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά διαφορετικά είδη τροφίμων για την επίλυση προβλημάτων νοθείας, αλλά και την ανίχνευση της αλλοίωσης (Al-Jowder, 2002, Argyri, 2014, Ellis et al., 2005, He et al., 2007, Manaf et al., 2007, Panagou et al., 2010). Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τον συσχετισμό του βαθμού αλλοίωσης σε χοιρινό και βόειο κρέας, συντηρημένο κάτω από διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και συσκευασίας, με τα βιοχημικά αποτυπώματα των δειγμάτων αυτών, που παρατηρήθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας FTIR (Ammor et al., 2009, Argyri et al., 2013, Argyri et al., 2010).

Τα φασματόμετρα FTIR (Fourier Transform υπέρυθρο φασματόμετρο) χρησιμοποιούνται ευρέως στην οργανική σύνθεση, την επιστήμη των πολυμερών, τη μηχανική των πετροχημικών, τη φαρμακευτική βιομηχανία και την ανάλυση τροφίμων. Επιπλέον, δεδομένου ότι τα φασματόμετρα FTIR μπορεί να συνδεθούν με

τη χρωματογραφία, ο μηχανισμός χημικών αντιδράσεων και η ανίχνευση ασταθών ουσιών μπορούν να διερευνηθούν με αυτά τα μέσα.

### **1.8.1. Αρχές λειτουργίας φασματοσκοπίας υπέρυθρου FTIR**

Η ανακάλυψη του υπέρυθρου φωτός μπορεί να χρονολογηθεί στον 19ο αιώνα. Από τότε, οι επιστήμονες έχουν δημιουργήσει διάφορους τρόπους για να χρησιμοποιήσουν το υπέρυθρο φως. Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον καθορισμό των δομών των μορίων μέσω μιας χαρακτηριστικής απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας από αυτά. Το υπέρυθρο φάσμα είναι το μοριακό φάσμα δονήσεων. Όταν εκτίθεται σε υπέρυθρη ακτινοβολία, τα μόρια του δείγματος απορροφούν επιλεκτικά ακτινοβολία συγκεκριμένων μηκών κύματος, που προκαλεί την αλλαγή της διπολικής ροπής των μορίων. Κατά συνέπεια, τα δονητικά επίπεδα ενέργειας των μορίων του δείγματος μεταφέρονται από θεμελιώδη κατάσταση σε διεγερμένη κατάσταση. Η συχνότητα της κορυφής απορρόφησης καθορίζεται από το δονητικό ενεργειακό κενό.

Ο αριθμός των κορυφών απορρόφησης είναι σχετικός με τον αριθμό ελευθερίας του μορίου στην δόνηση. Η ένταση των κορυφών απορρόφησης σχετίζεται με την αλλαγή της διπολικής ροπής και τη δυνατότητα μετάβασης των επιπέδων ενέργειας. Ως εκ τούτου, αναλύοντας το φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας, μπορεί κανείς να αποκτήσει εύκολα πληροφορίες για τη δομή ενός μορίου. Τα περισσότερα μόρια είναι ενεργά στο υπέρυθρο, εκτός από μερικά ομοπυρηνικά διατομικά μόρια όπως τα  $O_2$ ,  $N_2$  και  $Cl_2$ , λόγω της μηδενικής αλλαγής διπόλου στη δόνηση και την περιστροφή αυτών των μορίων. Αυτό που κάνει τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπέρυθρου ακόμη πιο χρήσιμη είναι το γεγονός ότι είναι σε θέση να αναλύει και αέρια και υγρά και στερεά δείγματα.

Η φασματική περιοχή του υπέρυθρου διακρίνεται σε τρεις υποπεριοχές:

- Εγγύς υπέρυθρο, εύρος  $12500-4000\text{ cm}^{-1}$ , παρατηρούνται συνδυασμοί ταλαντώσεων και μεγαλύτερης τάξης σκεδάσεις,
- Μέσο υπέρυθρο, εύρος  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ , διεγείρονται θεμελιώδεις ταλαντώσεις,
- Μακρινό υπέρυθρο, εύρος  $400-5\text{ cm}^{-1}$ , καλύπτει τις συχνότητες ταλάντωσης της δομής των μεγάλων μορίων.

Η κοινώς χρησιμοποιούμενη περιοχή για τη φασματοσκοπία απορρόφησης υπέρυθρου είναι  $4000 \sim 400\text{ cm}^{-1}$ , επειδή η περιοχή απορρόφησης ακτινοβολίας των περισσότερων οργανικών ενώσεων και ανόργανων ιόντων βρίσκεται εντός αυτής της περιοχής.

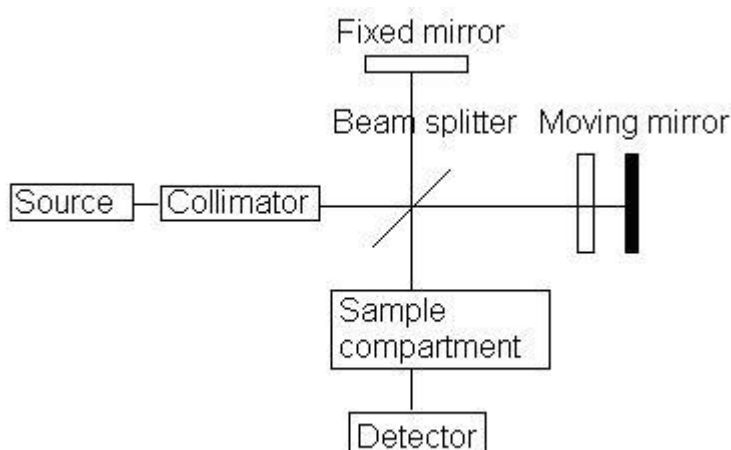
### **1.8.2. Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας FTIR**

Τα πλεονεκτήματα των FTIR φασματομέτρων, που τα έκαναν να υπερισχύσουν έναντι των φασματομέτρων διασποράς IR είναι:

- Ο λόγος σήματος προς θόρυβο του ραδιοφάσματος είναι σημαντικά υψηλότερος από τα υπέρυθρα φασματόμετρα προηγούμενης γενιάς,
- Η ακρίβεια των κυματάρθμων είναι υψηλή. Το σφάλμα είναι εντός του εύρους των  $\pm 0,01 \text{ cm}^{-1}$ .
- Ο χρόνος σάρωσης όλων των συχνοτήτων είναι μικρός (περίπου 1 λεπτό).
- Η ανάλυση είναι εξαιρετικά μεγάλη ( $0,1 \sim 0,005 \text{ cm}^{-1}$ ).
- Το εύρος σάρωσης είναι μεγάλο ( $1000 \sim 10 \text{ cm}^{-1}$ ).
- Η παρεμβολή φωτός από εξωτερικές πηγές είναι μειωμένη.

### 1.8.3. Βασικά στοιχεία του φασματόμετρου FTIR

Ένα κοινό φασματόμετρο FTIR αποτελείται από μια πηγή, το συμβολόμετρο, το χώρο τοποθέτησης του δείγματος, τον ανιχνευτή, έναν ενισχυτή, ένα μετατροπέα A/D, και έναν υπολογιστή. Η πηγή παράγει ακτινοβολία η οποία περνά από το δείγμα μέσω του συμβολομέτρου και φθάνει στον ανιχνευτή. Στη συνέχεια, το σήμα ενισχύεται και μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα από τον ενισχυτή και από τον μετατροπέα αναλογικού-ψηφιακού αντίστοιχα. Τελικά, το σήμα μεταφέρεται σε έναν υπολογιστή στον οποίο διεξάγεται ο μετασχηματισμός Fourier.



Εικόνα 5: Βασικά στοιχεία φασματομέτρου FTIR

**Το συμβολόμετρο Michelson**, το οποίο αποτελεί τον πυρήνα του φασματόμετρου FTIR, χρησιμοποιείται για να χωρίσει μία δέσμη φωτός σε δύο, έτσι ώστε οι διαδρομές των δύο δεσμών να είναι διαφορετικές. Στη συνέχεια, το συμβολόμετρο Michelson συνδυάζει τις δύο δέσμες και τις οδηγεί στον ανιχνευτή όπου η διαφορά της έντασής τους μετράται ως συνάρτηση της διαφοράς των διαδρομών τους.

**Το διάγραμμα παρεμβολής** είναι μία συνάρτηση του χρόνου και οι τιμές που εξάγονται από αυτό συνθέτουν το πεδίο του χρόνου. Το πεδίο του χρόνου είναι

μετασχηματισμένο κατά Fourier για να δημιουργήσει ένα πεδίο συχνότητας, το οποίο μετατρέπεται για να παράγει ένα φάσμα.

Ο πρώτος που διαπίστωσε ότι ένα φάσμα και το συμβολογράφημά του σχετίζονται μέσω ενός **μετασχηματισμού Fourier** ήταν ο Λόρδος Rayleigh, το 1892. Αλλά ο πρώτος που συσχέτισε με επιτυχία ένα συμβολογράφημα με το φάσμα του ήταν ο Fellgett, περισσότερο από μισό αιώνα μετά. Η γρήγορη μέθοδος μετατροπής Fourier, στην οποία βασίστηκε η σύγχρονη φασματομετρία FTIR, εισήχθη από τους Cooley και την Turkey το 1965.

## 2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1.Προκαταρκτικά Πειράματα για την επιλογή κατάλληλου προϊόντος κρέατος και συνθηκών μεταχείρισης

Μία σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν με σκοπό την επιλογή του κατάλληλου προϊόντος προς μελέτη, της κατάλληλης συνθήκης πίεσης-χρόνου, καθώς και της επιθυμητής συγκέντρωσης αιθερίου ελαίου ρίγανης. Επιπροσθέτως, στόχος ήταν η επιλογή των κατάλληλων συνθηκών που θα εξασφάλιζαν παράταση της διάρκειας ζωής του προϊόντος, ενίσχυση του επιπέδου της ασφάλειάς του, αλλά και διατήρηση των ποιοτικών του χαρακτηριστικών.

#### 2.1.1. Α: Εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης-χρόνου σε μοσχαρίσιο κιμά και χοιρινά σουβλάκια.

Δύο εμπορικά τρόφιμα, μοσχαρίσιος κιμάς συσκευασμένος και χοιρινά σουβλάκια συσκευασμένα, υπέστησαν περαιτέρω επεξεργασία με εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης/χρόνου ως εξής: 300MPa/2min, 300MPa/5min, 400MPa/2min και 500MPa/5min. Σαν χρονοδιάγραμμα ενδεικτικών δειγματοληψιών για την επίτευξη των επιμέρους στόχων ακολουθήθηκε δειγματοληψία την ημέρα 0, την 1η και την 4η ημέρα, έπειτα από συντήρηση στους 12°C. Σε κάθε δειγματοληψία έγινε εκτίμηση στο χρώμα του προϊόντος σε σύγκριση με το απίεστο (control), μέτρηση του pH και μικροβιολογική ανάλυση (ολική μικροβιακή χλωρίδα,ψευδομονάδες, *Brochothrix thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια, ζύμες-μύκητες και εντεροβακτήρια).

Είχαμε τις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. Control (μη πιεσμένο δείγμα)
2. Πίεση στα 300 MPa για 2 min
3. Πίεση στα 300 MPa για 5 min
4. Πίεση στα 400 MPa για 2 min
5. Πίεση στα 500 MPa για 5 min

Για κάθε πίεση υπήρχαν δύο επαναλήψεις. Έγιναν τρεις δειγματοληψίες, η πρώτη την ημέρα 0, οπότε και τα δείγματα πιέστηκαν, η δεύτερη μετά από μία μέρα και η τρίτη μετά από 4 ημέρες, μετά από συντήρηση στους 12°C. Συνολικά εξετάστηκαν 60 δείγματα, 20 για κάθε μέρα δειγματοληψίας.

Σε κάθε δειγματοληψία μετρήθηκαν:

- Χρώμα, σε σύγκριση πάντα με το μη πιεσμένο
- pH
- Μικροβιολογικά (PCA για Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα,CFC για ψευδομονάδες, RBC για ζύμες-μύκητες, STAA για *Brochothrix thermosphacta*, MRS για γαλακτικά βακτήρια και VRBG για εντεροβακτήρια).

- Τα δείγματα κλείστηκαν σε συσκευασίες των 20g περίπου, υπό κενό και τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της υπερυψηλής πίεσης. Αμέσως μετά την εφαρμογή της πίεσης, 20 δείγματα επιλέχθηκαν για την δειγματοληψία 0, ενώ τα υπόλοιπα συντηρήθηκαν σε κλίβανο στους 12°C. Για τη δειγματοληψία ζυγίστηκαν 10g από κάθε δείγμα και προστέθηκαν 90ml Ringer. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις.

### **2.1.2. B: Κιμαδοποίηση μοσχαρίσιου κρέατος και εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 2 min.**

Το 1<sup>ο</sup> προκαταρκτικό πείραμα έδειξε ότι τα δείγματα που πιάστηκαν τόσο για τον μοσχάρισιο κιμά όσο και για το χοιρινό σουβλάκι ήταν μη αποδεκτά οπτικά από το πάνελ αξιολόγησης, παρόλα τα θετικά μικροβιολογικά αποτελέσματα. Συνεπώς, επιλέξαμε να πιέσουμε πρώτα το νωπό μοσχάρι και μετά να ακολουθηθεί κιμαδοποίησή του στον χώρο του εργαστηρίου, χρησιμοποιώντας τη συνθήκη πίεσης-χρόνου που είχε δείξει τα καλύτερα αποτελέσματα στο 1<sup>ο</sup> προκαταρκτικό πείραμα.

Ένα κομμάτι μοσχάρισιου κρέατος, περίπου 1kg τεμαχίστηκε και χωρίστηκε σε 500g για control και 500g για εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης. Τα δείγματα που προορίζονταν για πίεση συσκευάστηκαν σε κενό, πρωτού τους εφαρμοστεί πίεση 300MPa για 2 λεπτά, μία συνθήκη που μας έχει δείξει από προηγούμενα πειράματα ότι δεν μεταβάλλει το χρώμα του κρέατος σε μη αποδεκτά για τον καταναλωτή επίπεδα. Παράλληλα, αυτή η συνθήκη πίεσης-χρόνου μειώνει κατά 2,5 λογάριθμους την ολική μικροβιακή χλωρίδα του μοσχάρισιου κρέατος. Προγραμματίστηκαν τέσσερις δειγματοληψίες (ημέρα 0, ημέρα 1, ημέρα 4, ημέρα 5). Τα δείγματα κιμαδοποιήθηκαν στον χώρο του εργαστηρίου.

Σε κάθε δειγματοληψία έγινε:

- Εκτίμηση στο χρώμα του προϊόντος σε σύγκριση με το απίεστο (control),
- Μέτρηση του pH και
- Μικροβιολογική ανάλυση (PCA για Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, CFC για ψευδομονάδες, STAA για *Brochothrix thermosphacta*, MRS για γαλακτικά βακτήρια και VRBG για εντεροβακτήρια).

Είχαμε τις ακόλουθες περιπτώσεις:

1. Μοσχάρι control (1η δειγματοληψία)
2. Κιμάς control (1η δειγματοληψία)
3. Μοσχάρι πιεσμένο (1η δειγματοληψία)
4. Κιμάς πιεσμένος (1η δειγματοληψία)
5. Κιμάς στους 4°C πιεσμένος

6. Κιμάς στους 4°C control (1 επανάληψη)
7. Κιμάς στους 12°C πεισμένος
8. Κιμάς στους 12°C control (1 επανάληψη)

Στην δειγματοληψία της ημέρας 0 ένα μέρος του μοσχαρίσιου κρέατος κρατήθηκε ως έχει και το υπόλοιπο κιμαδοποιήθηκε στον χώρο του εργαστηρίου. Πρώτα κιμαδοποιήθηκαν τα πεισμένα δείγματα, και μετά τα control, με καθαρισμό της κιμαδομηχανής ενδιάμεσα για την αποφυγή μεταφοράς μικροβιακού φορτίου. Στις υπόλοιπες δειγματοληψίες όλα τα δείγματα ήταν κιμαδοποιημένα, συσκευασμένα σε μερίδες των 30-40g σε κενό, και αποθηκεύτηκαν στους 4 και 12°C . Κάθε δείγμα είχε δύο επαναλήψεις, εκτός από τα δύο control του κιμά στους 4 και 12°C . Σε κάθε δειγματοληψία ζυγίζονταν 10g κιμά με προσθήκη 90ml Ringer.



Εικόνα 6: Κιμαδοποίηση κρέατος

### 2.1.3. Γ: Επιλογή της κατάλληλης συνθήκης πίεσης-χρόνου για εφαρμογή σε ζαμπόν και γαλοπούλα

Τα δύο πρώτα πειράματα έδειξαν ότι η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης σε μοσχαρίσιο κιμά (είτε απευθείας πιεσμένος είτε εφαρμογή της πίεσης σε νωπό κρέας και μετά κιμαδοποίηση) και χοιρινά σουβλάκια μετέβαλλε το χρώμα των προϊόντων, δίνοντάς τους την όψη μαγειρεμένου κρέατος, γεγονός που κατέστησε τα εν λόγω προϊόντα απορριπτέα από το σύνολο του πάνελ αξιολόγησης. Επομένως, η μελέτη δύο άλλων προϊόντων που ενδεχομένως να είχαν καλύτερα ποιοτικά αποτελέσματα, του ζαμπόν και της γαλοπούλας κρίθηκε απαραίτητη.

Φέτες ζαμπόν και γαλοπούλας αγοράστηκαν από σούπερ μάρκετ. Τα τεμάχια τους συσκευάστηκαν στο εργαστήριο σε κενό (3 φέτες ανά συσκευασία). Σε αυτή τη μορφή οι συσκευασίες υποβλήθηκαν στις ακόλουθες τιμές υπερυψηλής πίεσης:

- 300MPa - 5min
- 400MPa - 2min
- 400MPa - 5min
- 500MPa - 2min
- 500MPa - 5min
- 500MPa - 10min
- 600MPa - 2min

Είχαμε τις ακόλουθες περιπτώσεις για το ζαμπόν και τη γαλοπούλα:

Ημέρες Δειγματ/ίας	Χωρίς πίεση (μάρτυρας)	300MPa /5 λεπτά	400MPa /2 λεπτά	400MPa /5 λεπτά	500MPa /2 λεπτά	500MPa /5 λεπτά	500MPa /10 λεπτά	600MPa /2 λεπτά
0	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2
4	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2
14	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2	X2

Σε όλες τις δειγματοληψίες χρησιμοποιήθηκαν διπλά δείγματα. Τα δείγματα μετά την πίεση αποθηκεύτηκαν στους 4°C .

Σε κάθε δειγματοληψία έγιναν οι εξής αναλύσεις:

- Μικροβιολογικές αναλύσεις (PCA για απαρίθμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, MRS για απαρίθμηση των γαλακτικών βακτηρίων) και
- μέτρηση του pH



#### **2.1.4. Δ: Προσθήκη υδρολύματος ρίγανης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και εφαρμογή σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένων με *Listeria monocytogenes*.**

Μετά την εφαρμογή διαφορετικών πιέσεων σε γαλοπούλα και ζαμπόν, έγινε επιλογή του ζαμπόν ως καταλληλότερου προϊόντος για την παρούσα πειραματική μελέτη, λόγω του καλού διαχωρισμού που παρατηρήθηκε στις φέτες μετά την υπερυψηλή πίεση. Αφού επιλέχθηκε το προϊόν, επόμενο βήμα ήταν η επιλογή του κατάλληλου αντιμικροβιακού παράγοντα.

Στόχος του πειράματος ήταν ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης του υδρολύματος ρίγανης, ενσωματωμένου σε εδώδιμες μεμβράνες, έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*. Για το σκοπό αυτό οι φέτες ζαμπόν εμβολιάστηκαν με δυο στελέχη *Listeria monocytogenes* (128, 131), σε επίπεδο  $10^5$  cfu/g, και έγινε δοκιμή τριών συγκεντρώσεων υδρολύματος (0.1%, 0.5%, 1% v/v).

##### Παρασκευή μεμβρανών

Παρασκευάστηκαν διαλύματα αλγινικού νατρίου 2% w/v και προστέθηκε σε όλα γλυκερόλη 1% v/v.

- Διάλυμα αλγινικού χωρίς προσθήκη υδρολύματος
- Διάλυμα αλγινικού με προσθήκη 0,1% υδρολύματος
- Διάλυμα αλγινικού με προσθήκη 0,5% υδρολύματος
- Διάλυμα αλγινικού με προσθήκη 1% υδρολύματος

##### Εμβολιασμός με *Listeria*

Έγινε παραλαβή καλλιεργειών δυο στελεχών *L. monocytogenes*, B129 και B131, μετά από επώαση 18 ωρών και φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 6000 στροφές, στους 4°C. Μετά από την παραλαβή του pellet, ακολούθησε επαναιώρηση σε ίσο όγκο διαλύματος Ringer. Η φυγοκέντρηση επαναλήφθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες, έγινε παραλαβή του pellet και επαναιώρηση σε ίσο όγκο διαλύματος Ringer. Έγινε μια τελική φυγοκέντρηση υπο τις ίδιες συνθήκες και επαναιώρηση των pellet σε όγκο, που είχαμε υπολογίσει.

Ακολούθως, έγινε εμβολιασμός με  $10^5$  cfu/g *Listeria monocytogenes* στο ζαμπόν. Οι φέτες αφέθηκαν να στεγνώσουν για 15min σε Laminar και στη συνέχεια συσκευάστηκαν μαζί με μεμβράνες (ανάλογες ανά περίπτωση) κατά το σχέδιο (μεμβράνη-φέτα ζαμπόν-μεμβράνη-φέτα ζαμπόν-μεμβράνη) σε πλαστική συσκευασία και υπό κενό. Το ζαμπόν, αφού συσκευάστηκε, αποθηκεύτηκε στους 4°C για 7 ημέρες.

Περιπτώσεις δειγματοληψιών:

Ημέρες Δειγματοληψίας	Χωρίς <i>L. monocytogenes</i>	Με <i>L. monocytogenes</i> (10 <sup>5</sup> CFU/g)	Με <i>L. monocytogenes</i> + Μεμβράνες με Υδρόλυμα ρίγανης			
			0%	0,1%	0,5%	1%
0	X2	X2				
1			X2	X2	X2	X2
7			X2	X2	X2	X2

Σε όλες τις δειγματοληψίες χρησιμοποιήθηκαν διπλά δείγματα. Σε κάθε δειγματοληψία έγιναν οι ακόλουθες αναλύσεις:

1. Μικροβιολογικές αναλύσεις (PCA για απαρίθμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, MRS για απαρίθμηση των γαλακτικών βακτηρίων, Palcam Agar Base για απαρίθμηση της *Listeria monocytogenes*)
2. Μέτρηση pH έπειτα από κάθε δειγματοληψία.

### 2.1.5. E: Προσθήκη αιθερίου ελαίου ρίγανης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και εφαρμογή σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένων με *Listeria monocytogenes*.

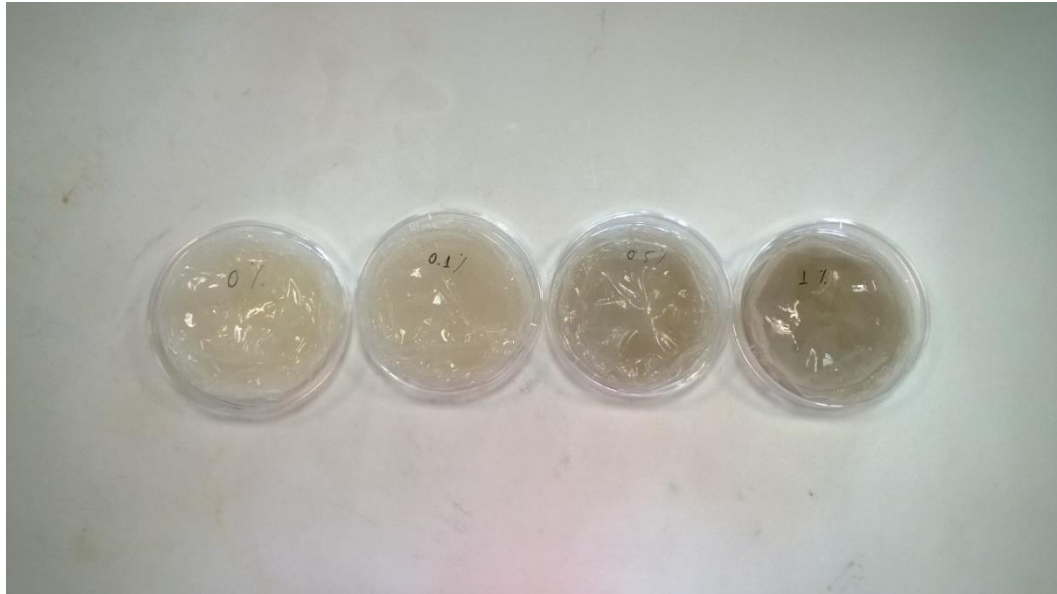
Μετά την εφαρμογή του υδρολύματος ρίγανης, το οποίο δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα έναντι του *L. monocytogenes*, εξετάστηκε το αιθέριο έλαιο ρίγανης ως αντιμικροβιακός παράγοντας, το οποίο είναι πιο ισχυρό.

Στόχος του πειράματος ήταν ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης του αιθερίου ελαίου ρίγανης, ενσωματωμένου σε εδώδιμες μεμβράνες, έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*. Για το σκοπό αυτό οι φέτες ζαμπόν εμβολιάστηκαν με δυο στελέχη *Listeria monocytogenes* (128, 131), σε επίπεδο 10<sup>5</sup> cfu/g, και έγινε δοκιμή τριών συγκεντρώσεων αιθερίου ελαίου (0.1%, 0.5%, 1% v/v).

#### Παρασκευή μεμβρανών

Παρασκευάστηκαν διαλύματα αλγινικού νατρίου 2% w/v και προστέθηκε σε όλα γλυκερόλη 1% v/v.

- Διάλυμα αλγινικού χωρίς προσθήκη αιθερίου ελαίου
- Διάλυμα αλγινικού με προσθήκη 0,1% αιθερίου ελαίου
- Διάλυμα αλγινικού με προσθήκη 0,5% αιθερίου ελαίου
- Διάλυμα αλγινικού με προσθήκη 1% αιθερίου ελαίου



Εικόνα 4: Μεμβράνες με διαφορετική συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης (0, 0,1, 0,5 και 1% αντίστοιχα)

#### Εμβολιασμός με *Listeria*

Έγινε παραλαβή καλλιεργειών από δυο στελέχη *L. monocytogenes*, μετά από επώαση 18 ωρών. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 6000 στροφές, στη θερμοκρασία των 4°C. Στη συνέχεια έγινε επαναιώρηση του pellet σε ίσο όγκο διαλύματος Ringer. Η φυγοκέντριση επαναλήφθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες, έγινε παραλαβή του pellet και επαναιώρηση σε ίσο όγκο διαλύματος Ringer. Έγινε μια τελική φυγοκέντριση υπο τις ίδιες συνθήκες και επαναιώρηση των pellet σε όγκο, που είχαμε υπολογίσει.

Ακολούθως, έγινε εμβολιασμός με  $10^5$  CFU/g στο ζαμπόν (οι φέτες αφέθηκαν να στεγνώσουν για 15min σε Laminar) και στη συνέχεια συσκευάστηκαν μαζί με μεμβράνες (ανάλογες ανά περίπτωση) κατά το σχέδιο (μεμβράνη-φέτα ζαμπόν-μεμβράνη-φέτα ζαμπόν-μεμβράνη) σε πλαστική συσκευασία και υπό κενό. Η συντήρηση έγινε στους 20°C, θερμοκρασία υψηλή, που όμως δίνει γρήγορα αποτελέσματα.

Περιπτώσεις δειγματοληψιών:

Ημέρες Δειγματοληψίας	Χωρίς <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	Με <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> ( $10^5$ CFU/g)	Με <i>L. monocytogenes</i> + Μεμβράνες με Αιθέριο έλαιο ρίγανης			
			0%	0,1%	0,5%	1%
0	X2	X2				
1			X2	X2	X2	X2
7			X2	X2	X2	X2

Σε όλες τις δειγματοληψίες χρησιμοποιήθηκαν διπλά δείγματα. Σε κάθε δειγματοληψία έγιναν οι ακόλουθες αναλύσεις:

1. Μικροβιολογικές αναλύσεις (PCA για απαρίθμηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας, MRS για απαρίθμηση των γαλακτικών βακτηρίων, Palcam Agar Base για απαρίθμηση της *Listeria monocytogenes*)
2. Μέτρηση pH έπειτα από κάθε δειγματοληψία.

## **2.2. Εφαρμογή ΥΥΠ σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένες με *Listeria monocytogenes* και συσκευασία σε κενό σε διαφορετικές θερμοκρασίες με την προσθήκη εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου εμπλουτισμένες με αιθέριο έλαιο ρίγανης.**

Στόχος του πειράματος είναι η παρασκευή ενός προϊόντος θερμικής επεξεργασίας (ζαμπόν), το οποίο, επιμολύνεται με *Listeria monocytogenes* (μείγμα τριών στελεχών) και στο οποίο εφαρμόζεται ΥΥΠ για επιμήκυνση της συντήρησής του, ενώ σαν αντιμικροβιακός παράγοντας εφαρμόζονται εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου που περιέχουν αιθέριο έλαιο ρίγανης.

- Παρασκευή μεμβρανών με γνωστή συγκέντρωση αιθερίου ελαίου ρίγανης (1% v/v)
- Εμβολιασμός με *Listeria monocytogenes* (B129, B131, B133)
- Ζαμπόν δύο εταιρειών (Α και Β, δηλαδή οι επαναλήψεις μας προέρχονταν από διαφορετική εταιρεία)
- Πίεση 500Μρα για 2min
- Θερμοκρασίες συντήρησης: 4°C , 8°C , 12°C

### **2.2.1.Παρασκευή μεμβρανών με αιθέριο έλαιο 1%**

Σε ποτήρι ζέσεως ζεσταίνουμε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, έως ότου φτάσει στη θερμοκρασία των 60°C. Στη συνέχεια προσθέτουμε σε δόσεις τα αλγινικά (συγκέντρωση 2% w/v) και ανακατεύουμε συνεχώς. Αφήνουμε το παχύρευστο διάλυμα που δημιουργήθηκε για 30 min στο ψυγείο, ώστε να διαλυθούν τυχόν φυσαλίδες. Ζεσταίνουμε γλυκερόλη (συγκέντρωση 1% v/v) και την προσθέτουμε στο μίγμα υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια προσθέτουμε το αιθέριο έλαιο ρίγανης 1% v/v. Μοιράζουμε το μίγμα σε τετράγωνα τρυβλία και αφήνουμε να στεγνώσουν σε Laminar για όλη τη νύχτα (12-13h). Το επόμενο πρωί παρασκευάζουμε διάλυμα CaCl 2% και το μοιράζουμε στα τρυβλία ώστε να ξεκολλήσουν οι μεμβράνες. Αφού τις στεγνώσουμε προσεκτικά με λίγο χαρτί τις συσκευάζουμε αεροστεγώς και τις τοποθετούμε στους 4°C μέχρι να τις χρησιμοποιήσουμε.



Εικόνα 5: Παρασκευή εδώδιμων μεμβρανών με αλγινικά



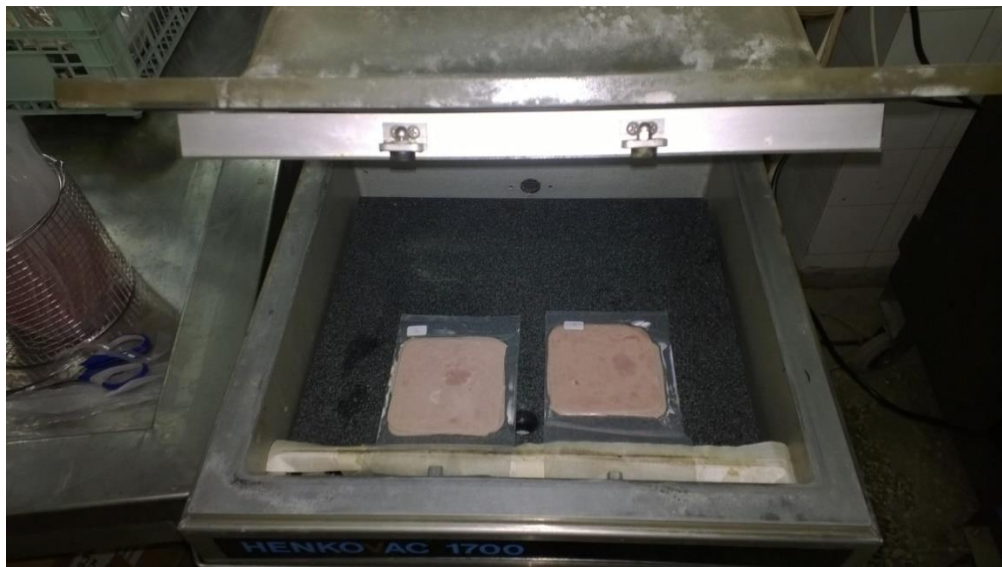
Εικόνα 6: Παραμονή των μεμβρανών στο Laminar μέχρι να στεγνώσουν

### 2.2.2. Εμβολιασμός με *Listeria monocytogenes*

Παραλάβαμε καλλιέργειες τριών στελεχών *L. monocytogenes* (B129, B131, B133) μετά από επώαση 18 ωρών και κάναμε φυγοκέντριση για 5 λεπτά στις 6000 στροφές, στους 4°C. Έγινε παραλαβή pellet και επαναιώρηση σε ίσο όγκο διαλύματος Ringer. Η φυγοκέντριση επαναλήφθηκε υπό τις ίδιες συνθήκες, έγινε παραλαβή pellet και επαναιώρηση σε ίσο όγκο διαλύματος Ringer. Τελική φυγοκέντριση ακολούθησε υπό τις ίδιες συνθήκες και επαναιώρηση των pellet σε προκαθορισμένο όγκο.

Έγινε εμβολιασμός με  $10^4$  CFU/g στο ζαμπόν (οι φέτες αφήθηκαν να στεγνώσουν για 20-30 min σε Laminar). Μετά τον εμβολιασμό, οι φέτες συσκευάστηκαν ανά 60 σε πλαστική συσκευασία και εφαρμόστηκε πίεση 500 MPa για 2 min. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν μεμβράνες και συσκευάστηκαν σε πλαστική συσκευασία υπό κενό, κατά το σχέδιο: μεμβράνη-φέτα ζαμπόν-μεμβράνη-φέτα ζαμπόν-μεμβράνη, ως εξής:

- Ζαμπόν χωρίς μεμβράνες, χωρίς πίεση (4°C, 8°C, 12°C), (Z)
- Ζαμπόν χωρίς μεμβράνες, με πίεση (4°C, 8°C, 12°C), (ZP)
- Ζαμπόν με μεμβράνες 0% αιθ. Έλαιο, χωρίς πίεση (4°C, 8°C, 12°C), (Z0%)
- Ζαμπόν με μεμβράνες 0% αιθ. Έλαιο, με πίεση (4°C, 8°C, 12°C), (ZP0%)
- Ζαμπόν με μεμβράνες και 1% αιθ. έλαιο χωρίς πίεση (4°C, 8°C, 12°C), (Z1%)
- Ζαμπόν με μεμβράνες και 1% αιθ. έλαιο με πίεση (4°C, 8°C, 12°C), (ZP1%)



Εικόνα 7: Μηχάνημα δημιουργίας κενού

Πραγματοποιήθηκαν 10 δειγματοληψίες ανά περίπτωση X 2 επαναλήψεις = 20 δείγματα X 3 θερμοκρασίες συντήρησης = 60 δείγματα ανα περίπτωση X 6 περιπτώσεις = 360 δείγματα εξετάστηκαν συνολικά.





Εικόνα 8: Απομάκρυνση εδώδιμης μεμβράνης κατά τη δειγματοληψία σε φέτα ζαμπόν

Σε κάθε δειγματοληψία πραγματοποιούνταν οι εξής αναλύσεις:

1. Μικροβιολογικές (PCA για Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, MRS για γαλακτικά βακτήρια, M17 για στρεπτόκοκκους, RBC για ζύμες-μύκητες, STAA για *Brochothrix thermosphacta*, CFC για ψευδομονάδες, BP για *Staphylococcus aureus*, VRBGA για εντεροβακτήρια, Palcam για *Listeria monocytogenes*).
2. Μέτρηση pH
3. Οργανοληπτικός έλεγχος
4. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR)
5. Χρωματομετρία

Πραγματοποιήθηκαν ακόμα μοριακές αναλύσεις με Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης Εναλλασσόμενου Πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE).

### 2.2.3. Καταμέτρηση

Μετά την προετοιμασία των κατάλληλων διαδοχικών αραιώσεων με διάλυμα Ringer, 1 ή 0,1 ml από τις επιθυμητές αραιώσεις, επιστρώθηκαν ή ενσωματώθηκαν σε τρυβλία με άγαρ (επιλεκτικά ή μη επιλεκτικά υποστρώματα).

- Για την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα χρησιμοποιήθηκε Plate Count Agar, επώαση στους 30°C για 3 ημέρες (επίστρωση)
- Για τα γαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιήθηκε MRS agar, επώαση στους 30°C για 3 ημέρες (ενσωμάτωση)



- Για τους στρεπτόκοκκους, M17 agar, επώαση στους 30°C για 3 ημέρες (ενσωμάτωση)
- Για ζύμες-μύκητες, Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base, επώαση στους 25 °C για 5 ημέρες (επίστρωση)
- Για τον *Staphylococcus aureus*, Baird-Parker Agar Base, επώαση στους 37°C για 2 ημέρες (εμπλουτισμένο με θρεπτικό συμπλήρωμα, επίστρωση)
- Για τον *Brochothrix thermosphacta*, STA Agar Base, επώαση στους 25°C για 2 ημέρες (εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό για επιλεκτική ανάπτυξη, επίστρωση)
- Για τα εντεροβακτήρια, Violet Red Bile Glucose Agar, επώαση στους 37°C για 24h (ενσωμάτωση)
- Για τις ψευδομονάδες, Pseudomonas Agar Base (CFC), επώαση στους 25°C για 2 ημέρες (εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό, επίστρωση)
- Για τη *Listeria monocytogenes*, Palcam Agar Base, επώαση στους 30°C για 2 ημέρες (εμπλουτισμένο με αντιβιοτικό, επίστρωση)

#### **2.2.4. Μέτρηση pH**

Οι τιμές pH καταγράφονταν με ένα pH-μετρο Hanna Instruments 2211 , με το ηλεκτρόδιο βυθισμένο στο αραιωμένο δείγμα, το οποίο είχε ομογενοποιηθεί σε Stomacher, στο τέλος της μικροβιολογικής ανάλυσης.

#### **2.2.5. Οργανοληπτικός έλεγχος**

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων ζαμπόν διεξαγόταν από μια ομάδα 5 μελών του εργαστηρίου, ειδικά εκπαιδευμένων στον έλεγχο αυτό, σύμφωνα με τους Gill and Jeremiah (1991). Ο έλεγχος λάμβανε χώρα σε ειδικά διαμορφωμένο περιβάλλον, με τεχνητό φωτισμό και τη θερμοκρασία του δείγματος πολύ κοντά σε αυτή του περιβάλλοντος. Τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που αξιολογούνταν ήταν η εμφάνιση, η οσμή και η γεύση, σε μία κλίμακα από το 1 έως το 3 (με διαβαθμίσεις της τάξεως του 0,5) : 1=φρέσκο (fresh), 2=οριακό (semi-fresh), 3=αλλοιωμένο (spoiled). Δείγματα που πήραν τιμές από 2 και πάνω, απορρίπτονταν.

#### **2.2.6. Ανάλυση FTIR**

##### **2.2.6.1. Προετοιμασία των δειγμάτων**

Η ανάλυση των δειγμάτων με FTIR πραγματοποιούνταν αμέσως μετά τη μικροβιολογική ανάλυση, ενώ τα δείγματα αποθηκεύονταν στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσαν 4 φάσματα, τα οποία πήραμε και από τις δύο πλευρές της φέτας ζαμπόν. Οι διαστάσεις των δειγμάτων ήταν τέτοιες ώστε να καλύπτουν πλήρως την επιφάνεια του κρυστάλλου που χρησιμοποιήθηκε.

### 2.2.6.2. Φασματοσκοπία FTIR

Η ανάλυση FTIR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός κρυστάλλου ZnSe 45° ATR (περιορισμένης ολικής ανάκλασης) με ανιχνευτή DLaTGS Detector με παράθυρο KBr σε ένα φασματόμετρο Perkin Elmer . Τα δείγματα τοποθετούνταν στον κρύσταλλο κατά τρόπο ώστε να καλύπτουν πλήρως την επιφάνειά του και να έρχονται σε καλή επαφή με αυτόν. Μετά την τοποθέτηση ειδικού καλύματος πάνω από το δείγμα, ασκούνταν πίεση (έως 30) ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη επαφή δείγματος – κρυστάλλου. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φασμάτων είναι το Omnic Software 7.3, το οποίο συνέλεγε φάσματα από 4000 έως 650 μήκη κύματος, κάνοντας 10 σαρώσεις ανά δείγμα. Κάθε δείγμα αναλύθηκε 4 φορές, ενώ λαμβάνονταν ακόμα φάσματα αναφοράς (background spectra) από τον καθαρισμένο, κενό κρύσταλλο κάθε φορά πριν τη λήψη φάσματος δείγματος. Ανάμεσα στα δείγματα, ο κρύσταλλος καθαριζόταν σχολαστικά με απιονισμένο νερό, σαπούνι και ειδικό πανί που δεν αφήνει χνούδι, ενώ στο τέλος χρήσης του μηχανήματος, ο καθαρισμός γινόταν και με αιθανόλη.



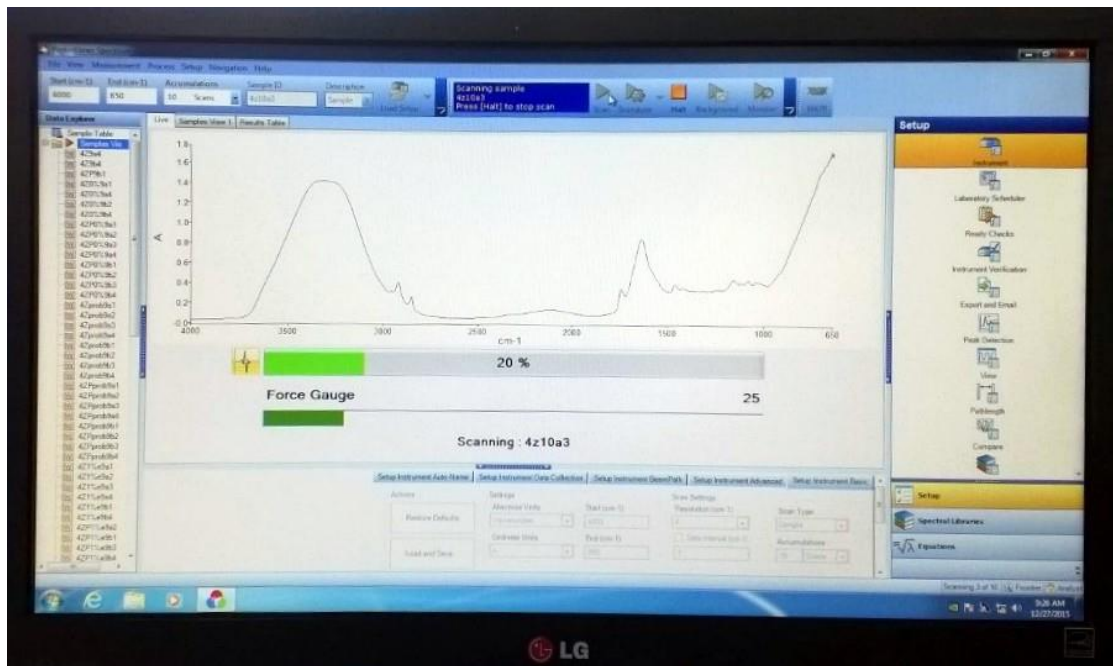
Εικόνα 9: Φασματόμετρο FTIR



Εικόνα 7: Τοποθέτηση δείγματος πάνω στον κρύσταλλο του FTIR



Εικόνα 11: Άσκηση πίεσης με το ειδικό έμβολο για βέλτιστη επαφή δείγματος-κρυστάλλου



Εικόνα 12: Το φάσμα ενός δείγματος ζαμπόν, όπως εμφανίζεται στην οθόνη του υπολογιστή κατά τη μέτρηση

### 2.2.6.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Για την ποσοτική ανάλυση των αποτελεσμάτων από το φασματομέτρο, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Unscrambler 9.6 (version 9.7, CAMO, Norway). Από τα φασματογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν με το FTIR χρησιμοποιήθηκαν οι κυματιριθμοί μεταξύ  $1800$  και  $900\text{cm}^{-1}$ . Στα δεδομένα έγινε μετασχηματισμός χρησιμοποιώντας τη μέθοδο standard normal variate (SNV), η οποία εφαρμόζεται για να μειώσει την επίδραση του θορύβου ή της μετατόπισης της γραμμής βάσης του μηχανήματος ή άλλες παρεμβολές οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την πολυμεταβλητή ανάλυση (Sinelli et al., 2005). Στη συνέχεια, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου των διαφορετικών μικροβιακών ομάδων που απαριθμήθηκαν, δημιουργήθηκαν μοντέλα χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Γραμμικής Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R), χρησιμοποιώντας τις τιμές των λανθάνουσων μεταβλητών ως μεταβλητές εισόδου και το μικροβιακό φορτίο της κάθε ομάδας μικροοργανισμών, το pH και τις τιμές της οργανοληπτικής αξιολόγησης ως μεταβλητή εξόδου. Η PLS-R είναι μια σταθερή γραμμική παλινδρόμηση του τύπου  $Y = AX + B$ , που εξάγει έναν μικρότερο αριθμό στοιχείων A, τα οποία είναι γραμμικοί συνδυασμοί του αρχικού X. Με άλλα λόγια, η PLS-R συμπυκνώνει την πληροφορία σε καινούργιες, λιγότερες μεταβλητές. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διασταυρούμενης επικύρωσης των αποτελεσμάτων (leave-one-out cross validation), η οποία αφήνει πάντα ένα δείγμα εκτός και το χρησιμοποιεί για επιβεβαίωση. Για παράδειγμα, αν έχουμε 300 δείγματα, θα χρησιμοποιήσει τα 299 για να χτίσει το μοντέλο και θα αφήσει το 1 για να κάνει την επιβεβαίωση. Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων που δημιουργήθηκαν με

PLS-R ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες επίδοσης Bf (δείκτης προκατάληψης bias factor), Af (συντελεστής ακρίβειας accuracy factor),  $R^2$  (τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης) και RMSE (ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος).

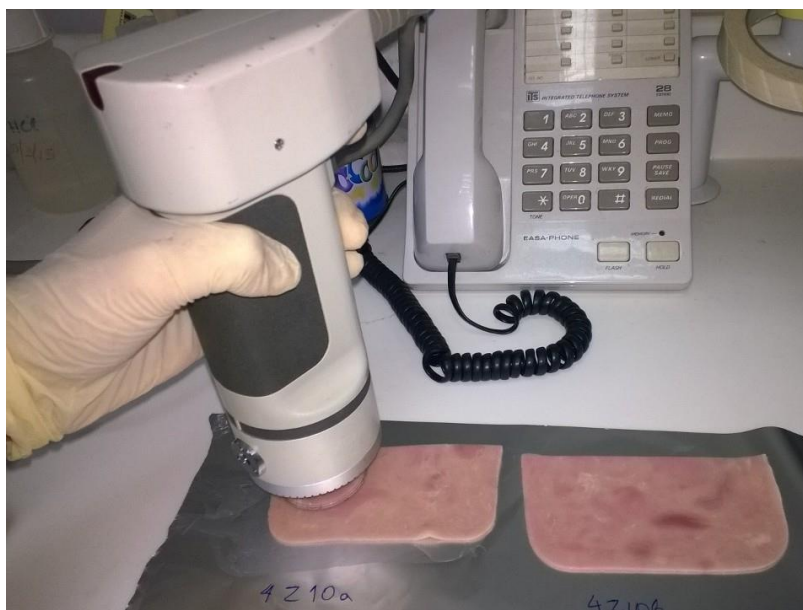
### 2.2.7. Χρωματομετρία

Παράλληλα με την φασματομετρία, μετά από κάθε δειγματοληψία τα δείγματα ζαμπόν αναλύονταν και με χρωματόμετρο Minolta, ώστε να ελεγχθεί κατά πόσο επηρεάζει ο χρόνος συντήρησης και οι διαφορετικές θερμοκρασίες, το χρώμα του προϊόντος. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσαν πέντε μετρήσεις του χρωματομέτρου, τις οποίες πήραμε από πέντε διαφορετικά σημεία πάνω στη φέτα ζαμπόν, αποφεύγοντας αυτά με το πολύ λίπος και τις ασυνέχειες. Καθορίστηκαν τρεις παράμετροι,  $L^*$  (lightness),  $a^*$  (redness) και  $b^*$  (yellowness).



Εικόνα 13: Χρωματόμετρο Minolta





Εικόνα 14: Μέτρηση χρώματος σε δείγματα ζαμπόν

### 2.2.8. Ηλεκτροφόρηση Αγαρόζης Εναλλασσόμενου Πεδίου (PFGE)

Πραγματοποιήθηκαν μοριακές αναλύσεις με PFGE από αποικίες *Listeria monocytogenes* που απομονώθηκαν από την αρχή, τη μέση και το τέλος του πειράματος για κάθε περίπτωση. Στόχος ήταν η διερεύνηση της αναλογίας των στελεχών *L. monocytogenes* στις τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές του πειράματος και κατ'επέκταση η μελέτη της ανθεκτικότητας του κάθε στελέχους στην εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης (Παράρτημα 4- Πρωτόκολλο PFGE).

### 2.3. Ποσοτική Ανάλυση Δεδομένων

Το κυρίως πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές (δύο διαφορετικές εταιρείες αλλαντικών) και κάθε δείγμα είχε δύο επαναλήψεις. Οι τιμές των μικροβιολογικών μετατράπηκαν σε λογάριθμους ( $\log$  CFU/g) και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος των επαναλήψεων και η τυπική απόκλιση. Τα μικροβιολογικά αποτελέσματα όλων των περιπτώσεων αναλύθηκαν με το στατιστικό μοντέλο του Baranyi (DMFIT).

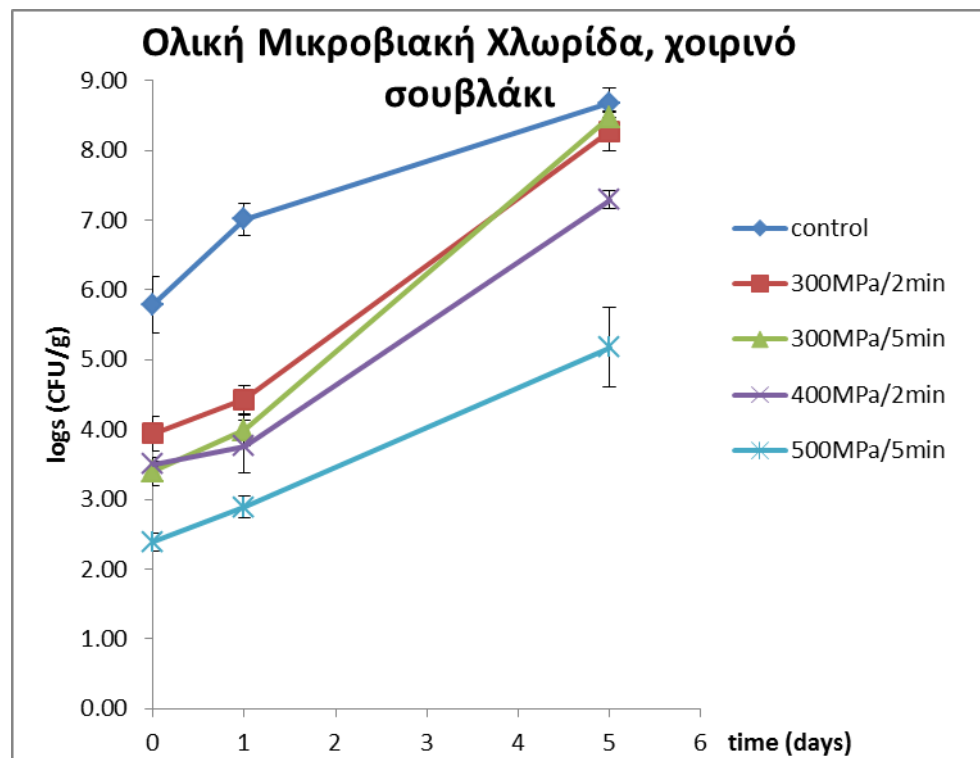
### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Αποτελέσματα Προκαταρκτικών Πειραμάτων για την επιλογή κατάλληλου προϊόντος κρέατος και συνθηκών μεταχείρισης

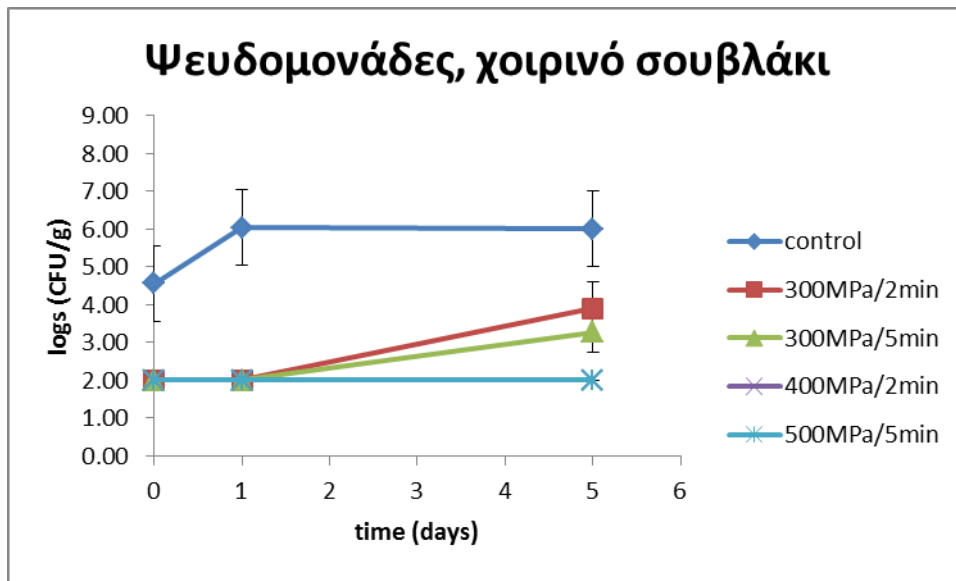
##### 3.1.1. Α: Εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης-χρόνου σε μοσχαρίσιο κιμά και χοιρινά σουβλάκια.

###### Χοιρινό σουβλάκι

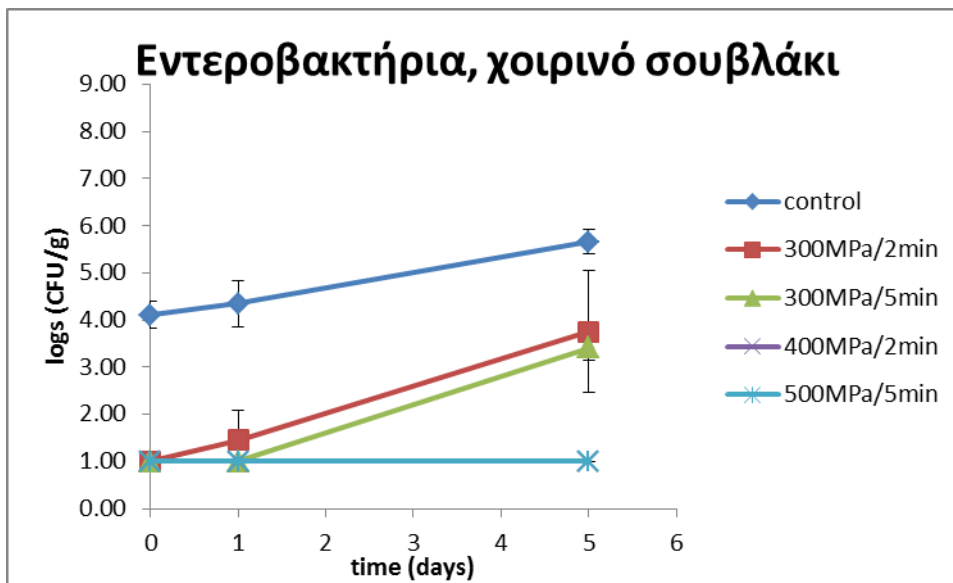
Όσον αφορά στο χοιρινό σουβλάκι, η καλύτερη συνθήκη πίεσης-χρόνου από αυτές που εφαρμόστηκαν φάνηκε να είναι η πίεση 300MPa για 2min. Ο χειρισμός του χοιρινού με τη συνθήκη αυτή είχε ως αποτέλεσμα μία αρχική μείωση του ολικού μικροβιακού πληθυσμού κατά 2 λογάριθμους, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 1, αλλά και διατήρηση του χρώματος σε αποδεκτά από τον καταναλωτή επίπεδα, σχετικά κοντά στο χρώμα του μάρτυρα (εικόνα 15).



Διάγραμμα 8: Ολική Μικροβιακή χλωρίδα στο χοιρινό σουβλάκι

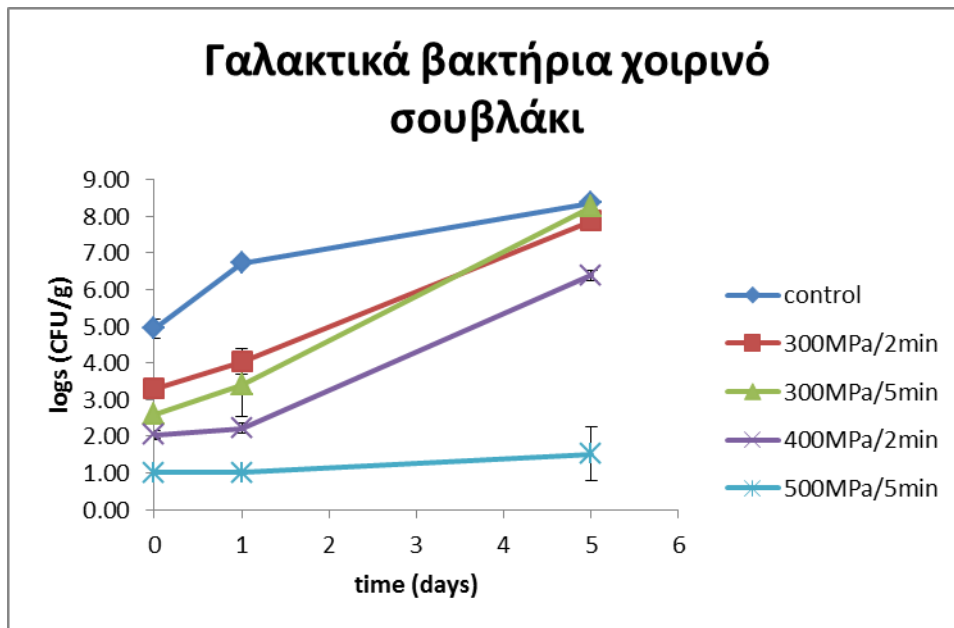


Διάγραμμα 9: Πληθυσμός ψευδομονάδων σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.

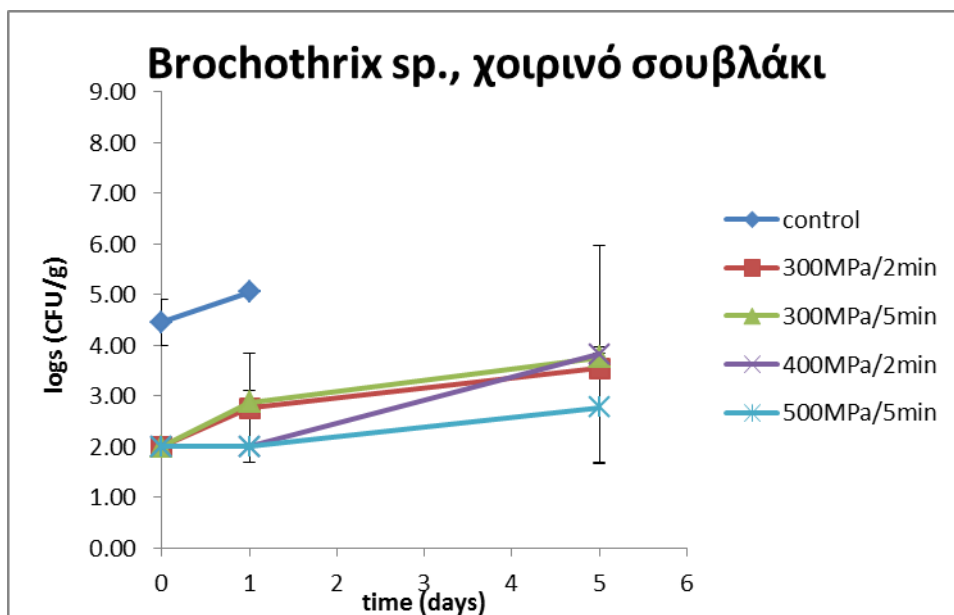


Διάγραμμα 10: Πληθυσμός εντεροβακτηρίων σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.

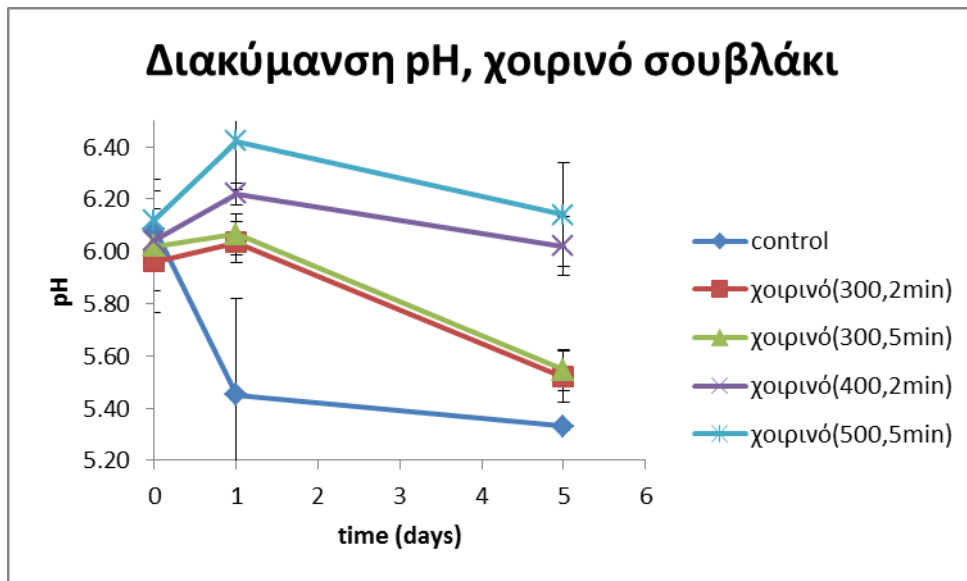




Διάγραμμα 11: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



Διάγραμμα 12: Πληθυσμός *Brochothrix thermosphacta* σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



Διάγραμμα 13: Διακύμανση του pH σε χοιρινό σουβλάκι, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



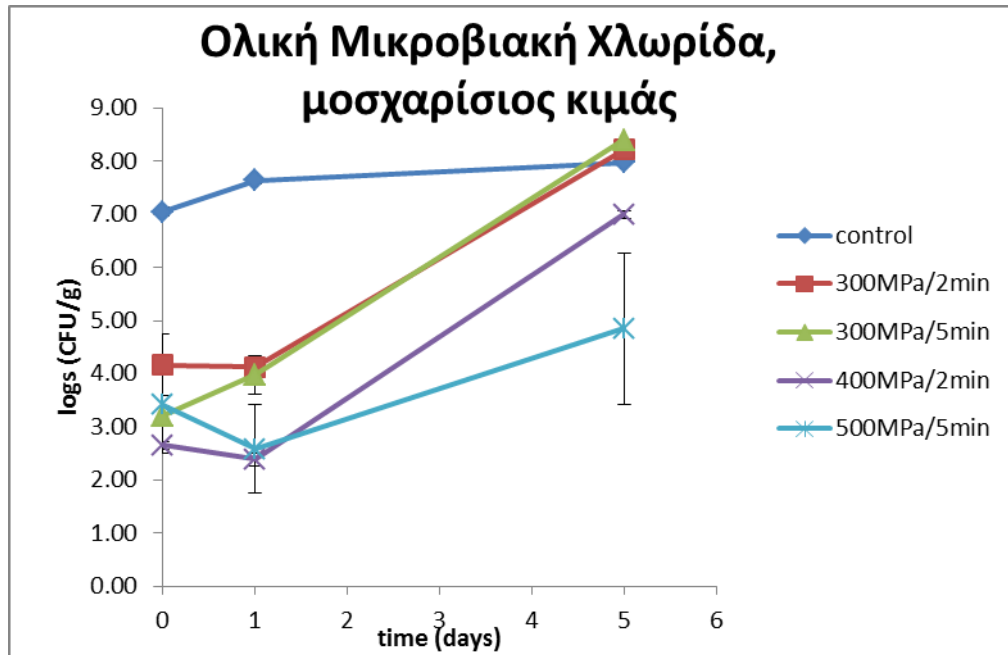
Εικόνα 85: μεταβολή χρώματος στο χοιρινό σουβλάκι με την πίεση. 1) control, 2) 300MPa/2min, 3) 300MPa/5min, 4) 400MPa/2min, 5) 500MPa/5min

Ζύμες-μύκητες (RBC) δεν έδειξε να αναπτύσσονται ακόμα και στην χαμηλότερη πίεση.

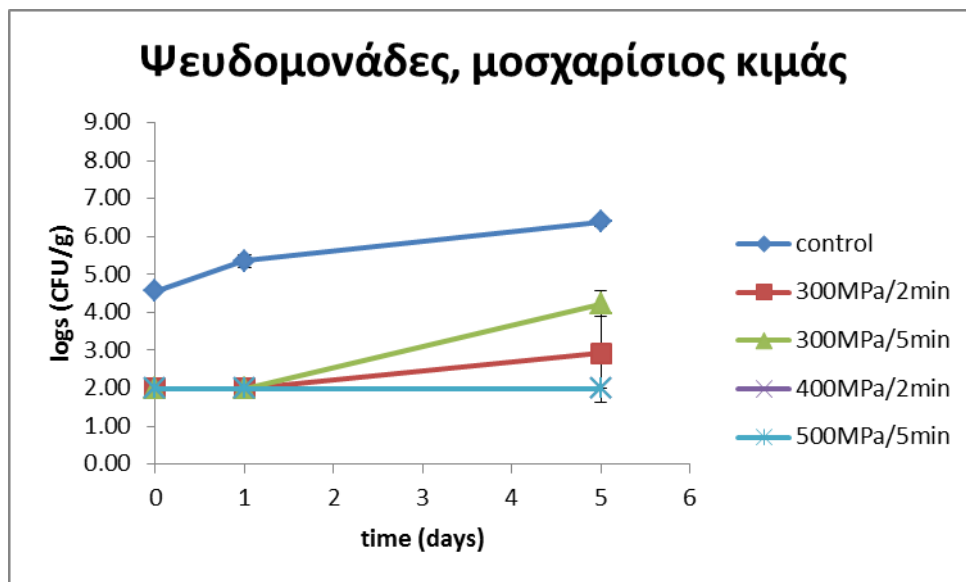
### Μοσχαρίσιος κιμάς

Όσον αφορά στον μοσχαρίσιο κιμά, παρατηρήθηκε μία αρχική μείωση στην ολική μικροβιακή χλωρίδα κατά 3 λογάριθμους περίπου, με την εφαρμογή πίεσης 300MPa για 2 λεπτά, η οποία ταυτόχρονα διασφάλιζε ένα σχετικά αποδεκτό χρώμα

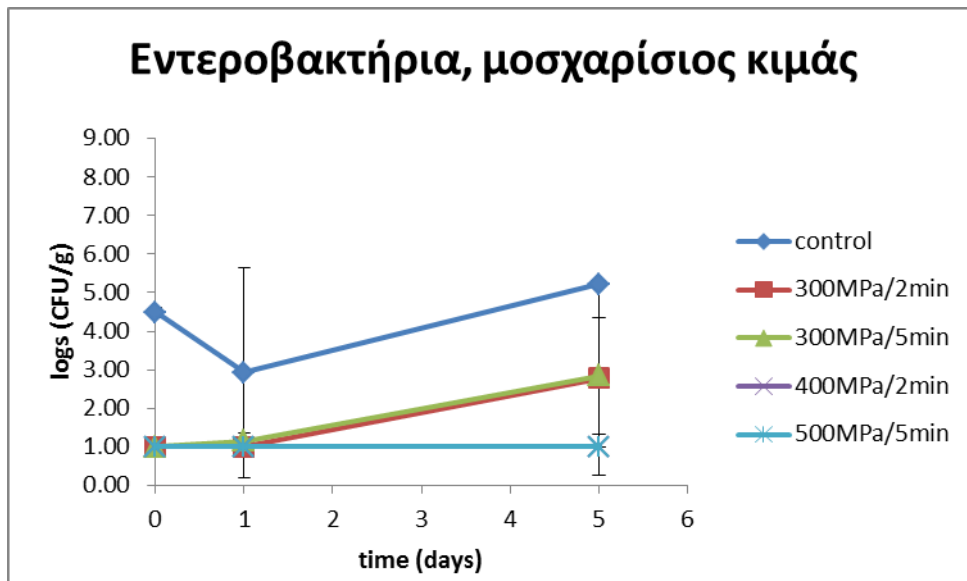
του προϊόντος για την αγορά (διάγραμμα 7, εικόνα 16). Και σε αυτή την περίπτωση, η συνθήκη 300MPa/2 min φάνηκε η καταλληλότερη.



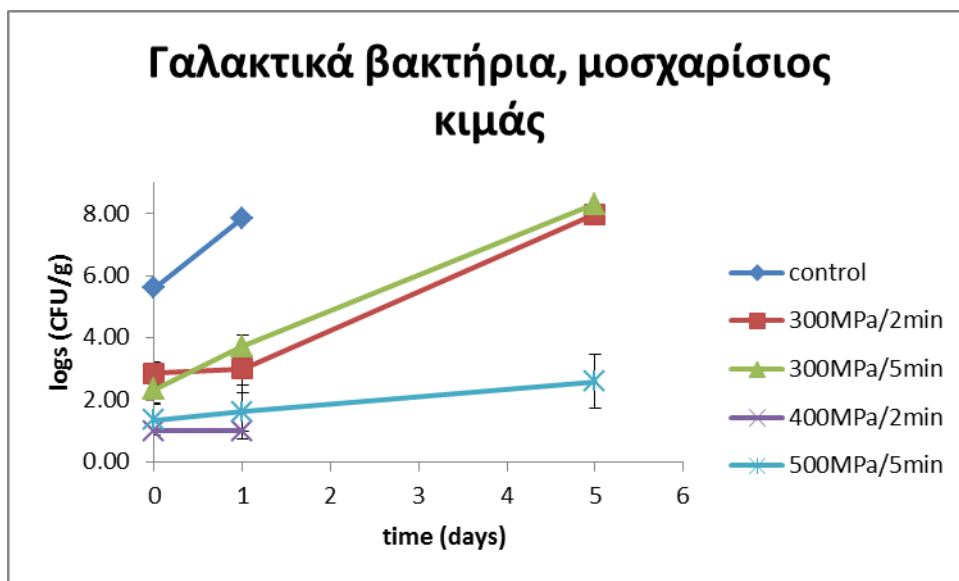
Διάγραμμα 14: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα στον μοσχαρίσιο κιμά



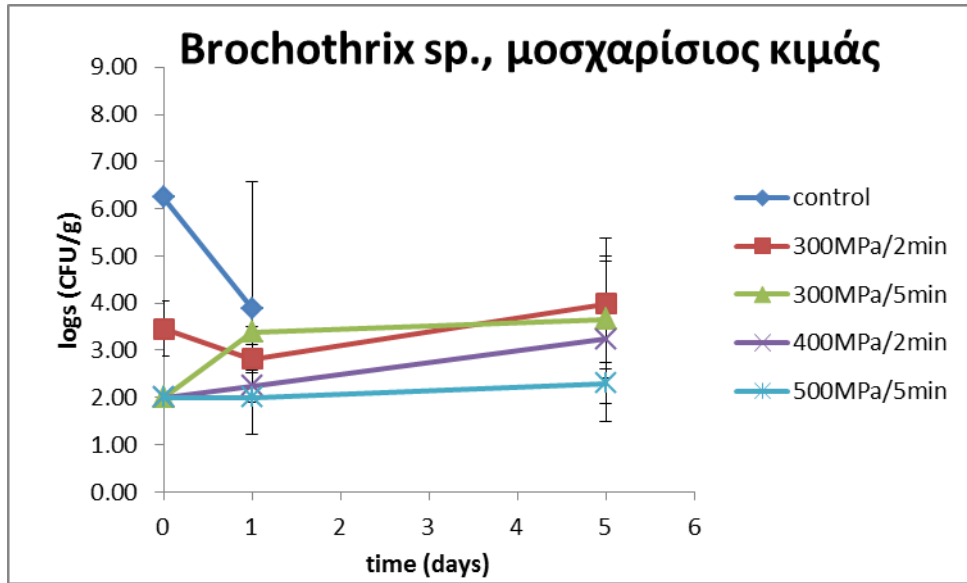
Διάγραμμα 15: Πληθυσμός ψευδομονάδων σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



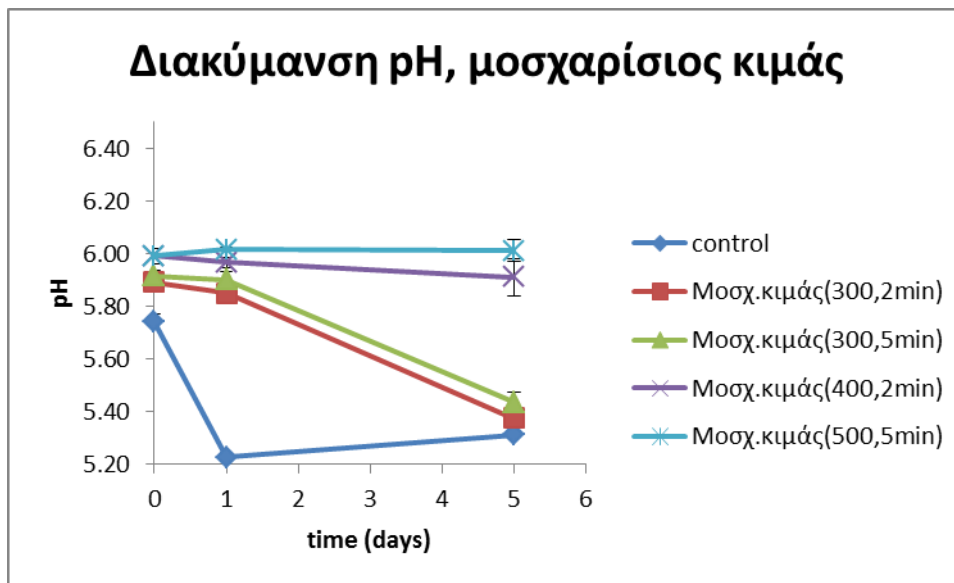
Διάγραμμα 16: Πληθυσμός εντεροβακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



Διάγραμμα 17: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



Διάγραμμα 18: Πληθυσμός *Brochothrix thermosphacta* σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



Διάγραμμα 19: Διακύμανση pH σε μοσχαρίσιο κιμά, μετά την εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών πίεσης/χρόνου.



Εικόνα 16: μεταβολή χρώματος στον μοσχαρίσιο κιμά με την πίεση.1) control, 2) 300MPa/2min, 3) 300MPa/5min, 4) 400MPa/2min, 5) 500MPa/5min

Και σε αυτή την περίπτωση, η εφαρμογή πίεσης παρεμπόδισε την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων (RBC).

Όπως φάνηκε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, η υπερυψηλή πίεση είναι ένα αποτελεσματικό μέσο για τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού, τόσο στο χοιρινό κρέας όσο και στον μοσχαρίσιο κιμά. Μπορεί έτσι να επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος και να διευκολύνει τη διακίνηση προϊόντων σε μακρινές αποστάσεις και τις εξαγωγές. Σημειώθηκε ακόμα, ότι η πίεση, ανεξαρτήτως μεγέθους και χρόνου, έδειξε να αυξάνει το pH των δειγμάτων, σε σύγκριση με αυτό του μάρτυρα. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μεταβάλλει το χρώμα των συγκεκριμένων προϊόντων, κάνοντάς το μη αποδεκτό όταν εφαρμόζεται πίεση πάνω από τα 300MPa για 2 λεπτά.

### **3.1.2. B: Κιμαδοποίηση μοσχαρίσιου κρέατος και εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 2 λεπτά.**

Παρακάτω παρουσιάζονται τα κύρια αποτελέσματα του 2<sup>ου</sup> προκαταρκτικού πειράματος:

- Δεν φάνηκαν μεγάλες διαφορές στο μικροβιακό φορτίο μεταξύ μοσχαρίσιου κρέατος και κιμά, είτε του μάρτυρα (control), είτε πιεσμένου.
- Η κιμαδοποίηση του μοσχαρίσιου κρέατος μετά από την εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 2 λεπτά αποδείχτηκε δύσκολη στην πράξη, και ο κιμάς θύμιζε περισσότερο κρεατόπαστα. Το χρώμα του κιμά είχε επίσης επηρεαστεί και κρίθηκε ακατάλληλο (εικόνα 17).
- Από τα κοντρόλ του κιμά, μετά από τη συντήρηση στους 4 και 12°C, φάνηκε ότι στους 12°C η ολική μικροβιακή χλωρίδα, ο πληθυσμός των

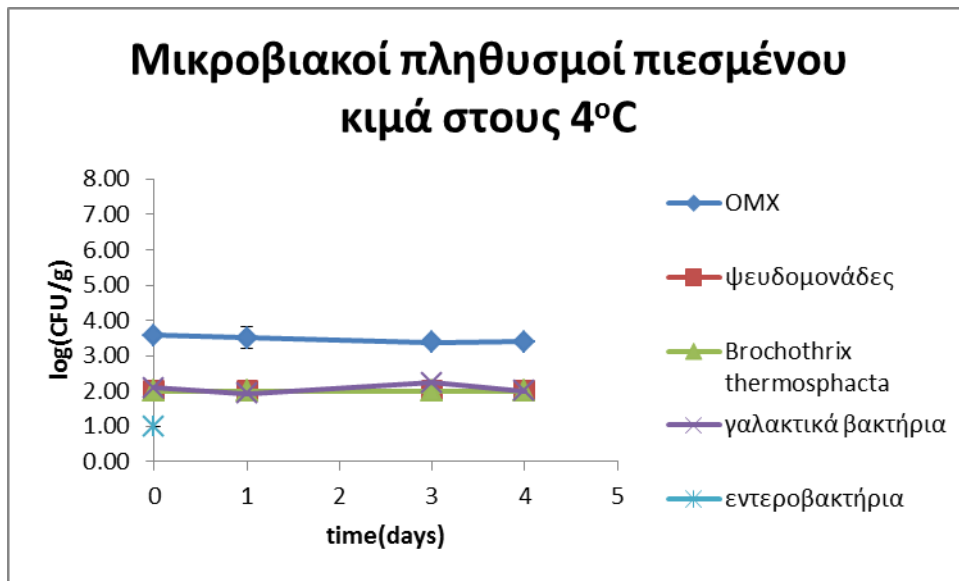
ψευδομονάδων και του *Brochothrix thermosphacta* ήταν υψηλότερα κατά 2 λογάριθμους, ενώ ο πληθυσμός γαλακτικών βακτηριων είχε μια μεγάλη αύξηση μετά από 24 ώρες στους 12°C .

➤ Μετά την πίεση (δειγματοληψία 0), το μοσχαρίσιο κρέας είχε χαμηλότερο πληθυσμό OMX(κατά 0,1 λογάριθμο), *Brochothrix thermosphacta* (κατά 0,85 λογάριθμους) και γαλακτικών βακτηρίων (κατά 2 λογάριθμους).

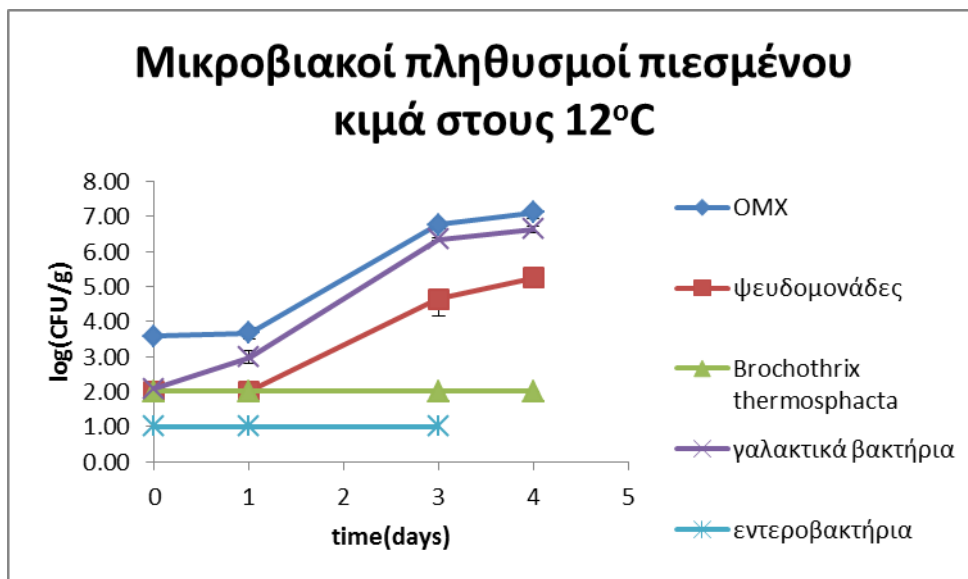
➤ Όσον αφορά στον πιεσμένο κιμά, κατά τη συντήρηση στους 4 και 12°C, οι μέγιστες διαφορές που παρατηρήθηκαν στους μικροβιακούς πληθυσμούς μεταξύ των δύο θερμοκρασιών μετά από τέσσερις μέρες ήταν: 4 λογάριθμοι για τα γαλακτικά βακτήρια, 2.5 λογάριθμοι για την OMX και 3 λογάριθμοι για τις ψευδομονάδες (διαγράμματα 13 και 14).



Εικόνα 17: Κιμαδοποίηση μοσχαρίσιου κρέατος, μετά από την εφαρμογή πίεσης 300 MPa για 2 λεπτά.



Διάγραμμα 20: Μικροβιακοί πληθυσμοί σε πιεσμένο μοσχαρίσιο κιμά, μετά από συντήρηση στους 4°C.



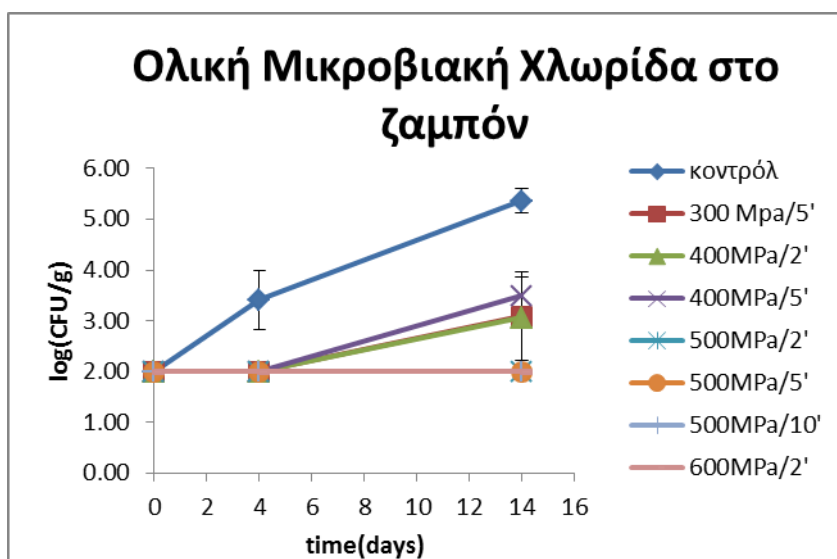
Διάγραμμα 21: Μικροβιακοί πληθυσμοί σε πιεσμένο μοσχαρίσιο κιμά, μετά από συντήρηση στους 12°C.



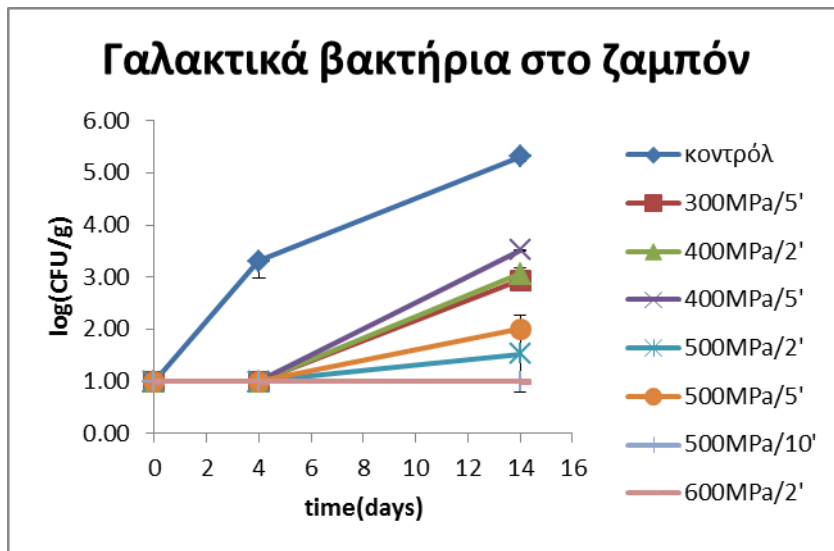
### 3.1.3. Γ: Επιλογή της κατάλληλης συνθήκης πίεσης-χρόνου για εφαρμογή σε ζαμπόν και γαλοπούλα

Ο σκοπός του συγκεκριμένου πειράματος ήταν η επιλογή μιας συνθήκης πίεσης-χρόνου που θα άφηνε αναλλοίωτο ποιοτικά το προϊόν. Πρέπει λοιπόν να τονιστεί ότι η επιλογή βασίστηκε στο κατά πόσο καλός ήταν ο διαχωρισμός μεταξύ των φετών ζαμπόν και γαλοπούλας και στο εάν διαλυόταν η φέτα κατά τη δειγματοληψία, σε συνδυασμό με τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού.

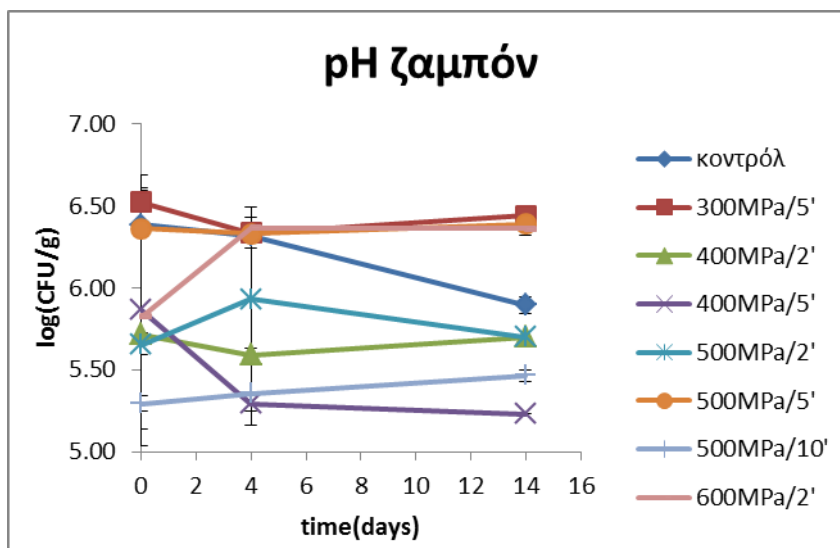
Η συνθήκη με τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα ήταν τα 500 MPa για 2 λεπτά, ενώ το προϊόν με την καλύτερη συμπεριφορά κατά τη δειγματοληψία (καλός διαχωρισμός, δεν διαλυόταν από την πίεση) ήταν το ζαμπόν. Από τα 400 MPa και πάνω, φάνηκε ο διαχωρισμός των φετών να επηρεάζεται σημαντικά και από το χρόνο παραμονής στην πίεση και όχι αποκλειστικά από το βαθμό πίεσης που ασκήθηκε. Ακόμα, παρατηρήθηκε αυξημένη υγρασία στις συσκευασίες των προϊόντων από τα 400 MPa και πάνω. Παρακάτω παρουσιάζονται τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και η διακύμανση του pH για τα δύο προϊόντα που εξετάστηκαν (διαγράμματα 15 έως 20).



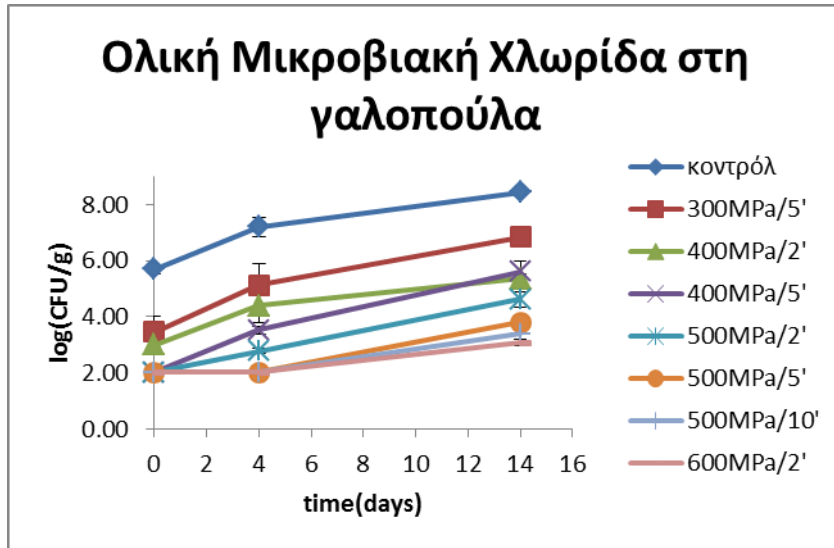
Διάγραμμα 22: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου



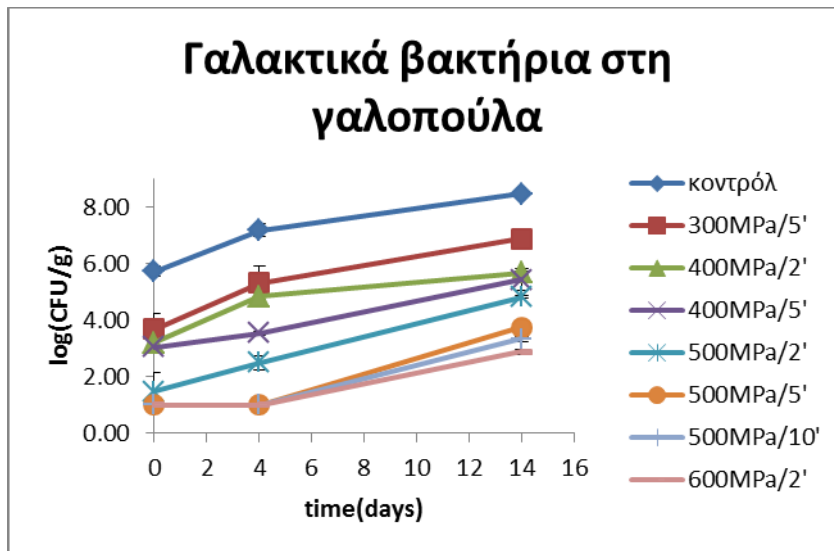
Διάγραμμα 23: Γαλακτικά βακτήρια σε φέτες ζαμπόν, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου



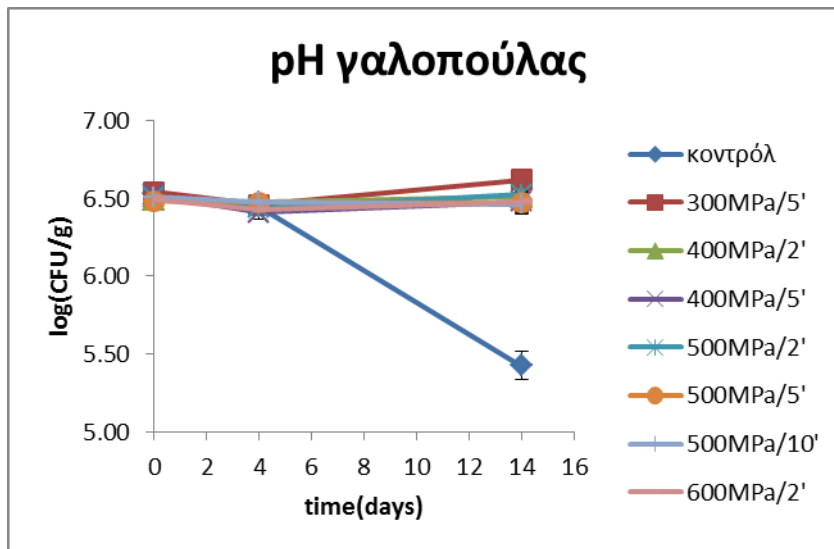
Διάγραμμα 24: Διακύμανση pH σε φέτες ζαμπόν, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου



Διάγραμμα 25: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες γαλοπούλας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου



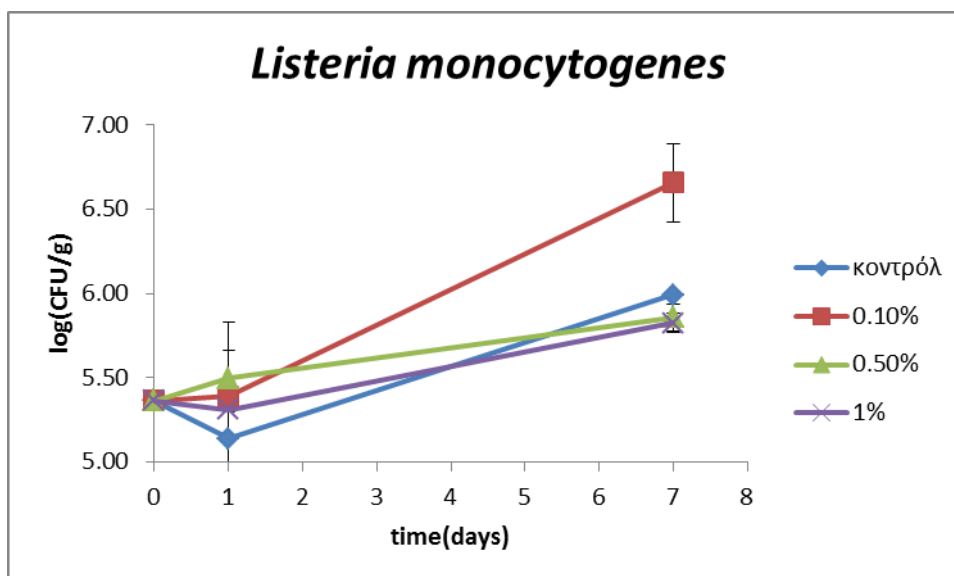
Διάγραμμα 26: Γαλακτικά βακτήρια σε φέτες γαλοπούλας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου



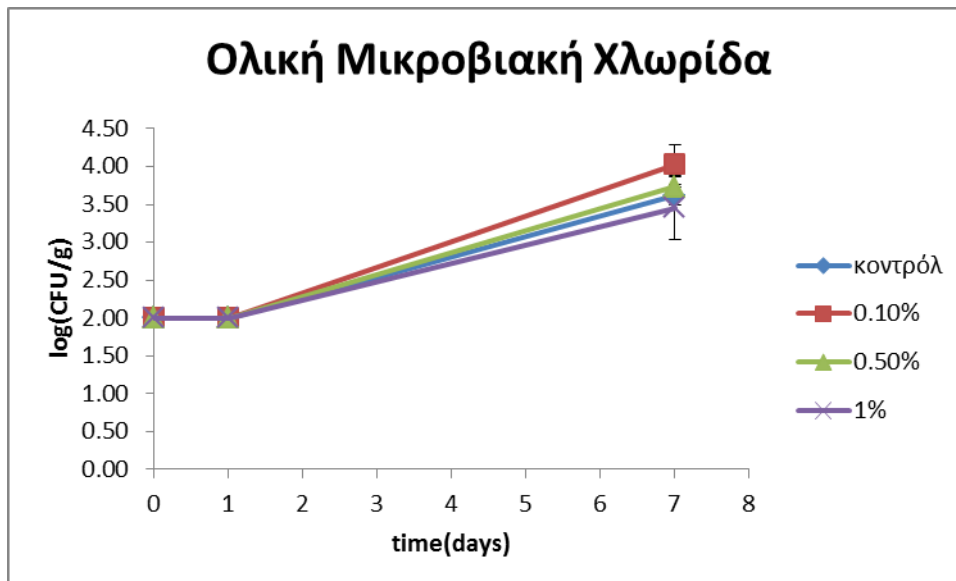
Διάγραμμα 27: Διακύμανση pH σε φέτες γαλοπούλας, κάτω από διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου

### 3.1.4. Δ: Προσθήκη υδρολύματος ρίγανης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και εφαρμογή σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένων με *Listeria monocytogenes*.

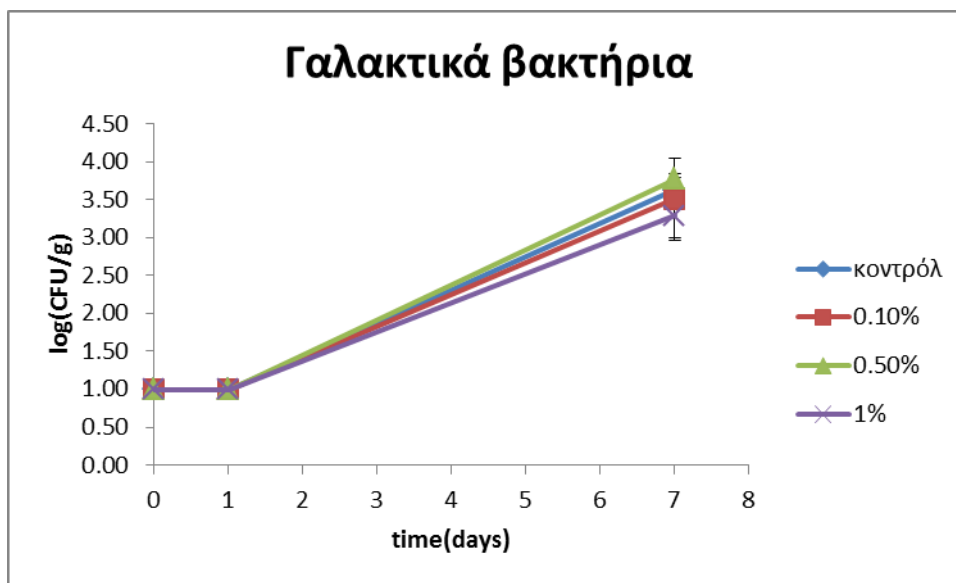
Η επιλογή του υδρολύματος της ρίγανης ως αντιμικροβιακού παράγοντα για ενσωμάτωση σε εδώδιμες μεμβράνες και εφαρμογή σε φέτες ζαμπόν κρίθηκε αναποτελεσματική, καθώς δεν βρέθηκε να έχει επίδραση στον πληθυσμό *Listeria monocytogenes*. Καμία συγκέντρωση του υδρολύματος δεν επέφερε σημαντική μείωση του παθογόνου, όπως φαίνεται στο διάγραμμα, επομένως η χρήση υδρολύματος ρίγανης απορρίφθηκε για τις ανάγκες του κυρίως πειράματος.



Διάγραμμα 28: Πληθυσμός *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδωδιμων μεμβρανών με διαφορετική συγκέντρωση υδρολύματος ρίγανης.



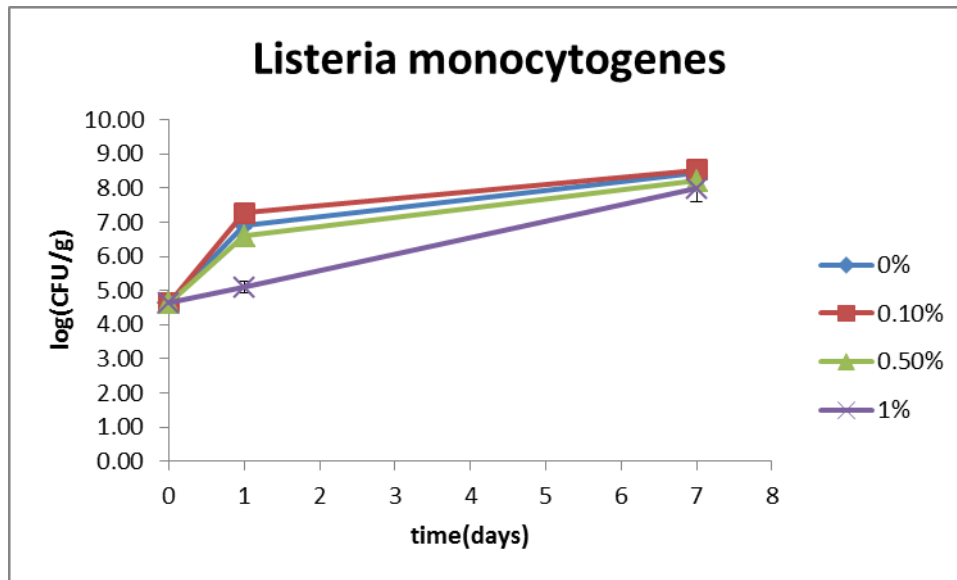
Διάγραμμα 29: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετική συγκέντρωση υδρολύματος ρίγανης.



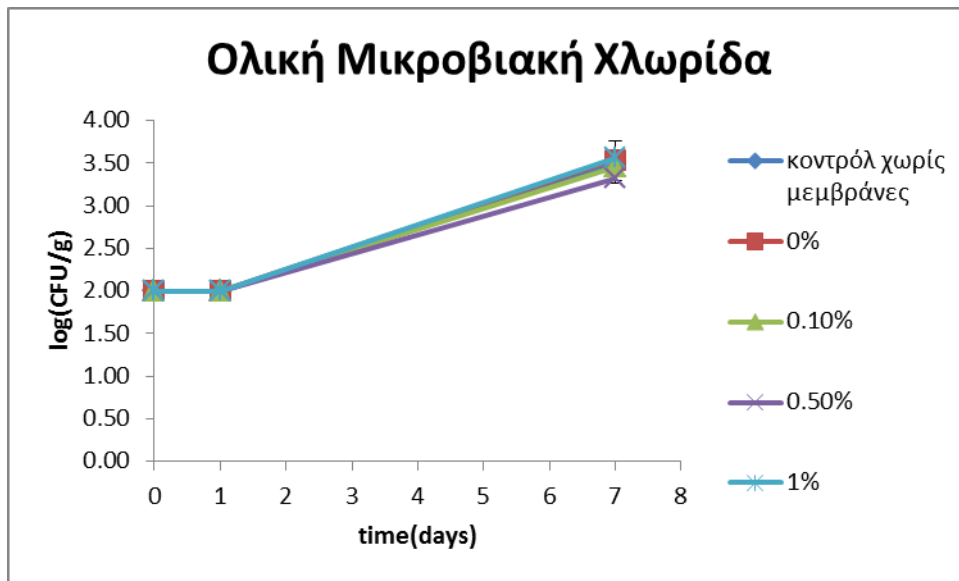
Διάγραμμα 30: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετική συγκέντρωση υδρολύματος ρίγανης.

### 3.1.5. Ε: Προσθήκη αιθερίου ελαίου ρίγανης σε εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και εφαρμογή σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένων με *Listeria monocytogenes*.

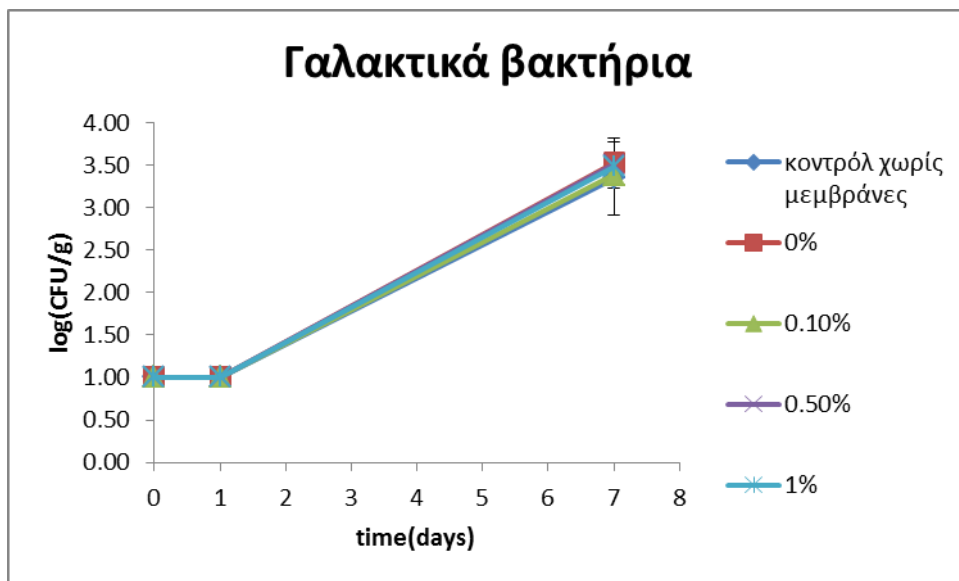
Η ενσωμάτωση αιθερίου ελαίου ρίγανης στις εδώδιμες μεμβράνες σε συγκέντρωση 1% έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στην μείωση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* σε σύγκριση με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις (0,10%, 0,50%), (διάγραμμα 12). Η επιλογή της συγκεκριμένης συγκέντρωσης (1%) βασίστηκε σε αυτήν ακριβώς την επίδραση που φάνηκε να έχει στο παθογόνο και όχι στους υπόλοιπους μικροβιακούς πληθυσμούς που εξετάστηκαν (γαλακτικά βακτήρια και ολική μικροβιακή χλωρίδα), στους οποίους δεν φάνηκε κάποια διαφοροποίηση από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθερίου ελαίου, στο διάστημα των 7 ημερών που διεξάγονταν οι δειγματοληψίες.



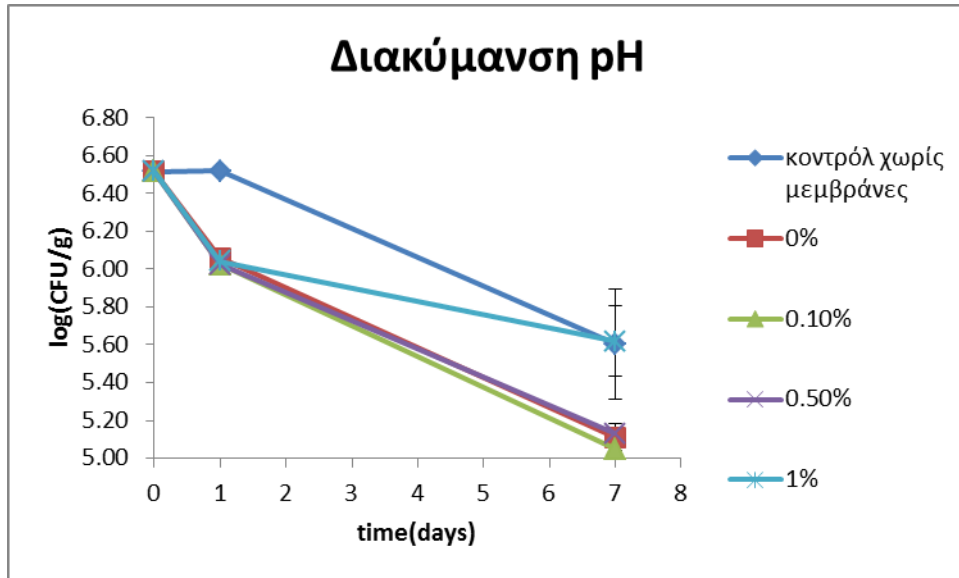
Διάγραμμα 31: Πληθυσμός *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν, υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθερίου ελαίου ρίγανης (0%, 0,10%, 0,50%, 1%) ενσωματωμένου σε εδώδιμες μεμβράνες.



Διάγραμμα 32: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης.



Διάγραμμα 33: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης.



Διάγραμμα 34: Διακύμανση του pH σε φέτες ζαμπόν, μετά την εφαρμογή εδώδιμων μεμβρανών με διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης.



### **3.2. Εφαρμογή ΥΥΠ σε φέτες ζαμπόν εμβολιασμένες με *Listeria monocytogenes* και συσκευασία σε κενό σε διαφορετικές θερμοκρασίες με την προσθήκη εδώδιμων μεμβρανών αλγινικού νατρίου εμπλουτισμένων με αιθέριο έλαιο ρίγανης.**

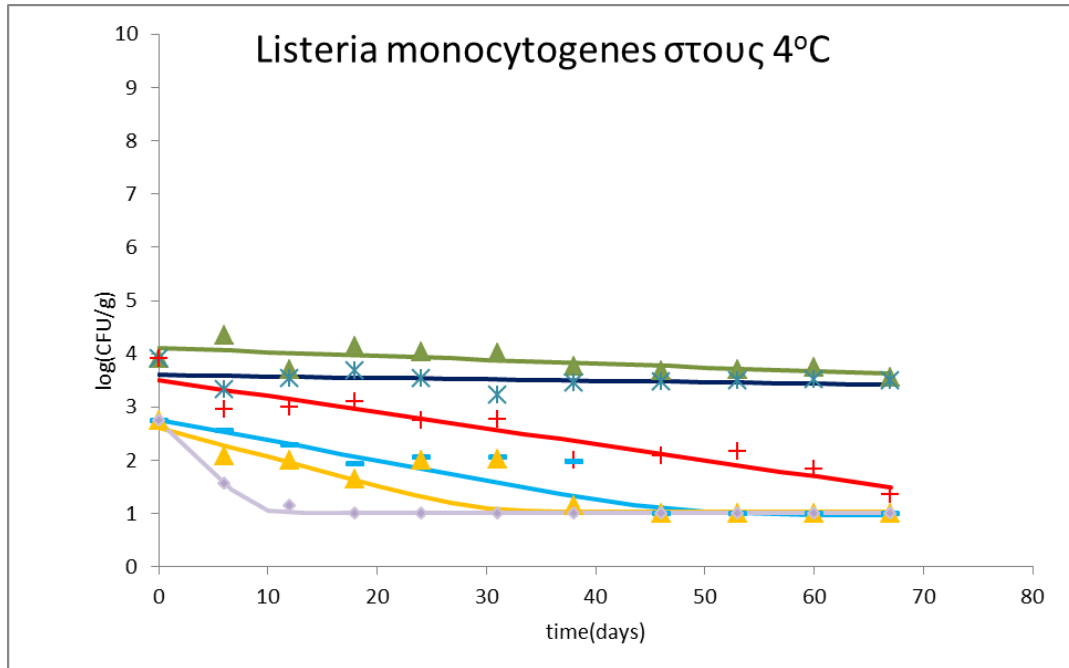
#### **3.2.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων**

##### **3.2.1.1. Αποτελέσματα καταμέτρησης *Listeria monocytogenes***

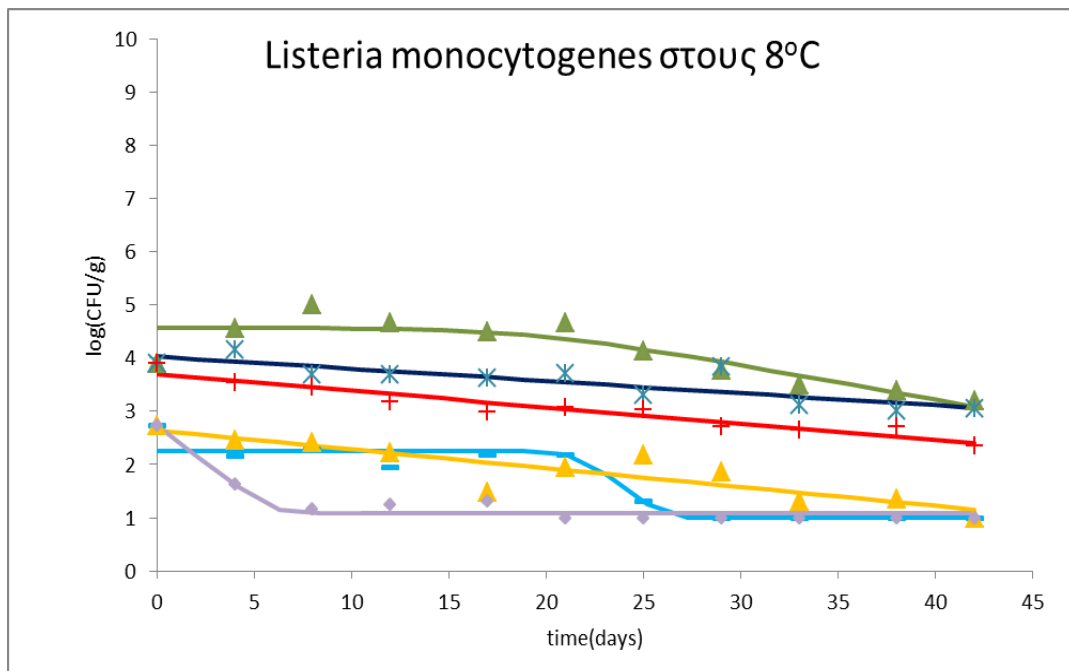
Η εφαρμογή Υπερυψηλής Πίεσης (ZP, ZP0%, ZP1%) μείωσε τον πληθυσμό της *Listeria monocytogenes* κατά 1-2 λογάριθμους, σε σύγκριση με τα δείγματα στα οποία δεν εφαρμόστηκε πίεση (Z, Z0%, Z1%) καθόλη τη διάρκεια συντήρησης του προϊόντος στους 4 °C, με τη μείωση αυτή να είναι μεγαλύτερη στις θερμοκρασίες συντήρησης 8 και 12 °C, (διαγράμματα 13 έως 15).

Η προσθήκη αιθέριου ελαίου (Z1%) προκάλεσε μια μείωση της τάξεως των 1,5 λογαρίθμων κατά μέσο όρο στο πληθυσμό της *L. monocytogenes*, σε σύγκριση με τα δείγματα στα οποία δεν είχε προστεθεί εδώδιμη μεμβράνη με αιθέριο έλαιο (Z). Το αποτέλεσμα αυτό παρατηρήθηκε σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης.

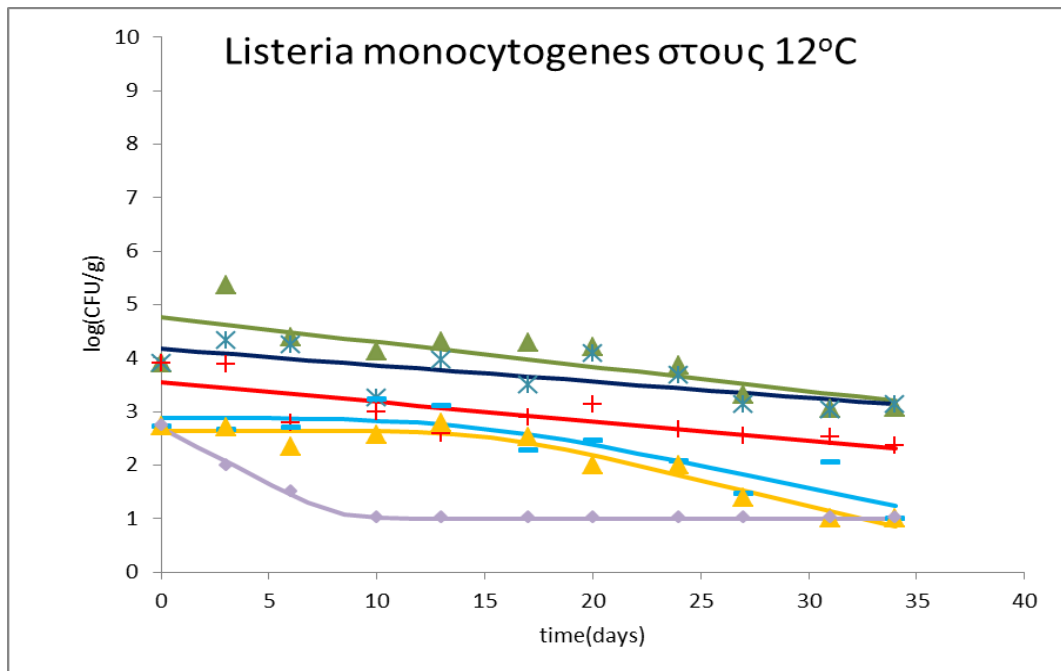
Ο συνδυασμός υπερυψηλής πίεσης και αιθέριου ελαίου στα δείγματα (ZP1%) μείωσε τον πληθυσμό *L. monocytogenes* 1 λογάριθμο περισσότερο (κατά μέσο όρο), από τα δείγματα στα οποία είχε εφαρμοστεί μόνο υπερυψηλή πίεση (ZP). Στην περίπτωση όπου εφαρμόστηκε μόνο πίεση 500 MPa για 2 λεπτά (ZP), η *L. monocytogenes* δεν ανιχνευόταν από την 60<sup>η</sup> ημέρα στους 4°C και την 42<sup>η</sup> ημέρα στους 8°C. Στους 12°C το παθογόνο εξακολούθησε να ανιχνεύεται μέχρι και την 34<sup>η</sup> ημέρα, οπότε και σταμάτησαν οι δειγματοληψίες, λόγω του ότι το προϊόν είχε κριθεί οργανοληπτικά ακατάλληλο, από την 31<sup>η</sup> ημέρα. Η περίπτωση εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης και μεμβρανών χωρίς αιθέριο έλαιο (ZP0%) έδωσε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της περίπτωσης ZP, με απουσία της *L. monocytogenes* από την 53<sup>η</sup> ημέρα στους 4°C και από την 42<sup>η</sup> ημέρα στους 8°C. Στους 12°C το παθογόνο ανιχνευόταν μέχρι και την λήξη των δειγματοληψιών, την 34<sup>η</sup> ημέρα. Στην περίπτωση εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης και αιθέριου ελαίου ρίγανης 1% (ZP1%), είχαμε απουσία του παθογόνου *L. monocytogenes* από τη 18<sup>η</sup> ημέρα στους 4°C, την 25<sup>η</sup> ημέρα στους 8°C και την 20<sup>η</sup> ημέρα στους 12°C.



Διάγραμμα 35: Πληθυσμός *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C. [Z: (▲), Z0%: (✕), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]



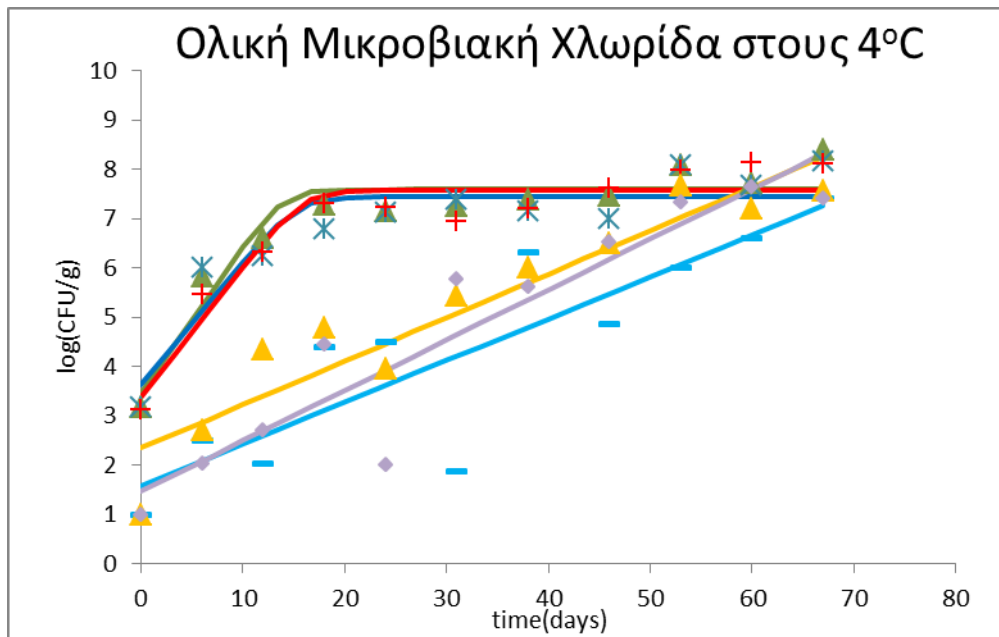
Διάγραμμα 36: Πληθυσμός *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C. [Z: (▲), Z0%: (✕), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]



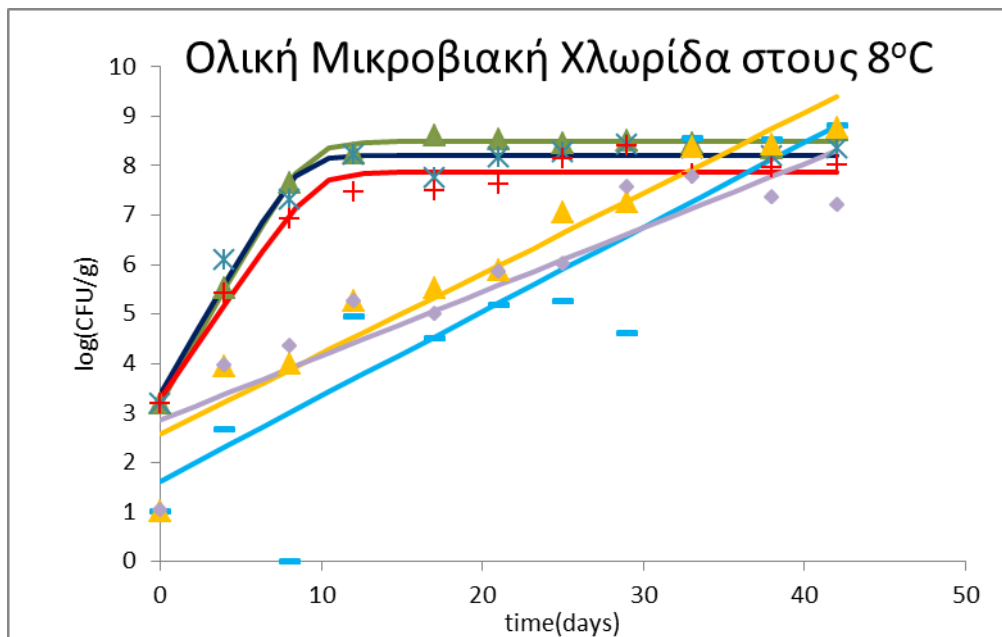
Διάγραμμα 37: Πληθυσμός *Listeria monocytogenes* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C [Z: (▲), Z0%: (✱), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

### 3.2.1.2. Αποτελέσματα καταμέτρησης- υπόλοιπα μικροβιολογικά

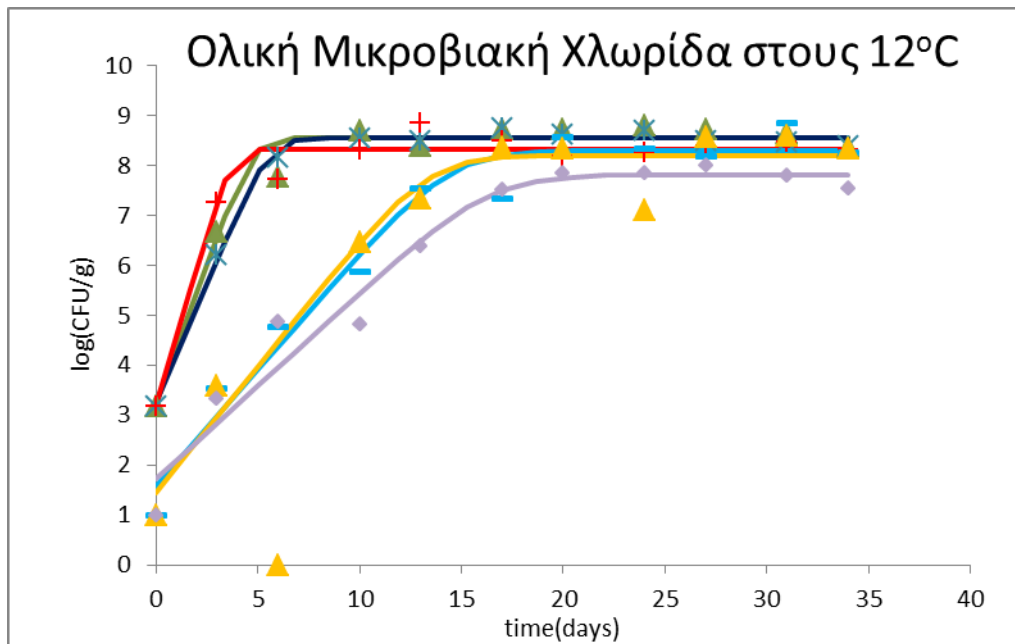
Όσον αφορά στην **Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα (OMX)** η διαφορά μεταξύ πιεσμένων (ZP, ZP0%, ZP1%) και απίεστων δειγμάτων (Z, Z0%, Z1%) βρέθηκε να είναι 2,8 λογάριθμοι στους 4°C, 1,7 λογάριθμοι στους 8°C και 0,8 λογάριθμοι στους 12°C (διαγράμματα 31-33). Η διαφορά αυτή έδειξε να μειώνεται με την πάροδο των ημερών συντήρησης, σε όλες τις θερμοκρασίες. Στους 4°C δεν σημειώθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των περιπτώσεων ως προς το έλαιο, τόσο στα απίεστα όσο και στα πιεσμένα δείγματα. Στις άλλες δύο θερμοκρασίες συντήρησης οι περιπτώσεις με το έλαιο (Z1%, ZP1%) υπερερούσαν ελαφρώς των υπολοίπων (Z, Z0% και ZP, ZP0% αντίστοιχα).



Διάγραμμα 38: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [ Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

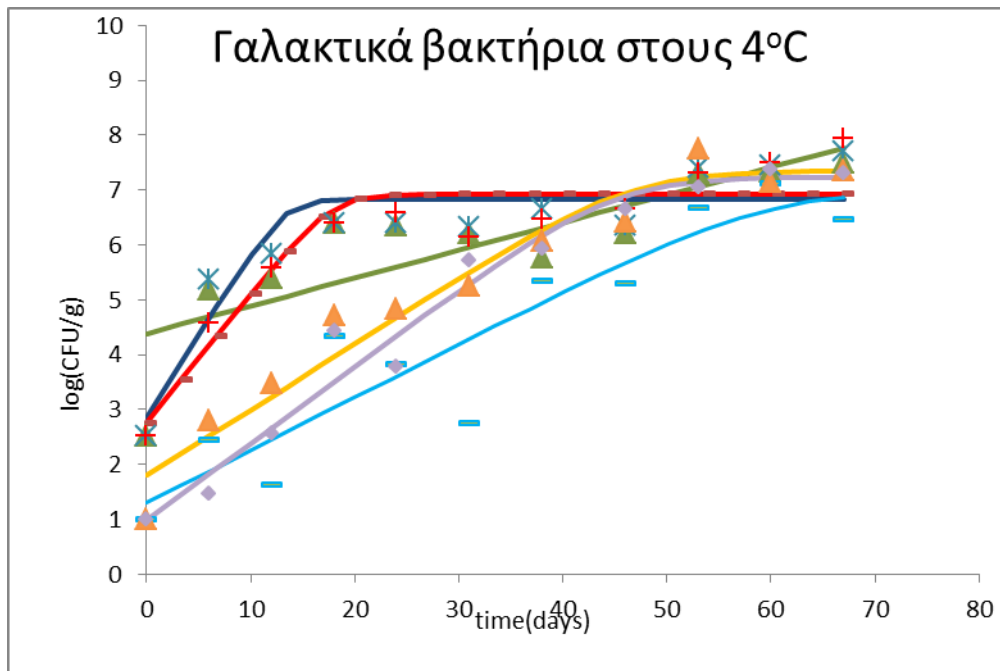


Διάγραμμα 39: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C [ Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

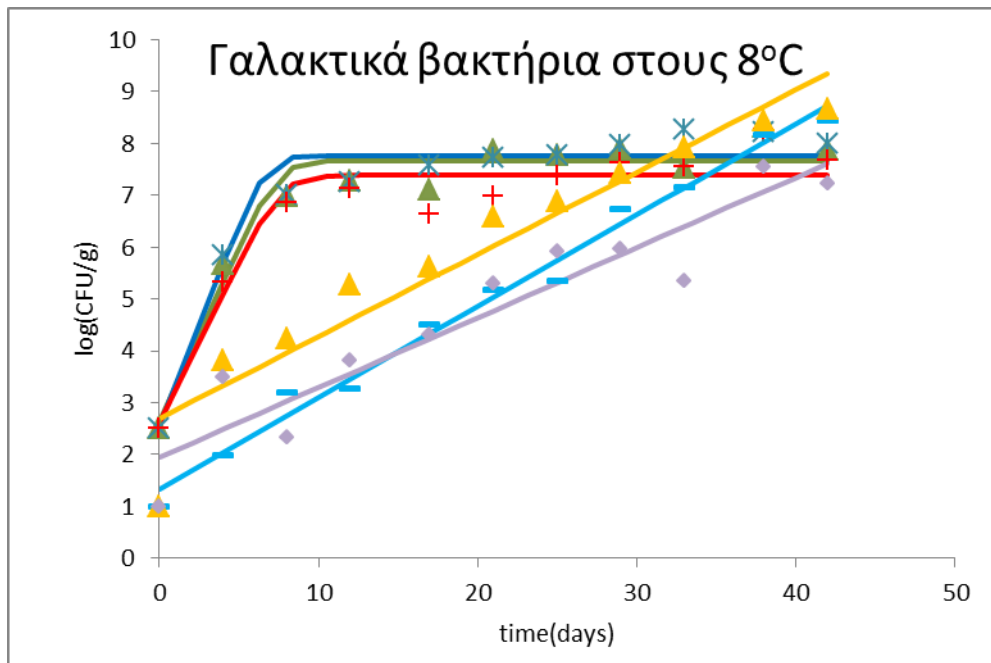


Διάγραμμα 40: Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C [Z: (▲), Z0%: (✖), Z1%: (⊕), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

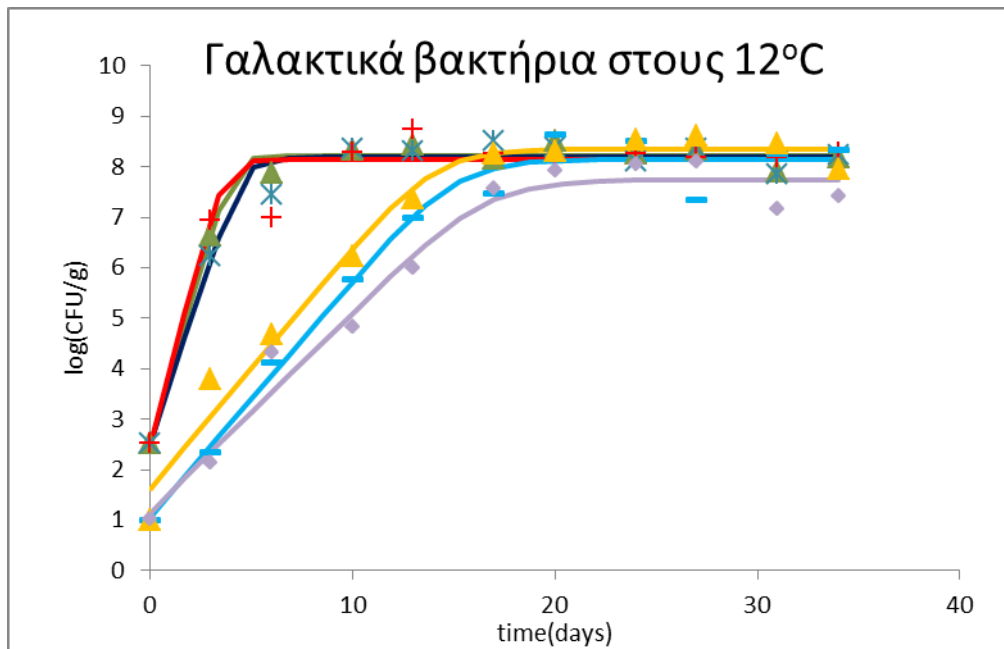
Όσον αφορά στον πληθυσμό των **γαλακτικών βακτηρίων**, η διαφορά μεταξύ πιεσμένων (ZP, ZP0%, ZP1%) και απίεστων δειγμάτων (Z, Z0%, Z1%) βρέθηκε να είναι 1,5 λογάριθμοι κατά μέσο όρο (διαγράμματα 19-21). Η διαφορά αυτή έδειξε να μειώνεται με την πάροδο των ημερών συντήρησης, σε όλες τις θερμοκρασίες. Μεταξύ του μάρτυρα (Z) και του ζαμπόν με μεμβράνες και έλαιο 1% (Z1%) δεν σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές, σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Αντίστοιχα, στα πιεσμένα δείγματα, η περίπτωση ZP1% (πίεση και έλαιο) δεν φάνηκε να υπερτερεί της περίπτωσης ZP (πίεση) στους 4°C. Στην περίπτωση των 8°C, παρατηρήθηκε μείωση των γαλακτικών βακτηρίων κατά 1,1 λογάριθμους μέσο όρο από την 15<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης και στην περίπτωση των 12°C, παρατηρήθηκε μείωση των γαλακτικών κατά 0,87 λογάριθμους μέσο όρο από την αρχή της συντήρησης.



Διάγραμμα 41: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

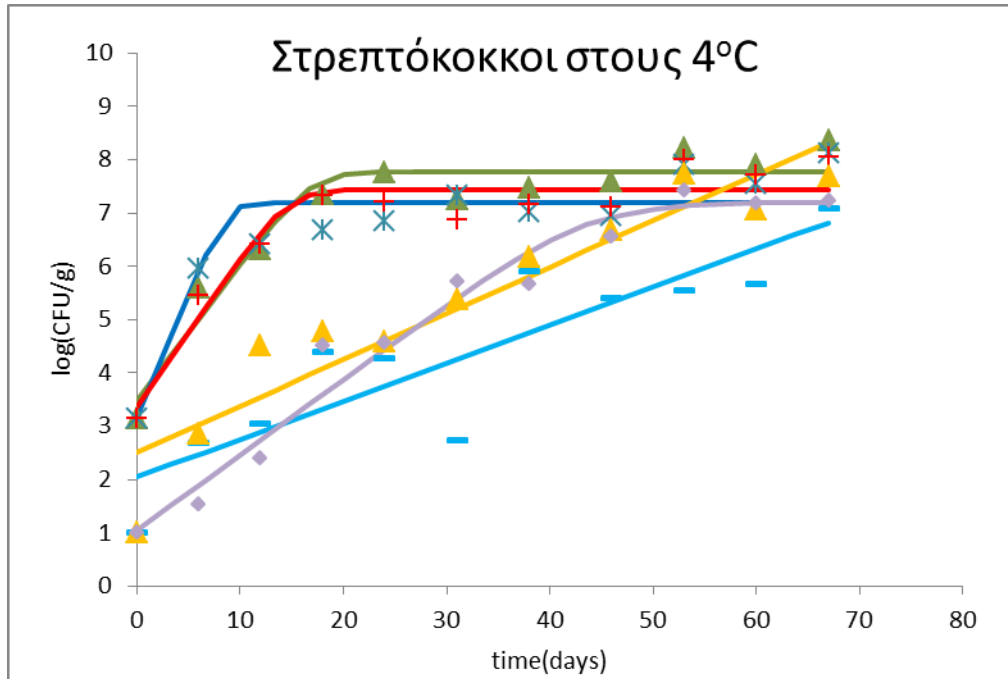


Διάγραμμα 42: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C [Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

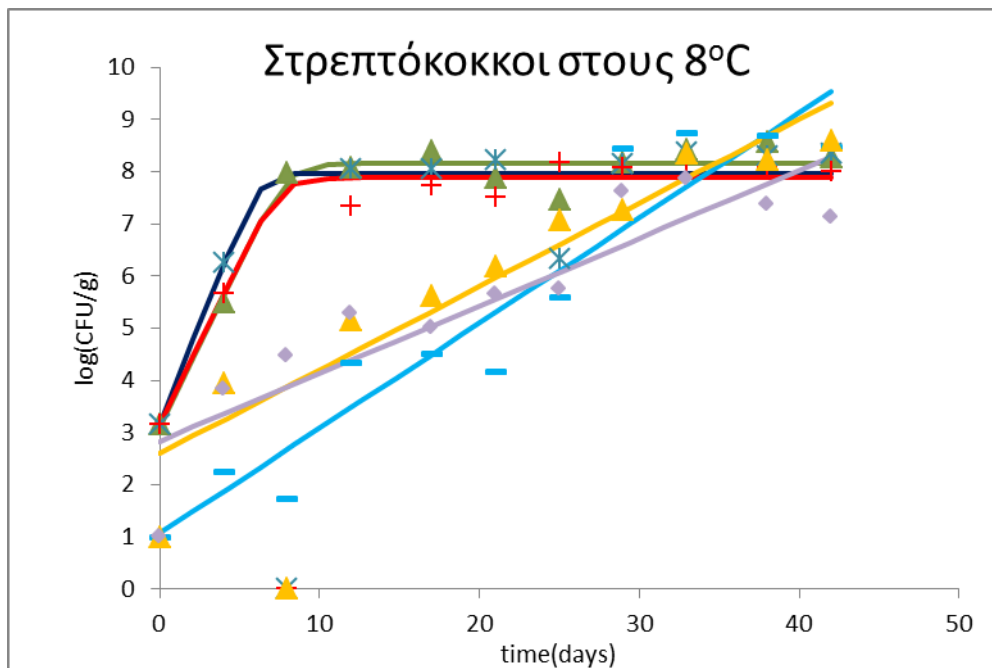


Διάγραμμα 43: Πληθυσμός γαλακτικών βακτηρίων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C [Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

Ομοίως, στους στρεπτόκοκκους, η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης πλεονεκτούσε στην μείωση του μικροβιακού πληθυσμού έναντι των απίεστων δειγμάτων κατά 1,46 λογάριθμους μέσο όρο (διαγράμματα 37-39). Συγκεκριμένα, στους 4°C η διαφορά μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων ήταν 2,3 λογάριθμοι κατά μέσο όρο, στους 8°C 1,3 λογάριθμοι, ενώ στους 12°C η διαφορά μειώθηκε στους 0,8 λογάριθμους. Στα απίεστα δείγματα οι διαφορές μεταξύ των περιπτώσεων (Z, Z0% και Z1%) ήταν πολύ μικρές. Το ίδιο συνέβη και στα πιεσμένα δείγματα (ZP, ZP0%, ZP1%).

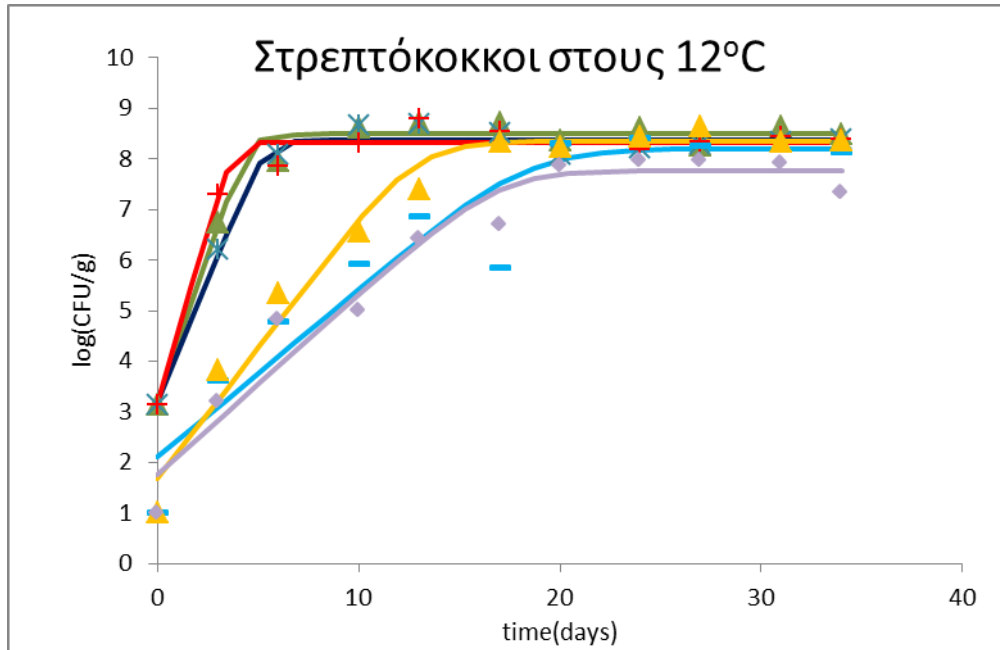


Διάγραμμα 44: Πληθυσμός στρεπτόκοκκων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]



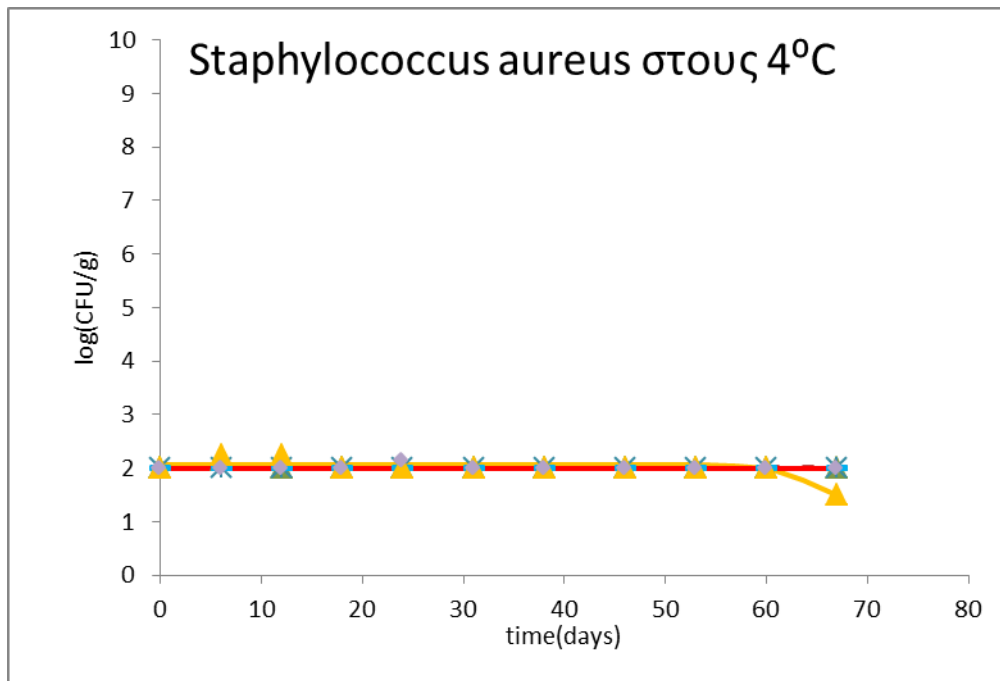
Διάγραμμα 45: Πληθυσμός στρεπτόκοκκων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C [Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]



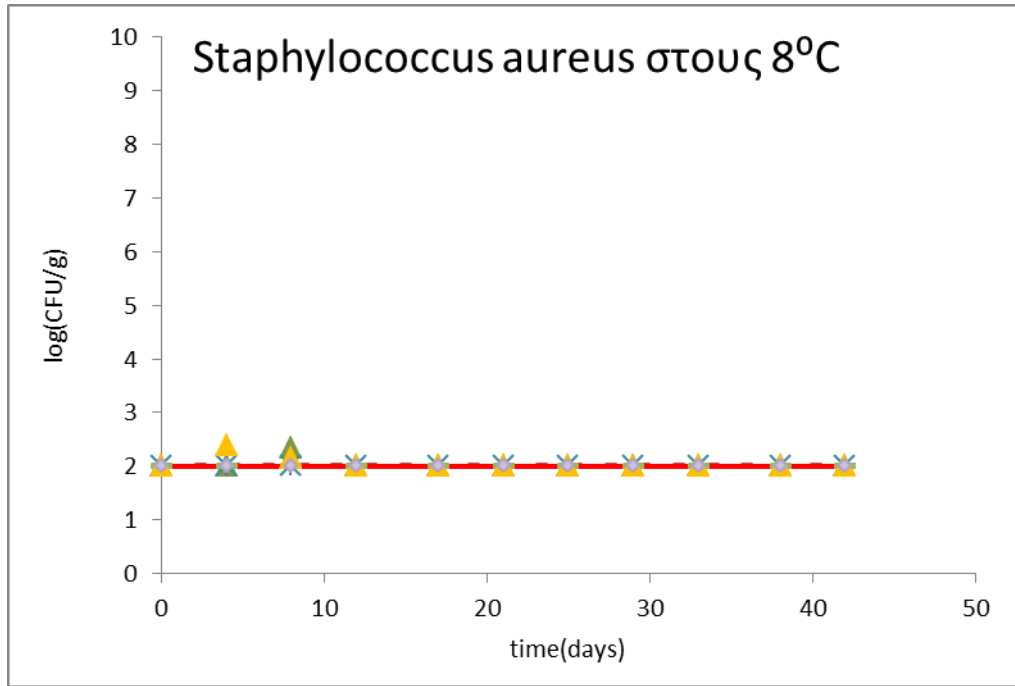


Διάγραμμα 46: Πληθυσμός στρεπτόκοκκων σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C [Z: (▲), Z0%: (✕), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

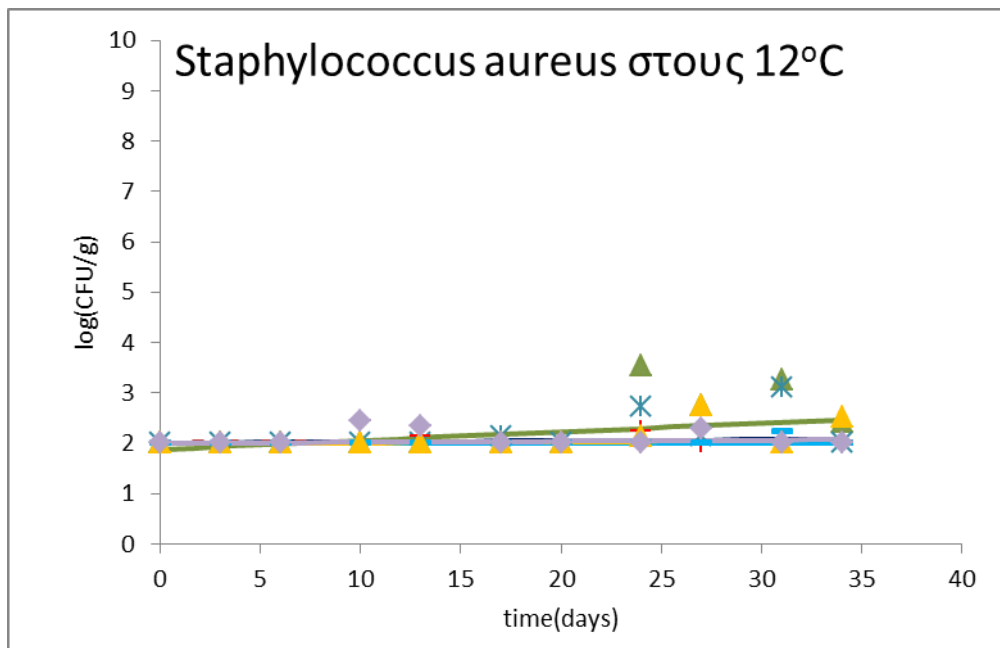
Δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* κατά τη συντήρηση στους 4 και 8°C σε όλες τις περιπτώσεις. Στους 12°C σημειώθηκε μια μικρή αύξηση του βακτηρίου, στην περίπτωση του μάρτυρα (Z), όπως φαίνεται στο διάγραμμα 42.



Διάγραμμα 47: *Staphylococcus aureus* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [Z: (▲), Z0%: (✕), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

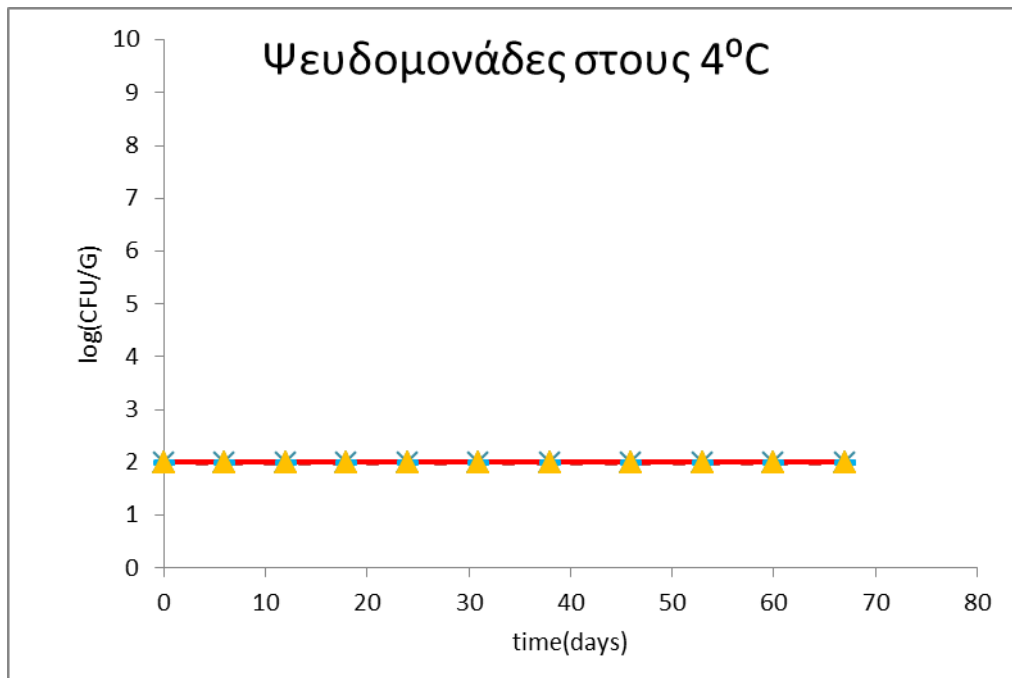


Διάγραμμα 48: *Staphylococcus aureus* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C [ Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

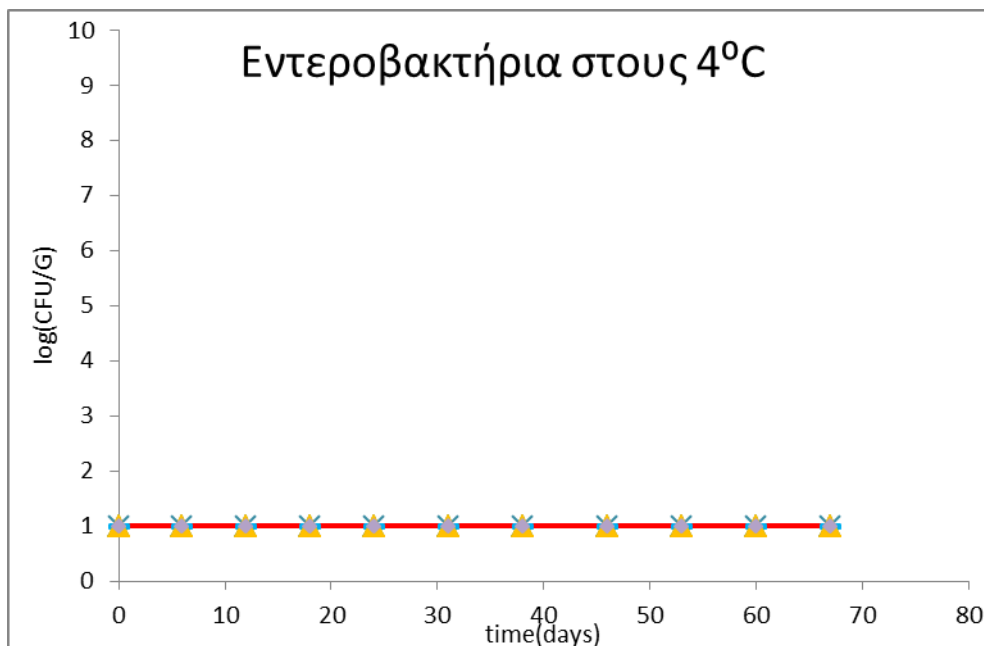


Διάγραμμα 49: *Staphylococcus aureus* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C [ Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

Ομοίως, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη **ψευδομονάδων** και **εντεροβακτηρίων** σε καμία θερμοκρασία συντήρησης, καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Ενδεικτικά παρουσιάζονται τα διαγράμματα στους 4°C.

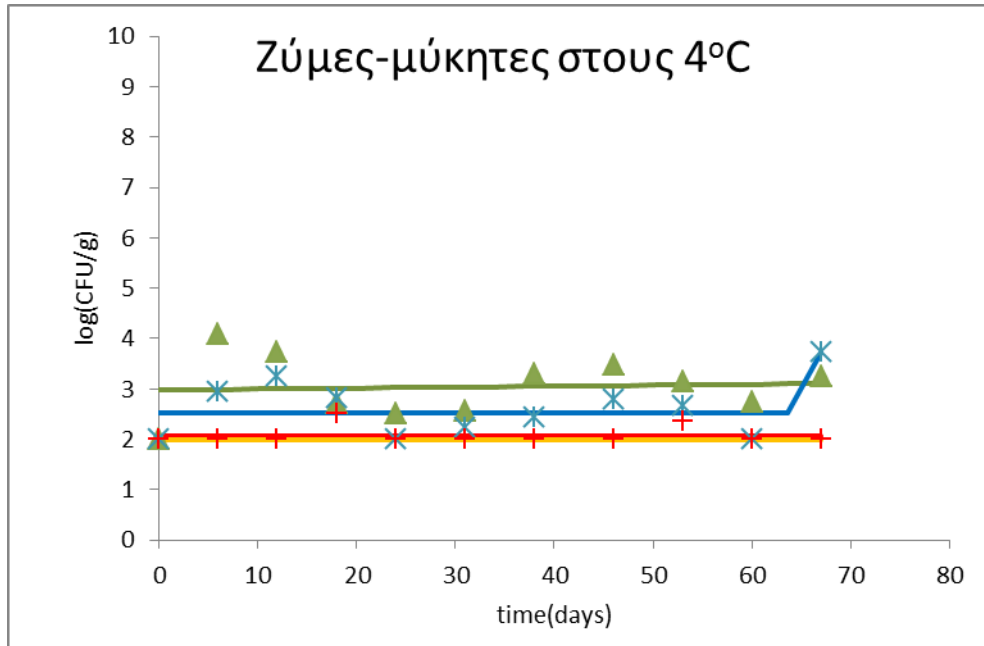


Διάγραμμα 50: Ψευδομονάδες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [ Z: (▲), Z0%: (✕), Z1%: (+), ZP: (—), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

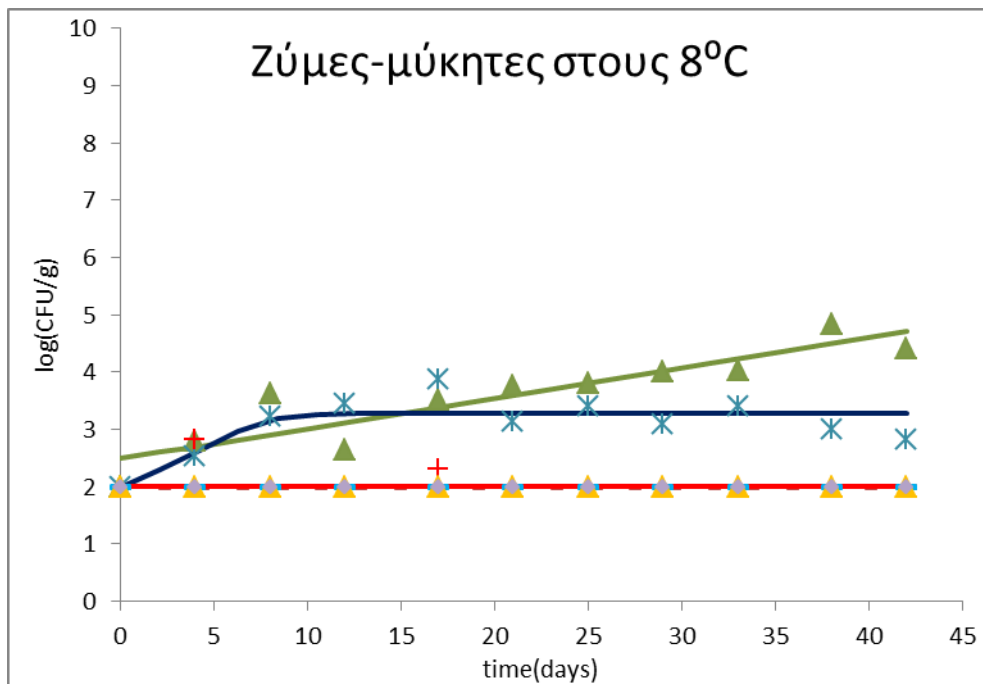


Διάγραμμα 44: Εντεροβακτήρια σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [ Z: (▲), Z0%: (✕), Z1%: (+), ZP: (—), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

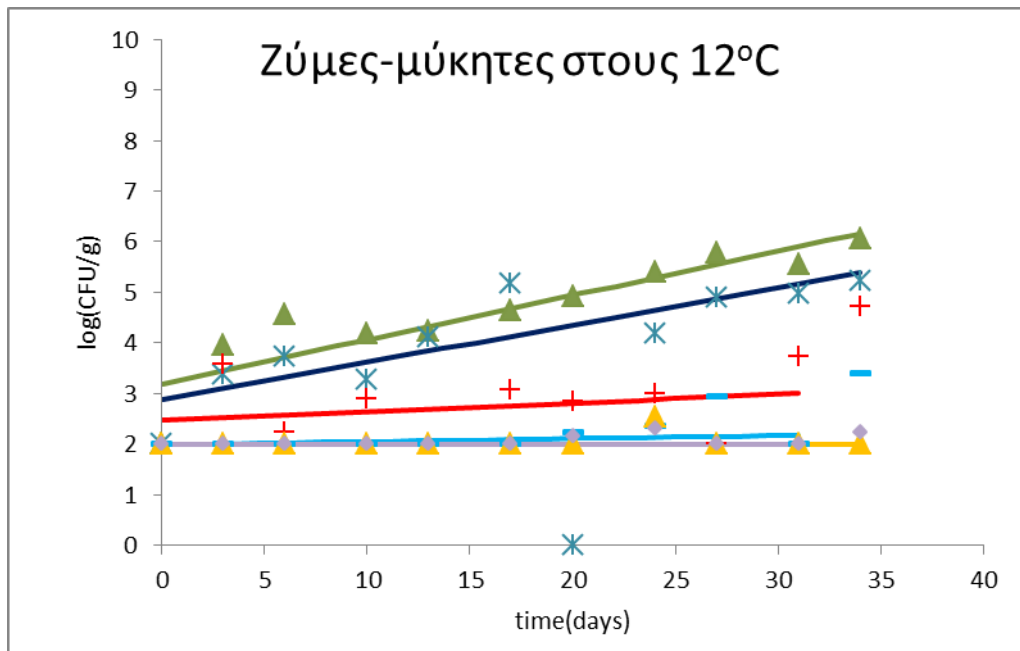
Η εφαρμογή πίεσης έδειξε να αναστέλλει την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων, ενώ το αιθέριο έλαιο ρίγανης στα απίεστα δείγματα (Z1%) υπερτερούσε έναντι των περιπτώσεων χωρίς έλαιο (Z, Z0%), όπως φαίνεται στα διαγράμματα 45-47.



Διάγραμμα 45: Ζύμες- μύκητες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [Z: (▲), Z0%: (✖), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

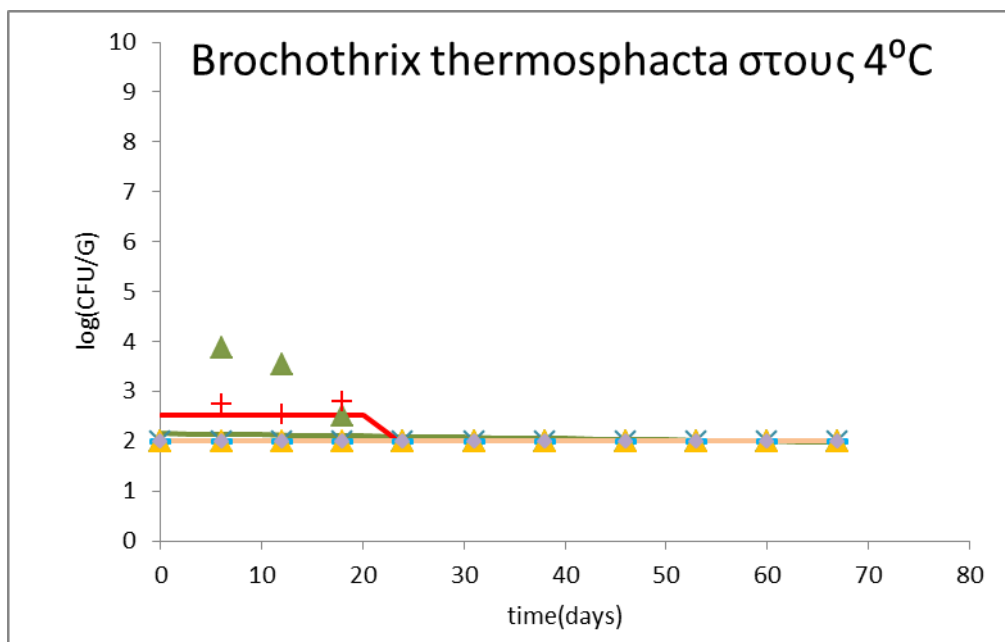


Διάγραμμα 46: Ζύμες- μύκητες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8 °C [Z: (▲), Z0%: (✖), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

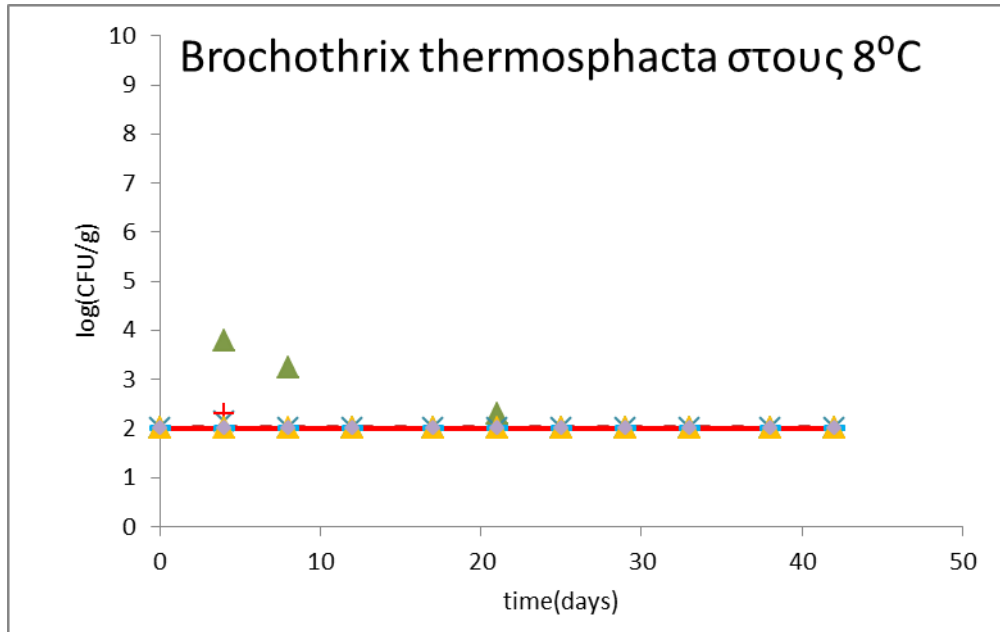


Διάγραμμα 47: Ζύμες- μύκητες σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C [Z: (▲), Z0%: (✖), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

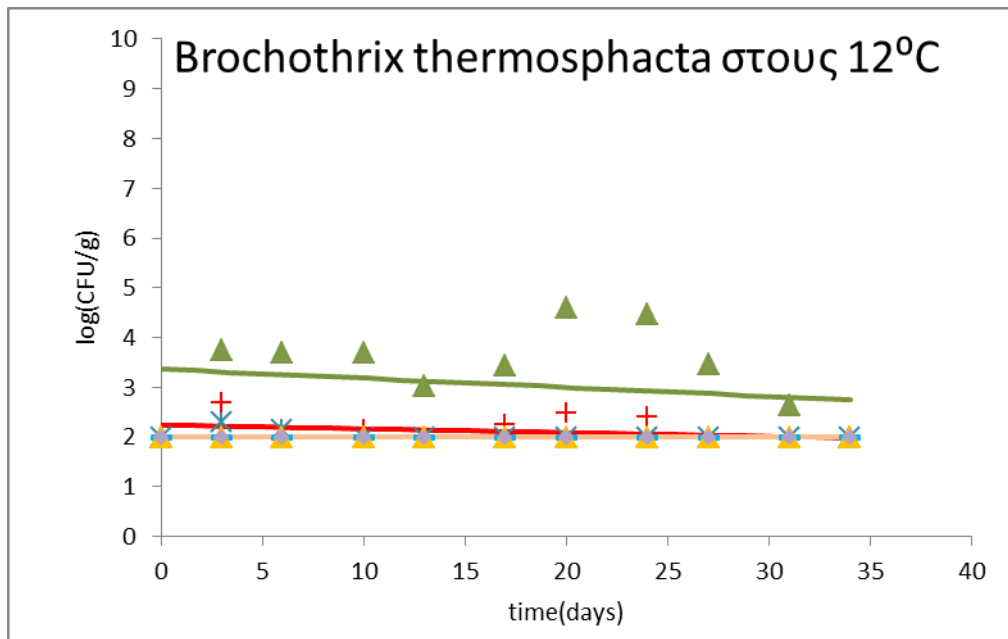
Ο *Brochothrix thermosphacta* δεν έδειξε να επιζεί της πίεσης και ανιχνεύθηκε μόνο στον μάρτυρα (Z) και στα απίεστα δείγματα με έλαιο (Z1%) στους 12°C (διαγράμματα 48-50).



Διάγραμμα 48: Πληθυσμός *Brochothrix thermosphacta* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C [Z: (▲), Z0%: (✖), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]



Διάγραμμα 49: Πληθυσμός *Brochothrix thermosphacta* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C [Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]



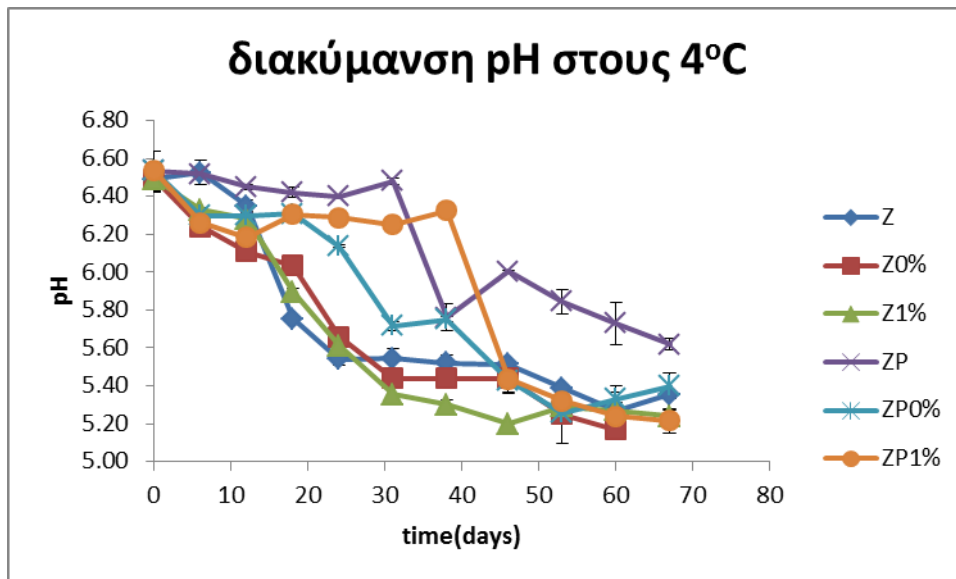
Διάγραμμα 50: Πληθυσμός *Brochothrix thermosphacta* σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C [Z: (▲), Z0%: (×), Z1%: (+), ZP: (■), ZP0%: (▲), ZP1%: (◆)]

### 3.3. Αποτελέσματα κινητικής αύξησης των μικροοργανισμών

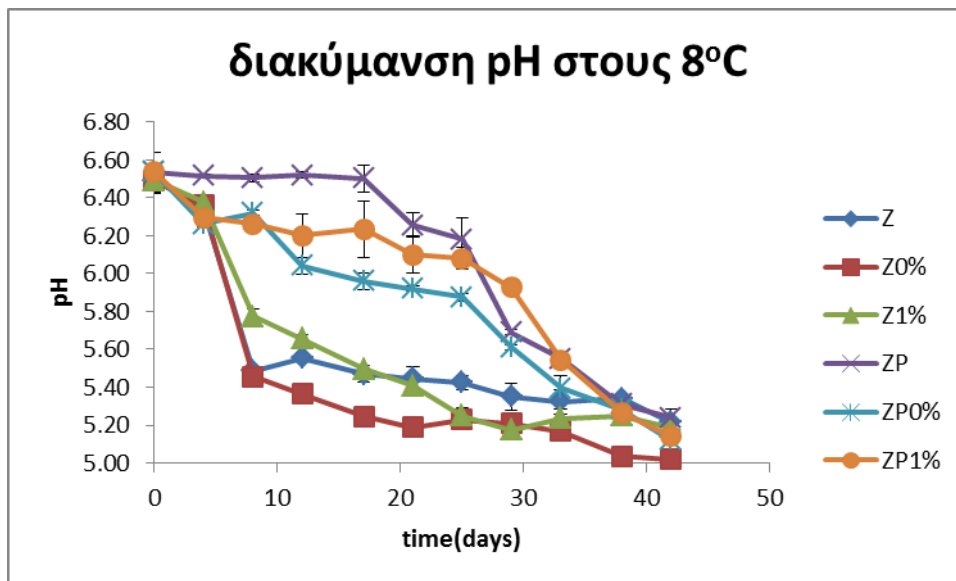
Τα δεδομένα αύξησης από την καταμέτρηση των διαφόρων ομάδων βακτηρίων μετασχηματίστηκαν σε δεκαδικούς λογάριθμους και προσαρμόστηκαν (με μη γραμμική παλινδρόμηση) στο πρωτογενές σιγμοειδές μοντέλο των Baranyi και Roberts (Baranyi & Roberts, 1994). Το μοντέλο βασίζεται σε τέσσερις κύριες παραμέτρους: τη διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag phase), το μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης (rate), την κατώτερη ( $y_0$ ) και την ανώτερη ( $y_{End}$ ) ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης μεταβολής των μικροβιακών πληθυσμών ως προς το χρόνο, που στην πλειοψηφία των καμπυλών ανάπτυξης αντιστοιχούν στο αρχικό και τελικό επίπεδο του μικροβιακού πληθυσμού, αντίστοιχα. Διαθέτει επίσης και δύο παραμέτρους καμπυλότητας  $mCurv$ ,  $nCurv$ . Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (rate) μπορεί να πάρει αρνητικές τιμές αν το μοντέλο φθίνει. Το rate είναι μόνο μια πιθανή τιμή, γιατί θεωρητικά δεν συμπίπτει ποτέ με την προσαρμοσμένη καμπύλη, λόγω των περιοριστικών συναρτήσεων που εφαρμόζονται. Ωστόσο η διαφορά μεταξύ πιθανού και πραγματικού ρυθμού είναι αμελητέα αν η παράμετρος  $mCurv$  είναι αρκετά μεγάλη. Το πρόγραμμα δίνει ακόμα το τυπικό σφάλμα (se) και το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης ( $R^2$ ) της προσαρμογής. Τα αποτελέσματα αυτά (rate, lag,  $y_0$ ,  $y_{End}$ , se,  $R^2$ ) παρουσιάζονται σε πίνακες στο Παράρτημα 1. Η μη γραμμική παλινδρόμηση αυτού του μοντέλου έγινε με το πρόγραμμα DMFit (Institute of Food Research, Reading, UK; διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση [www.combase.cc](http://www.combase.cc)) σε περιβάλλον Excel.

### 3.4. Αποτελέσματα pH

Οι μετρήσεις του pH έδειξαν ότι η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης οδήγησε σε αύξηση του pH σε σύγκριση με τα μη πιεσμένα δείγματα. Η διαφορά μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων άρχισε να μειώνεται με την πάροδο των ημερών συντήρησης, όπως φαίνεται στα διαγράμματα 51-53.

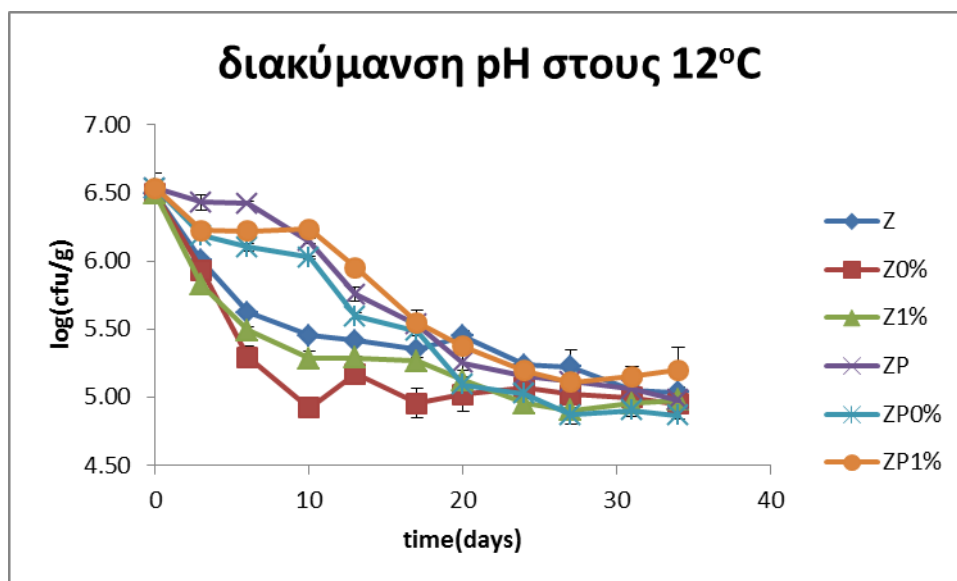


Διάγραμμα 51: pH σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 4°C.



Διάγραμμα 52: pH σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 8°C.





Διάγραμμα 53: pH σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες στους 12°C.

### 3.5. Αποτελέσματα οργανοληπτικού ελέγχου

Ο οργανοληπτικός έλεγχος έδειξε, όπως αναμενόταν, μία μείωση στη διάρκεια ζωής του προϊόντος με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης. Έτσι, στους 4°C, το ζαμπόν ήταν απορριπτέο οργανοληπτικά από την 60<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης, ενώ για τις περιπτώσεις με το έλαιο (Z1%, ZP1%) από την 53<sup>η</sup> ημέρα, λόγω της ιδιαίτερης επίγευσης που άφηνε το αιθέριο έλαιο. Δεν σημειώθηκε διαφορά μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων. Στον χρόνο που το προϊόν ήταν αποδεκτό οργανοληπτικά, στις περιπτώσεις ZP και ZP1% το ζαμπόν ήταν και απαλλαγμένο από *Listeria monocytogenes* (απουσία του παθογόνου) από την 53<sup>η</sup> και την 18<sup>η</sup> ημέρα αντίστοιχα.

Κατά τη συντήρηση στους 8°C, τα προϊόντα κρίθηκαν απορριπτέα οργανοληπτικά από την 42<sup>η</sup> ημέρα σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός των Z0% και ZP1%, που κρίθηκαν ακατάλληλα από την 38<sup>η</sup> ημέρα (το ZP1% λόγω της ιδιαίτερης επίγευσης που άφηνε το αιθέριο έλαιο). Μόνο στην περίπτωση ZP1% το ζαμπόν ήταν απαλλαγμένο από *L. monocytogenes* από την 25<sup>η</sup> ημέρα, μέσα στο χρόνο ζωής του προϊόντος.

Τέλος, στους 12°C, παρατηρήθηκε μια υπεροχή των πιεσμένων δειγμάτων σε σύγκριση με τα απίεστα, κατά τη συντήρηση, με τις περιπτώσεις με πίεση (ZP, ZP0%, ZP1%) να κρίνονται οργανοληπτικά μη αποδεκτές χρονικά αργότερα από τις αντίστοιχες απίεστες (Z, Z0%, Z1%). Συγκεκριμένα, οι περιπτώσεις Z και Z0% απορρίφθηκαν από την 27<sup>η</sup> ημέρα, ενώ οι αντίστοιχες πιεσμένες ZP και ZP0% από την 31<sup>η</sup> ημέρα, ενώ η περίπτωση Z1% από την 31<sup>η</sup> ημέρα, με την αντίστοιχή της ZP1% να απορρίπτεται από την 34<sup>η</sup> ημέρα. Οι διαφορές οφείλονταν στο άρωμα και τη γεύση. Στους 12°C φάνηκε επομένως η προσθήκη ελαίου να υπερτερεί

οργανοληπτικά έναντι των υπολοίπων περιπτώσεων. Και εδώ, μόνο στην περίπτωση ZP1% το ζαμπόν ήταν απαλλαγμένο από *L. monocytogenes* από την 20<sup>η</sup> ημέρα, μέσα στο χρόνο ζωής του προϊόντος.

Η εμφάνιση του ζαμπόν κρίθηκε καλή μέχρι το τέλος ζωής του προϊόντος, σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Στα πιεσμένα δείγματα η εμφάνιση αξιολογήθηκε καλύτερη από αυτή των απίστων. Παρακάτω φαίνεται αναλυτικά ο πίνακας με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης (Πίνακας 2).

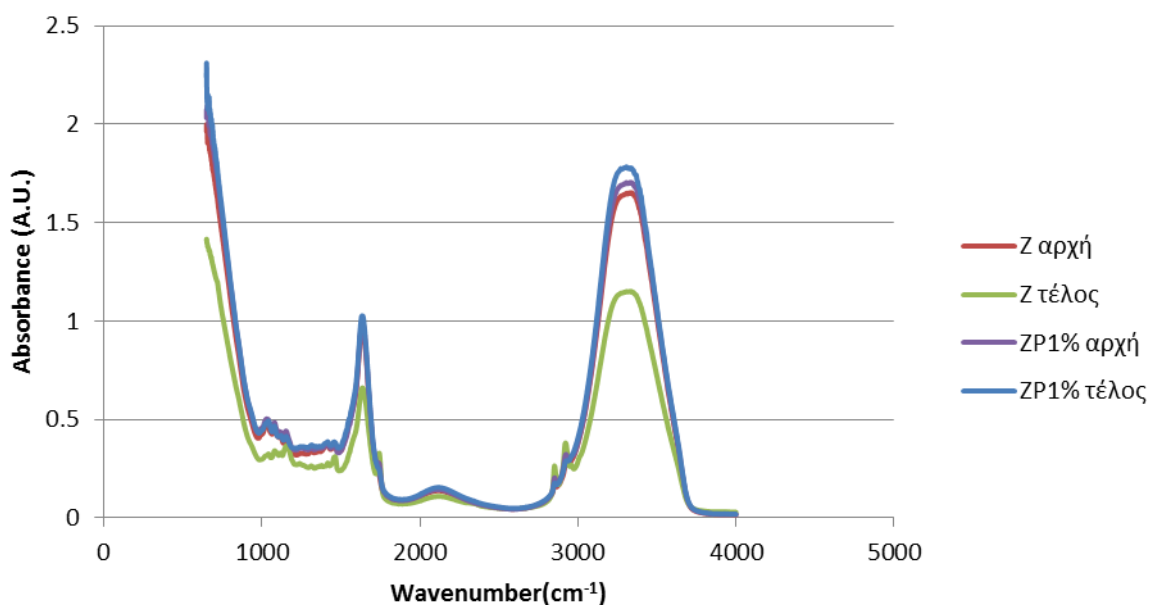
Πίνακας 3: Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης σε φέτες ζαμπόν συντηρημένες σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες (4, 8, 12°C), [ 1=φρέσκο (fresh), 1,5=οριακό (semi-fresh), ≥2 αλλοιωμένο (spoiled) ].

Κωδικός	Παράμετρος	Αρ. Δειγματοληψίας									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Z 4C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
	Γεύση	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5
Z0% 4C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	1
	Γεύση	1	1	1	1.5	1.5	1	1.5	1	1.5	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5
Z1% 4C	Άρωμα	1	1	1	1	1.5	1	1	1.5	1	1
	Γεύση	1	1	1	1	1.5	1	1.5	2	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1.5	1.5	1	1	1.5	1	1.5
ZP 4C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	1.5
	Γεύση	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5
ZP0% 4C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	2
	Γεύση	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5
ZP1% 4C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1	1
	Γεύση	1	1	1	1	1	1	1	2.5	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Z 8C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	2
	Γεύση	1	1.5	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5
Z0% 8C	Άρωμα	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1	1.5	2
	Γεύση	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1	1.5	1.5
Z1% 8C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1.5
	Γεύση	1	1	1	1	1.5	1	1.5	1	1.5	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1	1	1
ZP 8C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5
	Γεύση	1	1	1.5	1	1.5	1.5	1.5	1	1.5	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1.5	1.5	1	1	1	1.5
ZP0% 8C	Άρωμα	1	1	1	1	1.5	1.5	1	1	1.5	2
	Γεύση	1	1	1	1.5	1	1.5	1	1	1.5	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1.5	1	1.5	1.5	1	1.5	1.5
ZP1% 8C	Άρωμα	1	1	1	1.5	1	1	1	1	1.5	1
	Γεύση	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1
Z 12C	Άρωμα	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2
	Γεύση	1	1.5	1.5	1.5	1.5	2	1.5	2	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	2
Z0% 12C	Άρωμα	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2
	Γεύση	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Z1% 12C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1
	Γεύση	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5
ZP 12C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1.5	1.5	2	2
	Γεύση	1	1	1	1	1	1.5	1.5	1.5	2	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1.5	1.5	1	1.5	1.5	1.5
ZP0% 12C	Άρωμα	1	1	1	1.5	1	1.5	1.5	1.5	2	2
	Γεύση	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1.5	1.5
ZP1% 12C	Άρωμα	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.5
	Γεύση	1	1	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2
	Εμφάνιση	1	1	1	1	1	1.5	1	1	1	1.5

### 3.6. Αποτελέσματα FTIR

Η ανάλυση των δεδομένων από τα φασματογραφήματα έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Unscrambler. Από τα φασματογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν με το FTIR χρησιμοποιήθηκαν οι κυματαριθμοί μεταξύ 1800 και 900 $\text{cm}^{-1}$ . Στα δεδομένα έγινε μετασχηματισμός χρησιμοποιώντας τη μέθοδο standard normal variate (SNV) και στη συνέχεια, για τον ποσοτικό προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου των διαφορετικών μικροβιακών ομάδων που απαριθμήθηκαν, δημιουργήθηκαν μοντέλα χρησιμοποιώντας την μέθοδο της Γραμμικής Παλινδρόμησης Μερικών Ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R). Η αξιολόγηση της επίδοσης των μοντέλων που δημιουργήθηκαν με PLS-R ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες επίδοσης Bf, Af,  $R^2$  και RMSE.

Ο συντελεστής προκατάληψης Bf είναι ένας πολλαπλασιαστικός συντελεστής, που εκφράζει το κατά πόσο ένα μοντέλο υπερ- ή υπο- εκτιμά κατά μέσο όρο μία μεταβλητή. Ο συντελεστής ακριβείας Af είναι ένα μέτρο εκτίμησης της μέσης απόκλισης μεταξύ προβλέψεων και παρατηρήσεων (Ross, 1996). Τέλεια συμφωνία προβλέψεων και παρατηρήσεων αντιστοιχεί σε τιμή και των δύο συντελεστών ίση με 1, ενώ το αντίστροφο ισχύει μόνο για το συντελεστή ακριβείας, εξαιτίας της μαθηματικής μορφής του. Τιμές του συντελεστή προκατάληψης πάνω από 1, είναι ενδεικτικές του ότι το μοντέλο υπερεκτιμά τις παρατηρήσεις και το αντίθετο ισχύει για τιμές κάτω από 1. Τέλος, όσο τιμή του  $R^2$  πλησιάζει το 1 και η τιμή του RMSE το 0, τόσο καλύτερος είναι ο συσχετισμός μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών.



Εικόνα 9: Τυπικά φασματογραφήματα στους κυματαριθμούς δειγμάτων ζαμπόν χωρίς (μάρτυρας Z) και με την εφαρμογή πίεσης και εδώδιμων μεμβρανών με έλαιο (ZP1%), στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης στους 4 $^{\circ}\text{C}$ .

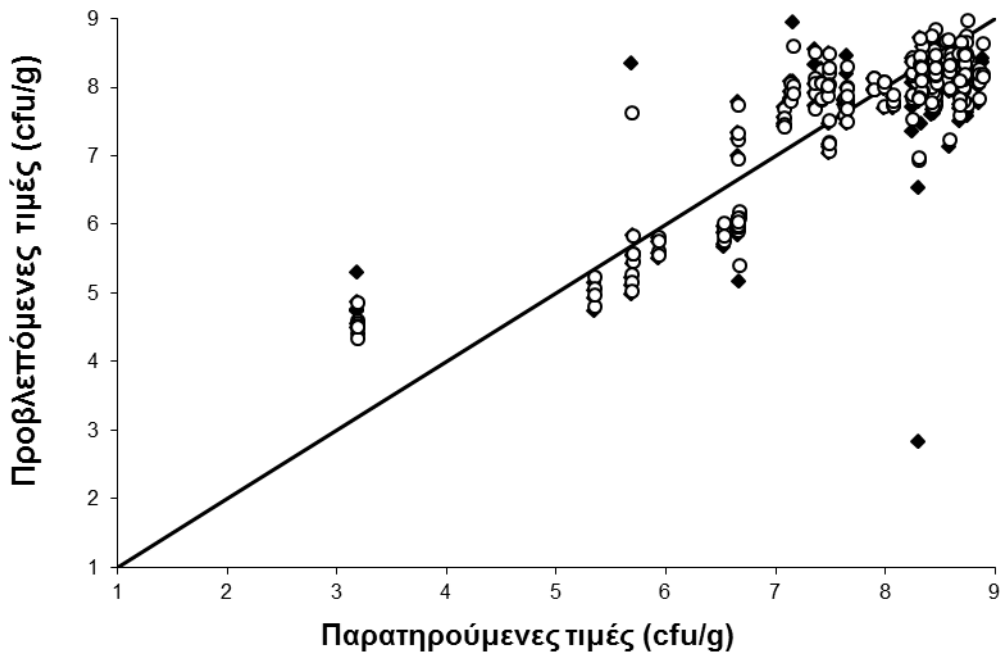
Στην εικόνα 18 παρουσιάζονται τυπικά φασματογραφήματα που ελήφθησαν από δείγματα ζαμπόν συντηρημένα στους 4°C στην αρχή και το τέλος της συντήρησης. Στην περιοχή 1800-900cm<sup>-1</sup> που έγινε η ανάλυση των δεδομένων, παρατηρούμε να εμφανίζεται μία κορυφή στον κυματαριθμό 1640cm<sup>-1</sup>, η οποία οφείλεται στο νερό (O-H) και στη συνεισφορά του Αμιδίου I (πρωτεΐνη). Μία ακόμα κορυφή παρατηρείται στην περιοχή 1550cm<sup>-1</sup> λόγω της απορρόφησης του Αμιδίου II (C-N δονήσεις τάσης), ενώ μία τρίτη κορυφή εμφανίζεται στον κυματαριθμό 1745cm<sup>-1</sup> που οφείλεται στο λίπος (C=O δονήσεις τάσης του καρβονυλίου των τριγλυκεριδίων). Άλλες κορυφές μικρότερης έντασης παρατηρούνται στο φασματογράφημα οι οποίες εμφανίζονται στους παρακάτω κυματαριθμούς: 1458cm<sup>-1</sup> (λίπος, CH<sub>2</sub>, σκελετική δόνηση), 1398cm<sup>-1</sup> (αμίδια, C-N δονήσεις τάσης), 1311cm<sup>-1</sup> και 1246cm<sup>-1</sup> (αμίνες, C-N δονήσεις τάσης), 1166cm<sup>-1</sup> και 1090cm<sup>-1</sup> (αμίνες, ελεύθερα αμινοξέα, C-N δονήσεις τάσης), (Argyri, 2010, Παπαδοπούλου, 2013).

Η πρώτη ανάλυση που έγινε με το Unscrambler αφορούσε όλα τα δείγματα (ALL). Στη συνέχεια, τα δείγματα χωρίστηκαν σε ομάδες σύμφωνα με το εάν είχε εφαρμοστεί πίεση ή όχι (PRESSED, NON PRESSED). Τα αποτελέσματα όμως, όπως αξιολογήθηκαν βάσει των δεικτών R<sup>2</sup> και RMSE, δεν ήταν ικανοποιητικά (Πίνακας 15, Παράρτημα 2). Τέλος τα δείγματα χωρίστηκαν ανά περίπτωση (Z, Z0%, Z1%, ZP, ZP0%, ZP1%) και κατασκευάστηκαν μοντέλα με καλύτερη συγκριτικά επίδοση. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές των δεικτών Bf, Af, R<sup>2</sup> και RMSE για την κάθε περίπτωση. Να σημειωθεί ότι από την ανάλυση των μικροβιολογικών δεδομένων εξαιρέθηκαν οι *Staphylococcus aureus*, *Brochothrix thermosphacta* και τα εντεροβακτήρια, καθώς δεν αναπτύχθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος.

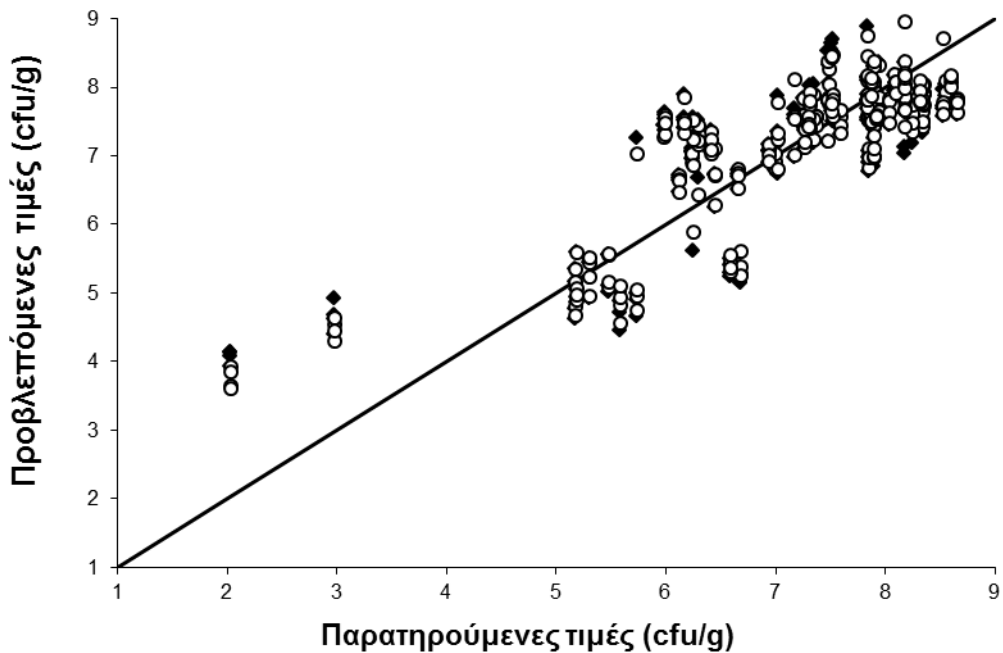
Ο δείκτης προκατάληψης (bias factor-Bf) για όλες τις μικροβιακές ομάδες που εξετάστηκαν ήταν κοντά στην τιμή 1, αποδεικνύοντας ότι τα μοντέλα δεν παρουσίασαν συστηματική, υπό ή υπερ-εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Επιπλέον, αν πάρουμε την περίπτωση του μάρτυρα (Z) για παράδειγμα, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακρίβειας (accuracy factor-Af), φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των προβλέψεων και των παρατηρήσεων ήταν για την Ολική μεσόφιλη χλωρίδα 12,8%, για τα γαλακτικά βακτήρια 9,6%, για τους στρεπτόκοκκους 5%, για τις ζύμες-μύκητες 19,2% και για το pH 1,7% (Πίνακας 3).

Πίνακας 4: . Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά και τα φυσικοχημικά δεδομένα με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα ζαμπόν (κάθε περίπτωση αναλύθηκε ξεχωριστά).

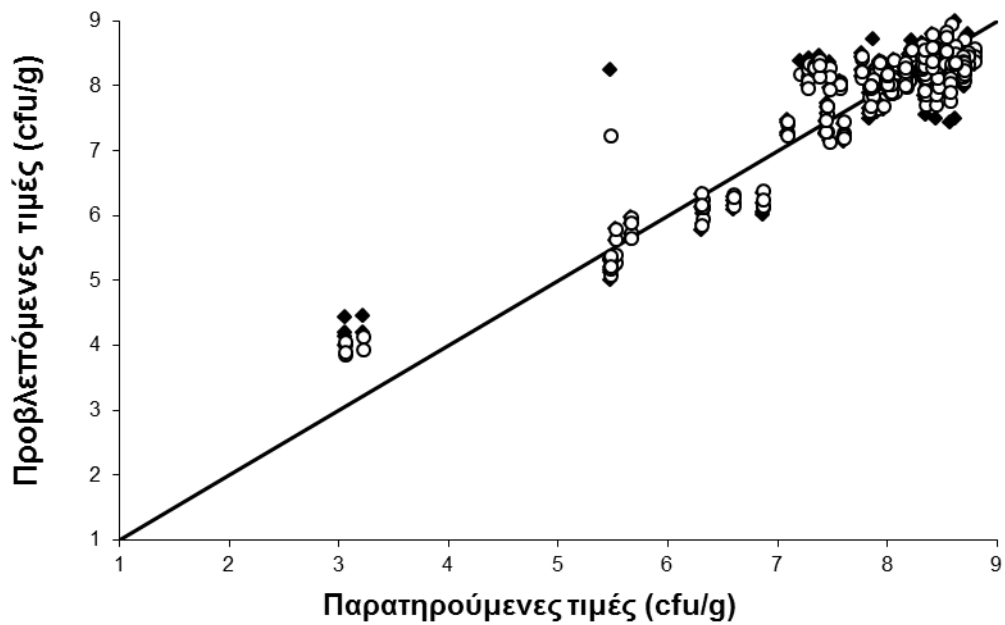
SAMPLES	Parameter	Bf	Af	RMSE	R <sup>2</sup>	20%Re	10%Re
Z	pH	1.000646	1.017172	0.127675	0.891873	100	100
Z	MRS	1.01002	1.09659	0.743269	0.658591	92.21311	72.95082
Z	M17	1.004291	1.050979	0.481616	0.814044	97.05882	91.17647
Z	PCA	1.02706	1.128806	1.216698	0.350696	94.67213	80.7377
Z	RBC	1.025471	1.192587	0.815239	0.423765	74.36975	45.37815
Z0%	pH	1.000404	1.027471	0.192606	0.807265	100	100
Z0%	MRS	1.006647	1.082139	0.653352	0.722825	95.1417	77.32794
Z0%	M17	1.019066	1.125855	1.123759	0.375711	94.44444	73.50427
Z0%	PCA	1.002416	1.055909	0.513552	0.766538	99.57265	87.60684
Z0%	RBC	1.017879	1.234116	0.837695	0.248696	63.67521	35.47009
Z1%	pH	1.000687	1.020592	0.145418	0.872665	100	100
Z1%	MRS	1.006076	1.07496	0.602686	0.777919	98.38057	82.18623
Z1%	M17	1.005164	1.061223	0.540456	0.767392	98.38057	89.06883
Z1%	PCA	1.003021	1.051775	0.46053	0.813626	98.32636	93.30544
Z1%	RBC	1.012795	1.213822	0.644041	0.298934	64.01674	31.79916
ZP	pH	0.999341	1.027922	0.200564	0.860539	100	100
ZP	MRS	1.046512	1.243485	1.082114	0.765513	69.26407	38.09524
ZP	M17	1.027559	1.301703	1.304563	0.671297	63.82114	41.05691
ZP	PCA	1.067801	1.285104	1.302446	0.693083	69.69697	46.32035
ZP	RBC	1.006644	1.079379	0.286342	0.11559	92.64069	75.75758
ZP0%	pH	1.000905	1.029408	0.221514	0.793813	100	100
ZP0%	MRS	1.011169	1.128888	0.768627	0.839667	89.7541	64.34426
ZP0%	M17	1.016012	1.125202	0.766942	0.829987	89.34426	65.16393
ZP0%	PCA	1.017627	1.145923	0.871134	0.798704	83.19672	56.14754
ZP0%	RBC	1.001339	1.023098	0.117146	0.323277	98.67257	96.90265
ZP1%	pH	1.000304	1.027452	0.20074	0.824046	100	98.76543
ZP1%	MRS	1.028749	1.219274	1.030807	0.734214	75.10917	46.72489
ZP1%	M17	1.024516	1.181709	0.974073	0.716798	81.65939	55.8952
ZP1%	PCA	1.022453	1.181632	0.986911	0.713077	77.72926	57.20524
ZP1%	RBC	1.000309	1.029204	0.10017	0.112314	100	96.94323



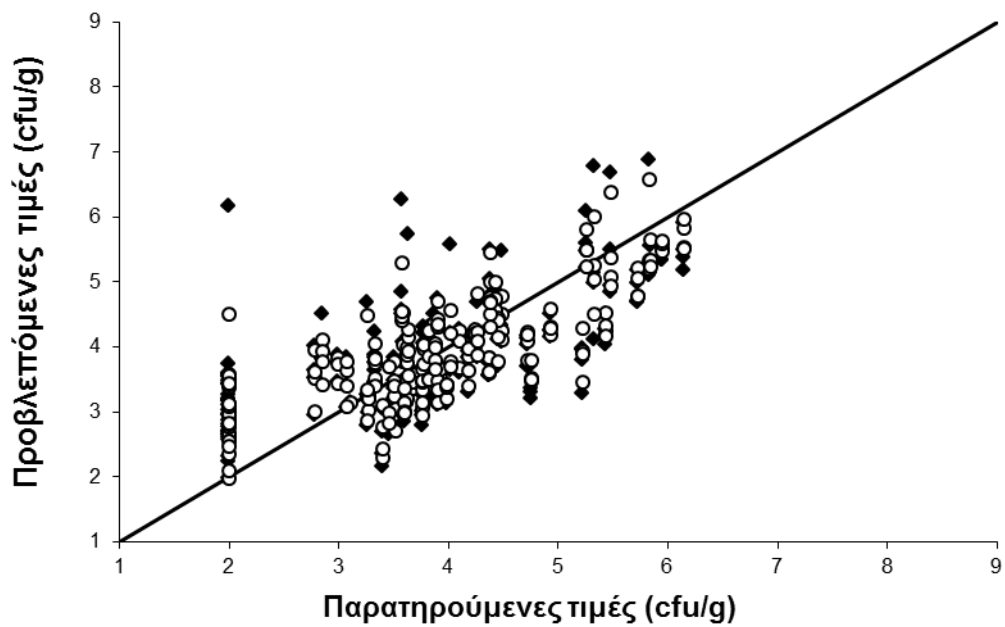
Διάγραμμα 54: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της ολικής μικροβιακής χλωρίδας του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης)



Διάγραμμα 55: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των γαλακτικών βακτηρίων του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης)

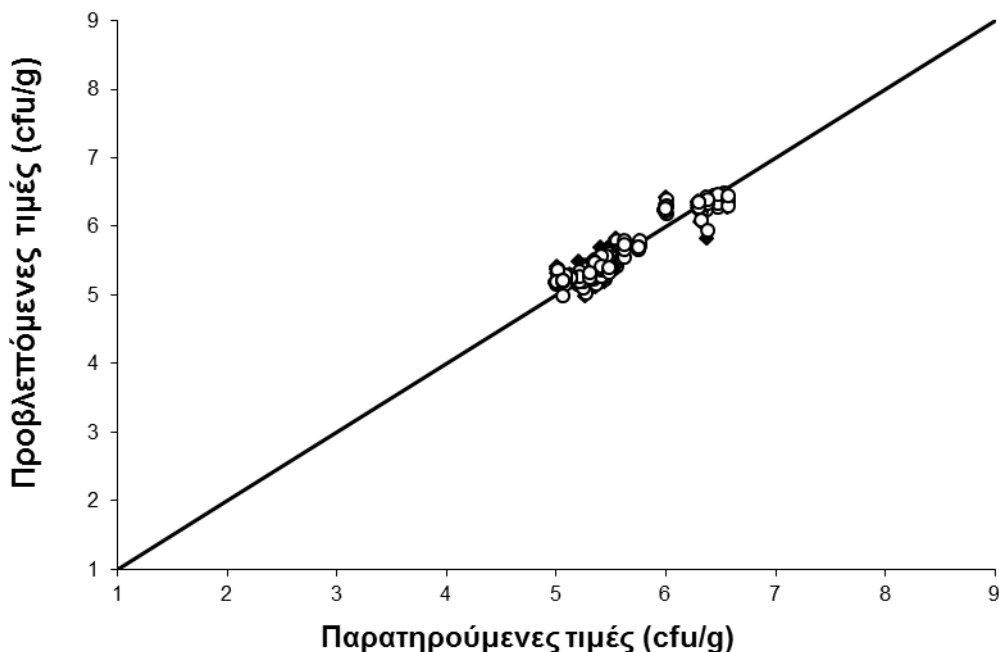


Διάγραμμα 56: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των στρεπτόκοκκων του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης)



Διάγραμμα 57: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των ζυμών-μυκήτων του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης)





Διάγραμμα 58: Σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών του pH του μάρτυρα (Z) από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης)

Γραφήματα για την σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών δεδομένων των υπόλοιπων περιπτώσεων (Z0%, Z1%, ZP, ZP0%, ZP1%) παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2.

### 3.6.1. Αξιολόγηση της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση των δεδομένων προκειμένου να ταξινομηθούν τα δείγματα ζαμπόν κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε κλάσεις ποιότητας σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε πίνακες διπλής εισόδου, όπου φαίνεται η ταξινόμηση των δειγμάτων ζαμπόν στις τρεις προκαθορισμένες κατηγορίες ποιότητας (φρέσκο-fresh, σχετικά φρέσκο-semi fresh, αλλοιωμένο-spoiled).

Η ακρίβεια της ταξινόμησης (ευαισθησία-sensitivity) καθορίστηκε από τον αριθμό των σωστών προβλέψεων σε κάθε κατηγορία ποιότητας διαιρεμένο με τον συνολικό αριθμό των δειγμάτων που βρίσκονταν σε αυτή τη κατηγορία όπως και με

το σωστό αριθμό ταξινομήσεων (ακρίβεια της πρόβλεψης-accuracy) και στις 3 κλάσεις προς τον συνολικό αριθμό δειγμάτων.

Πίνακας 5: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση του μάρτυρα (Z), όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				SENSITIVITY(%)
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	
FRESH	144	112	30	2	<b>77.8</b>
SEMI FRESH	51	9	38	4	<b>74.5</b>
SPOILED	43	0	22	21	<b>48.8</b>
SUM	<b>238</b>	<b>121</b>	<b>90</b>	<b>27</b>	
				ACCURACY(%)	<b>71.8</b>

Πίνακας 6: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση του μάρτυρα (Z), όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				SENSITIVITY(%)
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	
FRESH	73	63	9	1	<b>86.3</b>
SEMI FRESH	110	14	89	7	<b>80.9</b>
SPOILED	55	0	12	43	<b>78.2</b>
SUM	<b>238</b>	<b>77</b>	<b>110</b>	<b>51</b>	
				ACCURACY(%)	<b>81.9</b>

Πίνακας 7: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση του μάρτυρα (Z), όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				SENSITIVITY(%)
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	
FRESH	159	134	25	0	<b>84.3</b>
SEMI FRESH	63	4	59	0	<b>93.7</b>
SPOILED	16	0	9	7	<b>43.8</b>
SUM	<b>238</b>	<b>138</b>	<b>93</b>	<b>7</b>	
				ACCURACY(%)	<b>84.0</b>

Βλέπουμε στους πίνακες 4-6 πως η PLS-R στην περίπτωση του μάρτυρα (Z) έδωσε τη χειρότερη ακρίβεια ταξινόμησης (sensitivity) για τα αλλοιωμένα δείγματα (48,8% για την οσμή, 78,2% για την γεύση και μόλις 43,8% για την εμφάνιση) και

τις καλύτερες για τα φρέσκα δείγματα. Καλύτερη ακρίβεια πρόβλεψης (accuracy) σημειώθηκε για την εμφάνιση. Πρέπει πάντως να τονιστεί πως κανένα αλλοιωμένο δείγμα δεν ταξινομήθηκε ως φρέσκο, ενώ το αντίθετο συνέβη μόλις με 3 δείγματα επί του συνόλου δειγμάτων του μάρτυρα, υποδεικνύοντας πως τα φάσματα που λαμβάνονται με το FTIR μπορούν να δώσουν βιοχημικά αποτυπώματα ικανά να ξεχωρίσουν με μεγάλη ακρίβεια τις δύο αυτές κατηγορίες ποιότητας.

Οι πίνακες διπλής εισόδου των οργανοληπτικών των υπόλοιπων περιπτώσεων (Z0%, Z1%, ZP,ZP0%, ZP1%), αλλά και των κατηγοριών (ALL, PRESSED, NON PRESSED) παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2. Παρατηρούμε ότι γενικά, καλύτερη ακρίβεια ταξινόμησης (sensitivity) είχε η κατηγορία φρέσκων δειγμάτων και χειρότερη η κατηγορία αλλοιωμένων δειγμάτων. Καλύτερη ακρίβεια πρόβλεψης (accuracy) σημειώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις για την εμφάνιση.

### **3.7. Αποτελέσματα Χρωματομετρίας**

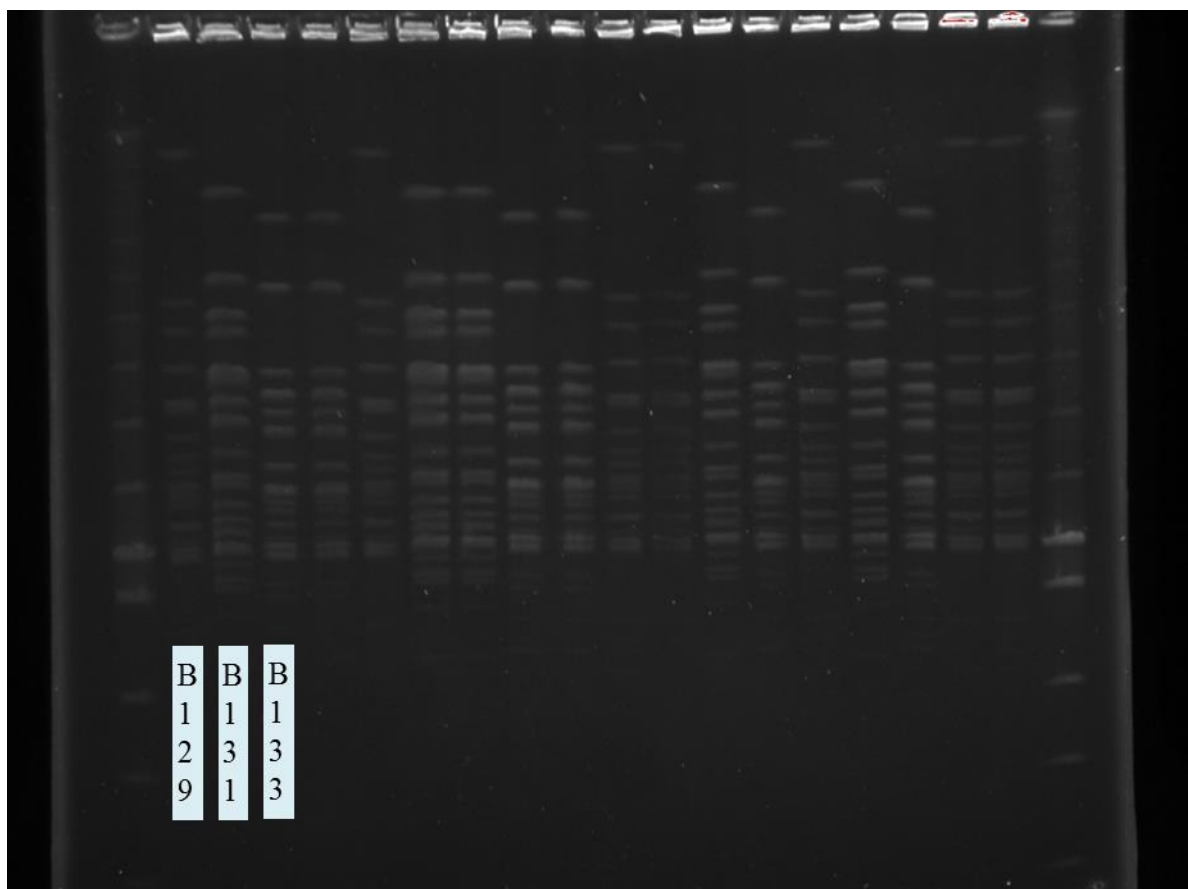
Μετά από κάθε δειγματοληψία και παράλληλα με την φασματομετρία, γίνονταν αναλύσεις χρώματος για κάθε δείγμα με χρωματόμετρο Minolta. Σε κάθε δείγμα αντιστοιχούσαν 5 μετρήσεις. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ φρέσκων και αλλοιωμένων δειγμάτων, ούτε μεταξύ πιεσμένων-απίεστων ή με/χωρίς έλαιο. Ακόμα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο χρώμα των δειγμάτων στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7 .

Πίνακας 8: Αποτελέσματα χρωματομετρίας για τα δείγματα ζαμπόν σε τρεις θερμοκρασίες συντήρησης.

Κωδικός	Παράμετρος Χρώματος	Αρ. Δειγματοληψίας									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Z 4C	L	67.287	68.14375	68.303	69.069	69.159	67.43325	67.92875	68.149	67.77675	69.63525
	a	14.088	13.93475	15.416	13.501	13.943	14.33175	15.04875	14.45225	14.826	15.317
	b	11.504	11.7375	10.628	11.129	12.041	10.61125	10.4025	10.7485	10.545	11.1645
Z0% 4C	L	67.8565	69.43625	68.561	69.53025	69.025	68.61175	69.02525	68.0145	69.38	69.28275
	a	13.9725	13.6425	14.602	13.7585	14.1774	13.536	13.64075	14.4475	13.97125	14.9405
	b	12.185	12.9725	11.795	12.494	12.152	12.539	11.75625	11.2345	12.13625	11.146
Z1% 4C	L	66.9385	67.9075	66.936	67.467	69.607	67.73425	68.123	68.606	67.07475	68.83675
	a	14.347	14.76125	17.085	16.264	13.76	15.5855	16.134	14.18275	15.6035	15.10825
	b	12.6205	12.594	12.352	12.438	11.274	12.2865	11.83975	13.10125	12.95575	12.79
ZP 4C	L	68.03125	68.778	68.423	68.4625	69.475	68.58375	68.379	68.958	68.948	71.201
	a	13.27375	13.77325	14.7825	12.91	13.259	14.4295	13.803	14.2	14.057	14.592
	b	11.695	11.8705	11.73425	12.2125	11.495	11.23475	11.633	11.127	11.364	11.128
ZP0% 4C	L	67.61	67.8525	67.6655	67.23	66.14	67.737	68.29	69.899	67.459	69.6015
	a	13.77125	14.3175	14.52025	14.0075	16.305	14.776	14.46325	13.727	14.878	13.82225
	b	11.7675	11.85	11.4215	11.77875	11.803	11.808	11.93225	11.18675	11.61525	11.64225
ZP1% 4C	L	68.825	66.71275	67.59525	68.527	67.70475	67.35	66.5625	66.54675	66.662	67.6495
	a	13.337	14.92025	15.39575	14.66925	14.489	13.563	15.63375	15.506	16.407	16.2035
	b	12.218	12.2275	11.6495	11.817	12.377	12.136	11.64875	12.45075	12.529	12.2495
Z 8C	L	67.89225	67.085	68.6	69.4245	69.2325	69.08125	68.123	67.611	68.346	67.267
	a	14.3885	15.489	14.136	14.3475	13.89375	13.93	14.99825	14.142	13.91275	15.379
	b	11.03225	10.85	10.814	11.0695	11.295	10.97875	10.86475	10.735	10.94175	10.291
Z0% 8C	L	68.993	69.28125	68.41025	69.1275	69.5505	68.812	69.222	68.671	70.2415	68.93
	a	14.213	14.36125	14.31425	13.445	13.711	14.936	13.781	13.928	13.54	13.7735
	b	11.829	11.5875	11.87925	12.735	12.24875	10.987	12.062	11.587	11.32325	11.53175
Z1% 8C	L	66.183	67.735	65.5035	67.503	66.8475	68.381	67.08625	66.07625	66.357	67.04
	a	16.78575	15.475	16.241	15.865	17.846	14.305	16.72625	16.4815	17.11575	15.964
	b	13.32975	12.936	13.6125	12.169	12.7255	12.887	11.91675	11.722	11.768	11.678
ZP 8C	L	68.119	68.37125	68.76425	68.4635	67.41125	68.305	68.687	68.97575	68.312	68.5495
	a	13.475	15.04625	13.51875	12.963	14.42625	14.189	13.791	12.8775	14.437	14.78025
	b	11.588	10.63625	11.72	12.38975	11.59625	11.233	11.303	12.00575	10.872	11.085
ZP0% 8C	L	66.30275	68.13767	69.79725	67.5635	66.5	67.134	67.1425	67.243	68.779	69.61
	a	16.2135	15.26633	13.928	15.21975	16.0225	14.47	15.42525	14.733	14.829	13.78675
	b	12.16875	11.19333	12.065	11.2	12.25	11.47	12.2205	11.16475	10.9315	11.43575
ZP1% 8C	L	66.8295	67.249	66.8185	67.168	66.948	67.2655	68.03475	67.45075	67.58225	66.5165
	a	14.446	14.262	14.47275	14.201	15.058	13.9415	14.466	14.662	14.86125	15.344
	b	13.0995	11.692	12.69775	12.419	11.724	12.07425	12.39025	12.475	11.42075	11.53175
Z 12C	L	67.608	68.61	68.422	69.26775	68.862	69.555	68.083	67.934	68.707	69.287
	a	13.888	13.80125	14.19025	13.655	13.6005	13.665	14.754	15.424	13.3865	13.326
	b	10.797	11.02625	11.06625	11.5735	11.1365	11.8475	10.757	10.102	10.74875	10.427
Z0% 12C	L	67.67	67.213	68.96825	68.327	68.9315	69.829	69.374	70.125	68.345	68.263
	a	13.78625	14.73825	14.779	13.995	14.0275	13.6715	13.783	13.281	14.248	14.668
	b	12.665	13.01975	11.60075	11.777	11.7555	11.87425	12.054	11.523	11.409	11.196
Z1% 12C	L	67.585	68.176	67.47	67.90175	66.951	66.54625	65.767	68.785	67.192	67.4285
	a	14.362	14.931	15.872	15.43725	15.762	16.25625	15.203	15.22925	15.2645	15.014
	b	12.817	13.302	12.889	13.33375	12.859	11.9725	13.445	12.98425	12.85425	12.35775
ZP 12C	L	68.067	68.658	67.736	68.454	68.3765	69.963	68.895	68.0345	69.6725	69.7165
	a	13.437	13.965	13.882	14.777	14.401	13.717	14.8255	15.8915	13.24875	13.08825
	b	11.62575	11.526	11.553	10.519	11.45925	10.945	10.9725	10.57525	11.3025	11.4445
ZP0% 12C	L	67.6295	68.61025	68.29125	67.599	68.464	68.89	69.402	68.777	67.085	69.5675
	a	14.08675	14.377	14.6995	15.16075	14.445	14.396	14.19375	15.59	15.965	13.01625
	b	11.2365	11.42975	11.73625	11.39	11.92	11.46825	11.52675	10.483	11.633	11.025
ZP1% 12C	L	69.14	66.64225	67.25625	68.105	68.805	67.6275	67.635	66.18	67.19	66.487
	a	12.08	14.87275	14.3845	13.801	13.6725	13.70375	14.092	16.4565	15.076	13.848
	b	11.186	12.67475	12.44725	12.074	12.33875	12.46875	11.701	11.88375	12.904	12.945

### 3.8. Αποτελέσματα Ηλεκτροφόρησης Αγαρόζης Εναλλασσόμενου Πεδίου (PFGE)

Αποικίες *Listeria monocytogenes* απομονώθηκαν από την αρχή, τη μέση και το τέλος της συντήρησης στους 4, 8 και 12°C για κάθε μία από τις 6 περιπτώσεις (Z, Z0%, Z1% ZP, ZP0%, ZP1%). Κατά κανόνα απομονωνόνταν το 20% των αποικιών των επιλεγμένων τρυβλίων (περίπου 20 αποικίες). Η μοριακή ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της PFGE, σύμφωνα με τους Doulgeraki et al., 2010. (Παράρτημα 4, πρωτόκολλο PFGE). Μετά το τέλος της διαδικασίας, που διαρκούσε 8 ημέρες, λαμβάναμε φωτογραφία του gel αγαρόζης (εικόνα 19). Μετά από σύγκριση με τα πρότυπα στελέχη *L. monocytogenes* (B129, B131, B133), γινόταν καταμέτρηση κάθε στελέχους.



Εικόνα 10: Φωτογραφία gel αγαρόζης όπου διακρίνονται τα τρία στελέχη *L. monocytogenes* (B129, B131, B133).

Η παρουσία των τριών στελεχών στην αρχή, τη μέση και το τέλος της συντήρησης για κάθε θερμοκρασία παρουσιάζεται με ποσοστά στους Πίνακες 8-10. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια διαφοροποίηση στην παραλλακτικότητα των στελεχών μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων. Συγκεκριμένα, το στέλεχος B129 ήταν το κυρίαρχο στα απίεστα δείγματα και το στέλεχος B131 στα πιεσμένα δείγματα. Το ίδιο συμπέρασμα βγήκε από όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης. Παρατηρούμε ότι

στο τέλος συντήρησης στους 4°C κανένα στέλεχος *Listeria monocytogenes* δεν έχει επιβιώσει. Στους 8 και 12°C μόνο ο συνδυασμός υπερυψηλής πίεσης και αιθερίου ελαίου ρίγανης (ZP1%) ήταν ικανός να εξαλείψει το παθογόνο στο τέλος της διάρκειας συντήρησης.

Πίνακας 9: Ποσοστά παρουσίας των 3 στελεχών *L. monocytogenes* (129, 131, 133) σε δείγματα ζαμπόν, στην αρχή, μέση και το τέλος συντήρησης στους 4°C.

Κωδικός	Στέλεχος	Αρχή	Μέση	Τέλος
<b>Z</b>	<b>129</b>	41.9	40	33.3
	<b>131</b>	22.6	26.7	33.3
	<b>133</b>	35.5	33.3	33.3
<b>Z0%</b>	<b>129</b>	41.9	35.3	28.6
	<b>131</b>	22.6	29.4	21.4
	<b>133</b>	35.5	45.5	28.6
<b>Z1%</b>	<b>129</b>	41.9	58.3	100
	<b>131</b>	22.6	16.7	0
	<b>133</b>	35.5	25	0
<b>ZP</b>	<b>129</b>	6.3	25	0
	<b>131</b>	93.8	75	0
	<b>133</b>	0	0	0
<b>ZP0%</b>	<b>129</b>	5.9	16.7	0
	<b>131</b>	94.1	83.3	0
	<b>133</b>	0	0	0
<b>ZP1%</b>	<b>129</b>	5.9	0	0
	<b>131</b>	94.1	0	0
	<b>133</b>	0	0	0

Πίνακας 10: Ποσοστά παρουσίας των 3 στελεχών *L. monocytogenes* (129, 131, 133) σε δείγματα ζαμπόν, στην αρχή, μέση και το τέλος συντήρησης στους 8°C.

Κωδικός	Στέλεχος	Αρχή	Μέση	Τέλος
<b>Z</b>	<b>129</b>	41.9	60	47.1
	<b>131</b>	22.6	13.3	23.5
	<b>133</b>	35.5	26.7	29.4
<b>Z0%</b>	<b>129</b>	41.9	45.5	64.3
	<b>131</b>	22.6	9.1	7.1
	<b>133</b>	35.5	45.5	28.6
<b>Z1%</b>	<b>129</b>	41.9	35	28.6
	<b>131</b>	22.6	20	21.4
	<b>133</b>	35.5	45	50
<b>ZP</b>	<b>129</b>	5.9	28.6	0
	<b>131</b>	94.1	57.1	100
	<b>133</b>	0	14.3	0
<b>ZP0%</b>	<b>129</b>	5.9	25	0
	<b>131</b>	94.1	75	100
	<b>133</b>	0	0	0
<b>ZP1%</b>	<b>129</b>	5.9	0	0
	<b>131</b>	94.1	100	0
	<b>133</b>	0	0	0

Πίνακας 11: Ποσοστά παρουσίας των 3 στελεχών *L. monocytogenes* (129, 131, 133) σε δείγματα ζαμπόν, στην αρχή, μέση και το τέλος συντήρησης στους 12°C.

Κωδικός	Στέλεχος	Αρχή	Μέση	Τέλος
<b>Z</b>	<b>129</b>	41.9	47.6	53.3
	<b>131</b>	22.6	4.8	13.3
	<b>133</b>	35.5	47.6	33.3
<b>Z0%</b>	<b>129</b>	41.9	36.4	31.3
	<b>131</b>	22.6	18.2	12.5
	<b>133</b>	35.5	45.5	56.3
<b>Z1%</b>	<b>129</b>	41.9	43	43.8
	<b>131</b>	22.6	21.4	18.8
	<b>133</b>	35.5	35.7	37.5
<b>ZP</b>	<b>129</b>	5.9	8.3	0
	<b>131</b>	94.1	83.3	100
	<b>133</b>	0	8.3	0
<b>ZP0%</b>	<b>129</b>	5.9	21.4	100
	<b>131</b>	94.1	78.6	0
	<b>133</b>	0	0	0
<b>ZP1%</b>	<b>129</b>	5.9	0	0
	<b>131</b>	94.1	100	0
	<b>133</b>	0	0	0

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η Υπερυψηλή Πίεση αποτελεί ένα αποτελεσματικό, μη θερμικό μέσο επεξεργασίας, το οποίο βελτιώνει την ασφάλεια και την διάρκεια ζωής των τροφίμων. Ως τεχνολογία αναπτύχθηκε σαν αποτέλεσμα της αυξανόμενης ζήτησης των καταναλωτών για προϊόντα πιο φυσικά, φρέσκα και θρεπτικά, τα οποία έχουν δεχτεί ελάχιστη επεξεργασία και προσθήκη συντηρητικών. Με τη μέθοδο αυτή τα τρόφιμα υποβάλλονται σε πιέσεις της τάξεως των 100-1000 MPa σε θερμοκρασίες που μπορεί να κυμαίνονται κάτω των 0°C ή άνω των 100°C (Yaldagard et al., 2008). Πλεονεκτεί έναντι της θερμικής επεξεργασίας, καθώς ελαχιστοποιεί τις αρνητικές αλλαγές στη γεύση, στο ιξώδες, στην εμφάνιση και στην θρεπτική αξία των τροφίμων (Hsu et al., 2014).

Στο Α προκαταρκτικό πείραμα, όπου εξετάστηκαν 4 συνθήκες πίεσης-χρόνου (300 MPa/2 λεπτά, 300 MPa/5 λεπτά, 400 MPa/2 λεπτά, 500 MPa/5 λεπτά) σε μοσχαρίσιο κιμά και χοιρινό σουβλάκι, βρέθηκε ότι μόνο η συνθήκη 300 MPa για 2 λεπτά ήταν σχετικά αποδεκτή ως προς το χρώμα των προϊόντων. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις, τα προϊόντα απέκτησαν ένα ωχρό χρώμα, που κρίθηκε ακατάλληλο από το σύνολο του πάνελ αξιολόγησης. Και άλλες μελέτες έχουν αναφέρει παρόμοια μεταβολή στο χρώμα των τροφίμων μετά από εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης. Οι Carlez et al., το 1993 ανέφεραν μερικό αποχρωματισμό σε μοσχαρίσιο κιμά σε πιέσεις άνω των 150 MPa και πρότειναν ότι επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος, όπως λουκάνικα, μπορεί να έχουν καλύτερο χρώμα με την εφαρμογή πίεσης από το νωπό κρέας. Σε άλλη μελέτη, οι Carlez et al., (1995) αναφέρουν ότι το κόκκινο χρώμα μοσχαρίσιου κιμά μετατράπηκε σε χλωμό ροζ με την εφαρμογή πιέσεων μεταξύ 200-350 MPa. Αυτός ο αποχρωματισμός που σημειώθηκε ως αποτέλεσμα της πίεσης, αποδόθηκε στην μετουσίωση της αιμοσφαιρίνης ή/και σε μετατόπιση ή απελευθέρωση της αίμης ή ακόμα σε οξειδωση της υποσιδηρούχας (ferrous) μυοσφαιρίνης σε σιδηρούχα (ferric), σε πιέσεις άνω των 400 MPa.

Η επίδραση της υπερυψηλής πίεσης στο χρώμα, όσον αφορά στο νωπό κρέας, θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με ζεμάτισμα του κρέατος για συγκεκριμένο χρόνο (λίγα δευτερόλεπτα), δεδομένου ότι το ζεμάτισμα επιφέρει μια αντιστρεπτή μεταβολή του χρώματος. Στη συνέχεια στο κρέας θα μπορεί να εφαρμοστεί πίεση ώστε να επιτευχθεί μείωση του μικροβιακού πληθυσμού, αλλά και διατήρηση του χρώματος του προϊόντος.

Στην παρούσα μελέτη, η εφαρμογή πίεσης 500 MPa για 2 λεπτά σε φέτες ζαμπόν επικαλυμμένες με εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου δεν έδειξε να επιφέρει κάποια αλλαγή στο χρώμα, όπως φάνηκε από τις παραμέτρους  $L^*$ ,  $a^*$  και  $b^*$ . Ακόμα, τα αποτελέσματα της χρωματομετρίας δεν έδειξαν διαφορές στο χρώμα μεταξύ των φρέσκων και των αλλοιωμένων δειγμάτων, ή εκείνων που είχαν μεμβράνες με έλαιο, μεμβράνες χωρίς έλαιο ή καθόλου μεμβράνες. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στο χρώμα των δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Παρόμοιες μελέτες σε ζαμπόν εντόπισαν μικρές



διαφορές στο χρώμα μεταξύ των πιεσμένων και των απίεστων δειγμάτων. Οι Alba et al., το 2012, εφάρμοσαν πίεση 400, 500 και 600 MPa (για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 12°C) σε ζαμπόν συντηρημένο στους 8°C υπό κενό και βρήκαν μικρές διαφορές στο χρώμα σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Η φωτεινότητα ( $L^*$ ), η ερυθρότητα ( $a^*$ ) και η κίτρινη χροιά ( $b^*$ ) ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένες στα πιεσμένα δείγματα ζαμπόν σε σύγκριση με τα απίεστα. Παρατήρησαν ακόμα ότι οι ημέρες συντήρησης επηρέασαν και τις τρεις χρωματικές παραμέτρους, οι οποίες είχαν χαμηλότερες τιμές στο τέλος της συντήρησης. Οι Clariana et al., το 2011, βρήκαν ότι η ένταση του χρώματος σε ζαμπόν μειώθηκε μετά από πίεση 600 MPa για 6 λεπτά, ενώ σημειώθηκε αύξηση της παραμέτρου  $L^*$ . Βρήκαν επίσης ότι η παράμετρος  $b^*$  δεν επηρεάστηκε από την πίεση, ενώ και οι δύο παράμετροι  $L^*$  και  $b^*$  δεν μεταβλήθηκαν με τις ημέρες συντήρησης. Όσον αφορά στην ερυθρότητα ( $a^*$ ), έδειξε να αυξάνεται με την πίεση και τις ημέρες συντήρησης. Απέδωσαν το τελευταίο αποτέλεσμα στην προστατευτική δράση που μπορεί να ασκεί η πίεση στην νιτροζυλομοσφαιρίνη (nitrosylmyoglobin), χρωστική υπεύθυνη για το χρώμα των επεξεργασμένων κρεάτων. Τέλος, οι Fuentes et al., (2014), έδειξαν ότι η παράμετρος της φωτεινότητας ( $L^*$ ) αυξήθηκε μετά από πίεση 600 MPa (για 6 λεπτά στους 12°C) σε ζαμπόν συσκευασμένο υπό κενό και συντηρημένο στους 2°C, ενώ η τιμή της μειώθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Αντίθετα, βρήκαν ότι οι τιμές των παραμέτρων  $a^*$  και  $b^*$  έδειξαν στατιστικώς σημαντική μείωση στο τέλος της συντήρησης.

Η υπερυψηλή πίεση μειώνει το μικροβιακό φορτίο των τροφίμων επιφέροντας αλλαγές στην κυτταρική μεμβράνη, μειώνοντας την κυτταρική βιωσιμότητα (διάσταση ριβοσωμάτων) και προκαλώντας βλάβη της δομής του κυττάρου ή καταστροφή του (Hsu et al., 2014). Από τα αποτελέσματα του Α προκαταρκτικού πειράματος, φάνηκε να υπάρχει μια μεγάλη μείωση στον πληθυσμό της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX), των γαλακτικών βακτηρίων, των εντεροβακτηρίων, των ψευδομονάδων και του *Brochothrix thermosphacta* την ημέρα 0 στον μοσχαρίσιο κιμά και στο χοιρινό σουβλάκι, σε σύγκριση με τον μάρτυρα (την ημέρα 0, η OMX ήταν χαμηλότερη κατά 2 λογάριθμους στο πιεσμένο χοιρινό σουβλάκι και κατά 2,5 λογάριθμους στον μοσχαρίσιο κιμά σε σχέση με τον μάρτυρα). Η μεγαλύτερη πίεση (500 MPa για 5 λεπτά) επέφερε την μεγαλύτερη μείωση στους μικροβιακούς πληθυσμούς. Η διαφορά μεταξύ των πιεσμένων δειγμάτων και του μάρτυρα έτεινε προς εξάλειψη με την πάροδο των ημερών συντήρησης. Η πρώτη αναφορά για εμπορικό, επεξεργασμένο με υπερυψηλή πίεση τρόφιμο, έγινε το 1991 από τους Horie et al., με μαρμελάδες φρούτων σε εργοστάσιο της Ιαπωνίας, οι οποίοι ανέφεραν μείωση του βακτηριακού πληθυσμού και των ζυμών σε μαρμελάδα φράουλα (294 MPa για 20 λεπτά). Σε εκτεταμένη βιβλιογραφική μελέτη τους, οι Yaldagard et al., (2008) αναφέρουν ότι μελέτες εφαρμογής υπερυψηλής πίεσης σε μοσχαρίσιο κιμά και κοτόπουλο έδειξαν μείωση της OMX και επέκταση της διάρκειας ζωής, αντίστοιχα. Ακόμα, αναφέρουν ότι παρατηρήθηκε αδρανοποίηση των ψευδομονάδων και της *L. monocytogenes* σε πιεσμένο κιμά. Οι Clariana et al., το 2011 αναφέρουν σημαντική μείωση της OMX σε πιεσμένο ζαμπόν (600 MPa για 6

λεπτά) και μείωση των εντεροβακτηρίων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Σημειώνουν ωστόσο, ότι οι μικροβιακοί πληθυσμοί μπορεί να αυξηθούν κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

Στο Β προκαταρκτικό πείραμα, η κιμαδοποίηση μοσχαρίσιου κρέατος στο οποίο είχε εφαρμοστεί πίεση 300 MPa για 2 λεπτά, οδήγησε στην παραγωγή κιμά με μη επιθυμητή δομή και χρώμα. Ο κιμάς θύμιζε περισσότερο κρεατόπαστα και το χρώμα του κρίθηκε απορριπτέο από το σύνολο του πάνελ αξιολόγησης, λόγω της ωχρότητάς του. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται σε μεταβολή της δομής του κρέατος από την πίεση. Οι Picouet et al., (2012) παρατήρησαν μείωση του περιεχομένου του ζαμπόν σε νερό με την αύξηση της πίεσης από τα 300 στα 900 MPa σε σύγκριση με τον μάρτυρα. Βρήκαν ακόμη ότι η πίεση επηρέασε τη δομή του ζαμπόν προκαλώντας μετουσίωση της εσωτερικής δομής των μυικών ινών και συσσωμάτωση των μυικών πρωτεϊνών. Οι Clariana et al., (2011) αναφέρουν αύξηση της σκληρότητας και της μασητικότητας σε πιεσμένο ζαμπόν (600 MPa για 6 λεπτά). Απέδωσαν την αύξηση αυτή σε αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών, ως αποτέλεσμα της υπερυψηλής πίεσης, οι οποίες συνδέονται με αλλαγές στις αποστάσεις μεταξύ των αδύναμων ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων, όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών-νερού.

Αλλαγή στη δομή ζαμπόν και γαλοπούλας με την πίεση παρατηρήθηκε και στο Γ προκαταρκτικό πείραμα, όπου 7 διαφορετικές συνθήκες πίεσης-χρόνου (300 MPa/5', 400 MPa/2', 400 MPa/5', 500 MPa/2', 500 MPa/5', 500 MPa/10', 600MPa/2') εξετάστηκαν ως προς την επίδρασή τους στον διαχωρισμό των φετών, την αρτιότητα των προϊόντων μετά το χειρισμό και τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο διαχωρισμός των φετών εξαρτάται όχι μόνο από το ύψος της πίεσης που εφαρμόζεται, αλλά και από το χρόνο παραμονής τους στην πίεση. Έτσι, ενώ στα 600 MPa για 2 λεπτά ο διαχωρισμός των φετών και στα δύο προϊόντα ήταν καλός, στα 500 MPa για 10 λεπτά οι φέτες διαλύονταν και ήταν πολύ δύσκολος ο διαχωρισμός τους. Ακόμα, σε όλες τις συνθήκες, εκτός των 300 MPa για 5 λεπτά, βρέθηκε αυξημένη υγρασία στη συσκευασία των προϊόντων, υποδεικνύοντας πιθανή απώλεια νερού λόγω πίεσης. Το ζαμπόν ανταποκρίθηκε καλύτερα στην πίεση από την γαλοπούλα, βάσει του διαχωρισμού και της αρτιότητας των φετών. Ένας επιπλέον λόγος που οδήγησε στην επιλογή του ζαμπόν ήταν ότι βιβλιογραφικά στοιχεία καταδείκνυαν ότι αλλαντικά όπως τα λουκάνικα ή το ζαμπόν μπορεί να έχουν καλύτερο χρώμα με την εφαρμογή πίεσης από ότι το νωπό κρέας (Carlez et al., 1993).

Σε όλα τα προκαταρκτικά πειράματα με εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης και στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση της τιμής του pH στα πιεσμένα δείγματα σε σχέση με τα απίεστα. Την αύξηση του pH με την πίεση αναφέρουν και άλλες μελέτες (Samaranayake and Sastry, 2013, Liu et al., 2012).

Στο Δ προκαταρκτικό πείραμα, η προσθήκη υδρολύματος ρίγανης σε εδώδιμες μεμβράνες (συγκεντρώσεις 0,1, 0,5 και 1% v/v), οι οποίες εφαρμόστηκαν σε φέτες

ζαμπόν (συντήρηση στους 4°C υπό κενό), δεν μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes*. Καμία επίδραση του υδρολύματος δεν φάνηκε ούτε στην OMX και τα γαλακτικά βακτήρια που εξετάστηκαν. Στο E προκαταρκτικό πείραμα, το υδρόλυμα αντικαταστάθηκε από αιθέριο έλαιο ρίγανης στις ίδιες συγκεντρώσεις, αλλά αυτή τη φορά με συντήρηση του ζαμπόν στους 20°C για την επιτάχυνση του φαινομένου της αλλοίωσης. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας συντήρησης, δεν φάνηκε η διαφορά που αναμενόταν στην μείωση του παθογόνου *L. monocytogenes* από την προσθήκη ελαίου, επιλέχθηκε παρόλα αυτά η συγκέντρωση 1% ως η πιο αποτελεσματική και κατάλληλη για χρήση στο κυρίως πείραμα. Η υψηλή θερμοκρασία ευνόησε επίσης την ανάπτυξη της OMX και των γαλακτικών βακτηρίων που εξετάστηκαν, με αποτέλεσμα να μην διακρίνεται διαφορά στους μικροβιακούς πληθυσμούς μεταξύ του μάρτυρα και των περιπτώσεων με έλαιο. Η σύγκριση της αντιμικροβιακής αποτελεσματικότητας του υδρολύματος και του αιθέριου ελαίου ρίγανης ενάντια στη *L. monocytogenes* δεν θα ήταν αντικειμενική, γνωρίζοντας ότι τα αιθέρια έλαια είναι αντιμικροβιακώς πιο δραστικά από τα αντίστοιχα υδρολύματά τους και δεδομένου ότι χρησιμοποιήθηκαν ίδιες συγκεντρώσεις για το υδρόλυμα και το αιθέριο έλαιο στα δύο πειράματα. Επιπλέον, η μεγάλη διαφορά στη θερμοκρασία συντήρησης που χρησιμοποιήθηκε δεν βοηθά στην ασφαλή σύγκριση των αποτελεσμάτων. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε τόσο χαμηλή συγκέντρωση υδρολύματος ήταν λόγω της μεγάλης συνολικά ποσότητας που χρειαζόταν για το κυρίως πείραμα, καθιστώντας την συγκέντρωση 1% τη μέγιστη δυνατή που μπορούσε να ενσωματωθεί στις μεμβράνες, ώστε να επαρκέσει υδρόλυμα ποσοτικά, αν καταλήγαμε στη χρήση του ως αντιμικροβιακού παράγοντα.

Τα φυσικά αντιμικροβιακά που προέρχονται από βότανα χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα για να ελέγξουν τις φυσικές διεργασίες αλλοίωσης και να αποτρέψουν ή να ελέγξουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών (Tajkarimi et al., 2010). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες πολλών μπαχαρικών, βοτάνων και εκχυλισμάτων αποδίδονται στα αιθέρια έλαια που περιέχουν (Nychas and Tassou, 2000). Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά προϊόντα με έντονη οσμή, που προέρχονται από διάφορα μέρη των φυτών, ως δευτερογενείς μεταβολίτες (Franz and Novak, 2010). Αποτελούν ισχυρούς αντιμικροβιακούς παράγοντες και γι' αυτό η χρήση τους έχει μελετηθεί διεξοδικώς (Nychas et al., 2003). Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (Burt, 2004, Tajkarimi et al., 2010) και είναι τα συστατικά που του προσδίδουν τις ισχυρές αντιμικροβιακές του ιδιότητες (Burt, 2004, Chorianoopoulos et al., 2004), ενώ το κατατάσσουν στα αιθέρια έλαια με την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα (Tajkarimi et al., 2010). Οι Skandamis et al., (2002) βρήκαν ότι 0,8% συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης μείωσε τον αρχικό πληθυσμό ψευδομονάδων, γαλακτικών βακτηρίων και *Brochothrix thermosphacta* σε κρέας (συντήρηση υπό κενό στους 5°C) κατά 2,5 λογάριθμους περίπου. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την δράση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης ενάντια στο παθογόνο *L. monocytogenes*. Οι Barbosa et al., (2016) βρήκαν ότι η μικρότερη συγκέντρωση ελαίου που ήταν ικανή να αναστείλει την ανάπτυξη του παθογόνου ήταν 0,6 μl/ml, ενώ οι Davidson and Naidu, (2000) βρήκαν ότι το αιθέριο

έλαιο ρίγανης είχε βακτηριοστατική δράση κατά της *L. monocytogenes* σε συγκέντρωση 0,5-1% μl/ml. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαν και οι Smith-Palmer et al., (1998), οποίοι αναφέρουν ως την ελάχιστη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης που προκαλεί παρεμπόδιση της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* τα 0,2 μl/ml. Η Burt (2004) αναφέρει ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης σε προϊόντα κρέατος μπορεί να παρεμποδίσει την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* και της φυσιολογικής μικροχλωρίδας όταν προστεθεί σε επίπεδα 5-20 μl/g.

Τα υδρολύματα από την άλλη, είναι παραπροϊόντα της παραγωγής αιθέριων ελαίων που προκύπτουν μετά από απόσταξη. Έχουν ελαφριά οσμή και η παραγωγή τους είναι πιο οικονομική από αυτή των ελαίων (Tassou et al., 2012). Αν και αρκετοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με τις ιδιότητες των υδρολυμάτων (Chorianopoulos et al., 2008, Sagdic, 2003), υπάρχουν ακόμα λίγες πληροφορίες για την αντιμικροβιακή τους δράση. Οι Tornuk et al., (2011) έδειξαν ότι προσθήκη διαφόρων υδρολυμάτων (θυμαριού, δάφνης, φασκόμηλου, δενδρολίβανου και μαύρου κύμινου) στο νερό πλυσίματος φρέσκων καρότων και μήλων, μείωσαν τον πληθυσμό των παθογόνων *E. coli* O157:H7 και *Salmonella* Typhimurium, ενώ οι Sagdic and Ozcan, (2003) βρήκαν ότι το υδρόλυμα ρίγανης ήταν αποτελεσματικό ενάντια και στα 15 είδη βακτηρίων που εξέτασαν.

Οι εδώδιμες μεμβράνες μπορούν να λειτουργήσουν ως φορείς αντιμικροβιακών παραγόντων, επιτρέποντας την βραδεία απελευθέρωσή τους και εμποδίζοντας κατά συνέπεια την ανάπτυξη αλλοιογόνων ή παθογόνων μικροοργανισμών στην επιφάνεια του τροφίμου (Karpetanakou et al., 2015). Στην παρούσα μελέτη, παρασκευάστηκαν μεμβράνες αλγινικού νατρίου 2% w/v, οι οποίες αποτελούν φραγμούς για το οξυγόνο και την υγρασία, ενώ παράλληλα αποτρέπουν την οξείδωση των λιπών. Σε μελέτη τους οι Zinoviadou et al., (2011) έδειξαν ότι η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης (συγκέντρωση 1,5%) σε μεμβράνες πρωτεϊνών ορού γάλακτος οι οποίες στη συνέχεια τυλίχτηκαν γύρω από κομμάτια μοσχαρίσιου κρέατος, συντέλεσε στη σημαντική μείωση του πληθυσμού των ψευδομονάδων και της OMX καθόλη τη διάρκεια συντήρησης (12 ημέρες στους 5°C) και σε αναστολή της αύξησης των γαλακτικών βακτηρίων. Οι Hosseini et al., (2015) μελέτησαν την επίδραση του αιθέριου ελαίου της ρίγανης ενσωματωμένου σε μεμβράνες από ζελατίνη ψαριών και χιτοζάνη (chitosan) ενάντια τεσσάρων παθογόνων μικροοργανισμών, ανάμεσα στους οποίους ήταν και η *L. monocytogenes* (εμβόλιο 10<sup>6</sup> CFU/ml). Τα αποτελέσματά τους που καθορίστηκαν με τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ, έδειξαν ότι 0,8% w/v συγκέντρωση αιθέριου ελαίου παρεμπόδισε την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, ενώ συγκέντρωση 1,2% w/v είχε μεγαλύτερη παρεμποδιστική δράση (μετά από επώαση 24 ωρών στους 37°C). Η αντιμικροβιακή δράση αποδόθηκε στα τερπενοειδή του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (καρβακρόλη, θυμόλη και *p*-κυμένιο). Συγκεκριμένα, η καρβακρόλη δημιουργεί περάσματα στην κυτταρική μεμβράνη, παραμερίζοντας τις αλυσίδες λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, επιτρέποντας στα ιόντα να εξέλθουν από το κυτταρόπλασμα (Burt, 2004). Ακόμα, η αντιμικροβιακή δράση του ελαίου βρέθηκε μεγαλύτερη ενάντια στα Gram-θετικά βακτήρια που εξετάστηκαν (όπως η

*L. monocytogenes*) απ' ότι στα Gram-αρνητικά. Το αποτέλεσμα αυτό αποδίδεται στην παρουσία της εξωτερικής μεμβράνης που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων, το οποίο περιορίζει τη διάχυση υδρόφοβων ουσιών μέσω των λιποπολυσακχαριτών που το επικαλύπτουν (Burt, 2004). Άλλοι ερευνητές πρόσθεσαν αλκοολούχα ποτά ως αντιμικροβιακό παράγοντα σε εδώδιμες μεμβράνες τις οποίες εφάρμοσαν σε φέτες ζαμπόν και βρήκαν ότι μείωσαν σημαντικά τον πληθυσμό του παθογόνου *L. monocytogenes* (Karpetanakou et al., 2016).

Σύμφωνα με τη θεωρία των εμποδίων του Leistner (1978), ο συνδυασμός μεθόδων συντήρησης έχει καλύτερο αποτέλεσμα από την επίδραση κάθε μεθόδου ξεχωριστά ή από την εφαρμογή υψηλής έντασης μίας μεθόδου. Όσον αφορά στην υπερυψηλή πίεση, οι Oliveira et al., (2015) υποστηρίζουν ότι ο συνδυασμός της πίεσης με φυσικά αντιμικροβιακά κατά την επεξεργασία των τροφίμων μπορεί να επιφέρει ακόμα καλύτερα αποτελέσματα στην ασφάλειά τους. Στην παρούσα μελέτη, η εφαρμογή υπερυψηλής πίεσης σε ζαμπόν εμβολιασμένο με *L. monocytogenes* συνδυάστηκε με εδώδιμες μεμβράνες που περιείχαν αιθέριο έλαιο ρίγανης ως αντιμικροβιακό παράγοντα και συσκευασία κενού. Η πίεση έριξε τον πληθυσμό OMX κατά 1,8 λογάριθμους μέσο όρο στις τρεις θερμοκρασίες συντήρησης και στα γαλακτικά βακτήρια και τους στρεπτόκοκκους κατά 1,5 λογάριθμους, ενώ ανέστειλε την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, του *Brochothrix thermosphacta*, των ψευδομονάδων, των εντεροβακτηρίων και των ζυμών-μυκήτων. Επίδραση του ελαίου φάνηκε μόνο στη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού ζυμών-μυκήτων μεταξύ των απίεστων δειγμάτων (Z, Z0%, Z1%) και στην μείωση των γαλακτικών βακτηρίων στους 8 και 12 °C στα πιεσμένα δείγματα. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα μικροβιολογικά αποτελέσματα, η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* έδειξε να αναστέλεται από την προσθήκη του αιθέριου ελαίου, με μείωση κατά 1-2 λογάριθμους στα απίεστα δείγματα (Z1% σε σύγκριση με Z και Z0%) και στις τρεις θερμοκρασίες συντήρησης και μείωση κατά 1 λογάριθμο στα πιεσμένα δείγματα (ZP1% σε σύγκριση με ZP και ZP0%). Στην περίπτωση όπου πίεση και αιθέριο έλαιο συνδυάστηκαν (ZP1%) σημειώθηκε απουσία του παθογόνου από την 18<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης στους 4°C, την 25<sup>η</sup> ημέρα στους 8°C και την 20<sup>η</sup> ημέρα στους 12°C. Πλήθος μελετών αναφέρουν τα αποτελέσματα του συνδυασμού υπερυψηλής πίεσης και φυσικών αντιμικροβιακών ή ακόμα και εδώδιμων μεμβρανών στην καταπολέμηση του παθογόνου *L. monogytogenes*. Οι Evrendilek and Balasubramaniam, (2011) αναφέρουν αναστολή της ανάπτυξης του παθογόνου σε αριάνι με το συνδυασμό πίεσης 300 MPa για 3,5 λεπτά και αιθέριου ελαίου μέντας (0,1 και 0,05% μl/ml). Προσθήκη εντεροσινών και εφαρμογή πίεσης 400 MPa για 10 λεπτά σε φέτες ζαμπόν συντηρημένου σε θερμοκρασία 1°C επέφερε μείωση της *L. monocytogenes* σε τελικό πληθυσμό 4 MPN/g μετά από 3 μήνες συντήρηση (Marcos et al., 2008). Εφαρμογή πίεσης 400 MPa για 10 λεπτά στους 17°C, σε συνδυασμό με εδώδιμες μεμβράνες αλγινικού νατρίου που περιείχαν εντεροσίνες μείωσε τον πληθυσμό της *L. monocytogenes* σε ζαμπόν κατά 3,4 λογάριθμους, ενώ παρέτεινε τη διάρκεια ζωής του ζαμπόν στις 60 ημέρες (Marcos et al., 2008). Τέλος, οι Hereu et al., (2012) με εφαρμογή πίεσης 600 MPa για 5 λεπτά στους 15°C και προσθήκη

νισίνης σε ζαμπόν, παρατήρησαν μείωση του παθογόνου κατά 1,82-3,85 λογάριθμους, ανάλογα με τον τύπο του ζαμπόν.

Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση του ζαμπόν (οσμή, γεύση, εμφάνιση), παρατηρήθηκε μείωση του χρόνου ζωής με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης (4, 8 και 12°C), αποτέλεσμα αναμενόμενο αφού αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε ανάπτυξη της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας του ζαμπόν. Σε όλες τις θερμοκρασίες η εμφάνιση αξιολογήθηκε ως καλή μέχρι και το τέλος ζωής του προϊόντος, με τα πιεσμένα δείγματα να έχουν λίγο υψηλότερα σκορ από τα απίεστα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα χρωματομετρικά αποτελέσματα, σύμφωνα με τα οποία δεν υπήρξε διαφορά στο χρώμα του ζαμπόν, ανεξαρτήτως μεταχείρισης. Στους 4°C μόνο οι περιπτώσεις ZP και ZP1% είχαν απουσία της *L. monocytogenes* μέσα στο χρόνο ζωής του ζαμπόν, ενώ στους 8 και τους 12°C το ίδιο ίσχυε μόνο για την περίπτωση ZP1%. Τέλος, μόνο στους 12°C φάνηκε η υπεροχή της εφαρμογής πίεσης και αιθέριου ελαίου, καθώς οι περιπτώσεις με πίεση (ZP1%) και έλαιο (Z1%) απορρίφθηκαν αργότερα από τις περιπτώσεις χωρίς πίεση και χωρίς έλαιο αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των φασματικών δεδομένων του FTIR έδειξαν ότι τα μοντέλα που δημιουργήθηκαν προέβλεψαν ικανοποιητικά τους πληθυσμούς OMX, γαλακτικών βακτηρίων, στρεπτόκοκκων και ζυμών-μυκήτων και το pH, βάσει των τιμών του δείκτη προκατάληψης Bf οι οποίες ήταν κοντά στο 1 (τιμή ίσον με 1 = τέλεια προσαρμογή προβλέψεων και παρατηρήσεων) (Panagou et al., 2011). Όσον αφορά στη διάκριση των δειγμάτων ζαμπόν σε τρεις προκαθορισμένες κλάσεις ποιότητας (φρέσκο, σχετικά φρέσκο, αλλοιωμένο), καλύτερη ακρίβεια ταξινόμησης είχε η κατηγορία των φρέσκων δειγμάτων και χειρότερη η κατηγορία των αλλοιωμένων δειγμάτων. Καλύτερη ακρίβεια πρόβλεψης σημειώθηκε για την εμφάνιση του ζαμπόν. Κανένα αλλοιωμένο δείγμα δεν κατηγοριοποιήθηκε ως αλλοιωμένο, ενώ το αντίθετο συνέβη σε πολύ μικρό αριθμό δειγμάτων. Άλλες μελέτες σε προϊόντα κρέατος έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα (Argyri et al., 2010). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα φάσματα που να σχετίζονται με τις βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την αλλοίωση. Σε μελέτη τους, οι Ammor et al., (2009) βρήκαν πιθανά μήκη κύματος που σχετίζονται με την αλλοίωση κυμά (1714-1710  $\text{cm}^{-1}$ , 1614-1211  $\text{cm}^{-1}$ , 1031-1000  $\text{cm}^{-1}$ ) και αντιστοιχούσαν κυρίως στην απορρόφηση αμιδίου II, αμιδίων και αμινών.

Η μοριακή ανάλυση με PFGE έδειξε παραλλακτικότητα των στελεχών της *L. monocytogenes* μεταξύ πιεσμένων και απίεστων δειγμάτων. Κυρίαρχο στέλεχος στα πιεσμένα δείγματα ήταν το B131 και στα απίεστα το B129. Στο τέλος του χρόνου συντήρησης στους 4°C επιβεβαιώθηκε απουσία του παθογόνου στα πιεσμένα δείγματα, ενώ στους 8 και 12°C μόνο στην περίπτωση ZP1% είχαμε απουσία *L. monocytogenes*.

## **Επίλογος**

Ο συνδυασμός υπερυψηλής πίεσης και εδώδιμων μεμβρανών με αιθέριο έλαιο ρίγανης (ZP1%) σε ζαμπόν συσκευασμένο υπό κενό μείωσε το παθογόνο *L. monocytogenes* σε βαθμό πλήρους απουσίας, σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης και μέσα στο χρόνο ζωής του προϊόντος. Ο πληθυσμός της OMX, των γαλακτικών βακτηρίων, των στρεπτόκοκκων και των ζυμών-μυκήτων μειώθηκε με την εφαρμογή πίεσης, ενώ παρεμποδίστηκε η ανάπτυξη των ψευδομονάδων, των εντεροβακτηρίων, του *Staphylococcus aureus* και του *Brochothrix thermosphacta*. Η οργανοληπτική αξιολόγηση και η χρωματομετρία έδειξαν ότι ο χειρισμός του ζαμπόν με υπερυψηλή πίεση και αιθέριο έλαιο ρίγανης είχε ως αποτέλεσμα την διατήρηση επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων και μιας καλής διάρκειας ζωής του προϊόντος (έως 53 ημέρες στους 4°C, 38 ημέρες στους 8°C και 34 ημέρες στους 12°C). Ο συνδυασμός της τεχνολογίας της υπερυψηλής πίεσης με τις εδώδιμες μεμβράνες αλγινικών και την ενσωμάτωση αιθέριου ελαίου μπορεί να συντελέσει επομένως στην ενίσχυση του επιπέδου ασφάλειας και ποιότητας προϊόντων κρέατος όπως το ζαμπόν, με έναν πιο φυσικό και λιγότερο παρεμβατικό τρόπο, σε ευθυγράμμιση με τις απαιτήσεις του σημερινού καταναλωτή. Ωστόσο, αν και πολλά υποσχόμενες, οι νέες αυτές τεχνολογίες χρήζουν περαιτέρω έρευνας, ώστε να αξιοποιηθούν στο έπακρο οι δυνατότητές τους, αλλά και για να μπορέσουν στο άμεσο μέλλον να εφαρμοστούν σε βιομηχανική κλίμακα.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adams, M.R., Moss, M.O., (2000). Food Microbiology. “The Microbiology of Food Preservation”. Pub. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Alba, M., Bravo, D., Medina, M., (2015). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in dry-cured ham by combined treatments of high pressure and the lactoperoxidase system or lactoferrin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31: 54-59.

Alba, M., Montiel, R., Bravo, D., Gaya, P., Medina, M., (2012). High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella Enteritidis* and the physicochemical, rheological and color characteristics of sliced vacuum-packaged dry-cured ham. *Meat Science*, 91:173-178.

Al-Jowder, O., Kemsley, E., K., Wilson, R., H., (2002). Detection of adulteration in cooked meat products by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1325-1329.

Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F., Sikes, A., Dunne, C., P., Ray, B., (1999). Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied Environmental Microbiology*, 65: 4248-4251.

Alpas, H., N. Kalchayanand, F. Bozoglu, A. Sikes, C.P. Dunne and B. Ray, Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (1999), pp. 4248–4251.

Amor, M., S., Argyri, A., Nychas, G.-J., E., (2009). 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: 507-514.

Andres, A., L., Adamsen, C., E., Moller, J., K., S., Ruiz, J., Skibsted, I., H., (2006). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 222: 486-491.

Argyri, A., A., (2010). Quantifying meat spoilage with an array of biochemical indicators. PhD Thesis, Cranfield University.

Argyri, A., A., Jarvis, R., M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E., Goodacre, R., Nychas, G.-J., E., (2013). A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, 29: 461-470.



Argyri, A., A., Panagou, E., Z., Nychas, G.-J., (2014). “Monitoring microbial spoilage of foods by vibrational spectroscopy (FT-IR and Raman)” in *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*. Ed. I.S. Boziaris, pp. 386-434.

Argyri, A., A., Panagou, E., Z., Tarantilis, P., A., Polysiou, P., A., Nychas, G.-J., E., (2010). Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sensors and Actuators B*, 145: 146-154.

Asensio, C., M., Grosso, N., R., Juliani, H., R., (2014). Quality characters, chemical composition and biological activities of oregano (*Origanum spp.*)- Essential oils from Central and Southern Argentina. *Industrial Crops and Products*, 63: 203-213.

Aymerich, T., Picouet, P., A., Montfort, J., M., (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78: 114-129.

Bajpai, V., K., Baek, K.-H., Kang, S., H., (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: a review. *Food Research International*, 45: 722-734.

Bakkali, F., Averbeck, D., Idaomar, M., (2008). Biological effects of essential oils- a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.

Balamurungan, S., Ahmed, R., Chibeu, A., Gao, A., Koutchma, T., Strange, P., (2016). Effect of salt types and concentrations on the high-pressure inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground chicken. *International Journal of Food Microbiology*, 218: 51-56.

Baranyi, J., Roberts, T., A., (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 277-294.

Barbosa, I., Medeirosa, J., A., Oliveira, K., A., Gomes-Neto, N., J., Tavares, J., F., Magnanic, M., Souzaa, E., L., (2016). Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables. *Food Control*, 59: 468-477.

Barbosa, W., B., Cabedo, L., Wederquist, H., J., Sofos, J., N., Schmidt, G., R., (1994). Growth variation among species and strains of *Listeria* in culture broth. *Journal of Food Protection*, 57 (765-769), 775.

Begot, C., Lebert, L., Lebert, A., (1997). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiology*, 14: 403-412.

Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., Boussaid, M., (2013). Essential Oil Composition and Antibacterial Activity of *Origanum vulgare* subsp.

glandulosum Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*, 16(12): 1115-1120.

Benet, G., U., (2005). Dipl.-Ing. High pressure low-temperature processing of foods: impact of metastable phases on process and quality parameters. Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, Berlin University of Technology.

Boziaris, I., S., (2014). Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques, chapter 14, "Monitoring Microbial Spoilage of Foods by Vibrational Spectroscopy (FT-IR & Raman)", CRC Press, USA.

Bravo, D., Alba, M., Medina, M., (2014). Combined treatments of high-pressure with the lactoperoxidase system or lactoferrin on the inactivation of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carpaccio. *Food Microbiology*, 41: 27-32.

Bukvicki, D., Stojkovic, D., Socovic, M., Vannini, L., Montanari, C., Pejin, B., et al., (2014). Satureja horvatii essential oil: in vitro antimicrobial and antiradical properties and in situ control of *Listeria monocytogenes* in pork meat. *Meat Science*, 96: 1355-1360.

Burt, s., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

CAC (Codex Alimentarius Commission), (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61-2007. *Codex Alimentarius*, 1-28.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P., W., Castillejos, L., Ferret, A., (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90: 2580-2595.

Carlez, A., Veciana-Nogues, T., Cheftel, J., C., (1995). Changes in color and myoglobin of minced beef meat due to high-pressure processing. *Food Science and Technology*, 28: 528-538.

Carlez, A., Rosec, J., P., Richard, N., Cheftel, J., C., (1993). High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *Lebensmittel Wissenschaft Techn.*, 26: 357-363.

Carpentier, B., Cerf, O., (2011). Review- Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 1-8.

Cava, R., Ladero, L., Gonzalez, S., Carrasco, A., Ramirez, M., R., (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced

dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 76.

CDC, (2011). Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe--United States, August-September 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 60(39): 1357-8.

CDC, (2014). Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 63(15): 328-332.

Chaves, A., V., He, M., L., Yang, W., Z., Hristov, A., N., McAllister, T., A., Benchaar, C., (2008). Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*, 88: 117-122.

Cheftel, J.C. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci Technol. Internat* 1:75-90.

chemwiki.ucdavis.edu

Chilton, P., Isaacs, N., S., Manas, P., Mackey, B., M., (2001). Biosynthetic requirements for the repair of membrane damage in pressure- treated *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 101-104.

Chorianopoulos, N., G., Giaouris, E., D., Skandamis, P., N., Haroutounian, S., A., Nychas, G.-J., E., (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitisers. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 1586-1596.

Chorianopoulos, N., G., Lambert, R., J., W., Skandamis, P., N., Evergetis, E., T., Haroutounian, S., A., Nychas, G.-J., E., (2006). A newly developed assay to study the minimum inhibitory concentration of *Satureja spinosa* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 778-786.

Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.-J., Haroutounian, S., A., (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum* and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 8261-8267.

Clariana, M., Guerrero, L., Sarraga, C., Diaz, I., Valero, A., Garcia-Regueiro, J., A., (2011). Influence of high pressure application on the nutritional, sensory and microbiological characteristics of sliced skin vacuum packed dry-cured ham. Effects along the storage period. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12: 456-465.

Cotter, P., D., Ryan, S., Gahan, C., G., M., Hill, C., (2005). Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected *Listeria monocytogenes* strains is associated with an ability to grow at low pH. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 2832-2839.

Davidson, P., M., Naidu, A., S., (2000). "Phyto-phenols" in Natural Food Antimicrobial Systems, chapter 10. CRS press, ed. A.S Naidu.

De Angelis, M., Gobbetti, M., (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 4: 106-122.

De Jesus, A., J., Whiting, R., C., (2003). Thermal inactivation, growth and survival studies of *Listeria monocytogenes* strains belonging to three distinct genotypic lineages. *Journal of Food Protection*, 66: 1611-1617.

Denyer, S., P., Hugo, W., B., (1991). Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: Denyer, S.P., Hugo, W.D. (Eds). Mechanisms of Action of Chemical Biocides. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 171-188.

Doulgeraki, A., I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J., (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 130-141.

Doulgeraki, A., I., Paramithiotis, S., Kagkli, D., M., & Nychas, G.-J., E., (2010). Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*, 27: 1028–1034.

EFSA, (2015). The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013, *EFSA Journal* 13(1).

Ellis, D., I., Broadhurst, D., Clarke, S/. J/. Goodacre, R/. (2005). Rapid identification of closely related muscle foods by vibrational spectroscopy and machine learning. *Analyst*, 130: 1648-1654.

Evrendilek, G., A., Balasubramaniam, V., M., (2011). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. *Food Control*, 22: 1435-1441.

Faleiro, M., L., (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2: 1143-1156.

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

Fisher, K., Phillips, C., A., (2009). The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1343-1349.

Franz, C., Novak, J. (2010) Handbook of essential oils. "Sources of essential oils". In: Baser KHC, Buchbauer G. (ed.) Science, technology, and applications. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton.

Friedly, E., C., Crandall, P., G., Ricke, S., C., Roman, M., O'Bryan, C., Chalova, V., L., (2009). In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. *Journal of Food Science*, 74: M67-M72.

Fuentes, V., Utrera, M., Estevez, M., Ventanas, J., Ventans, S., (2014). Impact of high pressure treatment and intramuscular fat content on colour changes and protein and lipid oxidation in sliced and vacuum-packaged Iberian dry-cured ham. *Meat Science*, 97: 468-474.

Gahan, C., Hill, C., (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in foodborne pathogenic bacteria, p. 213-245 In: Yousef, A.H., and Juneja, V.K. (eds.), Microbial stress adaptation and food safety. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Gill, C., O., (1986) the control of microbial spoilage in fresh meats. In A.M. Pearson & T.R. Dutson (Eds). "Advances in meat research: Meat poultry microbiology". Westport, CT: AVI Publishing Co. Inc.

Guinoiseau, E., Luciani, A., Rossi, P., G., Quilichini, Y., Ternengo, S., Bradesi, P., et al., (2010). Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina Corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 29: 873-879.

Hayouni, E., A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J., Y., Mohammed, H., et al., (2008). *Tunicia Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 242-251.

He, J., Rodriguez-Saona, L., E., Giusti, M., M., (2007). Midinfrared spectroscopy for juice authentication- Rapid differentiation of commercial juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:4443-4452.

Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T., (2011). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 107-112.

HHS (Health and Human Services), (2008). Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-to-Eat Foods. U.S.

Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center of Food Safety and Applied Nutrition.

Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 199–202.

Horie, Y., Kimura, K., Hori, K., (1991). Development of a new fruit processing method by high hydrostatic pressure. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 65(10): 1469-1474.

Hosseini, S., F., Rezaei, M., Zandi, M., Farahmandghavi, F., (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67: 403-413.

Hsu, H., Sheen, S., Sites, J., Cassidy, J., Scullen, B., Sommers, C., (2015). Effect of High Pressure Processing on the survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (Big Six vs. O157:H7) in ground beef. *Food Microbiology*, 48: 1-7.

Junttila, J., R., Niemela, S., I., Hirn, J., (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 321-327.

Kalemba, D., Matla, M., Smetek, A. (2012) Dietary Phytochemicals and Microbes. “Antimicrobial Activities of Essential Oils”. A.K. Patra (ed.).

Kapetanakou, A., E., Karyotis, D., Skandamis, P., N., (2015). Control of *Listeria monocytogenes* by applying ethanol-based antimicrobial edible films on ham slices and microwave-reheated frankfurters. *Food Microbiology*, 54: 80-90.

Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food. Prot.* 65, 1811–1829.

Kim, S.-Y., Kang, D.-H., Kim, J.-K., Ha, Y.-G., Hwang, J., Y., Kim, T., et al., (2011). Antimicrobial activity of plant extracts against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on fresh lettuce. *Journal of Food Science*, 76: M41-M46.

Kintzios, S., E., (2004). Handbook of Herbs and Spices. “Oregano”. Peter, K.V. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 215-226.

Kourkoutas, Y., Chorianopoulos, N., Nisiotou, A., Valdramidis, V., P., Karantzas, A., G., (2016). Editorial: Application of innovative technologies for improved food quality and safety. *BioMed Research International*, volume 2016, article ID 9160375, 2 pages.

Lebert, I., Begot, C., Lebert, A., (1998). Development of two *Listeria monocytogenes* growth models in a meat broth and their application to beef meat. *Food Microbiology*, 15: 499-509.

Leistner, L., (1978). Hurdle effect and energy saving. In Food Quality and Nutrition (ed. W.K. Downey). Applied Science Publishers, London, UK.

Leistner, L., (1999). Combined methods for food preservation. In: Shafiur Rahman, M. (Ed.), Handbook of Food Preservation, Marcel Dekker, New York, pp. 457-485.

Leistner, L., 1985. Hurdle technology applied to meat products of the shelf stable product and intermediate moisture food types. In: Simatos, D., Multon, J.L. (Eds.), Properties of Water in Foods in Relation to Quality and Stability, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 309–329.

Li, M., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., A., Gustafson, G., E., Li, Y., Crandall, P., G., et al., (2011). Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12: 1240-1254.

Lianou, A., Koutsoumanis, K., P., (2013). Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. *Food Microbiology*, 34: 259-267.

Lianou, A., Koutsoumanis, K., P., (2013). Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 310-321.

Lianou, A., Stopforth, J., D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J., N., (2006). Growth and stressresistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food protection*, 69: 2640-2647.

Liu, G., Wang, Y., Gui, M., Zheng, H., Dai, R., Li, P., (2012). Combined effect of high hydrostatic pressure and enterocin LM-2 on the refrigerated shelf life of ready-to-eat sliced vacuum-packed cooked ham. *Food Control*, 24: 64-71.

Mahmoud, S., S., Croteau, R., B., (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7: 366-373.

Manaf, M., A., Man, Y., B., C., Hamid, N., S., A., Ismail, A., Abidin, S., Z., (2007). Analysis of adulteration of virgin coconut oil by palm kernel olein using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Lipids*, 14: 111-121.

Marcos, B., Jofre, A., Aumerich, T., Monfort, J., M., Garriga, M., (2008). Combined effect of natural antimicrobials and high pressure processing to prevent *Listeria monocytogenes* growth after a cold chain break during storage of cooked ham. *Food Control*, 19:76-81.

Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergia, M., Sigismondi, C., Compagnone, D., Serio, A., (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria*

*monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50: 794-803.

McLauchlin, J., Mitchell, R., T., Smerdon, W., J., Jewell, K., (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 15-33.

NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods), (2005). Considerations for establishing safety-based consume-by date labels for refrigerated ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection*, 68: 1761-1775.

Nannapaneni, R., Chalova, V., I., Crandall, P., G., Ricke, S., C., Johnson, M., G., O'Bryan, C., A., (2009). Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 43-49.

Nychas, G.-J., E., Drosinos, E., H., Board, R., G., (1998). Chemical changes in stored meat. In A. Davies & R.G. Board (Eds). "The microbiology of meat and poultry". London: Blackie Academic and Professional.

Nychas, G.-J., E., Marshall, D., Sofos, J., (2007). Meat poultry and seafood. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat & T.J. Montville, *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, (Chapter 6). ASM press.

Nychas, G.-J., Skandamis, P., Tassou, C., Koutsoumanis, K., (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1-2): 77-89.

Nychas, G.-J., E., and Tassou, C., C., (2000). Preservatives: Traditional Preservatives - oils and spices pp.1717-1722 In R. Robison, C. Batt, and P. Patel, (Eds), *Encyclopedia of Food Microbiology* Academic Press, London.

Nychas, G.-J., E., Tassou, C., C., and Skandamis, P., (2003). Antimicrobials from herbs and spices. pp.176-200. In S., Roller, (ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. CRC Press, Woodhead Publishers, New York.

Olier, M., Rousseaux, S., Piveteau, P., Lemaitre, J., P., Rousset, A., Guzzo, J., (2004). Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 87-99.

Oliveira, T., L., C., Ramos, A., L., S., Ramos, E., M., Piccoli, R., H., Cristianini, M., (2015). Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology*, 45: 60-85.

Panagou, E., Z., Mohared, F., R., Argyri, A., A., Bessant, C., M., Nychas, G.-J., E., (2010). A comparison of artificial neural networks and partial least squares



modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints. *Food Microbiology*, 28: 782-790.

Paterson, M., H., (2005). Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6): 1400-1409.

Pesavento, G., Calonica, C., Bilia, A., R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Di Martino, M., C., Lo Nostro, A., (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54: 188-199.

Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Alige, S., (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 121-126.

Picouet, P., A., Sala, X., Garcia-Gil, N., Nolis, P., Colleto, M., Parella, T., Arnau, J., (2012). High pressure processing of dry-cured ham: Ultrastructural and molecular changes affecting sodium and water dynamics. *Innovative Food Science and Emerging technologies*, 16: 335-340.

Pothakos V., Devlieghere, F., Villani, F., Bjorkroth, J., Ercolini, D., (2015). Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat Science*, 109: 66-74.

Ravichandram, M., Hettiarachchy, N., S., Ganesh, V., Ricke, S., C., Singh, S., (2011). Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety*, 31: 462-471.

Rehder, V., L., G., Machado, A., L., M., Delarmelina, C., Sartoratto, A., Figueira, G., M., Duarte, M., C., T., (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from *Origanum applii* e *O. vulgare*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinalis*, 6: 67-71.

Rivera Calo, J., Crandall, P., G., O'Bryan, C., A., Ricke, S., C., (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems- A review. *Food Control*, 54: 111-119.

Rosenow, E., M., Marth, E., H., (1987). Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. *Journal of Food Protection*, 50(452-459), 463.

Ross, T., (1996). Indices for performance evaluation of predictive model in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 81:501-508.

Ryan, S., Hill, C., Gahan, C.G., (2008). Acid Stress Responses in *Listeria monocytogenes*. *Advances in Applied Microbiology*, 65: 67-82.

Sagdic, O., (2003). Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 467-473.

Sagdic, O., Ozcan, M., (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14: 141-143.

Samaranayake, C., P., Sastry, S., K., (2013). In-situ pH measurement of selected liquid foods under high pressure. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17: 22-26.

Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M.A., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M., (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging infectious diseases.*, 17(1):7-15.

Scandamis, P., Tsigarida, E., Nychas, G.-J., E., (2002). The effect of oregano essential oil on survival/death of Salmonella typhimurium in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. *Food Microbiology*, 19: 97-103.

Scott, V., N., Swanson, K., M., J., Freier, T., A., Pruet Jr., W., P., Sveum, W., H., Hall, P., A., Smoot, L., A., Brown, D., G., (2005). Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Protection Trends*, 25: 818-825.

Serra, X., Gou, P., Guerrero, L., Guardia, M., D., Picouet, P., Grebol, N., Arnau, J., (2006). Effect of high pressure on sensory properties of pasty hams. IFT-NPD/EFFoST Work-shop on Applications of Novel Technologies in Food and Biotechnology Cork, Ireland.

Serra, X., Sarraga, C., Grebol, N., Guardia, M., D., Guerrero, L., Gou, P., Masoliver, P., Gassiot, M., Monfort, J., M., Arnau, J., (2007). High pressure applied to frozen ham in different process stages. 1.Effect on the final physicochemical parameters and on the antioxidant and proteolytic enzyme activities of dry-cured ham. *Meat Science*, 75: 12-20.

Sikkema, J., De Bont, J., A., M., Poolman, B., (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(11): 8022-8028.

Silveira, S., M., Luciano, F., B., Fronza, N., Cunha, A., Scheuerman, G., N., et al., (2014). Chemical composition and antibacterial activity of *Laurus nobilis* essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 degrees C. *LWT-Food Science and Technology*, 59: 86-93.

Sinelli, N., Barzagli, S., Giardina, C., Cattaneo, T., M., P., (2005). A preliminary study using Fourier transform near infrared spectroscopy to monitor the shelf-life of packed industrial ricotta cheese. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13: 293-300.

Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.-J., E., (2001). Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. *Italian Journal of Food Science*, 13: 65-75.

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

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 118-122.

Sofos, J., N., Beuchat, L., R., Davidson, P., M., Johnson, E., A., (1998). Naturally occurring antimicrobials in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28: 71-72.

Solorzano-Santos, F., Miranda-Novales, M., G., (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 136-141.

Souza, E., L., Stamford, T., L., M., Lima, E., O., Trajano, V., N., (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18: 409-413.

Steele, J., E., Stiles, M., E., (1981). Microbial quality of vacuum packaged sliced ham. *Journal of Food Protection*, vol. 44, no. 6: 435-439.

Stratakos, A., C., Delgado-Pando, G., Linton, M., Patterson, M., F., Koidis, A., (2015). Synergism between high-pressure processing and active packaging against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken breast. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27: 41-47.

Surkiewicz, B., F., Harris, M., E., Carosella, J., M., (1977). Bacteriological survey and refrigerated storage test of vacuum-packed sliced imported canned ham. *Journal of Food Protection*, 40: 109-111.

Tassou, C., C., Chorianopoulos, N., G., Skandamis, P., N., Nychas, G.-J., E., (2012). "Herbs, spices and their active components as natural antimicrobials in foods" in *Handbook of Herbs and Spices (Second Edition)*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, pp. 17-50.

Tajkarimi, M., M., Ibrahim, S., A., Cliver, D., O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21: 1199-1218.

Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., Masoudpour-Behabadi, M., (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137: 360-374.

Tay, A., Shellhammer, T., H., Yousef, A., E., Chism, G., W., (2003). Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal of Food Protection*, 66: 2057-2061.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N., R., Nogueira, J., M., Saraiva, J., A., Nunes, M., L., (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30;93(11): 2707-2714.

Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food. Prot.* 65, 709–725.

Tornuk, F., Cnckurt, H., Ozturk, I., Sagdik, O., Bayram, O., Yetim, H., (2011). Efficacy of various plant hydrosols as natural food sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium on fresh cut carrots and apples. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 30-35.

Ultee, A., Bennink, M., H., J., Moezelaar, R., (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1561-1568. PhD thesis, ISBN 90-5808-219-9.

Velge, P., Roche, S., M., (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence? *Future Microbiology*, 5: 1799-1821.

Walker, S., J., Archer, P., Banks, J., G., (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 157-162.

Yaldagard, M., Mortazavi, S., A., Tabatabaie, F., (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7: 2739-2767.

Zinoviadou, K., G., Koutsoumanis, K., P., Biliaderis, C., G., (2016). Biopolymer-based films as carriers of antimicrobial agents. *Procedia Food Science*, 1: 190-196.

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, (2014). "Ταξινόμηση, προδιαγραφές και ορισμοί των προϊόντων με βάση το κρέας και παρασκευασμάτων κρέατος", Άρθρο 1, Έκδοση 1.

Παπαδοπούλου, Σ., Ο., (2013). Εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος με σύγχρονες μεθόδους. Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Αποτελέσματα Στατιστικής Ανάλυσης (Κεφάλαιο 3.3)

Πίνακας 12: Αποτελέσματα DMFit για τα μικροβιολογικά στους 4°C.

Κωδικός	rate	lag	yo	yEnd	se	R <sup>2</sup>
MRS 4 Z	0.0505		4.3831		0.8459	0.6297
M17 4 Z	0.2553		3.4703	7.77103826	0.4326	0.9175
BP 4 Z	-8E-04		2.039		0.0441	0.0562
CFC 4 Z	0		2		0	
VRBG 4 Z	0		1		0	
RBC 4 Z	0.002		2.9782		0.6374	
STAA 4 Z	-0.017		2.9152		0.5972	0.2456
PCA 4 Z	0.2988		3.4586	7.595343182	0.4863	0.8834
MRS 4 Z0%	0.2997		2.852	6.826935159	0.6325	0.7995
M17 4 Z0%	0.4604		3.1606	7.198818255	0.5642	0.8225
BP 4 Z0%	0		2		0	
CFC 4 Z0%	0		2		0	
VRBG 4 Z0%	0		1		0	
RBC 4 Z0%	0.6405	65.11516885	2.5124		0.4738	0.2809
STAA 4 Z0%	0		2		0	
PCA 4 Z0%	0.2514		3.6265	7.444960362	0.5923	0.8149
MRS 4 Z1%	0.2355		2.7606	6.924346186	0.5927	0.8472
M17 4 Z1%	0.2785		3.351	7.435546584	0.4444	0.9004
BP 4 Z1%	0		2		0	
CFC 4 Z1%	0		2		0	
VRBG 4 Z1%	0		1		0	
RBC 4 Z1%	2E-05		2.0765		0.1846	
STAA 4 Z1%	-0.543	21.96739627	2.5198	1.999999902	0.2383	0.4767
PCA 4 Z1%	0.2658		3.375	7.584302985	0.4764	0.8955
MRS 4 ZP	0.0869		1.461		0.8566	0.8357
M17 4 ZP	0.0713		2.0395		0.868	0.7678
BP 4 ZP	0		2		0	
CFC 4 ZP	0		2		0	
VRBG 4 ZP	0		1		0	
RBC 4 ZP	0		2		0	
STAA 4 ZP	0		2		0	
PCA 4 ZP	0.0846		1.5914		1.1299	0.7315
MRS 4 ZP0%	0.12		1.7956	7.349833988	0.5012	0.9429
M17 4 ZP0%	0.087		2.5054		0.7547	0.8684
BP 4 ZP0%	-0.08	60.09226418	2.053		0.1052	0.6958
CFC 4 ZP0%	0		2		0	

<b>VRBG 4</b>					
ZP0%	0	1		0	
RBC 4 ZP0%	0	2		0	
<b>STAA 4</b>					
ZP0%	0	2		0	
PCA 4 ZP0%	0.0883	2.3486		0.7492	0.8735
<b>MRS 4</b>					
ZP1%	0.1399	0.9885	7.240336975	0.4521	0.963
<b>M17 4</b>					
ZP1%	0.1416	1.0394	7.194427318	0.4742	0.9584
BP 4 ZP1%	-2E-04	2.0217		0.0475	
CFC 4 ZP1%	0	2		0	
<b>VRBG 4</b>					
ZP1%	0	1		0	
RBC 4 ZP1%	0	2		0	
<b>STAA 4</b>					
ZP1%	0	2		0	
PCA 4 ZP1%	0.1021	1.4798		0.9286	0.8572
MRS 4 ZP	0.0869	1.461		0.8566	0.8357

Πίνακας 13: Αποτελέσματα DMFit για τα μικροβιολογικά στους 8°C.

Κωδικός	rate	lag	yo	yEnd	se	R^2
MRS 8 Z	0.6712		2.6504	7.67210576	0.4239	0.9334
M17 8 Z	0.6396		3.0862	8.165357388	0.3428	0.9573
BP 8 Z	-0.05	94.29709701	2.0318	2.010658187	0.1259	
CFC 8 Z	0		2		0	
VRBG 8 Z	0		1		0	
RBC 8 Z	0.0528		2.4866		0.3784	0.7868
STAA 8 Z	-0.023		2.7888		0.5485	0.2036
PCA 8 Z	0.5723		3.2065	8.484269983	0.1353	0.9939
MRS 8 Z0%	0.7759		2.5775	7.771815823	0.4155	0.938
M17 8 Z0%	0.7777		3.1499	7.976091932	0.6808	0.8347
BP 8 Z0%	0		2		0	
CFC 8 Z0%	0		2		0	
<b>VRBG 8</b>						
Z0%	0		1		0	
RBC 8 Z0%	0.1588		1.9709	3.272851909	0.3101	0.6197
STAA 8 Z0%	-0.001		2.0407		0.0439	0.0662
PCA 8 Z0%	0.5531		3.4054	8.204879458	0.2954	0.9651
MRS 8 Z1%	0.6228		2.6099	7.380108517	0.4854	0.9061
M17 8 Z1%	0.6321		3.1516	7.883980905	0.3159	0.9612
BP 8 Z1%	0		2		0	
CFC 8 Z1%	0		2		0	
VRBG 8	0		1		0	

<b>Z1%</b>					
<b>RBC 8 Z1%</b>	-0.008	2.2619	0.2441	0.085	
<b>STAA 8 Z1%</b>	-0.003	2.0814	0.0877	0.0662	
<b>PCA 8 Z1%</b>	0.4704	3.3046	7.874785875	0.3119	0.9588
<b>MRS 8 ZP</b>	0.1762	1.333	0.2887	0.9864	
<b>M17 8 ZP</b>	0.2013	1.0767	0.9329	0.8998	
<b>BP 8 ZP</b>	0	2	0		
<b>CFC 8 ZP</b>	0	2	0		
<b>VRBG 8 ZP</b>	0	1	0		
<b>RBC 8 ZP</b>	0	2	0		
<b>STAA 8 ZP</b>	0	2	0		
<b>PCA 8 ZP</b>	0.1709	1.6334	1.016	0.845	
<b>MRS 8 ZP0%</b>	0.1585	2.6908	0.7154	0.9044	
<b>M17 8 ZP0%</b>	0.1599	2.6097	0.7714	0.8929	
<b>BP 8 ZP0%</b>	-0.004	2.1395	0.1109	0.1661	
<b>CFC 8 ZP0%</b>	0	2	0		
<b>VRBG 8 ZP0%</b>	0	1	0		
<b>RBC 8 ZP0%</b>	0	2	0		
<b>STAA 8 ZP0%</b>	0	2	0		
<b>PCA 8 ZP0%</b>	0.1625	2.5723	0.7038	0.9114	
<b>MRS 8 ZP1%</b>	0.1349	1.9403	0.7158	0.8723	
<b>M17 8 ZP1%</b>	0.1297	2.8378	0.9365	0.7843	
<b>BP 8 ZP1%</b>	0	2	0		
<b>CFC 8 ZP1%</b>	0	2	0		
<b>VRBG 8 ZP1%</b>	0	1	0		
<b>RBC 8 ZP1%</b>	0	2	0		
<b>STAA 8 ZP1%</b>	0	2	0		
<b>PCA 8 ZP1%</b>	0.1295	2.8596	0.9089	0.7942	

Πίνακας 14: Αποτελέσματα DMFit για τα μικροβιολογικά στους 12°C.

<b>Κωδικός</b>	<b>rate</b>	<b>lag</b>	<b>yo</b>	<b>yEnd</b>	<b>se</b>	<b>R^2</b>
<b>MRS 12 Z</b>	1.3846		2.5158	8.22140016	0.217	0.9846
<b>M17 12 Z</b>	1.1884		3.1599	8.488970059	0.2502	0.9772
<b>BP 12 Z</b>	0.0334		1.7994		0.4478	0.3866
<b>CFC 12 Z</b>	0		2		0	
<b>VRBG 12 Z</b>	0		1		0	
<b>RBC 12 Z</b>	0.0873		3.1894		0.5377	0.7709
<b>STAA 12 Z</b>	-0.006		3.4421		0.9065	

<b>PCA 12 Z</b>	1.1136		3.2236	8.554940266	0.3142	0.9651
<b>MRS 12 Z0%</b>	1.2059		2.5398	8.184444727	0.3276	0.9659
<b>M17 12 Z0%</b>	0.9837		3.1783	8.379291576	0.2107	0.9837
<b>BP 12 Z0%</b>	0.0169		1.9072		0.3295	0.1982
<b>CFC 12 Z0%</b>	-4E-04		2.021		0.0475	
<b>VRBG 12 Z0%</b>	0		1		0	
<b>RBC 12 Z0%</b>	0.0734		2.8822		0.5641	0.7002
<b>STAA 12 Z0%</b>	-0.004		2.1152		0.0877	0.188
<b>PCA 12 Z0%</b>	0.9573		3.2356	8.549068732	0.1394	0.9932
<b>MRS 12 Z1%</b>	1.5005		2.5152	8.146216826	0.4681	0.9285
<b>M17 12 Z1%</b>	1.4108		3.1502	8.320548654	0.2762	0.9694
<b>BP 12 Z1%</b>	0.0009		2.0208		0.0849	
<b>CFC 12 Z1%</b>	0		2		0	
<b>VRBG 12 Z1%</b>	0		1		0	
<b>RBC 12 Z1%</b>	0.4012	28.6682476	2.6266		0.5844	0.5319
<b>STAA 12 Z1%</b>	-0.005		2.2563		0.2498	
<b>PCA 12 Z1%</b>	1.3796		3.188	8.329209371	0.2985	0.964
<b>MRS 12 ZP</b>	0.4698		1.0565	8.145264645	0.4195	0.9749
<b>M17 12 ZP</b>	0.3311		2.1078	8.198205678	0.8214	0.8825
<b>BP 12 ZP</b>	0.0026		1.9784		0.0691	0.076
<b>CFC 12 ZP</b>	0		2		0	
<b>VRBG 12 ZP</b>	0		1		0	
<b>RBC 12 ZP</b>	0.0281		1.7941		0.3666	0.402
<b>STAA 12 ZP</b>	0		2		0	
<b>PCA 12 ZP</b>	0.4656		1.5807	8.308747303	0.5108	0.9588
<b>MRS 12 ZP0%</b>	0.4791		1.6188	8.360316239	0.4034	0.9739
<b>M17 12 ZP0%</b>	0.5171		1.679	8.353748353	0.4426	0.9675
<b>BP 12 ZP0%</b>	0.0135		1.903		0.2205	0.2805
<b>CFC 12 ZP0%</b>	0		2		0	
<b>VRBG 12 ZP0%</b>	0		1		0	
<b>RBC 12 ZP0%</b>	0.003		1.9994		0.1677	
<b>STAA 12 ZP0%</b>	0		2		0	
<b>PCA 12 ZP0%</b>	0.5043		1.4557	8.210002471	0.5614	0.9511
<b>MRS 12 ZP1%</b>	0.3968		1.1487	7.739486387	0.4463	0.9678
<b>M17 12 ZP1%</b>	0.3561		1.7668	7.777370596	0.5577	0.941
<b>BP 12 ZP1%</b>	-0.001		2.1174		0.184	
<b>CFC 12 ZP1%</b>	0		2		0	
<b>VRBG 12 ZP1%</b>	0		1		0	



RBC 12 ZP1%	0.0051	1.9764	0.1013	0.1917
STAA 12 ZP1%	0	2	0	
PCA 12 ZP1%	0.3736	1.7192	7.82201632	0.5102 0.9515

Πίνακας 15: Αποτελέσματα DMFit για τη *Listeria monocytogenes* στους 4, 8 και 12°C.

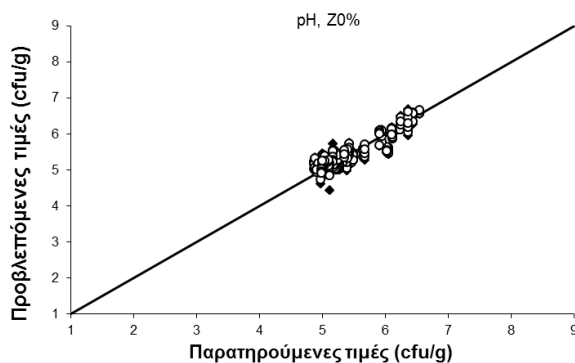
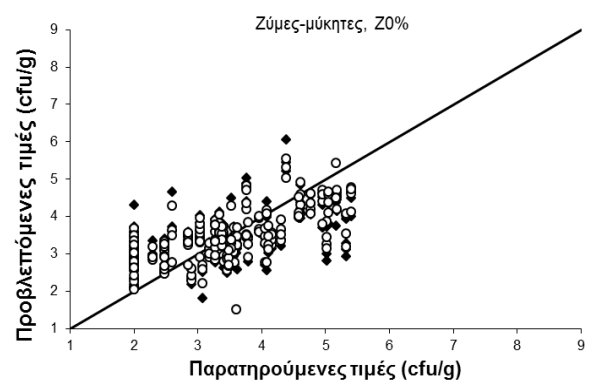
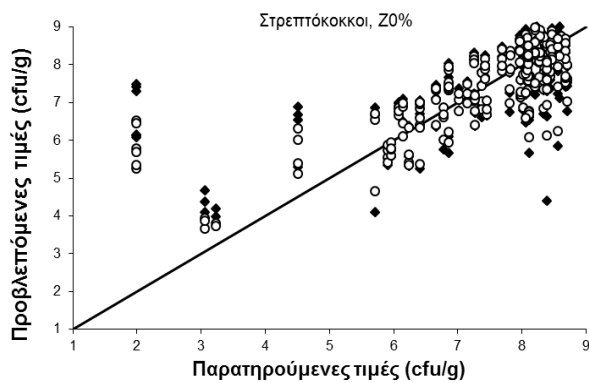
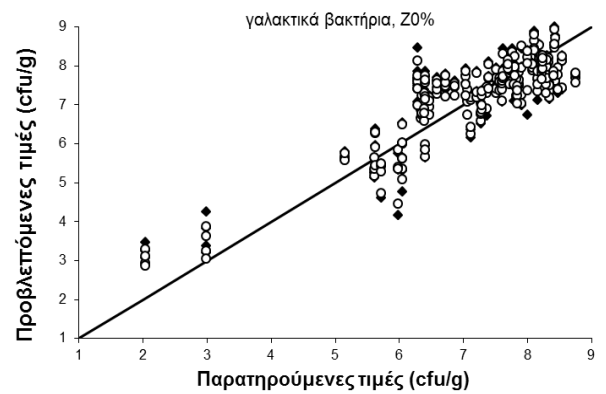
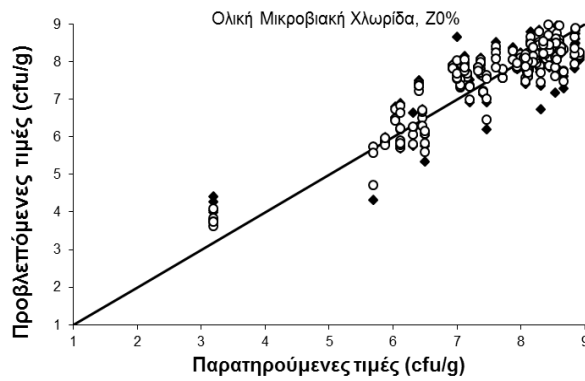
Κωδικός	rate	lag	γo	γEnd	se	R^2
PALCAM 4 Z	0.007	-	4.1077		0.185	0.4012
PALCAM 4 Z0%	0.003	-	3.6018		0.1739	0.0185
PALCAM 4 Z1%	-0.03	-	3.5105		0.2615	0.8688
PALCAM 4 ZP	0.028	-	2.6899		0.2334	0.8778
PALCAM 4 ZP0%	0.024	-	2.3928		0.2735	0.7968
PALCAM 4 ZP1%	0.194	-	2.7386	1.015537066	0.0486	0.9917
PALCAM 8 Z	0.065	19.28730267	4.5648		0.3144	0.7282
PALCAM 8 Z0%	0.023	-	4.0317		0.2108	0.6892
PALCAM 8 Z1%	0.031	-	3.6967		0.1361	0.9089
PALCAM 8 ZP	-0.28	21.53468152	2.2611	0.999956664	0.2226	0.8842
PALCAM 8 ZP0%	0.036	-	2.6444		0.2643	0.7746
PALCAM 8 ZP1%	0.278	-	2.7394	1.075681125	0.1207	0.9469
PALCAM 12 Z	0.046	-	4.76		0.44	0.57
PALCAM 12 Z0%	-0.03	-	4.1725		0.3416	0.4849
PALCAM 12 Z1%	0.036	-	3.5476		0.3344	0.5911
PALCAM 12 ZP	0.083	14.25644135	2.8862		0.3462	0.7338
PALCAM 12 ZP0%	0.096	15.42965895	2.6458		0.1912	0.9219
PALCAM 12 ZP1%	-0.21	-	2.6972	0.998519399	0.04	0.9951

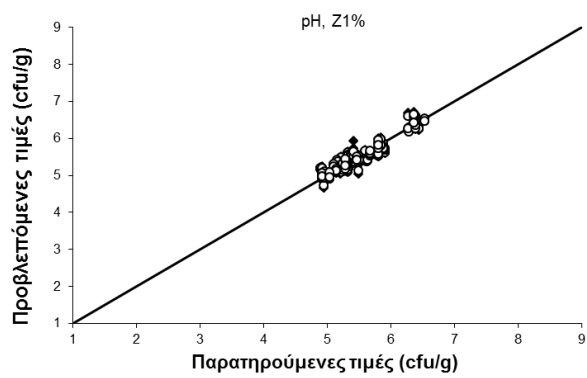
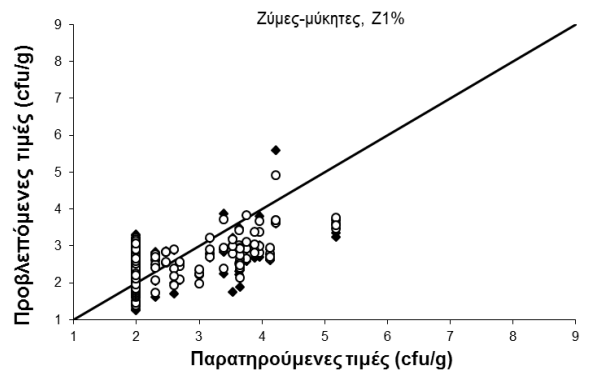
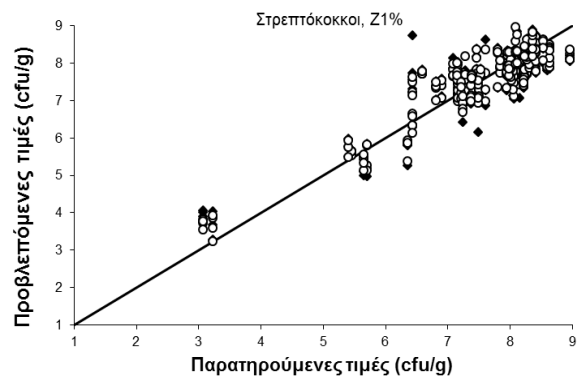
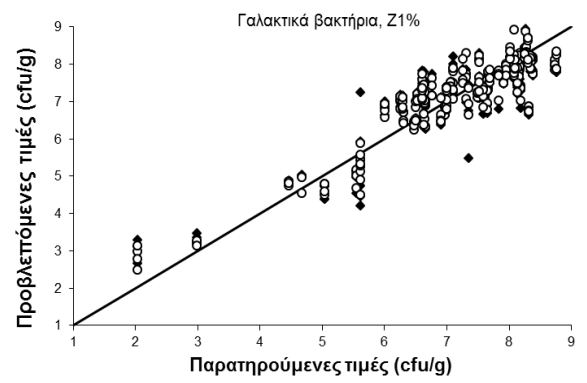
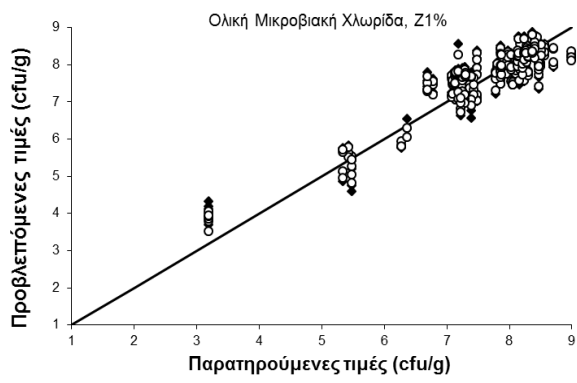
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Αποτελέσματα FTIR (Κεφάλαιο 3.5)

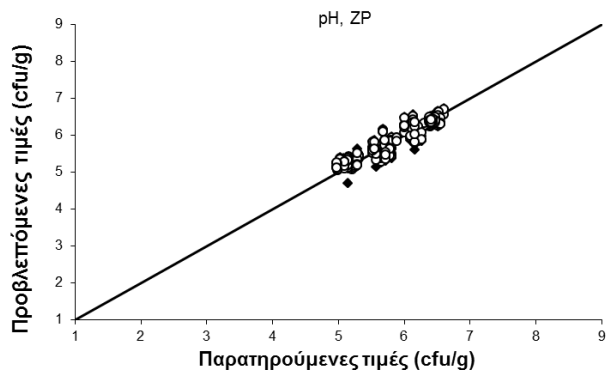
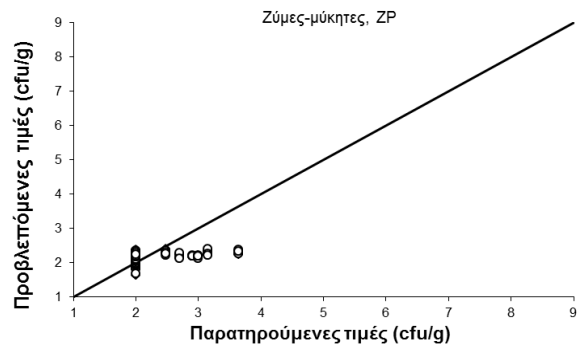
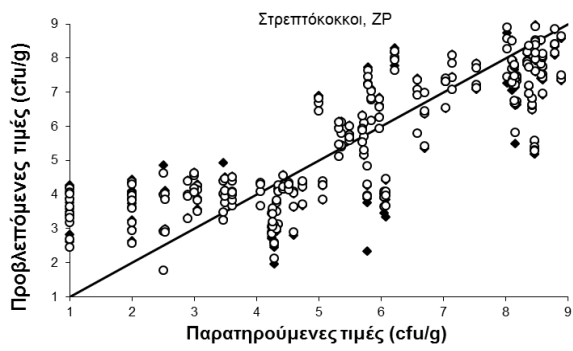
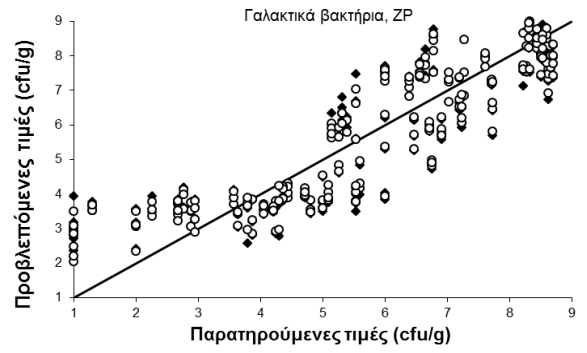
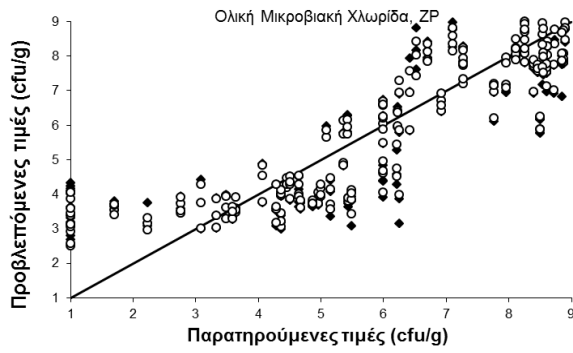
Πίνακας 16: Δείκτες επίδοσης του μοντέλου PLS-R συσχετίζοντας τα μικροβιολογικά και τα φυσικοχημικά δεδομένα με τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν από τα δείγματα ζαμπόν (η ανάλυση έγινε ανά κατηγορίες: ALL για όλα τα δείγματα, NON PRESSED για τα μη πιεσμένα και PRESSED για τα πιεσμένα).

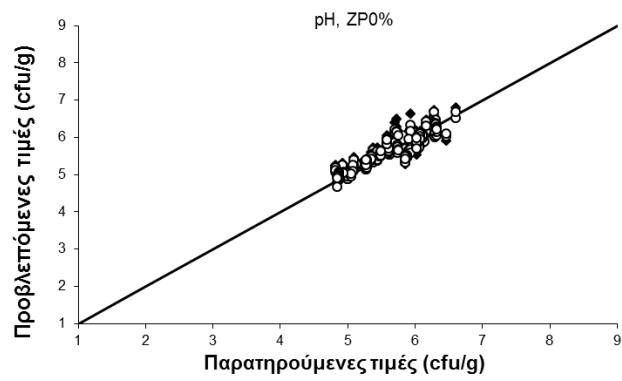
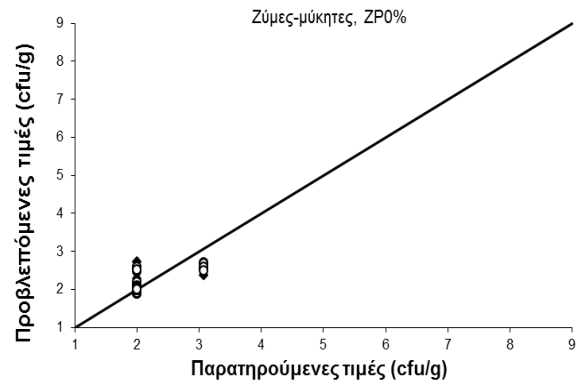
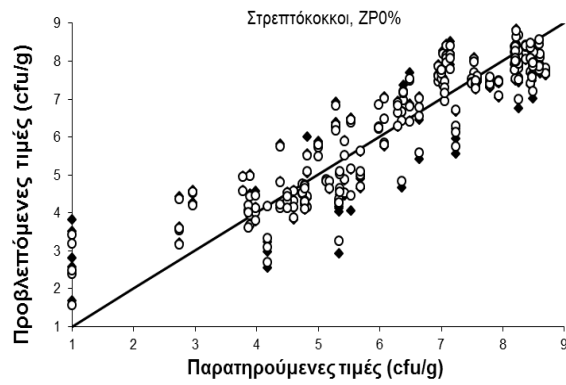
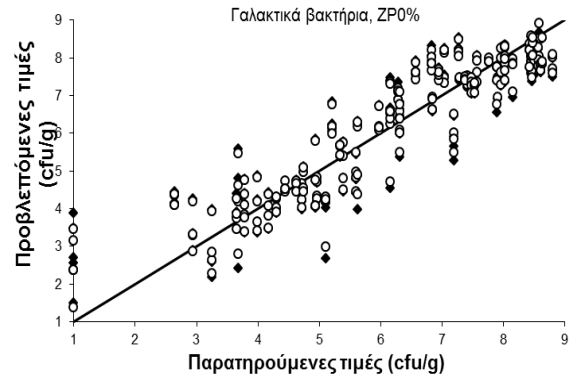
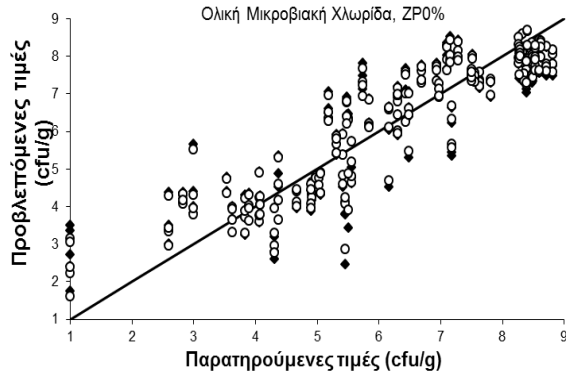
Samples	Parameter	Bf	Af	RMSE	R <sup>2</sup>	20%Re	10%Re
ALL	pH	1.000682	1.029857	0.217591	0.797632	100	98.38028
ALL	MRS	1.02661	1.160326	1.023446	0.662779	81.21968	54.60845
ALL	M17	1.025269	1.152103	1.11943	0.593053	82.0296	60.81748
ALL	PCA	1.031904	1.159503	1.143762	0.601303	81.56618	62.09286
ALL	RBC	1.039082	1.268137	0.861045	0.276805	45.38407	21.91684
NON PRESSED	pH	1.000399	1.025043	0.177678	0.794202	100	99.29178
NON PRESSED	MRS	1.005592	1.082622	0.685925	0.588178	96.12188	72.71468
NON PRESSED	M17	1.010089	1.078948	0.83749	0.428408	96.73759	84.68085
NON PRESSED	PCA	1.011623	1.074356	0.796978	0.47057	97.6912	87.73449
NON PRESSED	RBC	1.031581	1.260496	0.885785	0.379974	53.33333	26.95035
PRESSED	pH	1.000912	1.031936	0.234449	0.781884	100	98.017
PRESSED	MRS	1.034162	1.184374	1.021275	0.741276	77.19547	53.96601
PRESSED	M17	1.03346	1.185319	1.106742	0.678746	78.32861	51.41643
PRESSED	PCA	1.038266	1.197394	1.141915	0.669051	77.90368	50.56657
PRESSED	RBC	1.002915	1.047149	0.188706	0.140742	97.16714	90.50992

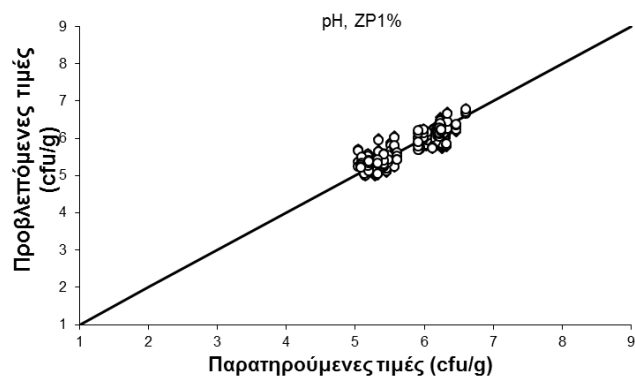
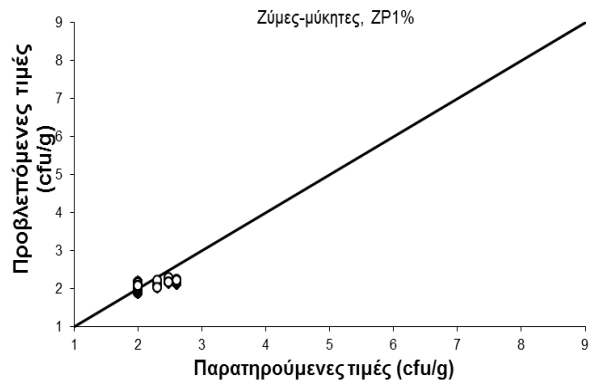
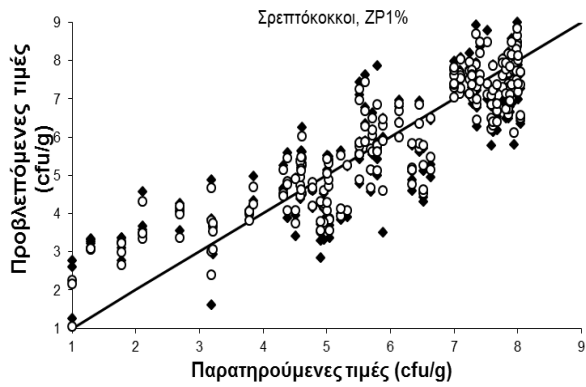
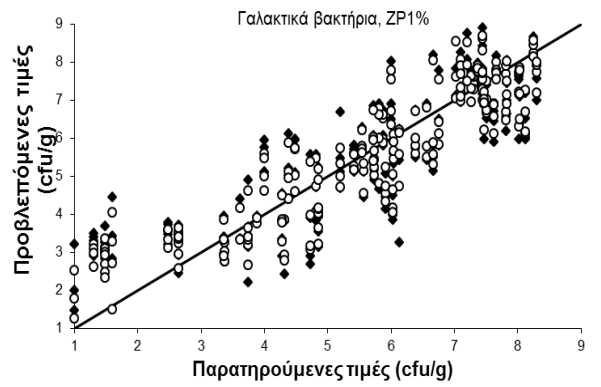
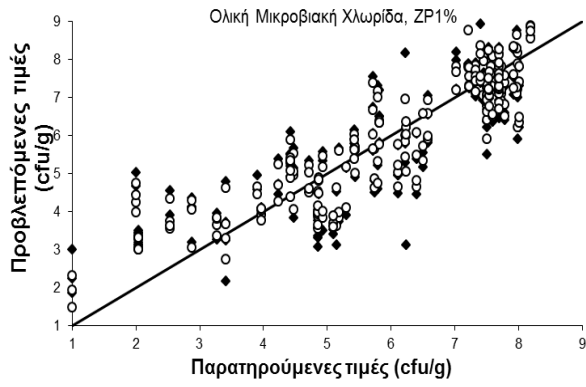
Παρακάτω παρουσιάζονται τα γραφήματα με τη σύγκριση μεταξύ των παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών των μικροβιολογικών δεδομένων από το μοντέλο παλινδρόμησης PLS (άσπρα σύμβολα: δεδομένα εκπαίδευσης, μαύρα σύμβολα: δεδομένα επικύρωσης) για κάθε μία από τις περιπτώσεις που δεν παρουσιάστηκαν στα Αποτελέσματα (Z0%, Z1%, ZP, ZP0%, ZP1%).











### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. Αποτελέσματα Αξιολόγησης της οργανοληπτικής εκτίμησης σε κλάσεις ποιότητας (Κεφάλαιο 3.5.1)

Πίνακας 17: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση Z0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				SENSITIVITY(%)
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	
FRESH	112	80	32	0	<b>71.4</b>
SEMI FRESH	86	10	71	5	<b>82.6</b>
SPOILED	36	1	20	15	<b>41.7</b>
SUM	<b>234</b>	<b>91</b>	<b>123</b>	<b>20</b>	
				ACCURACY(%)	<b>70.9</b>

Πίνακας 18: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση Z0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				SENSITIVITY(%)
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	
FRESH	81	51	30	0	<b>63.0</b>
SEMI FRESH	106	17	84	5	<b>79.2</b>
SPOILED	47	0	15	32	<b>68.1</b>
SUM	<b>234</b>	<b>68</b>	<b>129</b>	<b>37</b>	
				ACCURACY(%)	<b>71.4</b>

Πίνακας 19: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση Z0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				SENSITIVITY(%)
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	
FRESH	143	135	8	0	<b>94.4</b>
SEMI FRESH	104	6	97	1	<b>93.3</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>247</b>	<b>141</b>	<b>105</b>	<b>1</b>	
				ACCURACY(%)	<b>93.9</b>

Πίνακας 20: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση Z1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				SENSITIVITY(%)
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	
FRESH	191	180	11	0	<b>94.2</b>
SEMI FRESH	48	38	10	0	<b>20.8</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>239</b>	<b>218</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	
				ACCURACY(%)	<b>79.5</b>



Πίνακας 21: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση Z1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	106	76	29	1	<b>71.7</b>
SEMI FRESH	95	11	74	10	<b>77.9</b>
SPOILED	38	0	19	19	<b>50.0</b>
SUM	<b>239</b>	<b>87</b>	<b>122</b>	<b>30</b>	
				ACCURACY(%)	<b>70.7</b>

Πίνακας 22: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση Z1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	167	150	17	0	<b>89.8</b>
SEMI FRESH	80	31	48	0	<b>60.0</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>247</b>	<b>181</b>	<b>65</b>	<b>0</b>	
				ACCURACY(%)	<b>80.2</b>

Πίνακας 23: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση ZP, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	169	146	23	0	<b>86.4</b>
SEMI FRESH	40	4	34	2	<b>85.0</b>
SPOILED	22	0	12	9	<b>40.9</b>
SUM	<b>231</b>	<b>150</b>	<b>69</b>	<b>11</b>	
				ACCURACY(%)	<b>81.8</b>

Πίνακας 24: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση ZP, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	124	95	29	0	<b>76.6</b>
SEMI FRESH	69	15	53	1	<b>76.8</b>
SPOILED	38	0	17	21	<b>55.3</b>
SUM	<b>231</b>	<b>110</b>	<b>99</b>	<b>22</b>	
				ACCURACY(%)	<b>73.2</b>

Πίνακας 25: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση ZP, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	148	135	13	0	<b>91.2</b>
SEMI FRESH	83	14	69	0	<b>83.1</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>231</b>	<b>149</b>	<b>82</b>	<b>0</b>	
				ACCURACY(%)	<b>88.3</b>

Πίνακας 26: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση ZP0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	127	104	23	0	<b>81.9</b>
SEMI FRESH	61	5	53	3	<b>86.9</b>
SPOILED	38	0	15	23	<b>60.5</b>
SUM	<b>226</b>	<b>109</b>	<b>91</b>	<b>26</b>	
				ACCURACY(%)	<b>79.6</b>

Πίνακας 27: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση ZP0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	112	76	36	0	<b>67.9</b>
SEMI FRESH	84	8	72	4	<b>85.7</b>
SPOILED	30	0	29	1	<b>3.3</b>
SUM	<b>226</b>	<b>84</b>	<b>137</b>	<b>5</b>	
				ACCURACY(%)	<b>65.9</b>

Πίνακας 28: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση ZP0%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	143	127	16	0	<b>88.8</b>
SEMI FRESH	83	14	68	1	<b>81.9</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>226</b>	<b>141</b>	<b>84</b>	<b>1</b>	
				ACCURACY(%)	<b>86.3</b>

Πίνακας 29: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην περίπτωση ZP1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	200	196	4	0	<b>98.0</b>
SEMI FRESH	29	20	9	0	<b>31.0</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>229</b>	<b>216</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	
				ACCURACY(%)	<b>89.5</b>

Πίνακας 30: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην περίπτωση ZP1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	91	68	23	0	<b>74.7</b>
SEMI FRESH	94	12	76	6	<b>80.9</b>
SPOILED	44	0	10	34	<b>77.3</b>
SUM	<b>229</b>	<b>80</b>	<b>109</b>	<b>40</b>	
				ACCURACY(%)	<b>77.7</b>

Πίνακας 31: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην περίπτωση ZP1%, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	205	203	2	0	<b>99.0</b>
SEMI FRESH	24	18	6	0	<b>25.0</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>229</b>	<b>221</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	
				ACCURACY(%)	<b>91.3</b>

Πίνακας 32: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην κατηγορία ALL SAMPLES, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	953	714	236	3	<b>74.9</b>
SEMI FRESH	321	80	237	4	<b>73.8</b>
SPOILED	146	1	132	12	<b>8.2</b>
SUM	<b>1420</b>	<b>795</b>	<b>605</b>	<b>19</b>	
				ACCURACY(%)	<b>67.8</b>

Πίνακας 33: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην κατηγορία ALL SAMPLES, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	606	358	247	1	<b>59.1</b>
SEMI FRESH	575	72	477	26	<b>83.0</b>
SPOILED	262	0	191	71	<b>27.1</b>
SUM	<b>1443</b>	<b>430</b>	<b>915</b>	<b>98</b>	
				ACCURACY(%)	<b>62.8</b>

Πίνακας 34: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην κατηγορία ALL SAMPLES, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	980	851	129	0	<b>86.8</b>
SEMI FRESH	447	197	249	0	<b>55.7</b>
SPOILED	16	0	15	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>1443</b>	<b>1048</b>	<b>393</b>	<b>0</b>	
				ACCURACY(%)	<b>76.2</b>

Πίνακας 35: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην κατηγορία NON PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	440	305	133	2	<b>69.3</b>
SEMI FRESH	185	59	120	6	<b>64.9</b>
SPOILED	80	4	67	9	<b>11.3</b>
SUM	<b>705</b>	<b>368</b>	<b>320</b>	<b>17</b>	
				ACCURACY(%)	<b>61.6</b>

Πίνακας 36: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην κατηγορία NON PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	251	129	122	0	<b>51.4</b>
SEMI FRESH	313	22	271	20	<b>86.6</b>
SPOILED	141	0	90	51	<b>36.2</b>
SUM	<b>705</b>	<b>151</b>	<b>483</b>	<b>71</b>	
				ACCURACY(%)	<b>64.0</b>

Πίνακας 37: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην κατηγορία NON PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	459	386	72	1	<b>84.1</b>
SEMI FRESH	247	59	187	1	<b>75.7</b>
SPOILED	16	0	15	1	<b>6.3</b>
SUM	<b>722</b>	<b>445</b>	<b>274</b>	<b>3</b>	
				ACCURACY(%)	<b>79.5</b>

Πίνακας 38: Πίνακας διπλής εισόδου για την οσμή, στην κατηγορία PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	510	426	82	2	<b>83.5</b>
SEMI FRESH	133	28	104	1	<b>78.2</b>
SPOILED	63	1	51	11	<b>17.5</b>
SUM	<b>706</b>	<b>455</b>	<b>237</b>	<b>14</b>	
				ACCURACY(%)	<b>76.6</b>

Πίνακας 39: Πίνακας διπλής εισόδου για την γεύση, στην κατηγορία PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	335	243	90	1	<b>72.5</b>
SEMI FRESH	252	52	185	15	<b>73.4</b>
SPOILED	117	0	72	45	<b>38.5</b>
SUM	<b>704</b>	<b>295</b>	<b>347</b>	<b>61</b>	
				ACCURACY(%)	<b>67.2</b>

Πίνακας 40: Πίνακας διπλής εισόδου για την εμφάνιση, στην κατηγορία PRESSED, όπως προέκυψε μετά από ανάλυση PLS-R.

	PREDICTED				
	TRUE	FRESH	SEMI FRESH	SPOILED	SENSITIVITY(%)
FRESH	521	481	40	0	<b>92.3</b>
SEMI FRESH	200	74	125	1	<b>62.5</b>
SPOILED	0	0	0	0	<b>0.0</b>
SUM	<b>721</b>	<b>555</b>	<b>165</b>	<b>1</b>	
				ACCURACY(%)	<b>84.0</b>

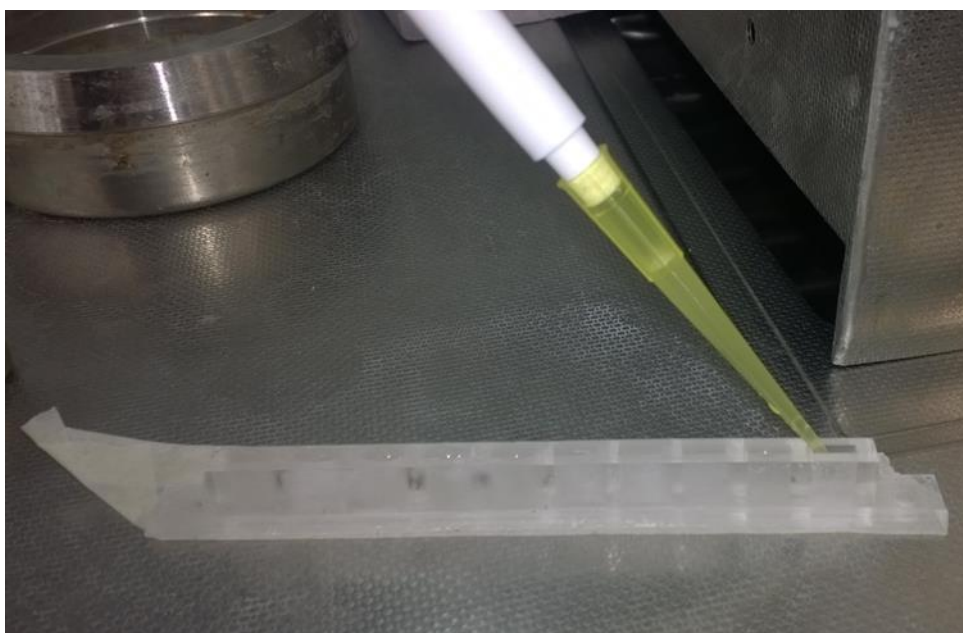
#### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4. Πρωτόκολλο PFGE για την *Listeria monocytogenes* (Κεφάλαιο 2.2.8)

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο σύμφωνα με τους Doulgeraki et al., 2010. Αρχικά, έγινε ανανέωση καλλιέργειών σε υλικό που δεν περιέχει αντιβιοτικά, εις διπλούν, για 24 και 18-24 ώρες αντίστοιχα.

##### 1<sup>η</sup> μέρα

- 1.mL καλλιέργειας τοποθετείται σε eppendorf
- Φυγοκεντρούμε για 5min στις 14000rpm
- Αφαιρούμε γρήγορα το υπερκείμενο
- Προσθέτουμε 0.5ml διαλύματος 10mM Tris-HCl (pH=7.6) που περιέχει 1M NaCl
- Φυγοκεντρούμε για 5min στις 14000rpm
- Αφαιρούμε γρήγορα το υπερκείμενο (εις διπλούν)
- Προσθέτουμε 100μL διαλύματος 10mM Tris-HCl (pH=7.6) που περιέχει 1M NaCl
- Ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο στους 55°C
- Προετοιμάζουμε την αγαρόζη ως εξής:
  - Αν έχουμε 30 δείγματα απαιτούνται  $30 \times 100\mu\text{L} = 3000 \mu\text{L}$  διαλύματος 0.125M EDTA (pH=7.6)
  - Για την 2% αγαρόζη ισχύει:  $2\text{g}/100\text{mL} \times 3000\mu\text{L} = 60\mu\text{g} = 0.06\text{g}$  άρα προσθέτουμε 0.06g αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως σε 3mL διαλύματος 0.125M EDTA (pH=7.6)
- Φτιάχνουμε τις θήκες για τις Plugs με την κολλητική ταινία
- Τοποθετούμε στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει
- Τοποθετούμε στο υδατόλουτρο για να μην παγώσει
- Προσθέτουμε **ίσο όγκο** (100μL ή λιγότερο) αγαρόζης σε ένα – ένα eppendorf και αναμιγνύουμε γρήγορα
- Για να φτιάξουμε τις plugs τοποθετούμε την πιπέτα πάνω αριστερά και ρίχνουμε προσεκτικά για να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Απομακρύνουμε χωρίς αναρρόφηση
- Τοποθετούμε τις φόρμες στο ψυγείο για να στερεοποιηθούν

- Μόλις στερεοποιηθούν με τη βοήθεια του «δοντιού» τις τοποθετούμε σε νέα eppendorfs
- Φτιάχνουμε διάλυμα με EC και λυσοζύμη (10mg/mL) ως εξής:
  - Αν έχουμε 30plugs απαιτούνται  $30 \times 0.5\text{mL} = 15\text{mL}$  EC
  - Για τη λυσοζύμη απαιτούνται  $10\text{mg/mL} \times 15\text{mL} = 0.15\text{g}$  λυσοζύμης
  - Ζυγίζουμε τη λυσοζύμη, προσθέτουμε το EC και τοποθετούμε στους  $37^\circ\text{C}$  για να διαλυθεί
- Προσθέτουμε 0.5mL διαλύματος στα eppendorfs
- Τοποθετούμε στους  $37^\circ\text{C}$  **overnight (18-20 hours)**



Εικόνα 20: Γέμισμα εκμαγείου για σχηματισμό plug

### 3<sup>η</sup> μέρα

- Φτιάχνουμε διάλυμα 0.5M EDTA, (1% sarkosyl pH=8) με 0.5mg/mL πρωτεΐνωση K ως εξής:
  - Για 30 plugs απαιτούνται  $30 \times 0.5\text{mL} = 15\text{mL}$  διαλύματος
  - Για την Πρωτεΐνωση K έχουμε  $0.5\text{mg/ml} \times 15\text{mL} = 7.5\text{mg} = 0.0075\text{g}$
- Αφαιρούμε το διάλυμα με τη λυσοζύμη και τη μουτανολυσίνη και προσθέτουμε 0.5mL από το διάλυμα με την Πρωτεΐνωση K
  - Τοποθετούμε **Overnight** στους  $55^\circ\text{C}$  (**24 hours**)

### 4<sup>η</sup> μέρα

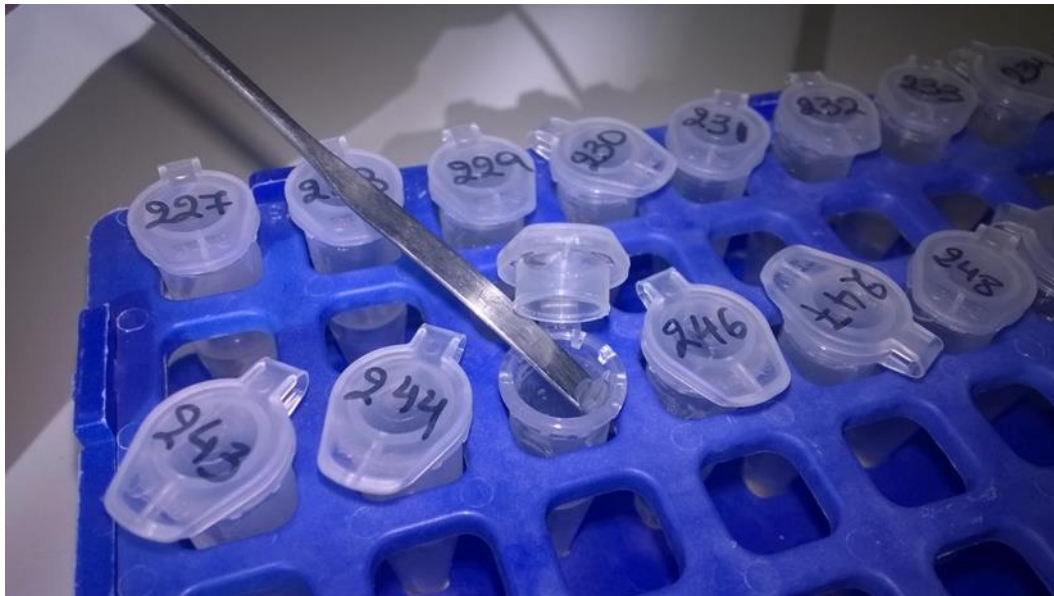
- Φτιάχνουμε διάλυμα TE 10/1 με 1mM PMSF

- Αν θέλουμε 50mL διάλυμα άρα 0.5mL PMSF τοποθετούνται σε 49.5mL TE 10/1
- Αφαιρούμε το διάλυμα με την Πρωτεϊνάση K
- Προσθέτουμε 0.5mL διαλύματος PMSF και τοποθετούμε για 1h στους 37°C
- Αφαιρούμε το διάλυμα και προσθέτουμε 0.5mL από το διάλυμα με την PMSF και τοποθετούμε για άλλη μια 1h στους 37°C
- Αφαιρούμε το διάλυμα με την PMSF
- Προσθέτουμε 0.5mL TE10/100 και **τοποθετούμε στους 4°C**
- Ρίχνουμε NaOH 2N για εξουδετέρωση του PMSF στο κουτί που πετούσαμε τα tips και το αφαιρούμενο διάλυμα.

### **5<sup>η</sup> μέρα**

- Με τη σπάτουλα βγάζουμε προσεκτικά τις plugs μια – μια και τις τοποθετούμε πάνω σε καλυπτρίδα και κόβουμε με μια άλλη λεπτές φέτες από την plug.
  - Τα τεμάχια που κόβουμε από την Plug τα τοποθετούμε σε νέα erpedorf ενώ το υπόλοιπο της το τοποθετούμε στο αρχικό erpedorf (στους 4°C για stock)
- Στα νέα erpedorf προσθέτουμε 0.5mL TE 10/0.1 και τα βάζουμε σε shaker (150) για 30min. (εις τριπλούν)
- Απομακρύνουμε προσεκτικά το TE 10/0.1
- Προετοιμάζουμε διάλυμα που περιέχει ddH<sub>2</sub>O, Enzyme Buffer και ApaI αν απαιτείται που φτιάχνουμε ως εξής:
  - Αν έχουμε 27 plugs θέλουμε 5400μL διαλύματος (συνολικός όγκος)
  - ddH<sub>2</sub>O = συνολικός όγκος – όγκος buffer – όγκος ApaI
  - Buffer :  $(1x) \times 5400 = (10x) \times V_1$  Πχ  $V_1 = 540\mu\text{L}$
  - Apa :  $(1x) \times 2700 = (100x) \times V_2$  Πχ  $V_2 = 54\mu\text{L}$
- Προσθέτουμε 100μL διαλύματος στα erpedorf
- Παραμονή στο ψυγείο για 30min – 1 h
- Αφαιρούμε το διάλυμα και προσθέτουμε εκ νέου 100μL διαλύματος
- Έπειτα τοποθετούμε 10U από το περιοριστικό ένζυμο και τοποθετούμε **overnight (16-18 hours)** στην απαιτούμενη θερμοκρασία.





Εικόνα 21: Προσεκτική απομάκρυνση plug με σπάτουλα



Εικόνα 22: Κόψιμο plug

### **6<sup>η</sup> μέρα**

Προσθέτουμε 0.5mL από το 0.5M EDTA (pH=8.0) και τοποθετούμε στο ψυγείο μέχρι να τα φορτώσουμε.

### **7η μέρα**

- Προετοιμάζουμε την αгарόζη για το gel ως εξής:
  - Σε 100mL από το running buffer προσθέτω 1g αгарόζη
  - Τοποθετούμε στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει
  - Τοποθετούμε στο υδατόλουτρο για να μην παγώσει

- Συνθέτουμε τη φόρμα του gel. Με καλυπτρίδες κόβουμε όσο πιο μικρά τεμάχια από τις ήδη τεμαχισμένες plugs και τις τοποθετούμε στα δόντια του χτενιού. Στην πρώτη και την τελευταία θέση τοποθετούμε πάντα το μάρτυρα.

- Με την καλυπτρίδα πιέζουμε τα τεμάχια προς την άκρη του χτενιού και τοποθετούμε το χτένι στην θέση του.

- Ρίχνουμε σιγά – σιγά την αгарόζη από το κάτω δεξιό άκρο ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες και για να μην παρασυρθούν τα τεμαχίδια των plugs.

- Αφού στερεοποιηθεί το gel θέτουμε το όργανο σε λειτουργία ως εξής:

- Τοποθετούμε το 3L running buffer
- Ανοίγουμε το drive module πρώτα από πίσω και μετά από μπροστά
- Ξαναγυρίζουμε πάνω και ρυθμίζουμε την αντλία στα 70
- Ανοίγουμε το cooler
- Πατάμε set temp και ρυθμίζουμε στους 14°C
- Πατάμε actual temp για να δούμε την πραγματική θερμοκρασία

- Όταν η actual temp είναι πέσει στη θερμοκρασία που έχουμε ρυθμίσει αφαιρούμε το gel μαζί με την βάση του και το τοποθετούμε στην ειδική θέση του οργάνου.

- Ρυθμίζουμε το κατάλληλο πρόγραμμα ως εξής:

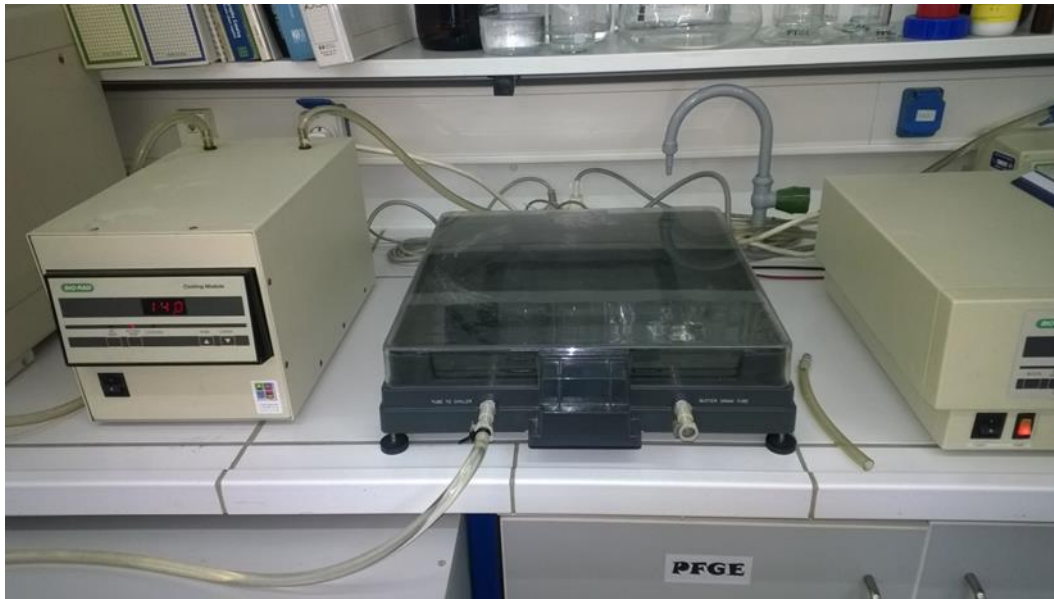
**ApaI:**        **Volts: 6V/cm<sup>2</sup>**  
                  **Hours: 16h**  
                  **Initial sec: 1 sec**  
                  **Final sec: 10**



Εικόνα 23: Φόρτωμα των plugs



Εικόνα 24: Τοποθέτηση του gel στη συσκευή PFGE



Εικόνα 25: Συσκευή PFGE

### **8η μέρα**

Μετά το τέλος της διαδικασίας το control module γράφει End.

- Κλείνουμε το control module
- Κλείνουμε το drive module από μπροστά και μετά από πίσω
- Κλείνουμε τον cooler
- Αφαιρούμε το gel και το τοποθετούμε για χρώση με προσοχή χωρίς τη βάση στο βρωμιούχο αιθίδιο για μια ώρα
  - Τοποθετούμε τον σωλήνα για να αφαιρεθεί το buffer από το όργανο. Αν δεν έχει αφαιρεθεί τελείως βάζουμε το όργανο υπό κλίση.
  - Μετά από τη μια ώρα στην χρώση τοποθετούμε για 2h σε νερό για να απομακρυνθεί το βρωμιούχο αιθίδιο από την αгарόζη.
  - Τοποθετούμε στο UV για να φωτογραφήσουμε το gel
    - Τοποθετούμε στο συρτάρι το gel
    - Ανοίγουμε το πρόγραμμα
    - Αν δεν είναι ίσιο ή δεν φαίνεται όλο το στρώνουμε ανοίγοντας το πορτάκι
    - Πατάμε το trust UV
    - Και προσπαθούμε να τραβήξουμε γρήγορα μια φωτογραφία, αποθηκεύουμε και την εκτυπώνουμε κάνοντας τις κατάλληλες ρυθμίσεις.

