

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«Μελέτη της επίδρασης εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης  
στο χρόνο ζωής στους 5 °C και τον έλεγχο της επιβίωσης  
και ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε  
προψημένους βόειους κεφτέδες»

ΔΗΜΗΤΡΑ ΑΝΤΩΝΙΑΔΟΥ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ  
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΕΤΟΣ 2017

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«Μελέτη της επίδρασης εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης  
στο χρόνο ζωής στους 5 °C και τον έλεγχο της επιβίωσης  
και ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε  
προψημένους βόειους κεφτέδες»

ΔΗΜΗΤΡΑ ΑΝΤΩΝΙΑΔΟΥ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ  
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΕΤΟΣ 2017

## Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Δρ. Σεργκελίδης Δανιήλ, Επίκουρος Καθηγητής

Μέλη: Δρ. Αμβροσιάδης Ιωάννης, Καθηγητής

Δρ. Γκόβαρης Αλέξανδρος, Καθηγητής

# Μελέτη της επίδρασης εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης στο χρόνο ζωής στους 5 °C και τον έλεγχο της επιβίωσης και ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* σε προψημένους βόειους κεφτέδες.

Σημαντικοί όροι: χιτοζάνη, *L. monocytogenes*, προψημένοι κεφτέδες

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα γίνονται ολοένα και πιο δημοφιλή λόγω αλλαγών στις προτιμήσεις και τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Μεταξύ των βασικότερων κινδύνων για την ασφάλεια των τροφίμων είναι η μόλυνσή τους από το βακτήριο *L. monocytogenes*, διότι το βακτήριο αυτό μπορεί να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται ακόμα και σε θερμοκρασίες ψύξης. Επιπλέον, οι αυξημένες απαιτήσεις των καταναλωτών για παραγωγή ασφαλών προϊόντων με μεγάλη διάρκεια ζωής οδήγησαν στην ανάπτυξη της ενεργού αντιμικροβιακής συσκευασίας.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η διερεύνηση της επίδρασης της χιτοζάνης με τη μορφή εδώδιμων μεμβρανών στο χρόνο ζωής και στην επιβίωση και την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* σε προψημένους βόειους κεφτέδες στους 5 °C. Δημιουργήθηκαν δύο ομάδες δειγμάτων. Οι δύο αυτές ομάδες επιμολύνθηκαν με *L. monocytogenes*. Η ομάδα των μαρτύρων (U) αποτελούνταν από κεφτέδες χωρίς χιτοζάνη ενώ η δεύτερη ομάδα (C) αποτελούνταν από ισάριθμους κεφτέδες οι οποίοι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης 1% w/v σε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v. Για τη αξιολόγηση του χρόνου ζωής των δειγμάτων καταμετρήθηκαν τις ημέρες 0, 1, 7, 14, 21 και 28 οι πληθυσμοί της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, των Enterobacteriaceae, των Lactobaciliaceae και της *L. monocytogenes*. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (χρώμα, γεύση, οσμή, τρυφερότητα και χυμώδες) αξιολογήθηκαν επίσης από ομάδα ημικειμαιδευμένων κριτών τις ίδιες ημέρες με αυτές που έλαβαν χώρα οι μικροβιολογικές αναλύσεις.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η επικάλυψη των προψημένων κεφτέδων με εδώδιμες μεμβράνες χιτοζάνης είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης όλων των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν από την πρώτη κιόλας μέρα του πειραματισμού, συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην παράταση του χρόνου ζωής των δειγμάτων κατά 14 ημέρες. Οι πληθυσμοί της *L. monocytogenes* στην ομάδα C ήταν κατά 2 περίπου log CFU/g καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού μικρότερη σε σύγκριση με την ομάδα U. Συνεπώς, η χρήση της χιτοζάνης είχε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη αυτού του βακτηρίου. Από την οργανοληπτική αξιολόγηση διαπιστώθηκε ότι τα εμβαπτισμένα σε χιτοζάνη δείγματα (C) δεν υποβαθμίστηκαν σε αντίθεση με τους μάρτυρες (U) οι οποίοι την ημέρα 28 του εμφάνισαν έντονες μακροσκοπικές και οργανοληπτικές αλλοιώσεις.

Συμπερασματικά, η εφαρμογή εδωδιμων μεμβρανών χιτοζάνης σε προνημένους βόειους κεφτέδες είχε ως αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου ζωής τους κατά 14 ημέρες και την καθυστέρηση ανάπτυξης της *L. monocytogenes*, ενώ καθ' όλον το χρόνο συντήρησής τους δεν παρατηρήθηκε υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους.

# **Study of edible chitosan membranes' effect in the shelf life at 5 °C and control of survival and growth of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat bovine meatballs.**

**Key Words: Chitosan, *L. monocytogenes*, ready-to-eat meatballs**

## **ABSTRACT**

Nowadays, ready-to-eat (RTE) meals become more and more popular due to the change in preferences and demands of the consumers. Among the most important risks for the safety foods is their contamination by *L. monocytogenes* as it can not only survive but also grow in refrigeration temperatures. Moreover, the increasing demand of consumers towards safe foods with long shelf life without chemical preservatives, led to the development of active antimicrobial packaging.

The aim of this master thesis was to study the effect of edible chitosan membranes in the shelf life at 5 °C and control of survival and growth of *L. monocytogenes* in RTE bovine meatballs. For this purpose two groups of samples were created. Both groups were contaminated with *L. monocytogenes*. The first group consisted of meatballs without chitosan coating and it was determined as the control group (U). The second one consisted of equal number of meatballs dipped in chitosan solution (1% w/v) (C). The bacterial counts that were enumerated included *L. monocytogenes*, Total Viable Count (TVC), lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae. Their population was counted for the evaluation of meatballs' shelf life at days 0, 1, 7, 14, 21 and 28 of the experiment. The sensory characteristics (colour, taste, flavor, odor, appearance) were also evaluated by semi-trained panelists.

The analysis depicted that the use of edible chitosan membranes reduced all of the microbial populations that were enumerated, from the first day of the experiment leading to the conclusion that they can prolong the span life of these products by 14 days. Moreover, the population of *L. monocytogenes* was about 2 log CFU/g lower in the meatballs coated with chitosan. Therefore, the use of chitosan had an inhibitory effect in the growth of this bacterium. Finally, the sensory analysis showed that the samples of group C were satisfactorily accepted by the panelists even at day 28, in contrast to the samples of group U.

In conclusion, the use of edible chitosan membranes in RTE bovine meatballs extended the shelf life of the samples by 14 days and delayed the growth of *L. monocytogenes*, achieving in parallel a satisfactory effect on their sensory characteristics.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |     |
|---|-----|
| ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ .....                                   | i   |
| ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ .....                                   | ii  |
| ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ .....                                | iii |
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....  | iv  |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....  | 1   |
| 1.1 Γενικά .....  | 1   |
| 1.2 Σιτιογενείς Διαταραχές .....                          | 2   |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....   | 5   |
| 2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....                   | 5   |
| 2.2 Λιστερίωση .....                                      | 7   |
| 2.2.1. <i>Επιδημιολογικά Δεδομένα</i> .....               | 8   |
| 2.2.2. <i>Παθογένεια</i> .....                            | 9   |
| 2.2.3. <i>Συμπτωματολογία στον Άνθρωπο</i> .....          | 10  |
| 2.2.4. <i>Θεραπεία</i> .....                              | 10  |
| 2.2.5. <i>Προληπτικά Μέτρα</i> .....                      | 10  |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....   | 12  |
| 3.1 Συντήρηση Κρέατος και Προϊόντων με βάση το Κρέας..... | 12  |
| 3.2 Προψημένα Κρέατα.....                                 | 13  |
| 3.3 Κίνδυνοι για τη Δημόσια Υγεία .....                   | 13  |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....   | 18  |
| 4.1 Αντιμικροβιακές Συσκευασίες .....                     | 18  |
| 4.2 Χιτοζάνη .....  | 20  |
| 4.3 Χαρακτηριστικά Χιτοζάνης .....                        | 21  |
| 4.4 Μηχανισμός Δράσης Χιτοζάνης.....                      | 22  |
| 4.5 Εφαρμογές Χιτοζάνης.....                              | 23  |
| 4.6 Νομοθετικό Πλαίσιο Χρήσης Χιτοζάνης.....              | 25  |

|   |    |
|---|----|
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....  | 26 |
| 5.1 Σκοπός της Έρευνας .....  | 26 |
| 5.2 Υλικά και μέθοδοι .....   | 26 |
| 5.2.1. Παρασκευή διαλύματος χιτοζάνης .....   | 26 |
| 5.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων .....   | 27 |
| 5.2.3. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος <i>L. monocytogenes</i> & ενοφθαλμισμός δειγμάτων | 28 |
| 5.2.4. Μικροβιολογικές Εξετάσεις.....   | 28 |
| 5.2.5. Οργανοληπτική αξιολόγηση .....   | 29 |
| 5.3 Αποτελέσματα .....  | 29 |
| 5.4 Συζήτηση.....   | 31 |
| 5.5 Συμπεράσματα.....   | 41 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 43 |



## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 1: Βασικότερες πηγές μόλυνσης και συμπτώματα τροφοδηλητηριάσεων από τα συνηθέστερα βακτήρια-αίτια τροφιμογενών διαταραχών (Σύμφωνα με Buzby et al., 1996; IFT, 2017). ..... | 3  |
| Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά της <i>L. monocytogenes</i> .....   | 7  |
| Πίνακας 3: Υλικά για την Παρασκευή κεφτέδων και ποσότητές τους .....  | 27 |
| Πίνακας 4: Πληθυσμοί Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C.....   | 36 |
| Πίνακας 5: Πληθυσμοί <i>Listeria monocytogenes</i> κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....  | 37 |
| Πίνακας 6: Πληθυσμοί εντεροβακτηριοειδών κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....  | 38 |
| Πίνακας 7: Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....  | 39 |
| Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας μεταβολών των εξεταζόμενων μικροβιακών πληθυσμών, κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C.....                                    | 40 |

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ

|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 1: Απεικόνιση της <i>L. monocytogenes</i> (Emily et al., 2008)..... | 5  |
| Εικόνα 2: Ανάμιξη διαλύματος χιτοζάνης με μαγνητικό αναδευτήρα.....        | 27 |

## ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

|   |    |
|---|----|
| Γράφημα 1: Μεταβολή πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C ..... | 36 |
| Γράφημα 2: Μεταβολή πληθυσμού της <i>Listeria monocytogenes</i> κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....   | 37 |
| Γράφημα 3: Μεταβολή πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....             | 38 |
| Γράφημα 4: Μεταβολή πληθυσμού των οξυγαλακτικών κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....                   | 39 |
| Γράφημα 5: Μεταβολή βακτηριακών πληθυσμών της ομάδας U κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....            | 40 |
| Γράφημα 6: Μεταβολή βακτηριακών πληθυσμών της ομάδας C κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C .....            | 41 |

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής διπλωματικής εργασίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής μου. Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Επίκουρο Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων, του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κ. Δανιήλ Σεργκελίδη, ο οποίος δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της εργασίας μου και μου πρόσφερε συνεχώς συμβουλές και καθοδήγηση, χωρίς τις οποίες η ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας δεν θα ήταν δυνατή. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αλέξανδρο Γκόβαρη, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, διότι ήταν πάντοτε διαθέσιμος και πρόθυμος να προσφέρει τις γνώσεις και να μοιραστεί τις εμπειρίες του για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής διπλωματικής αυτής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Αμβροσιάδη, Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Προϊόντων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, τόσο διότι διέθεσε τις υποδομές των εργαστηρίων του Τομέα Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως για τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, όσο και για την προθυμία του να προσφέρει τις επιστημονικές του γνώσεις και εμπειρίες. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα, κ. Δημήτρη Κομοδρόμο, ο οποίος ανέλαβε της εκπαίδευσή μου σχετικά τόσο με μικροβιολογικές τεχνικές, όσο και με τον χειρισμό του εξοπλισμού του εργαστηρίου.

Θεσσαλονίκη, 2017

Αντωνιάδου Δήμητρα

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Γενικά

Το κρέας και τα προϊόντα του συγκαταλέγονται μεταξύ των πλέον δημοφιλών τροφίμων και δικαιολογημένα εφ' όσον αποτελούν τρόφιμα υψηλής βιολογικής αξίας που προσφέρουν πληθώρα θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο είναι ένα τρόφιμο εξαιρετικά ευαλλοίωτο. Οι αλλοιώσεις αυτές οφείλονται σε μικροβιακούς, ενζυμικούς και βιοχημικούς παράγοντες οι οποίοι υποβαθμίζουν ποιοτικά το κρέας και τα προϊόντα του. Κάποιες από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους συντήρησης του κρέατος και των προϊόντων του είναι η συντήρηση υπό ψύξη και η χρήση συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Γεωργακάκης κ.α., 2002; Coma, 2008).

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ολοένα αυξανόμενη τάση των καταναλωτών, οι οποίοι αναζητούν προϊόντα υψηλής ποιότητας τα οποία όμως παραμένουν ασφαλή για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι απαιτήσεις αυτές των καταναλωτών είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενεργών και στη συνέχεια αντιμικροβιακών συσκευασιών (Kerry et al., 2006). Ως ενεργός συσκευασία, σύμφωνα με τον Κανονισμό 852/2004 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ορίζεται «το καινοτόμο σύστημα συσκευασίας, όπου η συσκευασία, το περιβάλλον της και το τρόφιμο αλληλεπιδρούν με τέτοιο τρόπο, που μεταβάλλει τις συνθήκες αποθήκευσης του τροφίμου, επιμηκύνοντας το χρόνο ζωής του και βελτιώνοντας την ασφάλειά του ή/και τις οργανοληπτικές του ιδιότητες, ενώ ταυτόχρονα διαφυλάσσει και την ποιότητά του» (ΕΚ 852/2004). Η χρήση αντιμικροβιακών συσκευασιών αποτελεί μια από τις πλέον υποσχόμενες λύσεις για την αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών σε τρόφιμα (Salleh et al., 2007).

Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα αντιμικροβιακών συσκευασιών αποτελούν οι εδώδιμες μεμβράνες. Μια από τις μεγαλύτερες προκλήσεις στον τομέα των τροφίμων τα τελευταία χρόνια αποτελεί η ανάπτυξη εδώδιμων αντιμικροβιακών μεμβρανών από φυσικές ουσίες (Sánchez-González et al., 2010). Μια φυσική ουσία με ικανότητα παραγωγής τέτοιων μεμβρανών είναι η χιτοζάνη. Η χιτοζάνη είναι ένας φυσικός αμινοπολυσακχαρίτης με αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε πληθώρα μικροοργανισμών και με ελάχιστη τοξικότητα. Συνεπώς αποτελεί μια ιδανική ουσία για την προστασία του κρέατος και των προϊόντων του (Kanatt et al., 2008).

Οι προτιμήσεις των καταναλωτών έχουν στραφεί, λόγω του σύγχρονου τρόπου ζωής, σε τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση (Ready-to-Eat, RTE) (Gilbert et al., 2009). Ως τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση ορίζονται αυτά «που προορίζονται από τον παραγωγό ή τον παρασκευαστή για ανθρώπινη κατανάλωση χωρίς να χρειάζονται μαγείρεμα ή άλλη επεξεργασία, αποτελεσματική για να εξαλείψει ή να μειώσει σε αποδεκτό επίπεδο τους ανησυχητικούς μικροοργανισμούς» ((ΕΚ) αριθ. 2073/2005; (ΕΚ) αριθ. 1441/2007). Στα τρόφιμα αυτά περιλαμβάνονται τα προψημένα κρέατα, τα οποία και αποτελούν αντικείμενο αυτής της διπλωματικής εργασίας (Gilbert et al., 2009).

Ένας από τους βασικότερους κινδύνους των έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων είναι η μόλυνση από το βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Η *L. monocytogenes* είναι ένας Gram αρνητικός βάκιλος ο οποίος μπορεί να μολύνει πολλά τρόφιμα. Το βακτήριο αυτό αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα διότι, ως ψυχρόφιλο βακτήριο, έχει την ικανότητα να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται σε θερμοκρασίες ψύξης (Levine et al., 2001). Η κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με *L. monocytogenes* προκαλεί τη νόσο λιστερίωση, η οποία στις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού (ηλικιωμένοι, παιδιά, ανοσοκατεσταλμένοι) μπορεί να προκαλέσει μηνιγγίτιδα ενώ σε εγκύους αποβολές ή γέννηση θνησιγενών εμβρύων (Roberts & Greenwood, 2003).

## 1.2 Σιτιογενείς Διαταραχές

Οι σιτιογενείς διαταραχές ή τροφοδηλητηριάσεις αποτελούν ένα πολύ σημαντικό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία με μεγάλες οικονομικές απώλειες (CDC, 2017e). Διακρίνονται στις τροφικές λοιμώξεις και τις τροφικές τοξινώσεις. Στην περίπτωση των τροφικών λοιμώξεων ο ασθενής νοσεί λόγω της πρόσληψης, μέσω των τροφίμων, ζωντανών μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί αυτοί στη συνέχεια προκαλούν βλάβες στην υγεία του ατόμου είτε μέσω της παραγωγής τοξινών είτε μέσω της διείσδυσής τους στον οργανισμό. Αντιθέτως, στις τροφικές τοξινώσεις ο υπεύθυνος μικροοργανισμός παράγει την τοξίνη στο τρόφιμο, την οποία στη συνέχεια προσλαμβάνει ο άνθρωπος καταναλώνοντας το. Συνεπώς, στην περίπτωση των τροφικών τοξινώσεων αιτία της ασθένειας θεωρείται η προσχηματισμένη στο τρόφιμο τοξίνη (Καραϊωάννογλου, 2008). Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 250 διαφορετικές σιτιογενείς διαταραχές, οι οποίες μπορούν να προκληθούν από βακτήρια, ιούς, μύκητες και παράσιτα (CDC, 2017e).

Σύμφωνα με την Scallan και τους συνεργάτες της (2011) το 90% των επιβεβαιωμένων τροφοδηλητηριάσεων οφείλονται σε βακτήρια. Τα κυριότερα βακτήρια που προκαλούν τροφοδηλητηριάσεις είναι τα εξής: *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Echerichia coli* O157, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus* spp (Scallan et al., 2011). Κάποια από τα βακτήρια αυτά προκαλούν τροφικές λοιμώξεις, όπως η *Salmonella* και η *Listeria*, ενώ κάποια άλλα, όπως ο *S.* και το *Cl. botulinum*, τροφικές τοξινώσεις (IFT, 2017). Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1) παρουσιάζονται τα βακτήρια αυτά, τα συμπτώματα που προκαλούν στους ασθενείς και οι πηγές μόλυνσης από αυτά.

**Πίνακας 1:** Βασικότερες πηγές μόλυνσης και συμπτώματα τροφοδηλητηριάσεων από τα συνηθέστερα βακτήρια-αίτια τροφιμογενών διαταραχών (Σύμφωνα με Buzby et al., 1996; IFT, 2017).

| <b>Βακτήρια</b>           | <b>Συνηθέστερες πηγές τροφιμογενούς μόλυνσης</b>  | <b>Συμπτώματα</b>  |
|---------------------------|---|--|
| <i>Bacillus cereus</i>    | Μαγειρεμένο ρύζι ή κρέας, πουλερικά, μπαχαρικά, σούπες, λαχανικά                                | Έμετος (εμετικό σύνδρομο)<br>Διάρροια (διαρροϊκό σύνδρομο)   |
| <i>Campylobacter</i> spp. | Πουλερικά, απαστερίωτο γάλα και γαλακτοκομικά. Προϊόντα από απαστερίωτο γάλα, επιμολυσμένο νερό | Κοιλιακός πόνος, διάρροια, πυρετός   |
| <i>Cl. perfringens</i>    | Κρέας, προϊόντα κρέατος, σάλτσες  | Κοιλιακός πόνος, διάρροια  |
| <i>Cl. botulinum</i>      | Ατελώς κλεισμένες κονσέρβες   | Νευρικά συμπτώματα όπως θολή όραση, δυσκολία σε ομιλία, κατάποση και αναπνοή                       |
| <i>E. coli O157</i>       | Ατελώς ψημένο βοδινό κρέας, απαστερίωτο γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα από απαστερίωτο γάλα    | Κοιλιακός πόνος, διάρροια, πυρετός, αιμορραγική κολίτιδα.  |
| <i>Salmonella</i> spp.    | Αυγά, πουλερικά, γάλα και προϊόντα του, θαλασσινά   | Διάρροια, έμετος, κοιλιακός πόνος, πυρετός, ναυτία   |
| <i>Shigella</i> spp.      | Σαλάτες, ωμά λαχανικά.  | Κοιλιακός πόνος και κράμπες, έμετος, διάρροια, πυρετός   |
| <i>Y. enterocolitica</i>  | Στρείδια, απαστερίωτο/ ωμό γάλα, ψάρια, κρέας   | Πυρετός, κοιλιακός πόνος, διάρροια, έμετος   |
| <i>L. monocytogenes</i>   | Μαλακά τυριά, απαστερίωτο/ωμό γάλα, ωμά λαχανικά, κρέατα και ψάρια, έτοιμα φαγητά               | Ναυτία, έμετος, διάρροια, πυρετός, μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, αποβολές, γέννηση θνησιγενών εμβρύων |
| <i>S. aureus</i>          | Επιμόλυνση από χειριστές τροφίμων όπως κρέας, πουλερικά, ψάρια, γαλακτοκομικά                   | Ναυτία, έμετος, κοιλιακός πόνος, κατάπτωση, διάρροια   |
| <i>Streptococcus</i> spp. | Επιμόλυνση από χειριστές τροφίμων   | Υψηλός πυρετός, ναυτία, κεφαλαλγία, έμετος, δυσκολία στην κατάποση, αμυγδαλίτιδα, πονόλαιμος       |

Επίσης σημαντικό ρόλο στις σιτιογενείς διαταραχές του ανθρώπου διαδραματίζουν κάποιοι ιοί. Οι βασικότεροι από αυτούς είναι οι εξής:

#### A. Ο ιός της ηπατίτιδας A του ανθρώπου

Η τροφιμογενής μόλυνση του ανθρώπου γίνεται κυρίως μέσω της κατανάλωσης ωμών μολυσμένων οστρακοειδών. Τα οστρακοειδή μολύνονται όταν η συλλογή τους γίνεται από νερά μολυσμένα από ανθρώπινα περιττώματα που φέρουν τον ιό. Σε μικρότερο βαθμό η μόλυνση γίνεται μέσω της κατανάλωσης επιμολυσμένων από τον ιό τροφίμων από άτομα – φορείς της νόσου, τα οποία είτε καταναλώνονται ατελώς ψημένα, είτε επιμολύνονται μετά τη θερμική τους επεξεργασία (Καραϊωάννογλου, 2008).

#### B. Οι Νοροϊοί

Οι νοροϊοί (*Norovirus*) προκαλούν στον άνθρωπο γαστρεντερίτιδα. Οι κυριότεροι τροφιμογενείς τρόποι μετάδοσης είναι μέσω νερού μολυσμένου με ανθρώπινα κόπρανα και μέσω της κατανάλωσης ωμών ή ατελώς ψημένων οστρακοειδών, η συλλογή των οποίων έχει γίνει από νερά στα οποία καταλήγουν ανθρώπινα κόπρανα (Καραϊωάννογλου, 2008).

Τέλος, η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν μυκοτοξίνες σε αυξημένα επίπεδα προκαλεί τοξινώσεις στον άνθρωπο. Οι σπουδαιότερες από τις μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, οι οποίες παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus*. Βασικότερη πηγή αφλατοξινών θεωρούνται τα φυστίκια και το φυστικοβούτυρο ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει και η παρουσία της αφλατοξίνης M1 σε γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα (Ιωσηφίδου, 2011).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### 2.1 *Listeria monocytogenes*

Ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* ή αλλιώς Λίστερια μονοκυτταρογόνος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Murray και τους συνεργάτες του το 1926 στο Ηνωμένο Βασίλειο ο οποίος του έδωσε το όνομα *Bacterium monocytogenes* λόγω του σχηματισμού μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων στο αίμα μολυσμένων κονίκλων και χοιριδίων (Murray, Webb, & Swann, 1926). Το τελικό του όνομα δόθηκε από τον Pirie το 1940 (Farber and Peterkin, 1991).

Το γένος *Listeria* είναι μέλος της οικογένειας *Listeriaceae* της τάξης *Bacillales*, που ανήκει στην κλάση *Bacilli*. Η κλάση αυτή ανήκει στο φύλο *Firmicute* (NCBI, 2016). Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει τα παρακάτω είδη: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. seeligeri* και *L. welshimeri* (Rocourt & Buchrieser, 2007). Από τα είδη αυτά ως παθογόνα χαρακτηρίζονται τα είδη *L. monocytogenes* και *L. ivanovii* (Vázquez-Boland et al., 2001). Η *L. monocytogenes* θεωρείται παθογόνο του ανθρώπου και των ζώων (Chand & Sadana, 1999), ενώ η *L. ivanovii* παθογόνο των ζώων, αν και έχουν παρουσιαστεί κάποια περιστατικά μόλυνσης ανθρώπων από το συγκεκριμένο είδος (Lessing et al., 1994; Snapir et al., 2006; Guillet et al., 2010).

Η *L. monocytogenes* είναι ένας gram-αρνητικός βάκιλος, μη σπορογόνος και προαιρετικά αναερόβιος (αυξάνεται καλύτερα σε συγκέντρωση 5-10% διοξειδίου του άνθρακα) (Farber & Peterkin, 1991). Έχει διαστάσεις 0,4-0,5 μm × 0,5-2,0 μm και απαντάται υπό μορφή μεμονωμένων κυττάρων ή αλυσίδων μικρού μήκους. Η κίνηση της γίνεται με περίτριχες βλεφαρίδες σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C), ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C στερείται κίνησης (Peel, et al, 1988; Andritsos, 2012).



**Εικόνα 1:** Απεικόνιση της *L. monocytogenes* (Emily et al., 2008).

Αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από -0,4 έως 50 °C, συνεπώς πρόκειται για ένα ψυχρόφιλο βακτήριο (Farber & Peterkin, 1991). Η βέλτιστη ανάπτυξή της παρατηρείται σε θερμοκρασία μεταξύ 35 και 37 °C, ενώ παρόλο που έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται σε θερμοκρασίες ψύξης (2-4 °C), η αύξηση αυτή γίνεται με αργούς

ρυθμούς. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί ότι ο χρόνος διπλασιασμού του βακτηρίου αυτού κατά τη συντήρηση γαλακτοκομικών προϊόντων στους 4 °C είναι περίπου 1-2 μέρες (Ryser, 2007). Επιπλέον είναι καταλάση θετική και οξειδάση αρνητική (Farber & Peterkin, 1991).

Η *L. monocytogenes* έχει τη δυνατότητα ανάπτυξης σε τιμές pH μεταξύ 4,4 και 9,4. Η βέλτιστη ανάπτυξη παρατηρείται σε pH 7. Μείωση του ρυθμού ανάπτυξης της παρατηρείται σε τιμές του pH μικρότερες από 5,5. Ο μικροοργανισμός αυτός είναι από τους λίγους που έχουν την ικανότητα να αυξηθούν σε τιμές ενεργότητας νερού μικρότερες της τιμής 0,93 (Farber et al., 1992).

Σε ότι αφορά στην αντοχή της *L. monocytogenes* στη θερμότητα έχουν γίνει αρκετές έρευνες. Από αυτές έχει προκύψει ότι στην περίπτωση του βόειου κιμά στους 50, 55 και 60°C οι τιμές D κυμαίνονται από 0,15 έως 36,1 min (Bolton et al., 2000). Επιπλέον, στην περίπτωση των Alheiras (παραδοσιακά λουκάνικα Πορτογαλίας), η τιμή D<sub>55</sub> κυμαίνεται από 7,2 έως 9,3, η τιμή D<sub>60</sub> από 1,3 έως 2,1 και η τιμή D<sub>70</sub> από 0,6 έως 1,8 min (Felicio et al., 2001). Τέλος, η τιμή D<sub>55</sub> σε κρέας και σε δέρμα κοτόπουλου βρέθηκε ότι είναι 38,94 και 34,05 αντίστοιχα, ενώ η τιμή D<sub>70</sub> 0,04 και 0,05 αντίστοιχα (Murphy et al., 2004).

Μια χαρακτηριστική ιδιότητα της *L. monocytogenes* είναι η αύξηση της θερμοανθεκτικότητάς της μετά από θερμικό σοκ. Κάθε θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης ενός βακτηρίου θεωρητικά οδηγεί στην καταστροφή του. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι η αργή θέρμανση ή η θέρμανση για μικρές χρονικές περιόδους οδηγούν σε αύξηση της θερμοαντοχής (Mackey & Derrick, 1986, 1987a, 1987b). Ο υπεύθυνος μηχανισμός δεν είναι πλήρως γνωστός, είναι όμως πιθανό οι θερμοκρασίες αυτές να προκαλούν μια κυτταρική αντίδραση. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει τη σύνθεση πρωτεϊνών, γνωστών ως πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat shock proteins, HSPs), για την προστασία των βακτηριακών κυττάρων (Schlesinger, 1986; Lindquist, 1986).

Συγκεκριμένα, ο Pagàn και οι συνεργάτες του (1997) παρατήρησαν ότι η προθέρμανση στους 47,5 °C επί 180 min είχε ως αποτέλεσμα τον τετραπλασιασμό της τιμής D<sub>65</sub> της *L. monocytogenes*. Επίσης, οι Novac και Juneja (2003) παρατήρησαν διπλασιασμό της τιμής D<sub>60</sub> μετά το θερμικό σοκ της *L. monocytogenes* στους 46 °C επί 60 min, ενώ σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και ο Sergelidis και οι συνεργάτες του (2001) σύμφωνα με τους οποίους παρατηρήθηκε αύξηση του D<sub>62,5</sub> κατά 3-4 φορές μετά από θερμικό σοκ στους 40°C για 24h. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Mackey και Derrick (1986), όσο πιο αργά αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο μεγαλύτερη είναι η θερμοαντοχή της *L. monocytogenes*. Η αύξηση της θερμοανθεκτικότητας του βακτηρίου αυτού είναι ιδιαίτερα σημαντική στη βιομηχανία των τροφίμων, όπως στην περίπτωση του κρέατος και των προϊόντων κρέατος των οποίων η θερμική επεξεργασία γίνεται με αργούς ρυθμούς, όπως τα προϊόντα που μαγειρεύονται sous-vide (Mackey & Derrick, 1986).

Οι απαιτήσεις της *L. monocytogenes* σε θερμοκρασία, pH, O<sub>2</sub> και ενεργότητα νερού καθώς και οι τιμές D<sub>60</sub> και D<sub>70</sub> φαίνονται στον Πίνακα 2 (Bolton et al., 2000; Beverly, 2004; Murphy et al., 2004).

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά της *L. monocytogenes*

|   | <b>Κατώτερο όριο</b> | <b>Βέλτιστο</b> | <b>Ανώτερο όριο</b> |
|---|----------------------|-----------------|---------------------|
| <b>Θερμοκρασία (°C)</b>                 | -0,4                 | 37              | 50                  |
| <b>pH</b>                               | 4,4                  | 7               | 9,4                 |
| <b>Διαθεσιμότητα σε O<sub>2</sub></b>   |                      | 5               |                     |
| <b>Ενεργότητα νερού (a<sub>w</sub>)</b> | 0,9                  | 0,92            | 0,97                |
| <b>D<sub>60</sub> (βόειος κιάς)</b>     |                      | 0,15min         |                     |
| <b>D<sub>70</sub> (κοτόπουλο)</b>       |                      | 0,04 min        |                     |

Η ανάπτυξη του βακτηρίου αυτού επηρεάζεται, εκτός από τη διαθεσιμότητα των αναγκαίων ποσοτήτων άνθρακα και αζώτου που απαιτούνται για την ανάπτυξή της, και από κάποιους άλλους παράγοντες όπως η παρουσία αμινοξέων. Τα αμινοξέα αυτά είναι τα εξής: κυστίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, αργινίνη, μεθειονίνη, βαλίνη και κυστεΐνη. Επιπλέον επηρεάζεται και από την παρουσία των βιταμινών ριβοφλαβίνη, βιοτίνη, θυαμίνη και λιποϊκό οξύ (Welshimer, 1963; Siddiqi & Khan, 1989; Premaratne et al., 1991). Τέλος, ευεργετικό ρόλο στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes* παίζει η ύπαρξη στο θρεπτικό υπόστρωμα τρισθενούς σιδήρου και φαινυλαλανίνης (Andritsos, 2012).

## 2.2 Λιστερίωση

Λιστερίωση ονομάζεται η νόσος που οφείλεται στη μόλυνση από το βακτήριο *L. monocytogenes*. Η νόσος αυτή προσβάλλει τόσο τα ζώα όσο και τους ανθρώπους, ενώ κύριος τρόπος μετάδοσής της είναι τα μολυσμένα με το βακτήριο αυτό τρόφιμα. Συνεπώς πρόκειται για ένα τροφιμογενές νόσημα (Beverly, 2004). Τα άτομα που επηρεάζει η λιστερίωση είναι αυτά που ανήκουν στις ομάδες υψηλού κινδύνου, όπως οι έγκυες, τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι. Εξαιτίας του μεγάλου χρόνου επώασης όμως είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η πηγή μόλυνσης μιας έξαρσης κρουσμάτων (Beverly, 2004). Τα υψηλά ποσοστά θνητότητας που χαρακτηρίζουν τη νόσο αυτή (20-30%) οδηγούν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα πολύ σοβαρό νόσημα και το βακτήριο που την προκαλεί ένα πολύ σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο (Mead et al., 1999).

Επίσημως η ιστορία της *L. monocytogenes* ξεκινά το 1924 με πρώτο επιβεβαιωμένο κρούσμα να χρονολογείται στα τέλη του Α' παγκοσμίου πολέμου. Συγκεκριμένα το κρούσμα αυτό αφορούσε έναν στρατιώτη ο οποίος έπασχε από μηνιγγίτιδα (Cotoni, 1942). Συνεπώς πρόκειται για έναν παθογόνο παράγοντα σχετικά πρόσφατο. Με το πέρασμα των ετών αναφέρθηκαν και άλλα περιστατικά λιστερίωσης σε ανθρώπους σε χώρες όπως στη Δανία το 1929 όπου απομονώθηκε *L. monocytogenes* από ασθενείς με συμπτώματα που παρουσίαζαν ομοιότητες με αυτά της λοιμώδους μονοπυρήνωσης (Nyfeldt, 1929). Παρόλα αυτά ήταν ένα νόσημα περιορισμένης εμφάνισης καθώς μέχρι το 1955 είχαν παρουσιαστεί μόνο 20 κρούσματα λιστερίωσης του ανθρώπου (Μπαλατσούρας, 2006). Ενώ λοιπόν η *L. monocytogenes* είχε αναγνωριστεί ως παράγοντας πρόκλησης νόσου στον άνθρωπο, μόλις το 1981 αναγνωρίστηκε η συσχέτισή της με τα τρόφιμα και ο τροφιμογενής χαρακτήρας της νόσου. Συγκεκριμένα,

το 1981 στον Καναδά σημειώθηκαν 41 κρούσματα και 7 θάνατοι λόγω λιστερίωσης μετά την κατανάλωση τυποποιημένης λαχανοσαλάτας του εμπορίου (Harris, 2002).

Το 2008 καταγράφηκε στον Καναδά μια έξαρση της νόσου με αποτέλεσμα 57 άτομα να νοσούν και 22 θανάτους. Αίτιο ήταν η κατανάλωση μολυσμένων αλλαντικών της εταιρίας Maple Leaf Foods Inc. Μετά από εκτενέστερη έρευνα διαπιστώθηκε ότι η πιο πιθανή πηγή μόλυνσης ήταν η μηχανή που χρησιμοποιήθηκε για την κοπή σε φέτες των αλλαντικών αυτών (HPCS, 2017).

Το 2009 καταγράφηκαν 3 εξάρσεις κρουσμάτων λιστερίωσης στην Αυστρία, την Τσεχία και τη Γερμανία. Αυτή η έξαρση περιελάμβανε 40 κρούσματα, από τα οποία τα 11 ήταν θανατηφόρα. Αίτιο των κρουσμάτων αυτών ήταν η κατανάλωση τυριού quargel (EFSA, 2011).

Το 2011 εμφανίστηκαν 146 κρούσματα λιστερίωσης στις ΗΠΑ από τα οποία τα 31 οδήγησαν στο θάνατο των ασθενών. Αίτιο της έξαρσης αυτής ήταν η κατανάλωση πεπονιών, ενώ *Listeria* απομονώθηκε από πεπόνια και από τον εξοπλισμό του συσκευαστηρίου (CDC, 2011; FDA, 2011).

Σύμφωνα με τον CDC (Centers for Disease Control and Prevention) έχουν αναφερθεί αρκετά κρούσματα λιστερίωσης από RTE τρόφιμα. Από τον Αύγουστο μέχρι το Νοέμβριο του 2013 εμφανίστηκαν 8 κρούσματα λιστερίωσης σε 5 πολιτείες της Αμερικής από την κατανάλωση ημίσκληρου τυριού. Από τα οκτώ αυτά κρούσματα το ένα οδήγησε στο θάνατο του ασθενούς (CDC, 2017d). Από τον Μάιο μέχρι τον Ιούλιο του 2013 εμφανίστηκαν 6 κρούσματα σε 5 πολιτείες της Αμερικής επίσης εξαιτίας της κατανάλωσης τυριού με αποτέλεσμα έναν θάνατο και μια αποβολή (CDC, 2017c). Ένα ακόμα περιστατικό αφορούσε της εμφάνιση λιστερίωσης σε 22 άτομα από τον Μάρτιο μέχρι τον Οκτώβριο του 2012 σε 13 πολιτείες της Αμερικής η οποία οφειλόταν στην κατανάλωση σαλάτας με τυρί ricotta (CDC, 2017b). Τέλος, 19 άνθρωποι σε 9 πολιτείες της Αμερικής νοσηλεύθηκαν λόγω της λιστερίωσης το 2015. Σε αυτήν την περίπτωση αιτία ήταν η κατανάλωση συσκευασμένης σαλάτας (CDC, 2017a).

### 2.2.1. Επιδημιολογικά Δεδομένα

Η *L. monocytogenes* συναντάται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα μπορεί να βρεθεί:

- Στο έδαφος
- Στη βλάστηση
- Στα λύματα
- Στα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών
- Στη λάσπη βιολογικών καθαρισμών και
- Στα κόπρανα ζώων και ανθρώπων (Schuchat et al., 1991; Allerberger, 2007).

Επιπλέον, ο μικροοργανισμός αυτός μπορεί να βρεθεί, εκτός από το φυσικό περιβάλλον και σε άγρια θηλαστικά τα οποία με τη σειρά τους ενδέχεται να μολύνουν άλλα ζώα ή

ανθρώπους. Η *L. monocytogenes* επιβιώνει στο έδαφος και το νερό για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του ενός έτους ενώ στα κόπρανα ζώων για περισσότερο από 2 έτη (Schlech et al., 1983; Schutchat et al. 1991).

Η μετάδοση της νόσου γίνεται με τους εξής τρόπους:

1. Άμεσα από προσβεβλημένα ζώα και
2. Μέσω μολυσμένων τροφίμων όπως:
  - Απαστερίωτο και παστεριωμένο γάλα
  - Κρέας και κρεατοσκευάσματα
  - Ωμές σαλάτες και λαχανικά
  - Πουλερικά
  - Ψάρια και
  - Οστρακοειδή (Andritsos, 2012)

Η μόλυνση των τροφίμων μπορεί να γίνει με έναν από τους ακόλουθους τρόπους:

1. Απευθείας μόλυνση προϊόντων διότι προέρχονται από μολυσμένα ζώα (π.χ. γάλα, ψάρια).
2. Διασπορά στο περιβάλλον με τα κόπρανα ζώων ή ανθρώπων (στο έδαφος και το νερό). Μέσω αυτών μολύνονται τρόφιμα όπως τα λαχανικά, τα ψάρια, τα οστρακοειδή κ.α.
3. Επιμόλυνση έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων λόγω κακών χειρισμών κατά την παρασκευή και τη διανομή τους (Andritsos, 2012).

Η συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* σύμφωνα με τον Meldrum και τους συνεργάτες του (2010) ήταν 4,1% σε οστρακοειδή, 6,7% σε καπνιστό ψάρι, 2% σε sushi και 0,9% σε πράσινες σαλάτες. Επιπλέον, το βακτήριο αυτό έχει απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα. Για παράδειγμα, ανιχνεύθηκε σε 78 δείγματα τυριού (ποσοστό 1,3%) στην Ισπανία, σε 1242 δείγματα σκληρού τυριού (ποσοστό 0,2%) στο Ηνωμένο Βασίλειο και σε 1734 παγωτά (ποσοστό 0,3%) στην Ιταλία (Busani et al. 2005; Cabedo et al. 2008; Little et al., 2009). Η συχνότητα απομόνωσης της *L. monocytogenes* σε δεξαμενές γάλακτος ποικίλει από 1 έως 60% (FSANZ, 2009). Ακόμα, η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από κρέας κοτόπουλου στην Αίγυπτο σε ποσοστό 41%, σε κατεψυγμένο βόειο κρέας στη Μαλαισία σε ποσοστό 73,9%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε βόειο κιμά στην Τουρκία ανέρχεται σε 83,3% (Abdelazeem & Elsayh, 2010; Yucel et al., 2005; Hassan et al., 2001). Τέλος, ανιχνεύθηκε *L. monocytogenes* σε ποσοστό 40% σε κρέας και κρεατοσκευάσματα στην Τσεχία (Kačániová et al., 2015).

### 2.2.2. Παθογένεια

Το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* είναι ένα ενδοκυτταρικό παράσιτο. Η εισαγωγή του στο υγιές κύτταρο γίνεται μέσω του σχηματισμού φαγοσωμάτων. Το φαγόσωμα εισάγεται στο κύτταρο με φαγοκύτωση με τη βοήθεια ενζύμων όπως η λιστεριολυσίνη O (LLO), η λεκιθινάση και η ειδική φωσφολιπάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (Vázquez-Boland et al., 2001; Portnoy et al., 2002; Dussurget et al., 2004). Με τα ένζυμα αυτά επέρχεται λύση της μεμβράνης του φαγοσώματος όταν

αυτό εισέλθει στο κύτταρο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του βακτηρίου στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια τον πολλαπλασιασμό του. Σημαντικό ρόλο στην παθογένεια της *L. monocytogenes* αποτελεί η ικανότητα που έχει να εισβάλλει και σε γειτονικά κύτταρα (Sanger et al., 1992; Southwick & Purich, 1996). Για να επιτευχθεί αυτό πολυμερίζει νημάτια ακτίνης ώστε να σχηματισθεί βλεφαρίδα σε έναν από τους δύο πόλους της. Μέσω αυτής η *L. monocytogenes* προωθείται δίπλα στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή (Salyers & Whitt, 2002), με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας προεκβολής μέσω της οποίας εισβάλλει στο διπλανό υγιές κύτταρο οδηγώντας στη μόλυνση του (Andritsos, 2012).

Στην περίπτωση της μόλυνσης του ανθρώπου, η *L. monocytogenes* επιβιώνει κατά τη διέλευσή της από το στομάχι και φτάνει στο έντερο όπου και πολλαπλασιάζεται. Ακολουθεί διήθηση του εντερικού βλεννογόνου από κύτταρα του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού (Farber & Peterkin, 1991; Cossart & Sansonetti, 2004), ενώ στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω του αίματος σε διάφορα όργανα όπως το ήπαρ και τον σπλήνα, τα οποία μολύνει. Επιπλέον μπορεί να μολύνει το ΚΝΣ και τον πλακούντα γυναικών που κυοφορούν (Andritsos, 2012).

### 2.2.3. Συμπτωματολογία στον Άνθρωπο

Η μέση διάρκεια της περιόδου επώασης της λιστερίωσης είναι 31 μέρες. Ωστόσο η διάρκεια αυτή ποικίλλει ανάλογα με τον πληθυσμό του μικροοργανισμού που προσλαμβάνεται και την ευπάθεια του κάθε ατόμου (Harris, 2002; Ooi & Lorber, 2005; Lorber, 2007). Σύμφωνα με τον Sim και τους συνεργάτες του (2002) απαιτείται κατανάλωση υψηλών δόσεων του βακτηρίου ( $1.9 \times 10^5/g$  έως  $1.2 \times 10^9/g$ ) για την εμφάνιση της νόσου. Σύμφωνα με τον Mead και τους συνεργάτες του (1999) η λιστερίωση είναι ένα νόσημα με υψηλά ποσοστά θνητότητας (20-30%), ιδιαίτερα σε ομάδες υψηλού κινδύνου όπως οι ηλικιωμένοι, οι έγκυες, τα νεογνά και τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα.

Τα συμπτώματα στην ήπια μορφή της νόσου μοιάζουν με αυτά της γρίπης ή με απλή λοίμωξη του δέρματος. Συνήθως όμως η λιστερίωση εμφανίζεται με τη μορφή «μηνιγγοεγκεφαλίτιδας με μικροβαιμία» (Lorber, 1997; Bucholz & Mascola, 2001; Wing & Gregory, 2002; Allerberger, 2007). Το χαρακτηριστικότερο σύμπτωμα της νόσου αυτής είναι η πολυμορφοπύρρηνη λευκοκυττάρωση και στη συνέχεια η μονοπύρρηνη λευκοκυττάρωση (Andritsos, 2012).

### 2.2.4. Θεραπεία

Για τη θεραπεία της λιστερίωσης χορηγούνται αντιβιοτικά, με αντιβιοτικό εκλογής την αμικικιλίνη. Σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να χορηγηθεί και γενταμυκίνη (Heymann, 2008). Στην περίπτωση νεογνών που νοσούν χορηγούνται τα ίδια αντιβιοτικά, ενώ στην περίπτωση των εγκύων η λοίμωξη του νεογνού ή του εμβρύου μπορεί να προληφθεί με άμεση αντιμικροβιακή αγωγή (Ποταμίτη-Κόμη, 2011).

### 2.2.5. Προληπτικά Μέτρα

Η μετάδοση της λιστερίωσης είναι κυρίως τροφιμογενής. Ως μέτρα για την πρόληψη της προτείνονται τα εξής:

- Ορθός χειρισμός ωμών τροφίμων που περιλαμβάνει τη λήψη μέτρων υγιεινής και την διατήρησή τους μακριά από μαγειρεμένα και έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) τρόφιμα.
- Στην περίπτωση των λαχανικών απαραίτητο είναι το ενδεδειγμένο πλύσιμό τους ειδικά εάν πρόκειται να καταναλωθούν ωμά π.χ. σαλάτες.
- Επιμελές μαγείρεμα των τροφίμων ζωικής προέλευσης ώστε η θερμοκρασία στο κέντρο μάζας να φθάσει τους 75 °C.
- Κατανάλωση γάλακτος και τροφίμων που παρασκευάζονται από γάλα μόνο εφόσον αυτό είναι παστεριωμένο.
- Ικανοποιητική αναθέρμανση τροφίμων πριν την κατανάλωσή τους (τουλάχιστον μέχρι τους 63°C στο κέντρο μάζας του τροφίμου).
- Για άτομα που ανήκουν σε ομάδες υψηλού κινδύνου απαραίτητο προληπτικό μέτρο είναι και η αποφυγή κατανάλωσης μπλε και μαλακών τυριών κυρίως από απαστερίωτο γάλα, καθώς και καπνιστών ψαριών όπως ο σολομός (Lorber, 2007; Andritsos, 2012).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### 3.1 Συντήρηση Κρέατος και Προϊόντων με βάση το Κρέας

Το κρέας αποτελεί αναντικατάστατο κομμάτι της διατροφής του ανθρώπου παρά την τεράστια ποικιλία τροφών που είναι πλέον διαθέσιμες (Heinz & Hautzinger, 2007). Το γεγονός αυτό είναι απόλυτα δικαιολογημένο καθώς το κρέας αποτελεί πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών και πρωτεϊνών υψηλής βιολογικής αξίας αλλά και βιταμινών του συμπλέγματος Β, όπως θειαμίνη, φολικό οξύ, Β6, Β12, ριβοφλαβίνη και νιασίνη (Fink-Gremmels, 1992; Καραϊωάννογλου, 2004).

Τα χαρακτηριστικά αυτά του κρέατος καθώς και των προϊόντων με βάση το κρέας, όπως οι κεφτέδες οι οποίοι αποτελούν το αντικείμενο της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας, το καθιστούν αρκετά ευαίσθητο στην ανάπτυξη αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, καθώς τους παρέχουν υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους (Aymerich et al., 2008). Εκτός από διάφορους μικροοργανισμούς, η αλλοίωση του κρέατος προκαλείται και από διάφορες ενζυμικές και οξειδωτικές διεργασίες (Lambert et al., 1991). Ο κιμάς και οι κεφτέδες συγκαταλέγονται στα πλέον ευαλλοιώτα προϊόντα του κρέατος. Είναι τρόφιμα που μπορούν εύκολα να μολυνθούν τόσο από τους χειριστές όσο και από τη μηχανή κοπής τους και τα σκεύη επεξεργασίας. Επιπλέον, με την κοπή του κιμά τα βακτήρια που βρίσκονταν στην εξωτερική επιφάνεια μεταφέρονται σε όλη τη μάζα του, ενώ εξαιτίας της μεγαλύτερης επιφάνειας που έχει μετά την κοπή του επιτρέπει την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων. Συνεπώς, οι κεφτέδες αποτελούν ένα προϊόν η συντήρηση του οποίου πρέπει να είναι ιδιαίτερα επιμελής για να αποφευχθεί η ανάπτυξη μικροοργανισμών (Γεωργάκης και άλλοι, 2002).

Είναι λοιπόν φανερό ότι επειδή όλες αυτές οι αλλοιώσεις υποβαθμίζουν ποιοτικά το κρέας είναι απαραίτητη η επαρκής συντήρησή του, τόσο με παραδοσιακές όσο και με καινοτόμους μεθόδους (Zhou et al., 2010). Η πιο διαδεδομένη παραδοσιακή μέθοδος συντήρησης του κρέατος και των προϊόντων του είναι η συντήρηση υπό ψύξη (0-7 °C). Η μέθοδος συντήρησης αυτή δρα προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών και μείωση της ταχύτητας των βιοχημικών αντιδράσεων (Cassens, 1994). Μια ακόμη διαδεδομένη μέθοδος συντήρησης είναι η συσκευασία σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα καθώς η σύσταση των αερίων στις συσκευασίες αυτές είναι τέτοια ώστε να μην επιτρέπει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών που υπάρχουν φυσιολογικά στην επιφάνεια του κρέατος. Συγκεκριμένα, έχουν πολύ μικρή περιεκτικότητα σε οξυγόνο (<1%) και υψηλή περιεκτικότητα σε CO<sub>2</sub> (περίπου 20%) (Newton & Gill, 1978). Οι μέθοδοι αυτοί σε περίπτωση που συνδυαστούν έχουν ακόμη πιο ευεργετικά αποτελέσματα στη συντήρηση του κρέατος και στα προϊόντα του.



### 3.2 Προψημένα Κρέατα

Το κρέας και συνεπώς και τα προϊόντα κρέατος είναι ευαλλοιώτα τρόφιμα. Η θερμική επεξεργασία που υφίστανται κατά το μαγείρεμά τους και η συντήρησή τους υπό ψύξη δεν είναι πάντα πλήρως αποτελεσματικές. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις αυξημένες απαιτήσεις των καταναλωτών σχετικά με την αύξηση του χρόνου ζωής των τροφίμων, χωρίς αυτό όμως να σημαίνει την ποιοτική τους υποβάθμιση, ήταν κάποιοι από τους λόγους που οδήγησαν στη δημιουργία των έτοιμων προς κατανάλωση (RTE) τροφίμων, τα οποία περιλαμβάνουν και τα προψημένα κρέατα (Gilbert et al., 2009).

Τρόφιμα έτοιμα προς κατανάλωση είναι αυτά «που προορίζονται από τον παραγωγό ή τον παρασκευαστή για ανθρώπινη κατανάλωση χωρίς να χρειάζονται μαγείρεμα ή άλλη επεξεργασία, αποτελεσματική για να εξαλείψει ή να μειώσει σε αποδεκτό επίπεδο τους ανησυχητικούς μικροοργανισμούς» (ΕΚ) αριθ. 2073/2005; (ΕΚ) αριθ. 1441/2007).

Η επεξεργασία των τροφίμων αυτών μπορεί να περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα από τα παρακάτω βήματα, τα οποία μπορούν και να συνδυαστούν.

- Λεπτοτεμαχισμό
- Προσθήκη διαλυτών και γαλακτωματοποιητών
- Προσθήκη γεύσεων
- Προσθήκη αντιμικροβιακών συντηρητικών
- Θερμική επεξεργασία
- Κάπνιση
- Συσκευασία υπό κενό
- Χρήση συσκευασιών τροποποιημένης ατμόσφαιρας
- Συντήρηση είτε σε ψύξη είτε σε κατάψυξη (Gilbert et al., 2009).

Τα βήματα αυτά, εκτός από τον λεπτοτεμαχισμό και την προσθήκη διαλυτών και γαλακτωματοποιητών, μπορούν δυνητικά να βοηθήσουν στον έλεγχο παθογόνων βακτηρίων (Gilbert et al., 2009).

### 3.3 Κίνδυνοι για τη Δημόσια Υγεία

Τα προψημένα τρόφιμα πρέπει να ελέγχονται ώστε να διασφαλιστεί η δημόσια υγεία. Παρακάτω αναφέρονται τα παθογόνα βακτήρια τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τη δημόσια υγεία καθώς και η σημασία τους.

#### 1) *Listeria monocytogenes*

Η *L. monocytogenes* αποτελεί τον βασικότερο κίνδυνο σε προψημένα τρόφιμα καθώς είναι ένα βακτήριο ευρέως διαδεδομένο στη φύση, ενώ μπορεί να επιβιώσει και σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως θερμοκρασίες κατάψυξης (Sofos & Geornaras,

2010). Η μόλυνση RTE τροφίμων από *L. monocytogenes* αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ζήτημα για την ασφάλεια τους διότι:

- i. Τα προψημένα γεύματα έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και καταναλώνονται χωρίς περαιτέρω θερμική επεξεργασία
- ii. Η *L. monocytogenes* μπορεί να φτάσει σε «απειλητικά» επίπεδα κατά τη συντήρηση των τροφίμων αυτών εξαιτίας της ικανότητας της να αναπτύσσεται και να πολλαπλασιάζεται σε θερμοκρασίες ψύξης (Lou & Yousef, 1999) και
- iii. Η εμφάνιση πολυανθεκτικότητας στα είδη λιστέριας λόγω της απόκτησης ενός αντιγράφου από τους σταφυλοκόκκους (Lemaitre et al., 1998)

Η μόλυνση του προψημένου κρέατος από *L. monocytogenes* μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Αρχικά, μπορούν να μολυνθούν από τις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τους. Ωστόσο, επειδή προτού διατεθούν προς κατανάλωση υφίστανται θερμική επεξεργασία, ο κίνδυνος αυτός εξαλείφεται (Lianou & Sofos, 2007; Sofos, 2008; Zhu et al., 2005). Συνεπώς, η μόλυνση των RTE κρεάτων γίνεται κυρίως με κάποιου είδους επιμόλυνσή τους αφού έχουν ήδη μαγειρευτεί (Zhu et al., 2005). Η παρουσία του βακτηρίου αυτού σε RTE τρόφιμα συνήθως οφείλεται σε κακούς χειρισμούς, επιμόλυνση κατά την παραγωγή ή και στο σημείο πώλησης, έλλειψη ελέγχου της θερμοκρασίας ή ακατάλληλη διάρκεια του χρόνου συντήρησης (Health Protection Agency Working Group, 2009).

Σύμφωνα με αρκετές έρευνες που έχουν λάβει χώρα η συχνότητα παρουσίας της *L. monocytogenes* ποικίλει από 1,8 έως 48% (Ryu et al., 1992; Wilson, 1995; Bersot et al., 2001; Eleftheriadou et al., 2002 ; Soultos et al., 2003; Mena et al., 2004; Vitas et al., 2004). Ειδικότερα, ανιχνεύθηκε *Listeria* spp. στην Ισπανία σε ποσοστό 8,1% σε μαλακά τυριά και σε ποσοστό 76,3% σε ωμά κοτόπουλα (Vitas et al., 2004). Στην Ιρλανδία το ποσοστό απομόνωσης της *L. monocytogenes* σε τυποποιημένα κοτόπουλα του εμπορίου έφτασε το 18% (Soultos et al., 2003), ενώ στην Πορτογαλία ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 7% σε δείγματα που περιελάμβαναν γάλα, κρέας, ψάρια και αλεύρι (Mena et al., 2004). Σύμφωνα με τον Ryu και τους συνεργάτες του (1992) το ποσοστό ανίχνευσης της *L. monocytogenes* σε δείγματα κρέατος στην Ιαπωνία ήταν 34% , ενώ σύμφωνα με τον Bersot και τους συνεργάτες του (2001) το ποσοστό παρουσίας του βακτηρίου αυτού σε δείγματα μορταδέλας στη Βραζιλία έφτασε το 26,7%. Τέλος, η *L. monocytogenes* ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 18,2% σε ωμά προϊόντα κρέατος στο Τρινιντάντ (Gibbons, 2006).

Τα κριτήρια ασφάλειας για τη *L. monocytogenes* σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005, αναφέρουν σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που προορίζονται για παιδιά ή για ιατρικούς σκοπούς καθώς και σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη του βακτηρίου αυτού είναι απαραίτητο να υπάρχει απουσία του σε 25 g τροφίμου. Στα υπόλοιπα προψημένα τρόφιμα, τα οποία δεν επιτρέπουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, η συγκέντρωσή της δε θα πρέπει να ξεπερνά τα 10<sup>2</sup> CFU/g κατά τη διάρκεια ζωής τους (Health Protection Agency Working Group, 2009; (ΕΚ) αριθ. 2073/2005; (ΕΚ) αριθ.1441/2007).

## 2) *Campylobacter* spp.

Το *Campylobacter* αποτελεί την πιο συχνή αιτία βακτηριακών λοιμώξεων του γαστρεντερικού σωλήνα στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Τα επιβεβαιωμένα κρούσματα το 2015 ανήλθαν σε 229.213 (EFSA, 2016). Το βακτήριο αυτό δεν μπορεί να αναπτυχθεί στα τρόφιμα και καταστρέφεται από τη θερμότητα. Συνεπώς, η ανίχνευση του σε RTE τρόφιμα οφείλεται είτε σε ανεπαρκή θερμική επεξεργασία, είτε σε κάποιου είδους επιμόλυνση (Health Protection Agency Working Group, 2009).

### 3) *Echerichia coli* O157

Ο αριθμός κρουσμάτων μόλυνσης από το βακτήριο αυτό είναι μικρότερος από τον αριθμό κρουσμάτων από *Salmonella* ή *Campylobacter*. Ωστόσο λόγω της αυξημένης θνητότητας που προκαλεί στις ευπαθείς ομάδες παραμένει ένα βακτήριο με μεγάλη σημασία για τη δημόσια υγεία. Όπως και στο *Campylobacter* έτσι στην *E. coli* εύρεση του βακτηρίου στα τρόφιμα οφείλεται είτε σε επιμόλυνση είτε σε ανεπαρκή θερμική επεξεργασία (Health Protection Agency Working Group, 2009).

### 4) *Salmonella* spp.

Η μόλυνση από *Salmonella* γίνεται μέσω της κατάποσης ζωντανών βακτηρίων. Όλες οι ηλικιακές ομάδες είναι ευαίσθητες στη μόλυνση από το βακτήριο αυτό ενώ έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και μικρές δόσεις του μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή του γαστρεντερικού σωλήνα. Συνεπώς, πρόκειται για ένα σοβαρό κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, ιδιαίτερα εφόσον εμφανίζονται συνεχώς νέα στελέχη τα οποία παρουσιάζουν αντοχή στα αντιβιοτικά. Η μόλυνση των τροφίμων από *Salmonella* γίνεται μέσω επιμόλυνσης ή λόγω ανεπαρκούς θερμικής επεξεργασίας τους (Health Protection Agency Working Group, 2009).

### 5) *Shigella* spp.

Σε αντίθεση με τους υπόλοιπους συχνότερους παράγοντες τροφιμογενών νοσημάτων η σιγγέλωση είναι αποκλειστικά ανθρώπινη ασθένεια. Για την εμφάνιση της ασθένειας αυτής αρκεί ακόμα και μικρή δόση του βακτηρίου, ενώ ευπαθείς είναι όλες οι ηλικιακές ομάδες. Τα τρόφιμα μολύνονται συνήθως κατά τον χειρισμό τους από μολυσμένους χειριστές ή από την κατανάλωση μολυσμένης πρώτης ύλης (Health Protection Agency Working Group, 2009).

### 6) *Vibrio cholerae*

Η χολέρα προκαλείται από την κατάποση ζωντανών βακτηρίων *Vibrio cholerae*. Δύο ορότυποι του *V. cholerae*, ο O1 και ο O139, έχουν ταυτοποιηθεί ως αίτια έξαρσης κρουσμάτων. Η χολέρα είναι ένα νόσημα που επηρεάζει τόσο παιδιά όσο και ενήλικες και έχει 1-10% ποσοστό θνητότητας. Μόλυνση από το βακτήριο αυτό γίνεται μέσω μολυσμένων θαλασσινών ή μολυσμένου νερού. Η μόλυνση RTE τροφίμων από το βακτήριο αυτό γίνεται είτε λόγω ανεπαρκούς θερμικής επεξεργασίας, είτε λόγω επιμόλυνσης από τους χειριστές των τροφίμων αυτών, είτε τέλος λόγω χρήσης μολυσμένου νερού άρδευσης (Health Protection Agency Working Group, 2009).

### 7) *Bacillus cereus*

Ο *B. cereus* προκαλεί είτε το εμετικό σύνδρομο (σε περίπτωση κατανάλωσης της τοξίνης του με το τρόφιμο) είτε το διαρροϊκό σύνδρομο (σε περίπτωση παραγωγής τοξινών στο έντερο μετά την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου). Ο *B. cereus* βρίσκεται στο περιβάλλον και μπορεί να μολύνει τρόφιμα και συστατικά τροφίμων με τη μορφή σπόρων. Συνεπώς, το βακτήριο αυτό μπορεί να βρεθεί σε προψημένα τρόφιμα λόγω ανεπαρκούς ελέγχου της θερμοκρασίας, κακής ποιότητας πρώτων υλών αλλά και λόγω κακών χειρισμών (Health Protection Agency Working Group, 2009).

#### 8) *Clostridium perfringens*

Το *C. perfringens* εντοπίζεται στο έντερο ανθρώπων και ζώων οπότε η μόλυνση από αυτό γίνεται μέσω των κοπράνων. Δεν είναι σύνηθες να εντοπίζεται ο μικροοργανισμός αυτός σε RTE τρόφιμα των οποίων ο χειρισμός είναι ορθός. Η νόσος προκαλείται από την κατάποση ζωντανών βακτηρίων τα οποία σπορογονούν στο έντερο και παράγουν εντεροτοξίνη η οποία προκαλεί διάρροια. Οι σπόροι του βακτηρίου μπορούν να επιβιώσουν μετά το μαγείρεμα του τροφίμου, συνεπώς ο έλεγχος του νοσήματος προϋποθέτει την αποτροπή βλάστησης των σπόρων. Για την πρόληψη εμφάνισης του νοσήματος αυτού σε RTE τρόφιμα είναι βασικό η ψύξη μετά το μαγείρεμα να γίνεται γρήγορα, το τρόφιμο να αποθηκεύεται σε θερμοκρασία ψύξης και να γίνεται επαρκής αναθέρμανση του πριν την κατανάλωση (Health Protection Agency Working Group, 2009).

#### 9) *Staphylococcus aureus*

Η τροφιμογενής νόσος που προκαλείται από τον *S. aureus* οφείλεται στην παραγωγή εντεροτοξινών στο τρόφιμο. Η θερμική επεξεργασία των τροφίμων καταστρέφει το βακτήριο, όχι όμως τις τοξίνες οι οποίες είναι θερμοάντοχες. Ανίχνευση *S. aureus* και άλλων θετικών στην πηκτάση σταφυλοκόκκων σε RTE τρόφιμα, σε συγκεντρώσεις  $>10^4$  οφείλεται πιθανώς σε κακούς χειρισμούς και ελλειπείς ελέγχους της θερμοκρασίας (Health Protection Agency Working Group, 2009).

#### 10) *Vibrio parahaemolyticus*

Το *V. parahaemolyticus* εντοπίζεται σε νερά ακτών και σε εκβολές ποταμών. Η νόσος που προκαλεί οφείλεται στην κατανάλωση ωμών θαλασσινών ή στην επιμόλυνση τροφίμων από θαλασσινά. Βασικότερες αιτίες παρουσίας του μικροοργανισμού αυτού σε προψημένα τρόφιμα είναι η ελλιπής θερμική επεξεργασία και κάποια επιμόλυνση (Health Protection Agency Working Group, 2009).

Η παρουσία τροφιμογενών παραγόντων που μπορούν να προκαλέσουν νόσο σε προψημένα τρόφιμα αποτελεί σημαντικό κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να γίνεται ανίχνευση των παραγόντων αυτών. Παρόλο που μικρές συγκεντρώσεις παθογόνων βακτηρίων, όπως *S. aureus*, *C. perfringens*, *B. cereus* και *L. monocytogenes*, σε προψημένα τρόφιμα πιθανότατα αντιπροσωπεύουν χαμηλό κίνδυνο στην περίπτωση των ανοσοϊκανών ατόμων, στα ανοσοκατεσταλμένα και ευπαθή άτομα είναι πολύ υψηλότερος. Χαμηλές συγκεντρώσεις τέτοιων παραγόντων μπορεί να οφείλονται σε φυσική μόλυνση των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν.

Ωστόσο, συνήθως η παρουσία τους υποδηλώνει σφάλματα κατά την παραγωγή ή τον χειρισμό των τροφίμων, γεγονός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερβολική αύξηση του κινδύνου. Τέλος, ίσως είναι αναγκαίο να παρθούν μέτρα ακόμα και στην περίπτωση που ανιχνεύονται μικρές συγκεντρώσεις των μικροοργανισμών αυτών σε προψημένα τρόφιμα, καθώς η ευπάθεια των ξενιστών και η παθογονικότητα των βακτηρίων αυτών ποικίλει (Health Protection Agency Working Group, 2009).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### 4.1 Αντιμικροβιακές Συσκευασίες

Ο βασικότερος ρόλος της συσκευασίας των τροφίμων είναι η προστασία τους από εξωτερικούς παράγοντες (Coles, 2003). Η συσκευασία των τροφίμων καθυστερεί την υποβάθμιση των τροφίμων και επιμηκύνει το χρόνο ζωής τους μέσω της προστασίας που προσφέρει από χημικούς, βιολογικούς και φυσικούς κινδύνους (Marsh & Bugusu, 2007).

Οι χημικοί κίνδυνοι περιλαμβάνουν αλλαγές στη σύνθεση των τροφίμων λόγω περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η έκθεση σε αέρια (κυρίως οξυγόνο), σε υγρασία ή στο φως. Η συσκευασία των τροφίμων ελαχιστοποιεί τους κινδύνους αυτούς. Πιο συγκεκριμένα, οι γυάλινες ή μεταλλικές συσκευασίες προστατεύουν πλήρως τα τρόφιμα από χημικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ωστόσο, λίγες συσκευασίες είναι πλήρως κατασκευασμένες από τα υλικά αυτά διότι για το κλείσιμο και το άνοιγμά τους χρησιμοποιούνται άλλα υλικά όπως πλαστικά καπάκια, τα οποία είναι διαπερατά σε μικρό βαθμό (Marsh & Bugusu, 2007).

Η βιολογική προστασία περιλαμβάνει το φραγμό που δημιουργείται ενάντια σε μικροοργανισμούς, έντομα, τρωκτικά και άλλα ζώα, με αποτέλεσμα να αποτρέπουν την εμφάνιση αλλοιώσεων και ασθενειών. Επιπλέον, οι βιολογικοί αυτοί φραγμοί ελέγχουν τη γήρανση του τροφίμου, διότι αποτρέπουν την άμεση πρόσβαση σε αυτό, την μετάδοση οσμών σ' αυτό και διατηρούν σταθερό το περιβάλλον συσκευασίας του (Marsh & Bugusu, 2007).

Τέλος, οι φυσικοί κίνδυνοι περιλαμβάνουν μηχανικές βλάβες που ενδεχομένως προκληθούν κατά τη μεταφορά των τροφίμων. Οι συσκευασίες των τροφίμων τα προστατεύουν από τέτοιες φθορές. Υπάρχουν ακόμα συσκευασίες οι οποίες προστατεύουν τους καταναλωτές από ποικίλους κινδύνους. Για παράδειγμα, υπάρχουν συσκευασίες με ειδικό κλείσιμο ώστε να μην έχουν πρόσβαση σε αυτά παιδιά, εάν πρόκειται για δυνητικώς επικίνδυνα προϊόντα. Επιπλέον, η χρήση πλαστικών περιεκτών είχε το πλεονέκτημα της μείωσης σπασμένων γυάλινων περιεκτών (Marsh & Bugusu, 2007).

Οι μεγαλύτερες απώλειες στα τρόφιμα παρατηρούνται λόγω των μικροβιολογικών μεταβολών στην επιφάνεια τους (Coma et al., 2002). Πολλές φυσικές αλλά και χημικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τη διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων (Cuero et al., 1991; Shahidi et al., 1999; Dutta et al., 2009; Κομοδρόμος, 2012). Τα αυξημένα, όμως, κρούσματα τροφιμογενών νόσων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι παραδοσιακές μέθοδοι συντήρησης των τροφίμων δεν επαρκούν. Συνεπώς, η έρευνα στράφηκε προς την ανάπτυξη νέων μεθόδων συντήρησης των τροφίμων (Appendini & Hotchkiss, 2002). Μια νέα και πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι η χρήση ενεργού συσκευασίας. Ως

ενεργός συσκευασία, σύμφωνα με τον Κανονισμό 852/2004 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ορίζεται «το καινοτόμο σύστημα συσκευασίας, όπου η συσκευασία, το περιβάλλον της και το τρόφιμο αλληλεπιδρούν με τέτοιο τρόπο, που μεταβάλλει τις συνθήκες αποθήκευσης του τροφίμου, επιμηκύνοντας το χρόνο ζωής του και βελτιώνοντας την ασφάλειά του ή/και τις οργανοληπτικές του ιδιότητες, ενώ ταυτόχρονα διαφυλάσσει και την ποιότητά του» (ΕΚ 852/2004).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντιμικροβιακή ενεργός συσκευασία. Μεταξύ των κυριότερων λόγων υποβάθμισης της ποιότητας του κρέατος κατά τη συντήρησή του περιλαμβάνονται η ανάπτυξη της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας και η επιμόλυνσή του. Μέσω των αντιμικροβιακών ενεργών συσκευασιών επιδιώκεται να αποφευχθούν οι δύο αυτοί κίνδυνοι (Mondry, 1996; Brody, 1997). Αυτό το είδος συσκευασίας λειτουργεί δημιουργώντας δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη και επιβίωση αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών. Η ιδιαιτερότητα αυτών των συσκευασιών εντοπίζεται στην ενσωμάτωση στη συσκευασία αντιμικροβιακών ουσιών ή/και στη μετατροπή της εσωτερικής ατμόσφαιρας τους (Kerry et al., 2006).

Η χρήση του τρόπου αυτού συσκευασίας παραμένει όμως περιορισμένη εξ' αιτίας πολλών παραγόντων. Ο βασικότερος από αυτούς είναι η άρνηση έγκρισης για τη χρήση τους από τις αρμόδιες ελεγκτικές αρχές καθώς πρέπει να διασφαλιστεί η υγεία των καταναλωτών προτού χρησιμοποιηθούν στο εμπόριο. Για να διασφαλιστεί κάτι τέτοιο πρέπει να διερευνηθεί κατά πόσο τα συστατικά των συσκευασιών μπορούν να μεταναστεύσουν στο τρόφιμο και αντίστροφα. Στην περίπτωση ιδιαίτερα των εδώδιμων ενεργών συσκευασιών η λήψη έγκρισης χρήσης γίνεται ακόμα πιο περίπλοκη (Rooney, 1995). Άλλοι παράγοντες που περιορίζουν τη χρήση των ενεργών συσκευασιών τροφίμων είναι το υψηλό κόστος αλλά και η δυσπιστία των καταναλωτών (Cho et al., 2009).

Ορισμένες από τις αντιμικροβιακές ουσίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι οι εξής: χημικές αντιμικροβιακές ουσίες, ιόντα μετάλλων, χηλικοί παράγοντες, η αιθυλική αλκοόλη και το διοξείδιο του χλωρίου, αιθέρια έλαια αρωματικών φυτών και βοτάνων, όπως ρίγανη και δενδρολίβανο, οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό, προπιονικό), αντιμικροβιακά πεπτιδία, βακτηριοσίνες (νισίνη) και κάποιες φαινόλες (Appendini & Hotchkiss, 2002). Ως φορείς των ουσιών αυτών συνήθως χρησιμοποιούνται το χαρτί ή το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (Cho et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και πιο δημοφιλείς γίνονται οι εδώδιμες πολυμερικές μεμβράνες. Για τη σύνθεσή τους χρησιμοποιούνται χιτοζάνη, καραγενάνη, πρωτεΐνες γάλακτος, αλγινικά, ζεΐνη καλαμποκιού, μεθυλοκυτταρίνη και υδροξυμεθυλοκυτταρίνη, και πολυβυνυλική αλκοόλη (Cha et al., 2001; Aymerich et al., 2008; Coma, 2008). Οι εδώδιμες μεμβράνες πολυσακχαριτών και πρωτεϊνών, οι οποίες είναι υδρόφιλες, και οι μεμβράνες λιπιδίων, που είναι υδρόφοβες, βελτιώνουν την ποιότητα του κρέατος, επιβραδύνοντας την απώλεια υγρασίας, αποτρέποντας τον αποχρωματισμό, μειώνοντας την οξείδωση του λίπους και βελτιώνοντας την εμφάνιση του (Gennadios et al., 1997).

Συμπερασματικά, η ενεργός αντιμικροβιακή συσκευασία, σύμφωνα με τις μελέτες που έχουν λάβει χώρα μέχρι στιγμής, είναι μια μέθοδος που έχει τη δυνατότητα να

παρατείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων, να βελτιώσει την εμφάνιση τους και να αποτρέψει τη μικροβιολογική τους υποβάθμιση (Coma, 2008).

## 4.2 Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα φυσικό και μη τοξικό βιοπολυμερές το οποίο προέρχεται από την αποακετυλίωση της χιτίνης (No et al., 2002). Η χιτίνη ή αλλιώς πολυ-β(1,4)-2-N-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές με υψηλό μοριακό βάρος που αποτελείται από μόρια 2-ακεταμιδο-2-δεοξυ-β-D-γλυκόζης τα οποία ενώνονται με β-(1,4) δεσμούς (Kumar, 2000; Elsabee & Abdou, 2013). Η χιτίνη είναι το δεύτερο πιο συχνά απαντώμενο βιοπολυμερές στη φύση μετά την κυτταρίνη (No et al., 2007). Το όνομά της προέρχεται από την ελληνική λέξη χιτών (=χιτώνας) και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1811 από τον Bradconnot (Shahidi et al., 1999).

Η χιτίνη μπορεί να βρεθεί στη φύση:

1. Ως δομικό συστατικό του εξωσκελετού των καρκινοειδών, όπως καβούρια, γαρίδες κλπ., και
2. Στο κυτταρικό τοίχωμα μυκήτων (*Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* κ.α.) (Devlieghere et al., 2004)

Δεδομένου ότι η βιοαποικοδόμηση της χιτίνης είναι μια αρκετά αργή διαδικασία, η συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων απορρίψεων από την επεξεργασία των καρκινοειδών αποτελεί αντικείμενο μεγάλης ανησυχίας στη βιομηχανία μεταποίησης ιχθυηρών (Shahidi et al., 1999). Συγκεκριμένα, το 50-90% των στερεών αποβλήτων των Η.Π.Α. προέρχεται από βιομηχανίες επεξεργασίας ιχθυηρών (Swanson et al., 1980). Λόγω του μεγάλου αυτού όγκου αποβλήτων, γρήγορα το επιστημονικό ενδιαφέρον στράφηκε στην αξιοποίησή του και ως συνέπεια μεταξύ άλλων και στη χρήση της χιτίνης και των παραγώγων της (Shahidi et al., 1999). Η παραγωγή της χιτοζάνης γίνεται μέσω της αλκαλικής αποακετυλίωσης της. Αυτό περιλαμβάνει την κατεργασία της με θερμό διάλυμα πυκνού καυστικού νατρίου 40-50% για αρκετές ώρες (120 °C για 1-3 ώρες). Η αποακετυλίωση αυτή δεν είναι πλήρης σχεδόν ποτέ, με αποτέλεσμα η χιτοζάνη να θεωρείται ένα μερικώς αποακετυλιωμένο παράγωγο της χιτίνης (Raafat & Sahl, 2009). Σε γενικές γραμμές ως χιτοζάνη θεωρείται η χιτίνη με βαθμό αποακετυλίωσης μεγαλύτερο από 70% (Li et al., 1997).

Για την παραγωγή της χιτοζάνης ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Αρχικά, πλένονται και κονιορτοποιούνται τα κελύφη. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται καυστικό νάτριο (NaOH) ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες και οι χρωστικές ουσίες (Jayakumar et al., 2010). Ακολούθως, προστίθεται διάλυμα υδροχλωρικού οξέως (HCl) με στόχο να απομακρυνθούν διάφορες ανόργανες ουσίες. Μετά την επεξεργασία με το HCl προκύπτει η χιτίνη ως άχρωμη ή υπόλευκη σκόνη. Ακολουθεί το τελικό στάδιο στο οποίο παράγεται η χιτοζάνη μέσω της αποακετυλίωσης της χιτίνης με τη χρήση διαλύματος πυκνού καυστικού νατρίου (Knorr, 1984).



Η χιτοζάνη είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά διαλύεται σε όξινους διαλύτες με  $\text{pH} < 6$ . Το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο οργανικό οξύ για τη διάλυση της χιτοζάνης είναι το διάλυμα οξικού οξέως 1%, ενώ άλλα οργανικά οξέα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι το φορμικό και το γαλακτικό. Αντιθέτως, η διαλυτότητα της σε διαλύματα ανόργανων οξέων είναι αρκετά περιορισμένη. Η χιτοζάνη, αν και διαλύεται σε 1% υδροχλωρικό οξύ, είναι αδιάλυτη σε φωσφορικά και θειικά οξέα (Nadarajah, 2005).

### 4.3 Χαρακτηριστικά Χιτοζάνης

Η χιτοζάνη μπορεί να χαρακτηριστεί με βάση την ποιότητα της, ενδογενείς παράγοντες όπως η καθαρότητά της, το μοριακό βάρος, το ιξώδες και ο βαθμός αποακετυλίωσης και τη φυσική της μορφή (Sanford, 1989).

#### 1. Βαθμός αποακετυλίωσης

Ο βαθμός αποακετυλίωσης είναι ένα από τα σημαντικότερα χημικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν την απόδοση της χιτοζάνης (Muzzarelli, 1977; Li et al., 1992). Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο βαθμός αποακετυλίωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό της χιτίνης από τη χιτοζάνη (Li and others, 1997). Παράμετροι, όπως η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) που χρησιμοποιείται, επηρεάζουν την απομάκρυνση των ακετυλοομάδων από τη χιτίνη με αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλης ποικιλίας μορίων χιτοζάνης με διαφορετικές ιδιότητες και εφαρμογές. Συνεπώς είναι αναγκαίο να καθορίζεται ο βαθμός αποακετυλίωσης της χιτοζάνης ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζεται. Πολλές μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν, ωστόσο συχνότερα εφαρμόζεται η υπέρυθρη φασματοσκοπία, λόγω της απλότητας της (Baxter et al., 1992).

#### 2. Μοριακό βάρος

Το μοριακό βάρος της χιτοζάνης ποικίλει ανάλογα με την πηγή προέλευσης της και τις μεθόδους προετοιμασίας της (Li et al., 1992). Οι περισσότερες από τις χιτοζάνες που πωλούνται στο εμπόριο έχουν μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 100.000 Da έως 1,2 εκατομμύρια Da (Onsoyen and Skaugrud, 1990).

Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους της χιτοζάνης μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, όπως φασματοσκοπία, ιξωδομετρία και χρωματογραφία (Kumar, 2000).

#### 3. Ιξώδες

Το ιξώδες της χιτοζάνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από παράγοντες όπως ο βαθμός αποακετυλίωσης, το μοριακό βάρος, η συγκέντρωση του διαλύματος το  $\text{pH}$  και η θερμοκρασία. Επίσης, η διαδικασία εξαγωγής της χιτοζάνης μπορεί να επηρεάσει το ιξώδες της (Moorjani and others, 1975). Συγκεκριμένα η χρήση ακετόνης ή υποχλωριώδους νατρίου σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας παραγωγής χιτοζάνης προκαλεί μείωση του ιξώδους της. Μείωση του ιξώδους

παρατήρησαν και ο No και οι συνεργάτες του (1999) στην περίπτωση αύξησης του χρόνου και της θερμοκρασίας κατά την παραγωγή της χιτοζάνης.

#### 4.4 Μηχανισμός Δράσης Χιτοζάνης

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον από τους καταναλωτές για τρόφιμα χωρίς χημικά συντηρητικά. Συνεπώς, η έρευνα στράφηκε στην ανακάλυψη φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών (Wang, 1992). Η χιτοζάνη παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε διάφορους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, ζύμες και μύκητες, γεγονός που δικαιολογεί το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον (Salleh et al., 2007).

Η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης έχει μελετηθεί εναντίον διαφόρων ομάδων μικροοργανισμών, όπως gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια, ζύμες, μύκητες και άλγη (Papineau et al., 1991; Sagoo et al., 2002). Η χιτοζάνη πιθανώς έχει και αντική δράση έναντι νοροϊών (Davis et al., 2012). Γενικώς η χιτοζάνη δείχνει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση για τα gram-θετικά σε σχέση με τα gram-αρνητικά βακτήρια (Jeon et al., 2001) ενώ έχει βρεθεί ότι δρα γρηγορότερα σε μύκητες και άλγη παρά σε βακτήρια (Cuero, 1999). Η αντιμικροβιακή δράση της εξαρτάται από παράγοντες όπως ο τύπος της χιτοζάνης, το μοριακό της βάρος και ο βαθμός αποακετυλίωσής της (Matsuhatsi and Kume, 1997).

Η αντιμικροβιακή ικανότητα της χιτοζάνης μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση ακτινοβολίας (υπεριώδους ακτινοβολίας) (Matsuhatsi and Kume, 1997), μερικής υδρόλυσης (Danydova et al., 2000), με τη χρήση διαφόρων οργανικών διαλυτών (No et al., 2002) και με χημικές τροποποιήσεις (Nishimura et al., 1984). Επιπλέον, η αντιμικροβιακή δράση αυτή βελτιστοποιείται με τη συνδυαστική χρήση άλλων συντηρητικών, όπως η καρνοσίνη (βακτηριοσίνη που παράγεται από το βακτήριο *Carnobacterium piscicola*) (Roller et al., 2002) ή και άλλων αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως η νισίνη (Lee et al., 2003).

Παρόλο που η έρευνα για τη αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης της χιτοζάνης είναι αρκετά εκτεταμένη, ο μηχανισμός αυτός παραμένει εν πολλοίς αδιευκρίνιστος (Shahidi et al, 1999; Liu et al., 2004; No et al., 2007; Dutta et al., 2009; Κομοδρόμος, 2012). Σύμφωνα με το επικρατέστερο σενάριο η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης οφείλεται στον πολυκατιονικό της χαρακτήρα (Young and Kauss, 1983). Συγκεκριμένα τα θετικά φορτισμένα μόρια της χιτοζάνης αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα συστατικά των μικροβιακών κυτταρικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα την απώλεια πρωτεϊνικών και άλλων ενδοκυτταρικών συστατικών (Young et al, 1982; Papineau et al, 1991; Sudarshan et al, 1992; Fang et al, 1994). Πιο συγκεκριμένα σε τιμές pH<6,3 οι θετικά φορτισμένες αμινομάδες του μορίου της χιτοζάνης (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ανταγωνίζονται μάλλον τα θετικά φορτισμένα ιόντα ασβεστίου (Ca<sup>++</sup>) για να καταλάβουν τις αρνητικά φορτισμένες θέσεις στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών (Young & Kauss, 1983). Η πρόσδεση αυτή της χιτοζάνης στην επιφάνεια των μικροοργανισμών και οι μη αναστρέψιμες μεταβολές που προκαλεί σε αυτήν είναι η αιτία της αντιμικροβιακής της δράσης (Kong et al., 2010). Αφενός με τις μεταβολές που προκαλεί στην κυτταρική

μεμβράνη παρεμποδίζει τις ιοντοανταλλαγές με αποτέλεσμα την πρόκληση οσμωτικού στρες και συνεπώς τον κυτταρικό θάνατο (Aider, 2010) και αφετέρου μέσω της υδρόλυσης των πεπτιδογλυκανών που προκαλεί, οι οποίες είναι βασικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών, επιτρέπει τη διαρροή ενδοκυτταρικών ηλεκτρολυτών και άλλων συστατικών, όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και γλυκόζη οδηγώντας στη λύση των κυτταρικών μεμβρανών (Κομοδρόμος, 2012).

Ένας ακόμη πιθανός μηχανισμός δράσης της χιτοζάνης είναι η δράση της ως χηλικού παράγοντα (Shahidii et al., 1999; Kong et al., 2010). Η χιτοζάνη δηλαδή, δεσμεύει εκλεκτικά μεταλλικά στοιχεία, τα οποία είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Συνεπώς, αναστέλλει τη μικροβιακή ανάπτυξη και την παραγωγή τοξινών (Shahidii et al., 1999; Dutta et al., 2009; Κομοδρόμος, 2012; Cuero et al., 1991). Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός θεωρείται αποτελεσματικός μόνο σε τιμές pH μεγαλύτερες του 6,3, δηλαδή της σταθεράς ιονισμού της χιτοζάνης (Guibal, 2004).

Ένας τρίτος πιθανός μηχανισμός δράσης της χιτοζάνης σχετίζεται με το γενετικό υλικό των μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με το σενάριο αυτό η χιτοζάνη συνδέεται με το DNA βακτηρίων και μυκήτων αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη σύνθεση του messenger RNA (mRNA) (Handwinger et al., 1986; Shahidi et al., 1999; Meyers et al., 2007). Για να επιτευχθεί αυτό η χιτοζάνη εισέρχεται στον πυρήνα των μικροοργανισμών και παρεμβαίνει στη σύνθεση του mRNA και των πρωτεϊνών. Συνεπώς, λόγω της αναστολής της μεταγραφής από το mRNA, αναστέλλεται και η πρωτεϊνοσύνθεση (Sudarshan et al., 1992). Κατά πάσα πιθανότητα, όμως, η θεωρία αυτή αμφισβητείται, διότι, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, προϋποθέτει τη διείσδυση των μορίων χιτοζάνης στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω του κυτταρικού τοιχώματος ή/και της κυτταρικής μεμβράνης. Κάτι τέτοιο, όμως, δεν είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί από τη χιτοζάνη καθώς είναι μακρομοριακή ένωση (Rafaat et al., 2008).

Τέλος, αναφέρονται κάποια ακόμα πιθανά σενάρια τα οποία όμως δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς. Το πρώτο από αυτά αναφέρει ότι η χιτοζάνη διαθέτει την ικανότητα να ενεργοποιήσει κάποιους αμυντικούς μηχανισμούς στους ιστούς του ξενιστή με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός περιβάλλοντος που δεν επιτρέπει την ανάπτυξη και επιβίωση των μικροοργανισμών (Κομοδρόμος, 2012). Επιπλέον, η χιτοζάνη μπορεί να δρα ως αντιμικροβιακός παράγοντας δεσμεύοντας τα μόρια νερού με αποτέλεσμα να παρεμποδίζονται οι διάφορες ενζυμικές τους διεργασίες (Young et al., 1982). Ο τελευταίος πιθανός μηχανισμός δράσης αναφέρει ότι η επικάλυψη των μικροοργανισμών από το στρώμα της χιτοζάνης έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωσή τους και συνεπώς την διακοπή μεταφοράς θρεπτικών συστατικών από και προς το περιβάλλον τους (Κομοδρόμος, 2012).

## 4.5 Εφαρμογές Χιτοζάνης

Η χιτοζάνη, χάρη στις ιδιαίτερες φυσικοχημικές και βιολειτουργικές ιδιότητες που διαθέτει, έχει βρει εφαρμογή σε πολλούς τομείς (Felse & Panda, 1999). Ορισμένες από τις εφαρμογές της περιλαμβάνουν τη χρήση της στη φωτογραφία, λόγω της αντοχής της στην τριβή, των οπτικών χαρακτηριστικών της και της ικανότητάς της να σχηματίζει

μεμβράνες (Muzzarelli, 1997), στην παραγωγή καλλυντικών, κυρίως λόγω των μυκητοκτόνων και μυκητοστατικών ιδιοτήτων της (Mark et al., 1985), στην παραγωγή τεχνητού δέρματος (Ravi Kumar, 2000) καθώς και στην οφθαλμολογία για την παραγωγή φακών επαφής (Markey et al., 1989). Επιπλέον, η χιτοζάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία παραγωγής χαρτιού (Allan et al., 1972) και στην ιατρική για τον έλεγχο του ρυθμού απελευθέρωσης φαρμάκων στον οργανισμό ασθενών (Uhrich et al., 1999). Στον τομέα της ιατρικής έχει βρει εφαρμογή και στην παραγωγή βαμβακιού, γαζών, επιδέσμων και άλλων ειδών ιατρικού εξοπλισμού (Bernkop-Schnurch & Kast, 2001).

Στον τομέα των τροφίμων η χρήση της χιτοζάνης βρίσκει πολλές εφαρμογές. Ορισμένες από αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση της για τη διαύγαση και μείωση της οξύτητας κάποιων χυμών φρούτων (Imeri & Knorr, 1988), για τη μείωση του οργανικού φορτίου νερού και λυμάτων που προέρχονται από τη βιομηχανία τροφίμων (Shahidi et al., 1999) και για την εξυγίανση του πόσιμου ύδατος, μέσω της δέσμευσης από αυτή βαρέων μετάλλων και εντομοκτόνων (Knorr, 1991). Επιπλέον, έχει χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση πρωτεϊνών και λίπους από ορό γάλακτος (Fernandes & Fox, 1997), ως αντιοξειδωτικό και στην παραγωγή συμπληρωμάτων διατροφής λόγω της ικανότητας που διαθέτει να μειώνει τη χοληστερίνη μέσω της δέσμευσης του διατροφικού λίπους (Shahidi, 1999).

Εκτεταμένη έρευνα έχει λάβει χώρα σε σχέση με την προσθήκη χιτοζάνης σε τρόφιμα για τη βελτίωση της μικροβιολογικής τους ασφάλειας και για την παράταση του χρόνου ζωής τους. Σύμφωνα με τον Ahn και τους συνεργάτες του (2003) η επικάλυψη ψωμιού με χιτοζάνη είχε ως αποτέλεσμα την βελτίωση της ποιότητας και την επιμήκυνση του χρόνου ζωής του. Αρκετοί ερευνητές (Lee et al., 1999; Bhale et al., 2003; Caner, 2005) ανέφεραν ότι η επικάλυψη χιτοζάνης είχε ευεργετικό αποτέλεσμα στην ποιότητα των αυγών, ενώ σύμφωνα με τον Han και τους συνεργάτες του (2004) η χιτοζάνη επιμήκυνε το χρόνο ζωής και έδρασε επικουρικά στον έλεγχο της αποδόμησης φραουλών και κόκκινων βατόμουρων. Σύμφωνα με τον Lee (1996) η χρήση χιτοζάνης σε μαγιονέζα είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της μικροβιολογικής σταθερότητας του γαλακτώματος της. Εκτεταμένη έρευνα έχει λάβει χώρα σε ότι αφορά στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής τροφίμων με τη χρήση διαλύματος χιτοζάνης. Για παράδειγμα, ο Agulo και οι συνεργάτες του (1998) παρατήρησαν επιμήκυνση του χρόνου ζωής σε προμαγειρέμενες πίτσες, ενώ παρόμοιες παρατηρήσεις έκαναν οι Skonberg και Gillman (2000) σε φρέσκο σολομό και ο Nadarajah και οι συνεργάτες του (2003) σε φιλέτα γατόψαρου. Ακόμη, σύμφωνα με τον Coma και τους συνεργάτες του (2002) η επικάλυψη χιτοζάνης είχε ως αποτέλεσμα την 100% αναστολή ανάπτυξης της *L. monocytogenes* για 8 ημέρες σε τυρί emmental. Τέλος, σύμφωνα με τον Kamił και τους συνεργάτες του (2002) και τον No και τους συνεργάτες του (2002) η χιτοζάνη χάρη στις αντιοξειδωτικές και αντιβακτηριδιακές τις ιδιότητες καθυστερεί την οξείδωση των λιπιδίων και την ανάπτυξη αλλοιογόνων βακτηρίων κατά την αποθήκευση του κρέατος. Συγκεκριμένα, για την επίδραση της χιτοζάνης σε βακτηριακούς πληθυσμούς σε κρέας έχουν γίνει αρκετές έρευνες. Οι Darmadji και Izumimoto (1994) παρατήρησαν ότι η προσθήκη χιτοζάνης σε φρέσκο βόειο κρέας είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων όπως ο *S. aureus* και η *E. coli*. Επιπλέον, σύμφωνα με τον Beverly και τους συνεργάτες του (2008) η επικάλυψη προμαγειρεμένου βοδινού κρέατος με μεμβράνες χιτοζάνης είχε ως αποτέλεσμα μια μικρή αναστολή στην ανάπτυξη της *L.*

*monocytogenes* σε σύγκριση με τους μάρτυρες που χρησιμοποιήσαν. Τέλος, ο Rodriguez και οι συνεργάτες του (2003) παρατήρησαν ότι η χρήση επικάλυψης χιτοζάνης σε προμαγειρευμένες πίτσες οδηγεί σε καθυστέρηση ανάπτυξης των *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. και *Cladosporium* sp.

#### 4.6 Νομοθετικό Πλαίσιο Χρήσης Χιτοζάνης

Η χιτοζάνη, όπως αναφέρθηκε, είναι μια ουσία που μπορεί να εφαρμοστεί σε πολλούς τομείς. Συνεπώς, η έρευνα στράφηκε υποχρεωτικά και στον έλεγχο της ασφάλειας της. Παρόλο που σύμφωνα με πολλούς ερευνητές υπάρχουν ενδείξεις ότι η χιτοζάνη είναι μη τοξική ουσία, ακόμη δεν υπάρχει σαφής απάντηση στο αν η ουσία αυτή είναι ασφαλής ή όχι (Rao & Sharma, 1997; Mou et al., 2003). Για το λόγο αυτό παρατηρούνται διαφορές στη χρήση ή όχι της χιτοζάνης από χώρα σε χώρα.

Το 1983 ήταν η πρώτη φορά που η χιτοζάνη εγκρίθηκε στην Ιαπωνία ως πρόσθετο τροφίμων (Weiner, 1992), ενώ την ίδια χρονιά χαρακτηρίστηκε και ως GRAS ουσία, δηλαδή ουσία που γενικά θεωρείται ασφαλής (Generally Regarded as Safe) για να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο ζωοτροφών (Κομοδρόμος, 2012). Μερικά χρόνια αργότερα, το 1986, εγκρίθηκε η χρήση της για την εξυγίανση του πόσιμου νερού (Knorr, 1986), ενώ το 2005 στην Ιαπωνία επιτράπηκε η χρήση της ως λειτουργικό συστατικό των τροφίμων (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). Το 2007 ήταν η πρώτη φορά που ο FDA αναγνώρισε ως GRAS ένα προϊόν χιτοζάνης, το ChitoClear, για χρήση στη βιομηχανία τροφίμων (Baldrick, 2010). Σε ότι αφορά στις μεμβράνες χιτοζάνης, εφόσον αυτές αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι του τροφίμου, θα πρέπει να πληρούν όλες τις προδιαγραφές που απαιτούνται για τα συστατικά τροφίμων. Για παράδειγμα, θα πρέπει να ανήκουν στα πρόσθετα των τροφίμων και να αναφέρονται οι μέγιστες επιτρεπόμενες ποσότητες τους (Guilbert & Gontard, 1995).

Συμπερασματικά, η χιτοζάνη και η χιτίνη δεν έχουν λάβει ακόμη αναγνώριση GRAS ως συστατικά τροφίμων. Παρόλα αυτά η έρευνα που λαμβάνει χώρα είναι αρκετά εκτεταμένη και τα αποτελέσματα μέχρι στιγμής ενθαρρυντικά.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 5.1 Σκοπός της Έρευνας

Η ανεύρεση νέων φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών για την επιμήκυνση του χρόνου ζωής των τροφίμων αποτελεί τα τελευταία χρόνια έναν από τους βασικούς στόχους στον τομέα της βιοσυντήρησης των τροφίμων. Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής εξετάζεται η επίδραση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης στο χρόνο ζωής και στην επιβίωση και την ανάπτυξη της *L monocytogenes* σε προψημένους βόειους κεφτέδες κατά τη συντήρησή τους στους 5 °C.

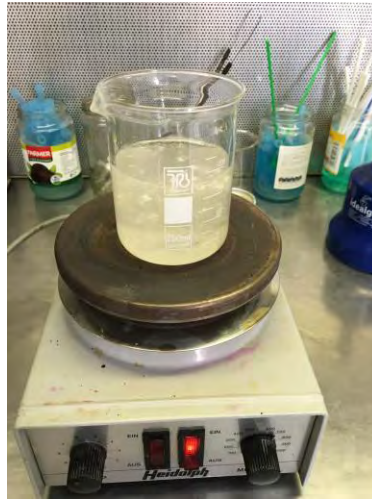
Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή» με κατεύθυνση « Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων & Υδάτων & Δημόσια Υγεία» του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η υλοποίηση της πειραματικής έρευνας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως, του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

### 5.2 Υλικά και μέθοδοι

#### 5.2.1. Παρασκευή διαλύματος χιτοζάνης

Για την παρασκευή του διαλύματος χιτοζάνης χρησιμοποιήθηκε κονιορτοποιημένη χιτοζάνη υψηλού μοριακού βάρους MW>800.000 Da (Aldrich, Germany) με βαθμό αποακετυλίωσης 75% και παρασκευασμένη από κελύφη καβουριών. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v.

Συνολικά παρασκευάστηκαν 500 ml διαλύματος χιτοζάνης. Συγκεκριμένα, σε 500 ml διαλύματος οξικού οξέος 1% v/v προστέθηκαν 5 g χιτοζάνης και ακολούθησε ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα (hotplate) σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) για περίπου 4 ώρες μέχρι την πλήρη διάλυσή της. Ως αποτέλεσμα δημιουργήθηκε διάλυμα χιτοζάνης 1% w/v το οποίο είχε pH 4 στους 25 °C.



**Εικόνα 2:** Ανάμιξη διαλύματος χιτοζάνης με μαγνητικό αναδευτήρα.

### 5.2.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Ως δείγματα χρησιμοποιήθηκαν προψημένοι βόειοι κεφτέδες, τους οποίους παρασκεύασα και τηγάνισα σε λάδι, βάρους  $18 \pm 1$  gr έκαστος. Οι κεφτέδες περιείχαν: βόειο κρέας (βόεια σπάλα), κρεμμύδι, νερό, φρυγανιά σίτου [αλεύρι σίτου νερό, ζάχαρη, μαργαρίνη (φοινικέλαιο, έλαιο καρύδας, κραμβέλαιο), μαγιά, προζύμι, γάλα, αλάτι], κρεμμύδι, κρόκους αυγού, αλάτι και πιπέρι (πίνακας 3). Τα δείγματα στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, τη C και την U. Η πρώτη, C, αποτέλεσε την ομάδα των κεφτέδων που εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα χιτοζάνης και η U την ομάδα των κεφτέδων που δεν εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα χιτοζάνης (ομάδα μάρτυρας).

**Πίνακας 3:** Υλικά για την παρασκευή κεφτέδων και ποσότητές τους

| Συστατικά                | Ποσότητα |
|--------------------------|----------|
| Κιμάς από βόεια ωμοπλάτη | 800g     |
| Φρυγανιά σιταρένια       | 200g     |
| Κρεμμύδι φρέσκο          | 150g     |
| Κρόκοι αυγού             | 2        |
| Αλάτι                    | 10g      |
| Μαύρο πιπέρι             | 5g       |
| Ελαιόλαδο                | 40ml     |

Για την επικάλυψη των κεφτέδων της ομάδας C με το διάλυμα χιτοζάνης ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας ο κάθε κεφτές βυθίστηκε στο διάλυμα χιτοζάνης όπου και παρέμεινε για 30 sec. Στη συνέχεια οι κεφτέδες τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο δίσκο, στέγνωσαν στο θάλαμο νηματικής ροής παραμένοντας σε θερμοκρασία δωματίου ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) για περίπου 1h, μέχρις ότου να στεγνώσει η επικάλυψη. Έπειτα συσκευάστηκαν ανά δέκα σε δίσκους από διογκωμένο πολυστυρόλιο πάνω σε ειδικά απορροφητικά χαρτιά κρέατος. Τόσο οι δίσκοι όσο και τα χαρτιά είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί με ακτίνες UV. Από την κάθε ομάδα συσκευάστηκαν δύο δίσκοι. Στη συνέχεια οι δίσκοι τοποθετήθηκαν σε σακούλες

τροφίμων και συντηρήθηκαν σε ηλεκτρονικά ρυθμιζόμενο ψυγειοκλίβανο (LBI-150M, Daihan Labtech CO., LTD, Korea) σε θερμοκρασία  $5\pm 0,5$  °C.

### 5.2.3. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος *L. monocytogenes* & ενοφθαλμισμός δειγμάτων

Για τον πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *L. monocytogenes* από τη συλλογή του Εργαστηρίου Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. τα οποία συντηρούνταν σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  σε πλαστικά φιαλίδια (cryorubes) με Tryptone Soy Broth (TSB, Biolab, Budapest, Hungary) εμπλουτισμένο με 15% γλυκερόλη. Πριν τη χρήση τους οι μικροοργανισμοί ανακαλλιεργήθηκαν 2 συνεχόμενες φορές φιαλίδια με 10 ml TSB για 24 h στους  $35^{\circ}\text{C}$ . Στη συνέχεια τα φιαλίδια φυγοκεντρώνταν σε 1200 στροφές από 10 min, ακολούθως απομακρύνονταν το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται στο βακτηριακό ίζημα 10 ml Peptone Water (PW). Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δύο φορές. Μετά και τη δεύτερη φυγοκέντρηση προστίθενται και πάλι 10 ml PW και με δεκαδικές αραιώσεις μετρούνταν ο πληθυσμός της λιστέριας σε Tryptone Soy agar (TSA, Biolab, Budapest, Hungary) με επιφανειακή εξάπλωση 0,1 ml από κάθε δεκαδική αραιώση.

Από την 3<sup>η</sup> δεκαδική αραιώση της καλλιέργειας, 0,1 ml μεταφέρονταν στους κεφτέδες και με τη βοήθεια αποστειρωμένης ράβδου εξαπλώνονταν επιφανειακά. Ο αρχικός πληθυσμός του ενοφθαλμίσματος υπολογίστηκε στις  $4\times 10^6$  CFU/g ( $6,60$  log CFU/g).

### 5.2.4. Μικροβιολογικές Εξετάσεις

Οι βακτηριακοί πληθυσμοί οι οποίοι μελετήθηκαν είναι οι εξής:

- Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)
- Enterobacteriaceae
- Lactobaciliaceae και
- *Listeria monocytogenes*

Οι αναλύσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν τις μέρες 0,1,7,14,21 και 28 του πειραματισμού. Για τις μικροβιολογικές αυτές αναλύσεις εξεταζόντουσαν καθεμία από αυτές τις μέρες 1 κεφτές από κάθε δίσκο (δηλαδή 2 κεφτέδες από την κάθε ομάδα). Κάθε κεφτές ομογενοποιούνταν σε σάκο Stomacher σε συσκευή Stomacher (Lab Blender 400, A. J. Seward and Co. Ltd., London, UK) για 60 sec με ανάλογη ποσότητα πεπτονόχου ύδατος 0,1% w/v ώστε να προκύψει αραιώση  $10^{-1}$ . Από την αραιώση αυτή παρασκευάζονταν οι υπόλοιπες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με τη μεταφορά από την προηγούμενη στην επόμενη αραιώση 1ml σε σωλήνες που περιείχαν 9 ml πεπτονόχο ύδωρ. Στη συνέχεια, 0,1 ml από την κάθε αραιώση εξαπλώνονταν επιφανειακά σε διπλή σειρά τρυβλίων με το κατάλληλο για τον κάθε εξεταζόμενο μικροοργανισμό υπόστρωμα.

Συγκεκριμένα, για την καταμέτρηση της *Listeria monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε το Agar Listeria Ottavani Agosti (ALOA, LabM, Hal 10, Lancashire, United Kingdom)



μετά από επώαση στους 37 °C για 24h. Για την μέτρηση της OMX χρησιμοποιήθηκε Tryptone Soy Agar (TSA) και ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 48h. Τα γαλακτικά βακτήρια μετρήθηκαν σε De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS, LabM, LAB093, Lancashire, United Kingdom) μετά από επώαση στους 25 °C για 5 μέρες υπό μικροαερόφιλες συνθήκες. Η μέτρηση των κολοβακτηριοειδών έγινε με τη χρήση του Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, LabM, LAB088, Lancashire, United Kingdom) μετά από επώαση στους 30 °C για 48h. Για την αρίθμηση των αποικιών ακολουθήθηκαν οι κανόνες της ΑΡΗΑ (1984).

#### 5.2.5. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Για την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων, δηλαδή την αξιολόγηση του χρώματος, της γεύσης, του αρώματος, της τρυφερότητας και του χυμώδους, χρησιμοποιήθηκαν δώδεκα ημικηρυχθέντες κριτές. Η αξιολόγηση έγινε τις ημέρες 0,14 και 28 του πειραματισμού. Την ημέρα 28 αξιολογήθηκαν μόνο τα δείγματα με επικάλυψη χιτοζάνης καθώς στην ομάδα των μαρτύρων είχαν ήδη εμφανιστεί μακροσκοπικές αλλοιώσεις.

Η αξιολόγηση έγινε με τη συμπλήρωση ερωτηματολογίων που δόθηκαν στους κριτές και αφορούσαν τα εξεταζόμενα χαρακτηριστικά. Τα εξεταζόμενα χαρακτηριστικά βαθμολογήθηκαν σε επταβαθμιαία ηδονική κλίμακα (1-7), όπου το 1 αντιστοιχεί στη χαμηλότερη και το 7 στην υψηλότερη δυνατή αξιολόγηση (1=απαράδεκτο, 2=πολύ κακό, 3=κακό, 4=αποδεκτό, 5=καλό, 6=πολύ καλό και 7=εξαιρετικό). Εκτός των ερωτηματολογίων αξιολογήθηκαν και τα μακροσκοπικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων από το προσωπικό του εργαστηρίου (3-6 άτομα) τις ημέρες που λάμβαναν χώρα και οι μικροβιολογικές αναλύσεις, δηλαδή τις ημέρες 0,7,14, 21 και 28. Η αξιολόγηση αυτή έγινε με τη χρήση κλίμακας παρόμοιας με την παραπάνω.

Η αξιολόγηση έδειξε πως η χιτοζάνη είχε ευεργετική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κεφτέδων. Συγκεκριμένα, η ομάδα των μαρτύρων παρουσίασε με την πάροδο των ημερών υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της με αποτέλεσμα την 28<sup>η</sup> ημέρα να μην αξιολογηθούν καν λόγω μακροσκοπικών αλλοιώσεων. Αντιθέτως, οι επικαλυμμένοι με χιτοζάνη κεφτέδες καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού δεν παρουσίασαν κάποια αλλαγή στη γεύση, την οσμή, τη σύσταση και το χρώμα.

### 5.3 Αποτελέσματα

Στους πίνακες 4-7 καθώς και στα γραφήματα 1-4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μεταβολής των μικροβιολογικών πληθυσμών που εξετάστηκαν (OMX, *L. monocytogenes*, οξυγαλακτικά βακτήρια και εντεροβακτηριοειδή) καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.

OMX

Ήδη από την πρώτη ημέρα συντήρησης (D1) των δειγμάτων έγινε φανερή η επίδραση της χιτοζάνης στον πληθυσμό της OMX. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της OMX ήταν 5,31 και 3,97 log CFU/g στις ομάδες U και C αντίστοιχα ενώ και οι δύο ομάδες είχαν την ημέρα 0 πληθυσμό OMX ίσο με 5,31 log CFU/g. Συνεπώς υπάρχει μια διαφορά 1,34 log CFU/g στον πληθυσμό της OMX ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες. Οι πληθυσμοί της OMX καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού εμφάνισαν ανοδική τάση (Πίνακας 4, Γράφημα 1). Ωστόσο, ήταν εμφανής η πληθυσμιακή διαφορά ανάμεσα στα δείγματα που εμβαπτίστηκαν σε χιτοζάνη και σε αυτά που δεν εμβαπτίστηκαν. Η διαφορά αυτή συνέχισε να αυξάνεται μέχρι την 21<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης των κεφτεδών, όπου μεγιστοποιήθηκε, όταν οι πληθυσμοί τους ανήλθαν στις 8,73 και 5,77 log CFU/g για τις ομάδες U και C αντίστοιχα. Την 28<sup>η</sup> και τελευταία ημέρα του πειραματισμού ο πληθυσμός της OMX στην ομάδα U ανήλθε στους 8,90 log CFU/g ενώ στην ομάδα C στους 6,73 log CFU/g. Συνεπώς, η διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες δειγμάτων, αν και μειώθηκε από τους 2,96 που ήταν την D21 στους 2,16 log CFU/g, παρέμεινε σημαντική δείχνοντας την ευεργετική επίδραση της βρώσιμης επικάλυψης χιτοζάνης στο χρόνο ζωής του προϊόντος.

### *L. monocytogenes*

Οι πληθυσμιακές μεταβολές της *L. monocytogenes*, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5 και το Γράφημα 2, παρουσιάζουν σημαντικές ομοιότητες με αυτές τις OMX. Όλα τα δείγματα στην αρχή του πειραματισμού είχαν περίπου τον ίδιο πληθυσμό *L. monocytogenes* (6,60 log CFU/g). Όπως και στην περίπτωση της OMX, έτσι και εδώ η επίδραση της χιτοζάνης στον πληθυσμό της *L. monocytogenes* φάνηκε από την πρώτη ημέρα συντήρησης των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, την ημέρα 0 ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* και στις δύο ομάδες ήταν 5,19 log CFU/g. Ωστόσο την επόμενη ημέρα (D1) ο πληθυσμός αυτός στην ομάδα U ήταν 5,19 log CFU/g, ενώ στην C 3,94 log CFU/g. Από την ημέρα 0 έως και τη ημέρα 28, η οποία ήταν η τελευταία ημέρα συντήρησης των δειγμάτων, ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* και στις δύο ομάδες είχε ανοδική τάση, φτάνοντας την D28 στην ομάδα U τους 8,89 log CFU/g και στην ομάδα C τους 6,72 log CFU/g. Ωστόσο, όλες τις μέρες συντήρησης των δειγμάτων υπήρχε σημαντική πληθυσμιακή διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες, με τη μέγιστη να καταγράφεται την 21<sup>η</sup> ημέρα του πειραματισμού (D21), φτάνοντας τους 3,16 log CFU/g και την ελάχιστη την D0 με τη διαφορά να υπολογίζεται στους 1,25 log CFU/g. Συνεπώς, είναι εμφανής η ανασταλτική επίδραση του διαλύματος χιτοζάνης στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*.

### Εντεροβακτηριοειδή

Στον Πίνακα 6 και το Γράφημα 3 παρουσιάζονται οι πληθυσμιακές μεταβολές των εντεροβακτηριοειδών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η επίδραση της χιτοζάνης στα βακτήρια αυτά καθώς παρόλο που τα δείγματα είχαν κοινή πληθυσμιακή αφετηρία (1,7 log CFU/g) από την D7 του πειραματισμού ο πληθυσμός τους στα δείγματα αυτά (ομάδα δειγμάτων C) ήταν μηδενικός. Αντιθέτως, στην ομάδα δειγμάτων U ο πληθυσμός σταδιακά αυξανόταν μέχρι το τέλος του πειραματισμού, όπου έφτασε τους 6,13 log CFU/g. Από αυτά προκύπτει το συμπέρασμα ότι και σε αυτή την ομάδα βακτηρίων η επικάλυψη χιτοζάνης έχει ανασταλτική δράση.

## Οξυγαλακτικά βακτήρια

Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως φαίνεται στον Πίνακα 7 και το Γράφημα 4, διαφέρει από τις υπόλοιπες ομάδες βακτηρίων που μελετήθηκαν. Την πρώτη ημέρα του πειραματισμού ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων και στις δύο ομάδες ήταν 3,13 log CFU/g. Ωστόσο την D1 εμφανίστηκε διαφορά στον πληθυσμό των βακτηρίων αυτών ανάμεσα στις ομάδες C και U. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών στην ομάδα U προσδιορίστηκε σε 3,13 log CFU/gr, ενώ στην ομάδα C σε 2,88 log CFU/g. Η διαφορά αυτή, όμως, σταδιακά μειωνόταν, ώστε την D28 τόσο τα δείγματα που εμβαιπίστηκαν σε χιτοζάνη, όσο και αυτά που δεν εμβαιπίστηκαν να έχουν σχεδόν τον ίδιο πληθυσμό (6,39 και 6,40 log CFU/g για τις ομάδες U και C, αντίστοιχα).

## 5.4 Συζήτηση

Μέχρι στιγμής είναι περιορισμένος ο αριθμός των εργασιών που έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την επίδραση της χιτοζάνης σε έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα και προημένα κρέατα.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8 και στα Γραφήματα 5 και 6, ότι η επικάλυψη των κεφτέδων με εδώδιμες μεμβράνες χιτοζάνης είχε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των τεσσάρων μικροβιακών πληθυσμών που μελετήθηκαν. Κατά την καταμέτρηση της OMX και της *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε ότι στα καλυμμένα με χιτοζάνη δείγματα οι βακτηριακοί πληθυσμοί ήταν κατά περίπου 2 λογαρίθμους μικρότεροι σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ανασταλτική δράση είχε και απέναντι στα οξυγαλακτικά βακτήρια τις πρώτες 14 μέρες συντήρησης των δειγμάτων. Τέλος, σημαντική ήταν η ανασταλτική δράση των μεμβρανών χιτοζάνης απέναντι στα εντεροβακτηριοειδή με μια πληθυσμιακή διαφορά που έφτασε τους 6,13 λογαρίθμους την 28<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης των δειγμάτων ανάμεσα στις ομάδες U και C. Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε το συμπέρασμα ότι η χρήση της χιτοζάνης είχε ως αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου ζωής των κεφτέδων κατά 14 ημέρες.

Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρθηκαν και από άλλους ερευνητές. Ο Beverly και οι συνεργάτες του (2008) στις Η.Π.Α., μετά τη χρήση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης σε προημένο ψητό βόειο κρέας διαπίστωσαν ότι αυτή δεν ήταν ικανή να αποτρέψει την ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Ωστόσο, παρατηρήθηκε σημαντική επιβράδυνση της ανάπτυξης. Στην έρευνα αυτή, όπως και στη δική μας, χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη υψηλού μοριακού βάρους από την οποία παρασκευάστηκε διάλυμα χιτοζάνης 1% με διαλύτη οξικό οξύ 1% v/v. Τα δείγματα, ενοφθαλμισμένα με *L. monocytogenes*, συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C για 28 ημέρες και οι μικροβιολογικές αναλύσεις έλαβαν χώρα τις ημέρες 0,7,14,21 και 28. Από τις αναλύσεις αυτές προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* κατά την αρχή του πειραματισμού ήταν παρόμοιος (περίπου 6 log CFU/g) τόσο στην ομάδα των μαρτύρων όσο και στα εμβαιπισμένα σε χιτοζάνη δείγματα. Στην πορεία οι πληθυσμοί και των δύο ομάδων αυξάνονταν. Ωστόσο, ο ρυθμός ανάπτυξης της *L.*

*monocytogenes* στα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε η χιτοζάνη ήταν βραδύτερος συγκριτικά με τους μάρτυρες. Συγκεκριμένα, την ημέρα 28 ο πληθυσμός του βακτηρίου αυτού στην ομάδα των μαρτύρων ήταν  $10,72 \log \text{CFU/g}$ , ενώ στην άλλη ομάδα δειγμάτων  $7,93 \log \text{CFU/g}$ . Συνεπώς, είναι φανερή η ευεργετική επίδραση των μεμβρανών χιτοζάνης στο προϊόν αυτό.

Ο Sathivel και οι συνεργάτες του (2007) στις Η.Π.Α. κατέληξαν, μετά την επικάλυψη φιλέτων σολομού με χιτοζάνη, ότι χάρη σε αυτή καθυστέρησε η εμφάνιση της οξείδωσης των λιπιδίων στο προϊόν αυτό μετά από οκτώ μήνες σε θερμοκρασίες κατάψυξης. Στην εργασία αυτή δεν μετρήθηκαν μικροβιακοί πληθυσμοί και χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη μικρού μοριακού βάρους από την οποία παρασκευάστηκε διάλυμα χιτοζάνης 1% w/v, με τη χρήση γαλακτικού οξέος.

Η Giatrakou και οι συνεργάτες της (2010) μελέτησαν την επίδραση διαλύματος χιτοζάνης σε τεμάχια ορνίθιου κρέατος, τα οποία συντηρούνταν σε θερμοκρασία  $4^\circ\text{C}$  υπό αερόβιες συνθήκες. Για τον πειραματισμό αυτό χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους και παρασκευάστηκε με τη χρήση οξικού οξέως διάλυμα 1,5% w/v. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις έλαβαν χώρα τις μέρες 0,2,4,6,8,10 και 12 του πειραματισμού και περιελάμβαναν την καταμέτρηση των παρακάτω μικροοργανισμών: *OMX*, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτηριοειδή και ζύμες-μύκητες. Από τις μικροβιολογικές αυτές αναλύσεις προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα. Ο πληθυσμός της *OMX* ήταν  $>7 \log \text{CFU/g}$  την ημέρα 4 για την ομάδα των μαρτύρων, ενώ για τα δείγματα με τη χιτοζάνη έφτασε στα ίδια επίπεδα την ημέρα 6. Συνεπώς, παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου ζωής των δειγμάτων κατά 2 ημέρες. Οι *Pseudomonas* spp. παρουσίασαν έναν αρχικό πληθυσμό  $5,05 \log \text{CFU/g}$ , ενώ στο τέλος του πειραματισμού ο πληθυσμός τους στους μάρτυρες ήταν  $9,42 \log \text{CFU/g}$  και στα δείγματα με τη χιτοζάνη περίπου  $0,5-1,5 \log \text{CFU/g}$  χαμηλότερος. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τον *B. thermosphacta*, τα εντεροβακτηριοειδή και τις ζύμες και τους μύκητες, όπου παρατηρήθηκαν χαμηλότεροι πληθυσμοί βακτηρίων στα εμβαπτισμένα με χιτοζάνη δείγματα, σε σύγκριση με τους μάρτυρες.

Με την επίδραση μεμβρανών χιτοζάνης σε ορνίθιο κρέας ασχολήθηκε και ο Κομοδρόμος και οι συνεργάτες του (2012). Χρησιμοποίησε διάλυμα χιτοζάνης υψηλού μοριακού βάρους 1% w/v σε οξικό οξύ. Τα δείγματα ήταν φιλέτα νωπού ορνίθιου κρέατος από τα οποία τα μισά εμβαπτίστηκαν σε χιτοζάνη και τα άλλα μισά όχι και αποτέλεσαν τους μάρτυρες. Τα δείγματα στη συνέχεια συντηρήθηκαν στους  $5^\circ\text{C}$  και ακολούθησαν μικροβιολογικές αναλύσεις τις ημέρες 1,3, 5 και 7 της συντήρησης. Από τις αναλύσεις αυτές προέκυψε το συμπέρασμα ότι η χρήση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης είχε ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των πληθυσμών της *OMX*, των εντεροβακτηρίων, των λακτοβακίλλων, των ψευδομονάδων και του *B. thermosphacta*, ενώ είχε ευεργετική δράση και στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Αντιθέτως, οι πληθυσμοί ζυμών και μυκήτων ανάμεσα στις δύο ομάδες δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά.

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και η Petrou και οι συνεργάτες της (2012), οι οποίοι ασχολήθηκαν με την επίδραση διαλύματος χιτοζάνης 1,5% w/v (παρασκευασμένο από χιτοζάνη μικρού μοριακού βάρους) σε φρέσκο ορνίθιο κρέας.

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις έλαβαν χώρα τις μέρες 0,3,6,9,12,15,18 και 21 του πειραματισμού για τα δείγματα που εμβαπτίστηκαν σε χιτοζάνη, ενώ μέχρι την ημέρα 12 για τους μάρτυρες, και περιελάμβαναν την καταμέτρηση των παρακάτω μικροοργανισμών: OMX, *Pseudomonas* spp., *B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτηριοειδή και ζύμες-μυκήτες. Ο πληθυσμός της OMX στην έρευνα αυτή ξεπέρασε τους 7 log CFU/g, που είναι το ανώτερο επιτρεπτό όριο για το φρέσκο κρέας, στην ομάδα των μαρτύρων ενώ στα εμβαπτισμένα με χιτοζάνη δείγματα ακόμα και μέχρι το τέλος του πειραματισμού (ημέρα 21) ο πληθυσμός δεν έφτασε σε αυτά τα όρια. Συνεπώς, όπως η Giatrakou και οι συνεργάτες της (2010), έτσι και η Petrou και οι συνεργάτες της (2012) παρατήρησαν αύξηση του χρόνου ζωής του προϊόντος κατά 10 ημέρες. Επιπλέον, τα εμβαπτισμένα σε χιτοζάνη δείγματα παρουσίασαν μικρότερους πληθυσμούς οξυγαλακτικών βακτηρίων, ζυμών-μυκήτων και *Pseudomonas* spp. σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Ο πληθυσμός του *B. thermosphacta* στην ομάδα των μαρτύρων έφτασε περίπου τους 6,3 log CFU/g, ενώ στην ομάδα όπου χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη ο πληθυσμός ήταν πολύ μικρότερος (περίπου 3 log CFU/g). Τέλος, σχετικά με τον πληθυσμό των εντεροβακτηριοειδών η ομάδα των μαρτύρων την ημέρα 12 έφτασε τους 6 log CFU/g, σε αντίθεση με την ομάδα της χιτοζάνης η οποία είχε πολύ μικρότερο πληθυσμό (περίπου 3 log CFU/g).

Μια ακόμα σχετική έρευνα έλαβε χώρα από τους Darmadji και Izumimoto (1994) στην Ινδονησία, οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της χιτοζάνης σε βακτήρια όπως *Staphylococcus aureus*, κολοβακτηριοειδή και *Pseudomonas fragi* καθώς και στην OMX. Τα δείγματα που μελετήθηκαν προήλθαν από φρέσκο βόειο κρέας και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης 0.2%, 0.5% και 1%. Τα δείγματα αυτά και η ομάδα των μαρτύρων συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 °C και οι μικροβιολογικές αναλύσεις που προαναφέρθηκαν έγιναν τις μέρες 0,3,5 και 10 της συντήρησής τους. Μετά τις μικροβιολογικές αυτές αναλύσεις προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: οι πληθυσμοί τόσο της OMX όσο και των κολοβακτηριοειδών παρουσίασαν αύξηση καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματισμού ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του διαλύματος χιτοζάνης. Πιο συγκεκριμένα, όλες οι ομάδες δειγμάτων είχαν παρόμοιο πληθυσμό OMX (περίπου 5-6 log CFU/g) και κολοβακτηριοειδών (περίπου 3 log CFU/g) την ημέρα 0. Κατά τη διάρκεια του πειραματισμού οι πληθυσμοί αυτοί αυξάνονται τόσο για την ομάδα των μαρτύρων όσο και τις ομάδες εμβαπτισμένες σε διάλυμα χιτοζάνης 0,2 και 0,5%, και έφτασαν την ημέρα 10 τους 9 log CFU/g για την OMX και τους 7-8 log CFU/g για τα κολοβακτηριοειδή. Αντίθετα, στα δείγματα που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χιτοζάνης 1% ο μέγιστος πληθυσμός της OMX και των κολοβακτηριοειδών ήταν μικρότερος από τις υπόλοιπες ομάδες δειγμάτων την ημέρα 10 του πειραματισμού (8,87 log CFU/g και 6,73 log CFU/g αντίστοιχα). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και για τα βακτήρια *P. fragi* και *S. aureus*. Η χιτοζάνη είχε και σε αυτά τα βακτήρια ανασταλτική επίδραση, η οποία μάλιστα αυξανόταν όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε, με αποτέλεσμα την ημέρα 10 του πειραματισμού η πληθυσμιακή διαφορά ανάμεσα στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα που χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα χιτοζάνης 1% να είναι περίπου 2 log CFU/g. Επιπλέον, σύμφωνα με την οργανοληπτική εξέταση του κρέατος, τα εμβαπτισμένα σε χιτοζάνη δείγματα συγκέντρωσαν υψηλότερη βαθμολογία και ήταν περισσότερο αποδεκτά από την ομάδα των μαρτύρων.

Με την επίδραση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης σε νωπό βόειο κρέας ασχολήθηκε και ο Κομοδρόμος (2012). Πιο συγκεκριμένα, μελέτησε της επίδραση διαλύματος χιτοζάνης 1% w/v (παρασκευασμένο από χιτοζάνη υψηλού μοριακού βάρους με διαλύτη οξικό οξύ 1% v/v) σε νωπό βόειο κρέας στους 5 °C με μικροβιολογικά και οργανοληπτικά κριτήρια. Τόσο οι μικροβιολογικές εξετάσεις, οι οποίες περιελάμβαναν την καταμέτρηση της OMX, εντεροβακτηριοειδών, της *Pseudomonas* spp., του *B. thermosphacta* και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όσο και οι οργανοληπτικές εξετάσεις (γεύση, άρωμα, τρυφερότητα, χυμώδες και χρώμα) έλαβαν χώρα τις ημέρες 0,2,4,6,8 και 10. Από τις εξετάσεις αυτές προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Οι αρχικοί μικροβιακοί πληθυσμοί όλων των δειγμάτων δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Ο πληθυσμός της OMX παρουσίασε ανοδική τάση και στις δύο ομάδες δειγμάτων. Στα εμβαπτισμένα σε χιτοζάνη δείγματα όμως οι πληθυσμοί ήταν κατά πολύ μικρότεροι, με αποτέλεσμα την 6<sup>η</sup> ημέρα της συντήρησής τους οι πληθυσμοί της OMX να είναι 8,90 log CFU/g και 4,65 log CFU/g στην ομάδα των μαρτύρων και στην ομάδα των δειγμάτων με χιτοζάνη αντίστοιχα. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα και στους υπόλοιπους βακτηριακούς πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν. Οι πληθυσμοί των Enterobacteriaceae, της *Pseudomonas* spp, του *Brochothrix thermosphacta* και των Lactobacillaceae εμφάνισαν επίσης ανοδική τάση και στις δύο ομάδες δειγμάτων, με την άνοδο στους μάρτυρες να είναι κατά πολύ μεγαλύτερη. Πιο συγκεκριμένα, κατά την 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης ο πληθυσμός των Enterobacteriaceae στους μάρτυρες ήταν 8,85 log CFU/g ενώ στα εμβαπτισμένα σε χιτοζάνη δείγματα 4,30 log CFU/g. Στον πληθυσμό των *Pseudomonas* spp η μέγιστη διαφορά ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες δειγμάτων παρατηρήθηκε της 6<sup>η</sup> ημέρα συντήρησης και έφτασε τους 4,22 log CFU/g. Στον πληθυσμό του *Brochothrix thermosphacta* την ημέρα 6 η διαφορά αυτή ήταν 3,98 log CFU/g, ενώ στα οξυγαλακτικά βακτήρια η διαφορά δεν ήταν τόσο έντονη, ήταν όμως εμφανείς. Σύμφωνα με την οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων τα δείγματα που είχαν ενοφθαλιστεί σε χιτοζάνη συγκέντρωσαν υψηλότερη βαθμολογία από τους κριτές σε όλα τα χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων.

Έναν αντίστοιχο πειραματισμό έκαναν και οι Xia και Kong (2008) στην Κίνα σε χοιρινό κρέας το οποίο εμβάπτισαν σε διάλυμα χιτοζάνης 0,5% και το οποίο συντηρήθηκε για 28 ημέρες στους 4°C. Στη συνέχεια, έγινε καταμέτρηση της OMX τις ημέρες 0,7,14,21 και 28 της συντήρησης των δειγμάτων. Από τον πειραματισμό αυτό προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Ενώ ο αρχικός πληθυσμός για την ομάδα των μαρτύρων ήταν 3,88 log CFU/g, συνέχισε να αυξάνεται με αποτέλεσμα την ημέρα 28 να ανέλθει στους 8,56 log CFU/g. Αντιθέτως, τα δείγματα που εμβαπτίστηκαν σε χιτοζάνη παρουσίασαν μειωμένους βακτηριακούς πληθυσμούς. Πιο συγκεκριμένα, σε σύγκριση με την ομάδα των μαρτύρων τις ημέρες 7,14,21 και 28 οι πληθυσμοί αυτοί ήταν μειωμένοι κατά 3,24, 2,31, 1,56 και 0,88 log CFU/g αντίστοιχα.

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν η Kulig και οι συνεργάτες της στην Πολωνία (2017) οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της χιτοζάνης σε χοίρειο κρέας κατά την αποθήκευση του για 14 ημέρες σε θερμοκρασία ψύξης (4 °C). Συγκεκριμένα, τις ημέρες 0,7 και 14 της συντήρησής του έγινε καταμέτρηση της OMX, ζυμών και μυκήτων, οξυγαλακτικών βακτηρίων και ψυχρότροφων μικροοργανισμών. Κατά μέσο όρο η ομάδα των μαρτύρων είχε περίπου 41% μεγαλύτερους πληθυσμούς σε όλες τις ομάδες βακτηρίων που εξετάστηκαν, σε σύγκριση με την ομάδα των δειγμάτων που

καλύφθηκαν με χιτοζάνη. Την ημέρα 0 ο πληθυσμός της OMX ήταν  $3,8 \log \text{CFU/cm}^2$ . Τις ημέρες 7 και 14 όμως ο πληθυσμός αυτός αυξήθηκε και έφτασε τους 6 και  $7 \log \text{CFU/cm}^2$  αντίστοιχα. Αντιθέτως, στα δείγματα όπου χρησιμοποιήθηκε η χιτοζάνη, ενώ την ημέρα 0 ο πληθυσμός της OMX ήταν ίδιος με την ομάδα των μαρτύρων ( $3,8 \log \text{CFU/cm}^2$ ), την ημέρα 7 έφτασε περίπου τους  $4 \log \text{CFU/cm}^2$  και την ημέρα 14 τους  $5-6 \log \text{CFU/cm}^2$ . Είναι φανερό λοιπόν η ευεργετική επίδραση της χιτοζάνης στο χρόνο ζωής των δειγμάτων αυτών. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στους υπόλοιπους βακτηριακούς πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα, στο τέλος του πειραματισμού τα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα ψυχρότροφα και οι ζύμες και οι μύκητες είχαν πληθυσμούς περίπου κατά  $2 \log \text{CFU/cm}^2$  μικρότερους στα εμβαπτισμένα σε χιτοζάνη δείγματα σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η επίδραση των εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης έχει μελετηθεί και σε σουτζούκια Καισαρείας (Δημητρακόπουλος, 2016). Στα δείγματα προστέθηκε και ενοφθάλμισμα *S. aureus*. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χιτοζάνης 1% w/v (παρασκευασμένο από χιτοζάνη υψηλού μοριακού βάρους με διαλύτη οξικό οξύ 1% v/v) στο οποίο εμβαπτίστηκαν τα μισά από τα σουτζούκια και ακολούθησαν μικροβιολογικές εξετάσεις τις ημέρες 0, 7, 14 και 21 καθώς και οργανοληπτική αξιολόγησή τους. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που μελετήθηκαν περιελάμβαναν την OMX, τον *S. aureus*, τα *Enterobacteriaceae* και τα *Lactobacillaceae* και προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα. Η δράση της χιτοζάνης δεν επηρέασε την ανάπτυξη της OMX, των *Enterobacteriaceae* και των *Lactobacillaceae*. Αντιθέτως, μέχρι την ημέρα 7 του πειραματισμού εμφάνισε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του *S. aureus*. Επίσης, κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση τόσο τα δείγματα με χιτοζάνη όσο και η ομάδα των μαρτύρων συγκέντρωσαν υψηλή βαθμολογία από τους κριτές.

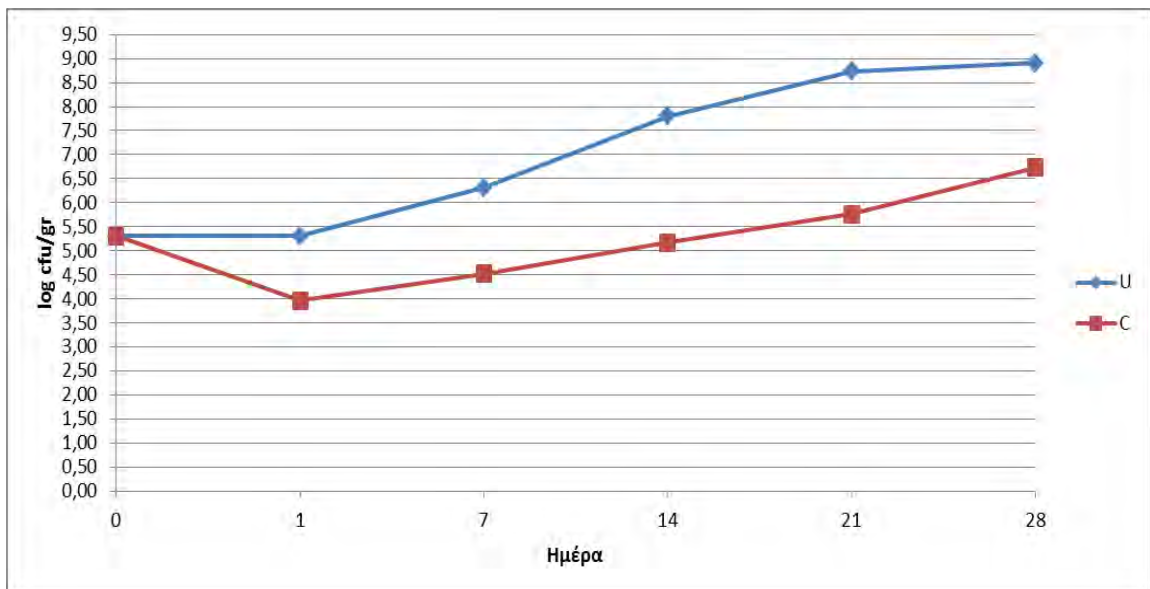
Τέλος, ο Οικονόμου και οι συνεργάτες του (2017) εμβάπτισαν σε διάλυμα χιτοζάνης 1% v/w (χιτοζάνη μικρού μοριακού βάρους) δείγματα από κιμά βουβάλου, στα μισά εκ των οποίων είχε γίνει ενοφθαλμισμός με καλλιέργεια *L. monocytogenes*, ώστε να διαπιστωθεί εάν οι εδώδιμες μεμβράνες χιτοζάνης παρατείνουν το χρόνο ζωής και βελτιώνουν την ασφάλεια του τροφίμου αυτού. Μετά τη συντήρηση των δειγμάτων για 14 ημέρες στους  $4^\circ\text{C}$  και την καταμέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας, της ολικής ψυχρόφιλης χλωρίδας, των οξυγαλακτικών βακτηρίων, των κολοβακτηριοειδών και της *L. monocytogenes* κατέληξαν στα παρακάτω συμπεράσματα. Η χρήση χιτοζάνης είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση του πληθυσμού της *L. monocytogenes*, των κολοβακτηριοειδών και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Επίσης, ανέστειλε την ανάπτυξη της ολικής ψυχρόφιλης χλωρίδας μέχρι την ημέρα 10, μετά από την οποία ο πληθυσμός της ήταν περίπου ο ίδιος ανάμεσα στις δύο ομάδες δειγμάτων, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Επιπλέον, ο Yangilar (2015) μελέτησε την επίδραση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης σε τυρί Kashar στην Τουρκία και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι μεμβράνες χιτοζάνης είχαν ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης παθογόνων και αλλοιογόνων βακτηρίων. Τέλος, σύμφωνα με τον Rodriguez και τους συνεργάτες του (2003) η χρήση χιτοζάνης σε προμαγειρευμένες πίτσες στην Αργεντινή είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή ανάπτυξης των *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. και *Cladosporium* spp.

**Πίνακας 4:** Πληθυσμοί Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτεδών στους 5 °C

| Δείγμα | Ημέρα |      |      |      |      |      |
|--------|-------|------|------|------|------|------|
|        | 0     | 1    | 7    | 14   | 21   | 28   |
| U      | 5,31* | 5,31 | 6,31 | 7,8  | 8,73 | 8,90 |
| C      | 5,31  | 3,97 | 4,52 | 5,17 | 5,77 | 6,73 |

\*Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε log CFU/g.



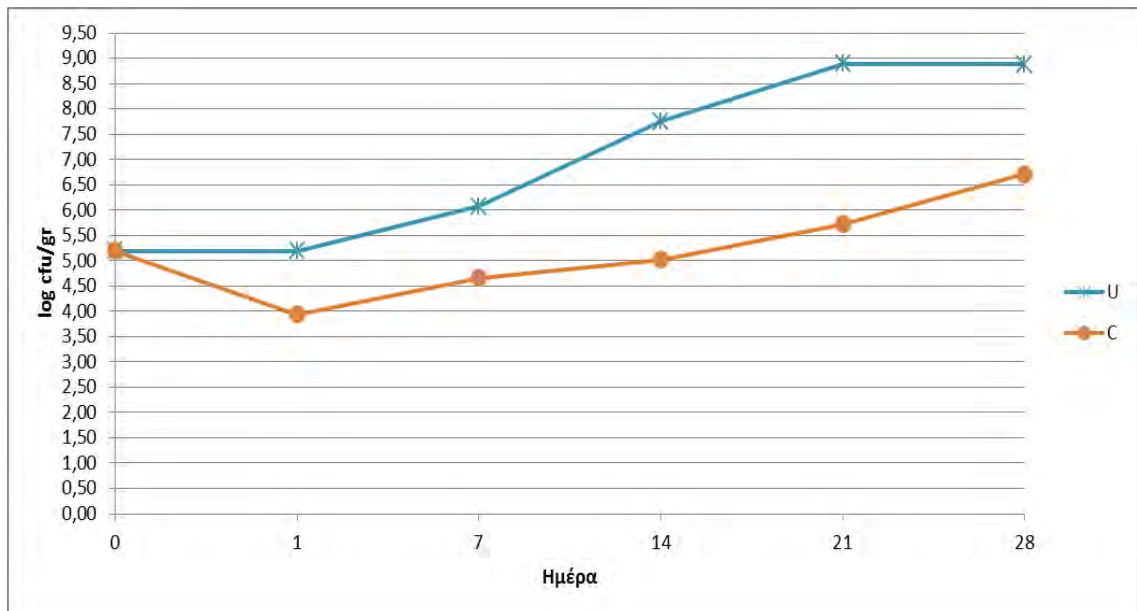
**Γράφημα 1:** Μεταβολή πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτεδών στους 5 °C



**Πίνακας 5:** Πληθυσμοί *Listeria monocytogenes* κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C

| Δείγμα | Ημέρα |      |      |      |      |      |
|--------|-------|------|------|------|------|------|
|        | 0     | 1    | 7    | 14   | 21   | 28   |
| U      | 5,19* | 5,19 | 6,07 | 7,75 | 8,89 | 8,88 |
| C      | 5,19  | 3,94 | 4,67 | 5,02 | 5,73 | 6,72 |

\*Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε log CFU/g.

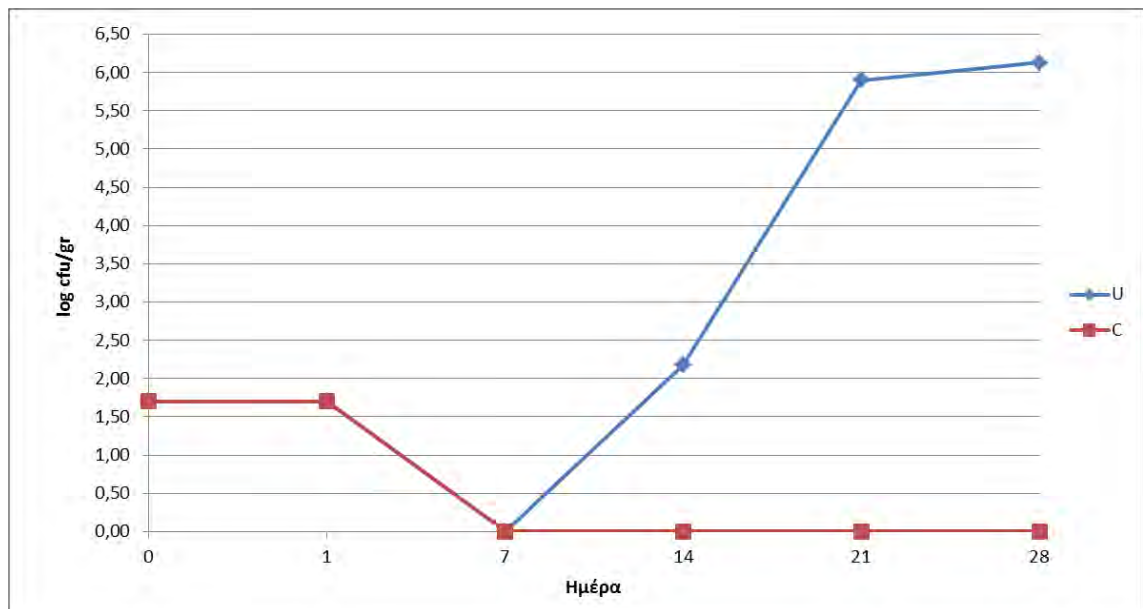


**Γράφημα 2:** Μεταβολή πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C

**Πίνακας 6:** Πληθυσμοί εντεροβακτηριοειδών κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C

| Δείγμα | Ημέρα |     |   |      |     |      |
|--------|-------|-----|---|------|-----|------|
|        | 0     | 1   | 7 | 14   | 21  | 28   |
| U      | 1,7*  | 1,7 | 0 | 2,18 | 5,9 | 6,13 |
| C      | 1,7   | 1,7 | 0 | 0    | 0   | 0    |

\*Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε log CFU/g.

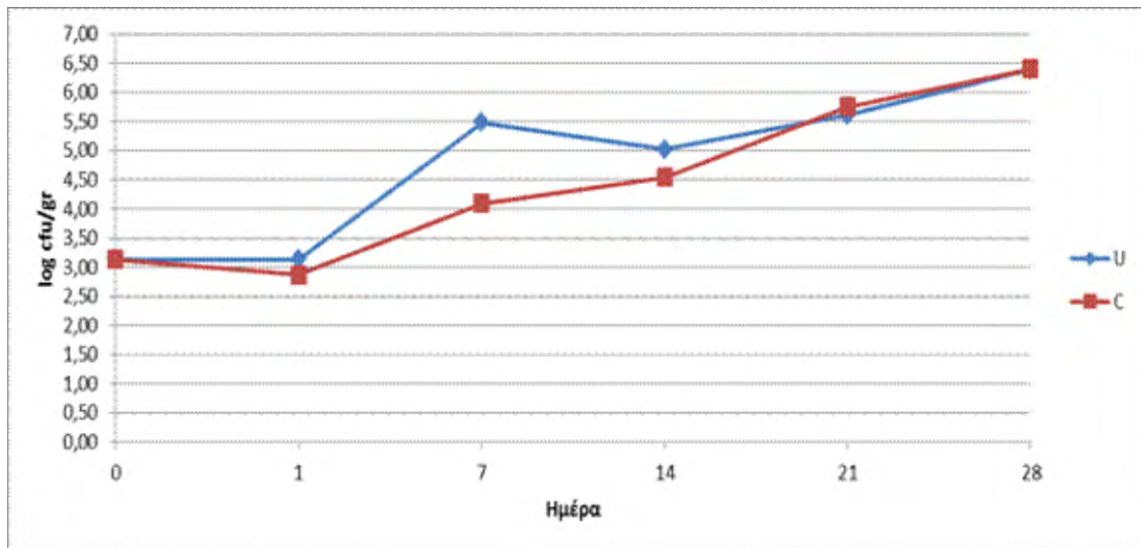


**Γράφημα 3:** Μεταβολή πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C

**Πίνακας 7:** Πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C

| Δείγμα | Ημέρα |      |      |      |      |      |
|--------|-------|------|------|------|------|------|
|        | 0     | 1    | 7    | 14   | 21   | 28   |
| U      | 3,13* | 3,13 | 5,48 | 5,02 | 5,61 | 6,39 |
| C      | 3,13  | 2,88 | 4,09 | 4,54 | 5,75 | 6,40 |

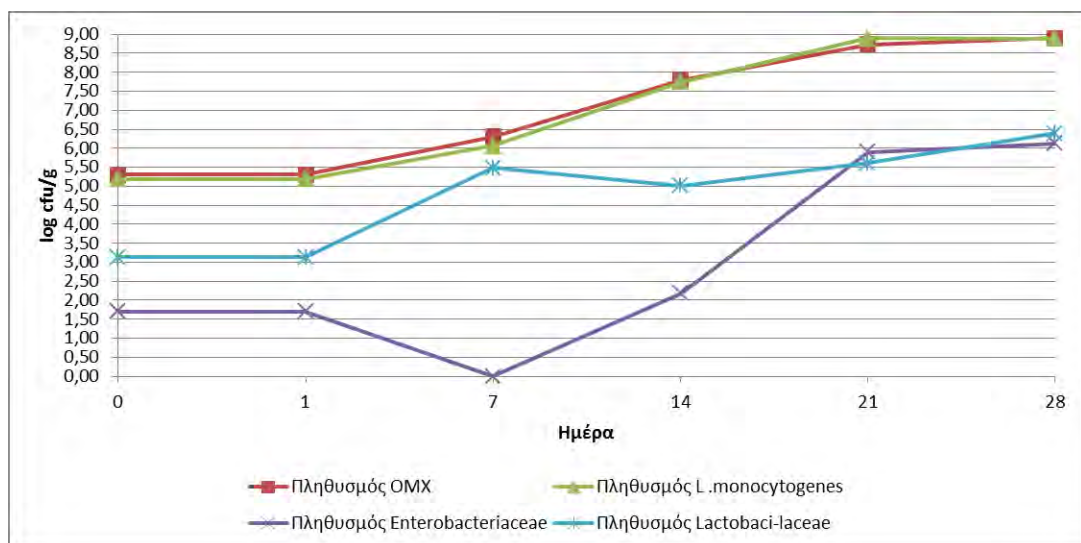
\* Οι βακτηριακοί πληθυσμοί εκφράζονται σε log CFU/gr.



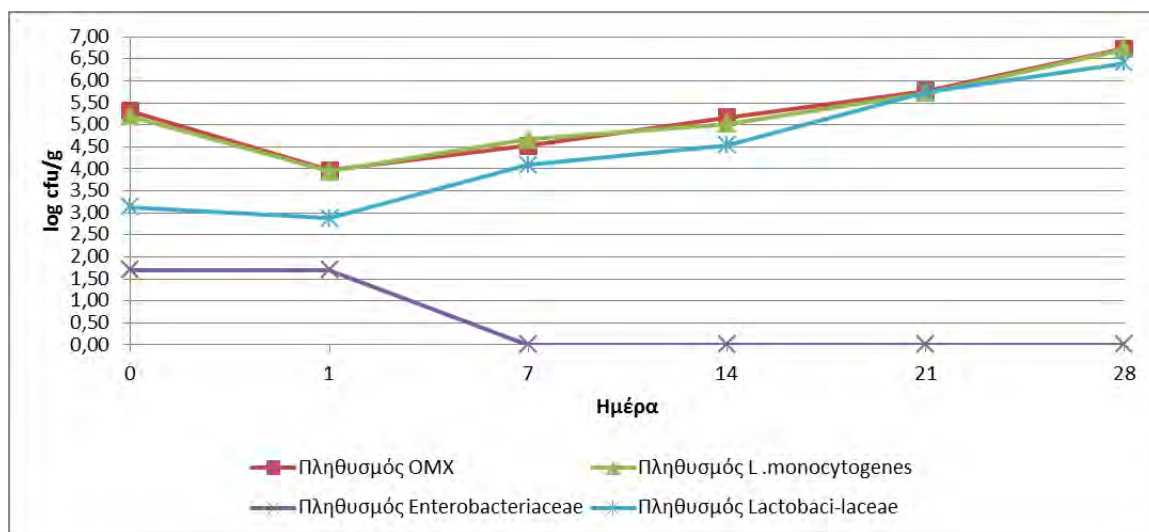
**Γράφημα 4:** Μεταβολή πληθυσμού των οξυγαλακτικών κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C

**Πίνακας 8:** Συγκεντρωτικός πίνακας μεταβολών των εξεταζόμενων μικροβιακών πληθυσμών, κατά τη συντήρηση προψημένων βόειων κεφτεδών στους 5 °C

| Ημέρα | Ομάδα Δειγμάτων | Πληθυσμός |                         |                    |                  |
|-------|-----------------|-----------|-------------------------|--------------------|------------------|
|       |                 | OMX       | <i>L. monocytogenes</i> | Εντεροβακτηριοειδή | Lactobacillaceae |
| 0     | U               | 5,31      | 5,19                    | 1,70               | 3,13             |
|       | C               | 5,31      | 5,19                    | 1,70               | 3,13             |
| 1     | U               | 5,31      | 5,19                    | 1,70               | 3,13             |
|       | C               | 3,97      | 3,94                    | 1,70               | 2,88             |
| 7     | U               | 6,31      | 6,07                    | 0,00               | 5,48             |
|       | C               | 4,52      | 4,67                    | 0,00               | 4,09             |
| 14    | U               | 7,80      | 7,75                    | 2,18               | 5,02             |
|       | C               | 5,17      | 5,02                    | 0,00               | 4,54             |
| 21    | U               | 8,73      | 8,89                    | 5,90               | 5,61             |
|       | C               | 5,77      | 5,73                    | 0,00               | 5,75             |
| 28    | U               | 8,90      | 8,88                    | 6,13               | 6,39             |
|       | C               | 6,73      | 6,72                    | 0,00               | 6,40             |



**Γράφημα 5:** Μεταβολή βακτηριακών πληθυσμών της ομάδας U κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτεδών στους 5 °C



**Γράφημα 6:** Μεταβολή βακτηριακών πληθυσμών της ομάδας C κατά τη διάρκεια συντήρησης προψημένων βόειων κεφτέδων στους 5 °C

## 5.5 Συμπεράσματα

Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας, εξετάστηκε η επίδραση των εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης στο χρόνο ζωής και στην επιβίωση και την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε προψημένους βόειους κεφτέδες στους 5 °C. Παράλληλα εξετάστηκαν και οι πληθυσμοί της OMX, των εντεροβακτηριοειδών και των λακτοβακίλλων οι οποίοι επηρεάζουν τη διάρκεια συντήρησής τους και αποτελούν κριτήρια αξιολόγησής του χρόνου ζωής.

Με βάση αυτά συνάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- Ο χρόνος ζωής των προψημένων κεφτέδων κατά τη συντήρησή τους στους 5 °C δεν ξεπερνά τις 28 ημέρες. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση των κεφτέδων.
- Η επικάλυψη των προψημένων κεφτέδων με εδώδιμες μεμβράνες χιτοζάνης είχε ευεργετική επίδραση σε όλες τις παραμέτρους που εξετάστηκαν. Ανέστειλε την ανάπτυξη μικροοργανισμών που ανήκουν στη φυσιολογική χλωρίδα του κρέατος, συμβάλλοντας στην παράταση του χρόνου ζωής τους κατά 14 ημέρες. Επιπλέον, η χρήση χιτοζάνης βελτίωσε τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των κεφτέδων. Με βάση τόσο τις μικροβιολογικές αναλύσεις, όσο και την οργανοληπτική αξιολόγηση είναι πιθανή η περαιτέρω παράταση του χρόνου ζωής των προψημένων κεφτέδων.
- Η χρήση χιτοζάνης, με τη μορφή εδώδιμων μεμβρανών, είχε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*, η οποία αποτελεί σημαντικό κίνδυνο στα προψημένα κρέατα/ κρεατοσκευάσματα. Συγκεκριμένα, καθ' όλη τη

διάρκεια του πειραματισμού ο πληθυσμός της ήταν περίπου 2 log CFU/g μικρότερος στους εμβαπτισμένους σε χιτοζάνη κεφτέδες.

- Συμπερασματικά, η χρήση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης σε προψημένους βόειους κεφτέδες είχε ως αποτέλεσμα την παράταση του χρόνου ζωής και την καθυστέρηση της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* χωρίς να αλλοιώσει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Πρόκειται, λοιπόν, για μια πολλά υποσχόμενη ουσία στον τομέα της βιοσυντήρησης των τροφίμων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

**Abdelazeem, M., & Elsayh, K. I.** (2010). Occurrence of *Listeria* species in meat, chicken products and human stools in Assiut city, Egypt with PCR use for rapid identification of *Listeria monocytogenes*.

**Agulló, E., Gschaider, M. E., Rodríguez, M. S., Ramos, V. M., Pedroni, V.** (1998). Efecto antifúngico de películas de quitosano sobre prepizzas. *Inform Tecnol* 9(3), 123-8.  
**Aider, M.** (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.

**Ahn, D. H., Choi, J. S., Lee, H. Y., Kim, J. Y., Youn, S. K., & Park, S. M.** (2003). Effects on preservation and quality of bread with coating high molecular weight chitosan. *Korean J. Food Nutr*, 16(4), 430-436.

**Allan, G., Crosby, G. D., Lee, J. H., Miller, M. L., Reif, W. M.**(1972). Proceedings of a Symposium on Man-made Polymers in Paper Making, Helsinki, Finland.

**Allerberger, F.** (2007). *Listeria*. In *Foodborne diseases* (pp. 27-39). Humana Press.

**APHA.** (1984). Compendium of methods for the microbiological examination of foods (2<sup>nd</sup> ed.). Washington, DC, USA: APHA.

**Appendini, P., & Hotchkiss, J. H.** (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.

**Authority, E. F. S.** (2015). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013." *EFSA Journal* 13.1.

**Aymerich, T., Picouet, P. A., & Monfort, J. M.** (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78(1), 114-129.

**Baldrick, P.** (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56(3), 290-299.

**Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. A., & Roberts, G. A.** (1992). Improved method for ir determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 14(3), 166-169.

**Bean, N. H., & Griffin, P. M.** (1990). Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. *Journal of Food Protection®*, 53(9), 804-817.

- Beverly, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatkula, W., & No, H. K.** (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 25(3), 534-537.
- Bernkop-Schnürch, A., & Kast, C. E.** (2001). Chemically modified chitosans as enzyme inhibitors. *Advanced drug delivery reviews*, 52(2), 127-137.
- Bersot, L. S., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., & Destro, M. T.** (2001). Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. *Meat science*, 57(1), 13-17.
- Bhale, S., No, H. K., Prinyawiwatkul, W., Farr, A. J., Nadarajah, K., & Meyers, S. P.** (2003). Chitosan coating improves shelf life of eggs. *Journal of food science*, 68(7), 2378-2383.
- Bolton, D. J., McMahon, C. M., Doherty, A. M., Sheridan, J. J., McDowell, D. A., Blair, I. S., & Harrington, D.** (2000). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in minced beef under laboratory conditions and in sous-vide prepared minced and solid beef cooked in a commercial retort. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 626-632.
- Buchholz, U., & Mascola, L.** (2001). Transmission, pathogenesis, and epidemiology of *Listeria monocytogenes*. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 10(1), 34-41.
- Busani, L., Cigliano, A., Taioli, E., Caligiuri, V., Chiavacci, L., Di Bella, C., Battisti, A., Duranti, A., Gianfranceschi, M., Nardella, M. C. & Ricci, A.** (2005). Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in foods of animal origin in Italy. *Journal of Food Protection*®, 68(8), 1729-1733.
- Buzby, J. C., Roberts, T., Lin, C. T. J., & MacDonald, J. M.** (1996). Bacterial foodborne disease. *Medical Costs and Productivity Losses, USDA/ERS, Washington, DC., Report, 741.*
- Cabedo, L., Picart i Barrot, L., & Teixidó i Canelles, A.** (2008). Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *Journal of food protection*, 71(4), 855-859.
- Caner, C.** (2005). The effect of edible eggshell coatings on egg quality and consumer perception. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(11), 1897-1902.
- Cartwright, E. J.** (2013). Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998–2008-Volume 19, Number 1—January 2013-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
- Cassens, R. G.** (2008). *Meat preservation: preventing losses and assuring safety*. John Wiley & Sons.



**CDC** (2011) Multistate outbreak of listeriosis linked to whole cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html>. , Ημερομηνία Ανάκτησης: 05/02/2017.

**Centers for Disease Control and Prevention-CDC**,  
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 01/02/2017a.

**Centers for Disease Control and Prevention-CDC**,  
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-02-14/index.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 01/02/2017b.

**Centers for Disease Control and Prevention-CDC**,  
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 01/02/2017c.

**Centers for Disease Control and Prevention-CDC**,  
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 01/02/2017d.

**Centers for Disease Control and Prevention-CDC**,  
<https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 02/02/2017e.

**Cha, D., Park, H., & Cooksey, K.** (2001). Preparation and diffusion rate of a nisin incorporated antimicrobial film. IFT Annual Meeting Technical Program. New Orleans: Illinois Institute of Technology – IFT.

**Chand, P., & Sadana, J. R.** (1999). Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Veterinary record*, 145(3), 83-84.

**Cho, S., Lee, D., & Han, J.** (2009). Antimicrobial packaging. In K. Yam, Encyclopedia of packaging technology (3 ed., pp. 50-59). Hoboken, USA: John Wiley and Sons Ltd.

**Coma, V.** (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science* , 78, 90-103.

**Coma, V., Martial- Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F., & Deschamps, A.** (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of food science*, 67(3), 1162-1169.

**Cossart, P., & Sansonetti, P. J.** (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science*, 304(5668), 242-248.

**Cotoni, L.** (1942). A propos des bacteries denommees Listerella-rappel d'une observation ancienne de meningite chez l'homme. *Ann. Inst. Pasteur*, 68, 92-95.

**Cuero, R. G.** (1998). Antimicrobial action of exogenous chitosan. *Exs*, 87, 315-333.

- Cuero, R. G., Osuji, G., & Washington, A.** (1991). N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnology Letters*, *13*(6), 441-444.
- Darmadji, P., & Izumimoto, M.** (1996). Effect of chitosan on meat preservation. *Indonesian Food and Nutrition Progress*, *3*(2), 51-56.
- Davis, R., Zivanovic, S., D'Souza, D. H., & Davidson, P. M.** (2012). Effectiveness of chitosan on the inactivation of enteric viral surrogates. *Food microbiology*, *32*(1), 57-62.
- Davydova, V. N., Yermak, I. M., Gorbach, V. I., Krasikova, I. N., & Solov'eva, T. F.** (2000). Interaction of bacterial endotoxins with chitosan. Effect of endotoxin structure, chitosan molecular mass, and ionic strength of the solution on the formation of the complex. *BIOCHEMISTRY C/C OF BIOKHMIIA*, *65*(9), 1082-1090.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J.** (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, *21*(6), 703-714.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P.** (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.*, *58*, 587-610.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J.** (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food chemistry*, *114*(4), 1173-1182.
- EFSA – European Food Safety Authority** (2011) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2009. *EFSA Journal*, *9*(3), 2090 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090.htm>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 05/02/2017.
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S.** (2013). Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering: C*, *33*(4), 1819-1841.
- Fang, S. W., Li, C. F., & Shih, D. Y.** (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *Journal of food protection*, *57*(2), 136-140.
- Farber, J. M., Coates, F., & Daley, E.** (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, *15*(3), 103-105.
- Farber, J. M., Daley, E., Coates, F., Beausoleil, N., & Fournier, J.** (1991). Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*(11), 2606-2608.
- Farber, J. M., & Peterkin, P. I.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*, *55*(3), 476-511.

- FDA** (2011) Environmental assessment: Factors potentially contributing to the contamination of fresh whole cantaloupe implicated in a multi-state outbreak of listeriosis.  
<http://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm276247.htm> ,  
 Ημερομηνία Ανάκτησης: 05/02/2017.
- Felse, P. A., & Panda, T.** (1999). Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 20(6), 505-512.
- Fernández, M., & Fox, P. F.** (1997). Fractionation of cheese nitrogen using chitosan. *Food chemistry*, 58(4), 319-322.
- Fink-Gremmels, J.** (1992). Nutrition, residues and health. *Fleischwirtsch* , 72, 1541-1546.
- FSANZ.** (2009). Microbiological risk assessment of raw cow milk.  
<http://www.foodstandards.gov.au>. Ημερομηνία Ανάκτησης: 05/02/2017.
- Giatrakou, V., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N.** (2010). Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. *Food microbiology*, 27(1), 132-136.
- Gibbons, I. S., Adesiyun, A., Seepersadsingh, N., & Rahaman, S.** (2006). Investigation for possible source (s) of contamination of ready-to-eat meat products with *Listeria* spp. and other pathogens in a meat processing plant in Trinidad. *Food microbiology*, 23(4), 359-366.
- Gilbert, S., Lake, R., Hudson, A., Cressey, P.** (2009). Risk Profile: *Listeria monocytogenes* in Processed Ready-to-Eat Meats. Institute of Environmental Science & Research Limited Christchurch Science Centre.
- Gray, M. L., & Killinger, A. H.** (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological reviews*, 30(2), 309.
- Guibal, E.** (2004). Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and purification technology*, 38(1), 43-74.
- Guilbert, S., & Gontard, N.** (1995). Edible and biodegradable food packaging. *SPECIAL PUBLICATION-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY*, 162(1), 159-159.
- Guillet, C.** (2010). Human Listeriosis Caused by *Listeria ivanovii*-Volume 16, Number 1—January 2010-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
- Hadwiger, L. A., Kendra, D. F., Fristensky, B. W., & Wagoner, W.** (1986). Chitosan both activates genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In *Chitin in nature and technology* (pp. 209-214). Springer US.

**Han, C., Zhao, Y., Leonard, S. W., & Traber, M. G.** (2004). Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria× ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest biology and Technology*, 33(1), 67-78.

**Harris, L. J.** (2002). *Listeria monocytogenes*. In D. O. Cliver & H. P. Riemann (Eds.), *Foodborne diseases* (2<sup>nd</sup> edn., pp. 137-150).

**Hassan, Z., Purwati, E., Radu, S., Rahim, R. A., & Rusul, G.** (2001). Prevalence of *Listeria* spp and *Listeria monocytogenes* in meat and fermented fish in Malaysia.

**Health Protection Agency Working Group.** (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market.

**Health Protection Surveillance Centre (HPSC) Annual Reports**  
<http://www.hpsc.ie/hpsc/AboutHPSC/AnnualReports/>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 05/02/2017.

**Heinz, G., & Hautzinger, P.** (2007). *Meat processing technology for small to medium scale producers*. FAO.

**IMERI, A. G., & KNORR, D.** (1988). Effects of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *Journal of Food Science*, 53(6), 1707-1709.

**Institute of Food Technologists-IFT, Bacteria Associated with Foodborne Diseases**,  
<http://www.ift.org/knowledge-center/read-ift-publications/science-reports/scientific-status-summaries/bacteria-associated-with-foodborne-diseases.aspx>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 31/01/2017.

**Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. V., Tokura, S., Tamura, H., & Selvamurugan, N.** (2010). Novel carboxymethyl derivatives of chitin and chitosan materials and their biomedical applications. *Progress in Materials Science*, 55(7), 675-709.

**Jeon, Y. J., Park, P. J., & Kim, S. K.** (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate polymers*, 44(1), 71-76.

**Kamil, J. Y., Jeon, Y. J., & Shahidi, F.** (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 79(1), 69-77.

**Kanatt, S. R., Chander, R., & Sharma, A.** (2008). Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. *Food Chemistry*, 107(2), 845-852.

**Kerry, J. P., O'grady, M. N., & Hogan, S. A.** (2006). Past, current and potential nglan d gen of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat science*, 74(1), 113-130.

- Kluz, M., Petrová, J., Mellen, M., & Kunová, S.** (2015). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Meat Product Samples by Real-Time PCR. *Modern Chemistry & Applications*.
- Knorr, D.** (1986). Nutritional quality, food processing, and biotechnology aspects of chitin and chitosan: a review. *Process biochemistry*, 21(3), 90-92.
- Knorr, D.** (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food technology (USA)*.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J.** (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International journal of food microbiology*, 144(1), 51-63.
- Kulig, D., Zimoch-Korzycka, A., Król, Ż., Oziębłowski, M., & Jarmoluk, A.** (2017). Effect of Film-Forming Alginate/Chitosan Polyelectrolyte Complex on the Storage Quality of Pork. *Molecules*, 22(1), 98.
- Kumar, M. N. R.** (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
- Lambert, A. D., Smith, J. P., & Dodds, K. L.** (1991). Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat—a review. *Food Microbiology*, 8(4), 267-297.
- Lee, C. H., An, D. S., Park, H. J., & Lee, D. S.** (2003). Wide- spectrum antimicrobial packaging materials incorporating nisin and chitosan in the coating. *Packaging technology and science*, 16(3), 99-106.
- Lee, S. H.** (1996). Effect of chitosan on emulsifying capacity of egg yolk. *Journal of the Korean Society of Food and Nutrition*.
- Lemaitre, J. P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Divies, C., & Rousset, A.** (1998). Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. *Journal of food protection*, 61(11), 1459-1464.
- Lenz, T. L., & Hamilton, W. R.** (2003). Supplemental products used for weight loss. *Journal of the American Pharmacists Association: JAPhA*, 44(1), 59-67.
- Lessing, M. P. A., Curtis, G. D. W., & Bowler, I. C. J.** (1994). *Listeria ivanovii* infection. *Journal of Infection*, 29(2), 230-231.
- Lianou, A., & Sofos, J. N.** (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2172-2198.

- Li, Q., Dunn, E. T., Grandmaison, E. W., & Goosen, M. F. A.** (1992). Applications and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 7(4), 370-397.
- Li, J., Revol, J. F., & Marchessault, R. H.** (1997). Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites. *Journal of Applied Polymer Science*, 65(2), 373-380.
- Lindquist, S.** (1986). The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 1151-1191.
- Little, C. L., Taylor, F. C., Sagoo, S. K., Gillespie, I. A., Grant, K., & McLauchlin, J.** (2007). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food microbiology*, 24(7), 711-717.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L.** (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International journal of food microbiology*, 95(2), 147-155.
- Lorber, B.** (1997). Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 1-11.
- Lorber, B.** (2007). Listeriosis. In H. Goldfine & H. Shen (Eds.), *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and host response* (pp. 13-31).
- Mackey, B. M., & Derrick, C. M.** (1986). Elevation of the heat resistance of *Salmonella typhimurium* by sublethal heat shock. *Journal of Applied Microbiology*, 61(5), 389-393.
- Mackey, B. M., & Derrick, C. M.** (1987a). Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at rising temperatures. *Letters in Applied Microbiology*, 4(1), 13-16.
- Mackey, B. M., & Derrick, C. M.** (1987b). The effect of prior heat shock on the thermoresistance of *Salmonella thompson* in foods. *Letters in Applied Microbiology*, 5(6), 115-118.
- Mark, H. F., Bikales, N. M., Overberger, C., G., Menges, G.** (1985), *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Vol. 1, Wiley, New York, p. 20.
- Markey, M. I., Bowman, M. L., Bergamini, M. V. W.** (1989), *Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London, p. 713.
- Marsh, K. S.** (1997). *Wiley encyclopedia of packaging technology*. Wiley.
- Marsh, K., & Bugusu, B.** (2007). Food packaging—roles, materials, and environmental issues. *Journal of food science*, 72(3), R39-R55.

- Matsubashi, S., & Kume, T.** (1997). Enhancement of antimicrobial activity of chitosan by irradiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(2), 237-241.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., & Tauxe, R. V.** (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5(5), 607.
- Meldrum, R. J., Ellis, P. W., Mannion, P. T., Halstead, D., & Garside, J.** (2010). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods sampled from the point of sale in Wales, United Kingdom. *Journal of food protection*, 73(8), 1515-1518.
- Mena, C., Almeida, G., Teixeira, P., Hogg, T., & Gibbs, P. A.** (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food microbiology*, 21(2), 213-216.
- Mondry, H.** (1996). Packaging systems for processed meat. *Meat quality and meat packaging*, 323-356.
- Moorjani, M. N., Achyuta, V., & Khasim, T.** (1975). Parameters affecting the viscosity of chitosan from prawn waste. *Journal of Food Science and Technology*, 12, 187-189.
- Mou, S. S., Ma, A. D., Tu, M., Li, L. H., & Zhou, C. R.** (2003). Preparation of polylactic acid/chitin composite material and its safety evaluation by animal experiments. *Di 1 jun yi da xue xue bao= Academic journal of the first medical college of PLA*, 23(3), 245-247.
- Murphy, R. Y., Osaili, T., Duncan, L. K., & Marcy, J. A.** (2004). Thermal inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground chicken thigh/leg meat and skin. *Poultry science*, 83(7), 1218-1225.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A., & Swann, M. B. R.** (1926). A disease of rabbits England genes by a large mononuclear England gene, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29(4), 407-439.
- Muzzarelli, R. A. A.** (1977). Chitin. Oxford. *Pergamon Press*. 326p.
- Muzzarelli, R. A. A.** (1997). Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(2), 131-140.
- Nadarajah, K.** (2005). *Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan* (Doctoral dissertation, University of Peradeniya).
- Nadarajah, K., No, H. K., Prinyawiwatkul, W., Bansode, R., Silva, L. V. A., Meyers, S. P.** (2003). Extending the selflife of fresh catfish fillets during refrigerated storage by chitosan coating [abstract]. In: *IFT Annual Meeting Book of Abstracts; 2003*

July 12-16; Chicago, IL. Chicago, Ill.: Institute of Food Technologists. Abstract nr 76A-4.

**Newton, K. G., & Gill, C. O.** (1978). The development of the anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, *44*(1), 91-95.

**NCBI.** Taxonomy browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 12/11/2016.

**Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., & Azuma, I.** (1984). Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, *2*(1), 93-99.

**No, H. K., Kim, D. S., & Meyers, S. P.** (1999). Effect of physical and chemical treatments on chitosan viscosity. *Journal of Korean Soc for Chitin and Chitosan*, *4*(4), 177-183.

**No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z.** (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of food science*, *72*(5), R87-R100.

**No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., Hwang, H. J., & Meyers, S. P.** (2002). Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu. *Journal of Food Science*, *67*(4), 1511-1514.

**No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P.** (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, *74*(1), 65-72.

**Novak, J. S., & Juneja, V. K.** (2003). Effects of refrigeration or freezing on survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in under-cooked ground beef. *Food Control*, *14*(1), 25-30.

**Nyfeldt, A.** (1929). Etiologie de la mononucleose infectieuse. *CR Soc. Biol*, *101*, 590-591.

**Onsosyen, E., & Skaugrud, O.** (1990). Metal recovery using chitosan. *Journal of chemical Technology and Biotechnology*, *49*(4), 395-404.

**Ooi, S. T., & Lorber, B.** (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, *40*(9), 1327-1332.

**Pagán, R., Condón, S., & Sala, F. J.** (1997). Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, *63*(8), 3225-3232.

**Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., & Farkas, D. F.** (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, *5*(1), 45-57.



- Peel, M., Donachie, W., & Shaw, A.** (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria nglad genes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and Western blotting. *Microbiology*, *134*(8), 2171-2178.
- Petrou, S., Tsiraki, M., Giatrakou, V., & Savvaidis, I. N.** (2012). Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. *International journal of food microbiology*, *156*(3), 264-271.
- Portnoy, D. A., Auerbuch, V., & Glomski, I. J.** (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection. *J Cell Biol*, *158*(3), 409-414.
- Premaratne, R. J., Lin, W. J., & Johnson, E. A.** (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(10), 3046-3048.
- Raafat, D., Von Bargaen, K., Haas, A., & Sahl, H. G.** (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and environmental microbiology*, *74*(12), 3764-3773.
- Raafat, D., & Sahl, H. G.** (2009). Chitosan and its antimicrobial potential—a critical literature survey. *Microbial biotechnology*, *2*(2), 186-201.
- Rao, S. B., & Sharma, C. P.** (1997). Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of biomedical materials research*, *34*(1), 21-28.
- Rocourt, J. O. C. E. L. Y. N. E., & Buchrieser, C.** (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, *161*, 1.
- Rodriguez, M. S., Ramos, V., & Agulló, E.** (2003). Antimicrobial action of chitosan against spoilage organisms in precooked pizza. *Journal of food science*, *68*(1), 271-274.
- Roller, S., Sagoo, S., Board, R., O'mahony, T., Caplice, E., Fitzgerald, G., Fogden, M., Owen, M. & Fletcher, H.** (2002). Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. *Meat Science*, *62*(2), 165-177.
- Rooney, M. L.** (1995). Overview of active food packaging. In *Active food packaging* (pp. 1-37). Springer US.
- Ryser, E. T.** (2007). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products. In *Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition* (pp. 357-403). CRC Press.
- Ryu, C. H., Igimi, S., Inoue, S., & Kumagai, S.** (1992). The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. *International journal of food microbiology*, *16*(2), 157-160.

- Sagoo, S., Board, R., & Roller, S.** (2002). Chitosan inhibits growth of spoilage microorganisms in chilled pork products. *Food Microbiology*, *19*(2-3), 175-182.
- Salleh, E., Muhamad, I., & Khairuddin, N.** (2007). Preparation, characterization and antimicrobial analysis of antimicrobial starch-based film incorporated with chitosan and lauric acid. *Asian Chitin Journal*, *3*, 55-68.
- Salyers, A. A., & Whitt, D. D.** (2002). *A molecular approach* (pp. 53-100). Bacterial pathogenesis, 2<sup>nd</sup> edn. Washington, DC: ASM Press.
- Sandford, P. A.** (1989). Chitosan: commercial uses and potential applications. *Chitin and chitosan*, 51-69.
- Sanger, J. M., Sanger, J. W., & Southwick, F. S.** (1992). Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, *60*(9), 3609-3619.
- Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C.** (2010). Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers*, *82*(2), 277-283.
- Sathivel, S., Liu, Q., Huang, J., & Prinyawiwatkul, W.** (2007). The influence of chitosan glazing on the quality of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorboscha*) fillets during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, *83*(3), 366-373.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., ... & Griffin, P. M.** (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis*, *17*(1).
- Schlech III, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., ... & Broome, C. V.** (1983). Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New England journal of medicine*, *308*(4), 203-206.
- Schlesinger, M. J.** (1986). Heat shock proteins: the search for functions. *J Cell Biol*, *103*(2), 321-325.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., & Broome, C. V.** (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical microbiology reviews*, *4*(2), 169-183.
- Sergelidis, D., Stefanopoulou, A. M., & Genigeorgis, C.** (2001). Effect of incubation temperature on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. In *Proceedings of the 2nd Balkan conference of microbiology* (p. 237).
- Shahidi, F., & Abuzaytoun, R.** (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Advances in food and nutrition research*, *49*, 93-135.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J.** (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology*, *10*(2), 37-51.

- Siddiqi, R., & Khan, M. A.** (1989). Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 271(2), 146-152.
- Skonberg, D. I.** (2000). Extending shelf life of fresh fish fillets with a chitosan coating. In *Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, Dallas, USA, June* (pp. 10-14).
- Snapir, Y. M., Vaisbein, E., & Nassar, F.** (2006). Low virulence but potentially fatal outcome—*Listeria ivanovii*. *European Journal of Internal Medicine*, 17(4), 286-287.
- Sofos, J. N.** (2008). *Listeria monocytogenes*—enemy no. 1 for the ready-to-eat industry. In *National Provisioner (February)*, 2 p.
- Sofos, J. N., & Geornaras, I.** (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157: H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86(1), 2-14.
- Soultos, N., Koidis, P., & Madden, R. H.** (2003). Presence of *Listeria* and *Salmonella* spp. in retail chicken in Northern Ireland. *Letters in applied microbiology*, 37(5), 421-423.
- Southwick, F. S., & Purich, D. L.** (1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, 334(12), 770-776.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D.** (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6(3), 257-272.
- Swanson, G. R., Dudley, E. G., & Williamson, K. J.** (1980). The use of fish and shellfish wastes as fertilizers and feedstuffs. *Handbook of organic waste conversion, Michael WM Bewick (Ed.) Van Nostrand Reinhold Environmental Engineering Series. Van Nostrand Reinhold, New York*, 281-327.
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M.** (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical reviews*, 99(11), 3181-3198.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J.** (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 584-640.
- Vitas, A. I.** (2004). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 349-356.
- Wang, G. H.** (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection®*, 55(11), 916-919.

**Weiner, M. L.** (1992). An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. *Advances in chitin and chitosan*, 663-670.

**Welshimer, H. J.** (1963). Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. *Journal of bacteriology*, 85(5), 1156-1159.

**Wing, E. J., & Gregory, S. H.** (2002). *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *Journal of Infectious Diseases*, 185(Supplement 1), S18-S24.

**Xia, X. F., & Kong, B. H.** (2008). Extending shelf life of chilled pork by combination of chitosan coating with spice extracts. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 15(4), 33-37.

**Yalpani, M., Johnson, F., & Robinson, L. E.** (1992). Antimicrobial activity of some chitosan derivatives. *Advances in chitin and chitosan*, 543-548.

**Yangıar, F.** (2015). Chitosan/whey Protein (CWP) Edible Films Efficiency for Controlling Mould Growth and on Microbiological, Chemical and Sensory Properties During Storage of Göbek Kashar Cheese. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(2), 216.

**Young, D. H., & Kauss, H.** (1983). Release of calcium from suspension-cultured Glycine max cells by chitosan, other polycations, and polyamines in relation to effects on membrane permeability. *Plant Physiology*, 73(3), 698-702.

**Young, D. H., Köhle, H., & Kauss, H.** (1982). Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris cells. *Plant Physiology*, 70(5), 1449-1454.

**Yousef, A. E.** (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. *Listeria: Listeriosis, and Food Safety*, 131.

**Yücel, N., Cıtaık, S., & Önder, M.** (2005). Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiology*, 22(2), 241-245.

**Zhou, G. H., Xu, X. L., & Liu, Y.** (2010). Preservation technologies for fresh meat—A review. *Meat science*, 86(1), 119-128.

**Zhu, M., Du, M., Cordray, J., & Ahn, D. U.** (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready- to- eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(2), 34-42.

EΛΛHNIKH

**Ανδρίτσος, Ν. Δ.** (2013). Βιοποικιλότητα και ποσοτική εκτίμηση του πληθυσμού του *Listeria monocytogenes* σε νωπό κρέας και προϊόντα του.

**Γεωργάκης, Σ. Α., Βαρελτζής, Σ. Α., Αμβροσιάδης, Ι.Α.** Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης. Β' έκδοση, Σύγχρονη Παιδεία, 2002.

**Δημητρακόπουλος, Χ. Β.** (2016). Μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στον έλεγχο της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* κατά την ωρίμανση παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Τμήμα Ιατρικής.

**Ιωσηφίδου, Ε.** (2011). Διδακτικές σημειώσεις μαθήματος «Σιτιογενείς διαταραχές της υγείας του ανθρώπου», Κτηνιατρική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

**ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 852/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ** της 29<sup>ης</sup> Απριλίου 2004 για την υγιεινή των τροφίμων.

**ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ** της 15<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.

**ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1441/2007 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ** της 5<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2007 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα.

**Καραϊωάννογλου, Π.** (2004). Κεφάλαιο II – Γενικώς για τη θρεπτική αξία και την υγιεινή του κρέατος. In Π. Καραϊωάννογλου, Υγιεινή του κρέατος – Επιθεώρηση των σφαγίων των θηλαστικών (pp. 53-59). Θεσσαλονίκη, Ελλάδα: Αφοι Κυριακίδη.

**Καραϊωάννογλου, Π.** Υγιεινή του κρέατος των θηλαστικών. Γ' έκδοση, ΑΦΟΙ Κυριακίδη Α.Ε., 2008.

**ΚΕΕΛΠΝΟ**, <http://www.keelpno.gr>, Ημερομηνία Ανάκτησης: 15/01/2017.

**Κομοδρόμος, Δ. Ι.** (2012). Συνδυαστική επίδραση των μεμβρανών ιόντων Ag<sup>+</sup>-Ζεολίθου και των εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης, στη μικροβιολογική και στην οργανοληπτική ποιότητα και στο χρόνο ζωής, του νωπού βόειου κρέατος, που συντηρείται στους 5 °C, αεροβίως. Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Χημείας.

**Κομοδρόμος, Δ., Σεργκελίδης, Δ., Κοντομηνάς, Μ., Αμβροσιάδης, Ι.** (2012). Παράταση του χρόνου συντήρησης του νωπού ορνίθιου κρέατος στους 5 °C αεροβίως, με τη χρήση εδώδιμων μεμβρανών χιτοζάνης. *Πανελλήνιο Συνέδριο Meat Days, 29-30 Σεπτεμβρίου & 1 Οκτωβρίου 2012*. Ελλάδα, Αθήνα.

**Οικονόμου, Ε., Χουλιάρη, Ε., Σταύρου, Δ., Κατσιαφλάκας, Δ., Θεοδορίδης, Α., Σούλτος, Ν.** (2017). Επίδραση συνδυασμού εδάδιμης μεμβράνης χιτοζάνης και αιθέριων ελαίων ρίγανης και θυμαριού στην ασφάλεια και συντήρηση του κρέατος βουβαλιού. *Πανελλήνιο Συνέδριο Το Κρέας και Τα Προϊόντα Του, 3-5 Φεβρουαρίου 2017*. Ελλάδα, Θεσσαλονίκη.