

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«Μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στον έλεγχο της
ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* κατά την ωρίμαση
παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας»

ΧΡΗΣΤΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΕΤΟΣ 2016

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΜΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ

«Μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στον έλεγχο της
ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* κατά την ωρίμαση
παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας»

ΧΡΗΣΤΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

ΑΠΟΦΟΙΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΤΟΥ
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΕΤΟΣ 2016

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Dr. Σεργκελίδης Δανιήλ, Επίκουρος Καθηγητής

Μέλη: Dr. Αμβροσιάδης Ιωάννης, Καθηγητής

Dr. Γκόβαρης Αλέξανδρος, Καθηγητής

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Αφιερωμένο στους γονείς μου

Μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στον έλεγχο της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* κατά την ωρίμαση παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας.

Σημαντικοί όροι: Ωρίμαση, *S. aureus*, χιτοζάνη, ζύμωση, σουτζούκι.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στην ανάπτυξη του *S. aureus* κατά την ωρίμαση του σουτζουκιού Καισαρείας, καθώς και στην ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας που συμβάλλει στη ωρίμαση, συντήρηση και ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αυτού του παραδοσιακού προϊόντος. Το παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας ανήκει στην κατηγορία των παραδοσιακών λουκάνικων και παρασκευάζεται ύστερα από την διαδικασία της φυσικής ωρίμασης. Η μεθοδολογία της έρευνας βασίστηκε στην προσθήκη χιτοζάνης (1% w/v) και στην επιμόλυνσή του σουτζουκιού με *S. aureus*, στην μάζα του και στην επιφάνειά του. Οι μικροβιολογικές εξετάσεις πραγματοποιούνταν κάθε 7 ημέρες σε διάστημα 21 ημερών και μετά το τέλος της ωρίμασης πραγματοποιήθηκαν οι οργανοληπτικές εξετάσεις. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων έδειξαν ότι η δράση της χιτοζάνης δεν εμπόδισε την ανάπτυξη του *S. aureus*, των λακτοβακίλλων, της OMX και των κολοβακτηριοειδών στην μάζα του σουτζουκιού, ενώ τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του σουτζουκιού δεν επηρεάστηκαν. Ο πληθυσμός των λακτοβάκιλλων δεν επηρεάστηκε από την χιτοζάνη και συνέβαλε στην σωστή ωρίμαση του σουτζουκιού. Όμως, φάνηκε η ανασταλτική της δράση στην ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου ως βιομεμβράνη μέχρι την 7^η ημέρα της ωρίμασης. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά δεν επηρεάστηκαν από την δράση της και ήταν σε ικανοποιητικό βαθμό αποδεκτά από τους δοκιμαστές.

Συνοψίζοντας, παρότι δεν έχει ολοκληρωθεί η αξιολόγηση της χιτοζάνης ως προς την τοξικότητά της από τον EFSA και τον FDA, η αντιμικροβιακή της δράση στην εξωτερική επιφάνεια του σουτζουκιού ως βιομεμβράνη κρίνεται σκόπιμη για περισσότερη έρευνα.

Study of the chitosan effect on the growth of *Staphylococcus aureus* during the ripening of traditional sucuk of Caesarea.

Key Words: Ripening, *S. aureus*, chitosan, fermentation, sucuk.

ABSTRACT

The aim of this research is to study the effects of chitosan on the growth of *S. aureus* during the ripening of traditional sucuk of Caesarea and the development of microbial flora contributing to maturation, maintenance and development of the organoleptic characteristics of this traditional product. The traditional sucuk of Caesarea is categorized with the traditional sausages and can be made following the natural ripening process. The research methodology was based on the use of chitosan (1% w/v) and the contamination of sucuk with *S. aureus* on its mass and its surface. Microbiological tests were carried out every seven days over a period of 21 days and after the end of the ripening was performed organoleptic tests. The results of the tests showed that the effect of chitosan did not prevent the development of *S. aureus*, lactobacilli, total mesophilic bacteria and coliforms in the mass of sucuk and also the organoleptic characteristics of sucuk were not affected. The population of lactobacilli was not affected also by the chitosan and contributed to the proper ripening of sucuk. On the other hand, we observed the inhibitory effect of chitosan on *S. aureus* as a biofilm until the 7th day of ripening. The organoleptic characteristics were not influenced by chitosan's action and they were satisfactorily accepted by the tasters.

In summary, despite the incomplete evaluation of chitosan on the toxicity from the EFSA and FDA, the antimicrobial action of chitosan on the surface of sucuk as a biofilm is appropriate for further investigation.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	i
1.Εισαγωγή	1
1.1. Γενικά.....	1
1.2. Χιτοζάνη.....	2
1.3. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης της χιτοζάνης	3
1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την δράση της Χιτοζάνης	4
1.5. Η Αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης	7
1.6. Η χρήση της χιτοζάνης στην βιομηχανική παραγωγή	8
1.7. Χρήση της χιτοζάνης και νομοθεσία	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	10
2.1. Σουτζούκι Καισαρείας	10
2.2. Ωρίμαση αλλαντικών αέρος-Διεργασίες.....	13
2.3. Μικροβιολογικές μεταβολές κατά την ωρίμαση.....	14
2.4. Φυσικοχημικές μεταβολές κατά την ωρίμαση.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	17
3.1. Μικροχλωρίδα του Σουτζουκιού και <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.1.1. Γενικά.....	17
3.1.2. Εντεροβακτηριοειδή.....	18
3.1.3. <i>Lactobacillus</i> spp.	18
3.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
1.Σκοπός και Πρωτοτυπία της Έρευνας	21
2.Υλικά και Μέθοδοι	21
2.1. Παρασκευή διαλύματος χιτοζάνης.....	21
2.2. Προετοιμασία δειγμάτων.....	22
2.2.1. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.2.2. Κατηγοριοποίηση και ωρίμαση των δειγμάτων	23

2.3. Μικροβιολογικές εξετάσεις.....	24
2.4. Φυσικοχημικές Εξετάσεις	25
2.4.1. Προσδιορισμός του συντελεστή ενεργότητας νερού (a_w) του σουτζουκιού..	26
2.4.2 Προσδιορισμός της ενεργού οξύτητας (pH).....	26
2.5. Οργανοληπτική αξιολόγηση	26
2.6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	26
3. Αποτελέσματα και Συζήτηση	28
3.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικών εξετάσεων	28
3.3 Μεταβολές της ενεργού οξύτητας (pH).....	34
4.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
Βιβλιογραφία	37
Ξένη Βιβλιογραφία	37
Ελληνική Βιβλιογραφία	46
Διαδικτυακή βιβλιογραφία.....	46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	47

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό, μου δίνεται η ευκαιρία να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής. Θεωρώ λοιπόν καθήκον μου, να ευχαριστήσω ειλικρινά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Επίκουρο Καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων, της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κ. Δανιήλ Σεργκελίδη, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του και δέχθηκε να αναλάβει την επίβλεψη της παρούσας εργασίας, δίνοντας μου την ευκαιρία και την χαρά της έρευνας μέσα από την εμπειρία του. Οι χρήσιμες συμβουλές του και η συνεχής καθοδήγηση, που μου παρείχε αφειδώς, από την επιλογή και τη διαμόρφωση του θέματος, μέχρι και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας υπήρξαν καθοριστικές για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, τον κ. Ιωάννη Αμβροσιάδη, Καθηγητή Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, της Κτηνιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, όχι μόνο γιατί διέθεσε με χαρά τις υποδομές των εργαστηρίων του Τομέα Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, αλλά επίσης γιατί υπήρξε πάντοτε διαθέσιμος και πρόθυμος να προσφέρει τις επιστημονικές γνώσεις του και την έμπειρη καθοδήγησή του, όποτε τη χρειάστηκα καθώς και την στήριξη του για να πραγματοποιήσω τις μεταπτυχιακές σπουδές μου. Στο τέλος, αλλά χωρίς να υπολείπεται η συμβολή του στην υλοποίηση της παρούσας εργασίας, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου απέναντι στον Καθηγητή του Τμήματος της Κτηνιατρικής Καρδίτσας

του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Γκόβαρη Αλέξανδρο, ο οποίος δέχτηκε να με βοηθήσει με την εμπειρία του και τις γνώσεις του στην παρούσα διπλωματική εργασία.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω και στα υπόλοιπα μέλη του επιστημονικού προσωπικού των εργαστηρίων της Υγιεινής και της Τεχνολογίας Τροφίμων Ζ.Π., τόσο για το χρόνο που μου διέθεσαν κάθε φορά που χρειάστηκα τη βοήθειά τους, όσο και για τη διαμόρφωση ενός γενικότερου κλίματος οικειότητας, που διευκόλυνε και έκανε ευχάριστη την εργασία μου στο εργαστήριο. Ιδιαίτερα δε την ΕΔΙΠ κ. Χουλιάρα Ειρήνη για την σημαντική βοήθεια που μου προσέφερε κατά την διάρκεια του πειραματισμού. Θα ήταν σοβαρή παράληψη να μην ευχαριστήσω τον φίλο μου και συνάδελφό μου Δημήτρη Κομοδρόμο, για τη βοήθεια που μου προσέφερε για την εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής εργασίας και ιδιαίτερα για την ηθική συμπαράστασή του. Τέλος, να ευχαριστήσω την αδελφή μου Φωτεινή που στάθηκε στο πλευρό μου και βοήθησε στην εκπόνηση της εργασίας μου.

Καβάλα, 2016

Δημητρακόπουλος Χρήστος

1.Εισαγωγή

1.1. Γενικά

Είναι αλήθεια ότι το κρέας και τα προϊόντα του είχαν πάντοτε πρωταγωνιστική θέση στη διατροφή του ανθρώπου, λόγω της διατροφικής τους αξίας. Έτσι, ο άνθρωπος οδηγήθηκε στην ανάγκη παραγωγής τροφίμων, που με την προσθήκη ουσιών θα τα καθιστούσε ασφαλέστερα και παράλληλα θα βελτιώναν την γεύση και το άρωμά του. Η χρήση πρόσθετων χημικών ουσιών τα τελευταία χρόνια για την βελτίωση των τροφίμων προσκρούει στην τάση του σύγχρονου καταναλωτικού κοινού να προτιμά τρόφιμα που περιέχουν βιολογικές ουσίες μη τοξικές. Μία από αυτές είναι η χιτοζάνη η οποία χρησιμοποιείται είτε στην μάζα του τροφίμου είτε ως μέρος της συσκευασίας του.

Οι αντιμικροβιακές συσκευασίες, όπως αυτές που έχουν ως βάση τους τη χιτοζάνη, έχουν καταστεί ιδιαίτερα ευεργετικές για την προστασία του τροφίμου λόγω της αντιμικροβιακής τους δράσης. Μεταξύ των πλέον συνηθισμένων παθογόνων μικροοργανισμών που εντοπίζονται στα τρόφιμα είναι η *Salmonella enterica serovar Enteritidis* και ο *Staphylococcus aureus* (Rodríguez et al., 2012). Τέτοιες συσκευασίες που μπορούν να έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες αλλά και να κρατήσουν το τρόφιμο σε υψηλή ασφάλεια είναι αυτές που βασίζονται σε βιομεμβράνες. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι βιομεμβράνες χιτοζάνης έχουν ασκήσει επιτυχώς αντιμικροβιακή δράση σε εργαστηριακό επίπεδο σε τρόφιμα όπως αυγά, κρέας, γαλακτοκομικά προϊόντα, σαλάτες (Ubonrat Siripatrawan & Suparat Noipha, 2012).

Η χιτοζάνη είναι ένα πολυκατιονικό πολυμερές το οποίο αποτελείται από 5000 και άνω γλυκοζαμίνες. Απομονώνεται από την χιτίνη με αλκαλική αποακετυλίωση και διαθέτει τις εξής ιδιότητες: είναι βρώσιμη, βιοαποικοδομήσιμη, βιοσυμβατή, μη τοξική, με αντιμικροβιακή δράση (Caner & Cansiz, 2007, Caner & Cansiz, 2008, Fernandez-Saiz et al., 2009).

Ο *S. aureus* κατατάσσεται μεταξύ των σημαντικότερων παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με τα τρόφιμα, λόγω της τοξικής δράσης των εντεροτοξινών τις οποίες παράγει, της διεισδυτικότητάς του και της αντοχής του στις αντιμικροβιακές ουσίες. Επίσης, αποτελεί έναν εκ των συνηθέστερων αιτιολογικών παραγόντων γαστρεντερίτιδας από έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, όπως ζυμούμενα κρεατοσκευάσματα, έτοιμες σαλάτες και γαλακτοκομικά προϊόντα (Lior et al., 2003).

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η επίδραση της χιτοζάνης και η αντιμικροβιακή της δράση εξαρτάται από το είδος του τροφίμου, το pH του, την συγκέντρωση με την οποία χρησιμοποιείται η χιτοζάνη, τη θερμοκρασία συντήρησης του τροφίμου και την παρουσία άλλων συστατικών σε αυτό. Η αντιμικροβιακή της δράση βασίζεται στην αλλαγή της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού, στην αναστολή

σύνθεσης του mRNA του και τέλος στη δέσμευση ιχνοστοιχείων και θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την ζωή του μικροοργανισμού (Orgaz et.al, 2011).

Αντικείμενο της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στην ανάπτυξη του *S. aureus* κατά την ωρίμαση του σουτζουκιού Καισαρείας και κατά πόσο αυτή η ουσία μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο συστατικό, χωρίς να έχει αρνητική οργανοληπτική επίδραση στον προϊόν και ταυτόχρονα να εμποδίζει την ανάπτυξη του σταφυλόκοκκου σε αυτό.

Στην παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη υψηλού μοριακού βάρους τόσο επιφανειακά για το σχηματισμό βιομεμβράνης όσο και με ενσωμάτωση της υπό μορφή διαλύματος στην κρεατόμαζα του σουτζουκιού. Παράλληλα με τη διερεύνηση της επίδρασής της επί του σταφυλόκοκκου, διερευνήθηκε και η επίδρασή της στην ανάπτυξη διαφόρων ειδών μικροοργανισμών οι οποίοι επηρεάζουν την διαδικασία της ζύμωσης (π.χ. λακτοβάκιλλοι), την υγιεινή του προϊόντος (π.χ. κολοβακτηριοειδή) και το χρόνο ζωής τους (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα).

1.2. Χιτοζάνη

Η χιτοζάνη είναι ένα βιοπολυμερές αποτελούμενο από πολυσακχαρίτες και χάρις στις φυσικοχημικές και βιολογικές του ιδιότητες λειτουργεί ως συντηρητικό τροφίμων με αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές ιδιότητες (Mohamed & Rabea, 2011).

Το όνομα χιτίνη προέρχεται από την αρχαιοελληνική λέξη «χιτών» που ήταν το γνωστό εξωτερικό αρχαίο ελληνικό ένδυμα. Έτσι, η ουσία πήρε την ονομασία της λόγω της παρουσίας της στην εξωτερική ή κελυφική επιφάνεια των οστρακοειδών και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Bradconnot το 1811 (Shahidi et al, 1999). Επίσης η χιτίνη είναι ένα φυσικό πολυμερές που βρίσκεται στο εξωτερικό μέρος (κέλυφος) του σώματος των καρκινοειδών και εντόμων καθώς και στο κυτταρικό τοίχωμα κάποιων μυκήτων. Για την παραγωγή της χιτοζάνης, χρειάζεται η πλήρης ή η μερική αποακετυλίωση της χιτίνης (Eaton et al, 2008). Λόγω των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών της και κυρίως της μη τοξικότητάς της και της ιδιότητάς της να βιοδιασπάται, έχει βρει πολλές εφαρμογές σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας όπως στην κλωστοϋφαντουργία, τη φαρμακοβιομηχανία, τη γεωργία, την επεξεργασία νερού, καλλυντικών αλλά και στον τομέα των τροφίμων, μόνη της ή αναμειγμένη με άλλα φυσικά πολυμερή (άμυλο, ζελατίνη, αλγινικά) (Arvanitoyannis et.al, 1998).

1.3. Μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης της χιτοζάνης

Τα τελευταία χρόνια η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης έχει απασχολήσει έντονα την επιστημονική κοινότητα σε ό,τι αφορά την παραγωγή ασφαλών τροφίμων. Η χρήση της σε υγρή μορφή στα τρόφιμα είτε ως ενεργή συσκευασία είναι πολλά υποσχόμενη στην αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών που μπορούν να μολύνουν τα τρόφιμα (Muhamad & Khairuddin, 2007).

Η πιο πιθανή εξήγηση και κοινώς αποδεκτή άποψη για τον μηχανισμό με τον οποίο δρα η χιτοζάνη σχετίζεται με τον πολυκατιονικό χαρακτήρα της που οδηγεί σε αλληλεπίδραση μεταξύ των θετικά φορτισμένων μορίων της χιτοζάνης και των αρνητικά φορτισμένων μορίων της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων με αποτέλεσμα την διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης. Ειδικότερα, σε τιμές pH χαμηλότερες του 6,3 αναπτύσσεται αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων $-NH_3^+$ της χιτοζάνης με τα φορτισμένα ιόντα Ca^{2+} της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του μικροοργανισμού (Goy, 2009, Young & Kaus, 1983).

Η ηλεκτροστατική επίδραση που αναπτύσσεται μεταξύ των μορίων προκαλεί:

1. Μη αναστρέψιμες μεταβολές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και την παρεμπόδιση ανταλλαγής ουσιών
2. Διαταραχή της οσμωτικής πίεσης του βακτηρίου με αποτέλεσμα την καταστροφή των οργανιδίων του με εκροή τους στον εξωκυττάριο χώρο και με επακόλουθο τον θάνατό του.
3. Την υδρόλυση της πεπτιδογλυκάνης του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου, οδηγώντας στην τελική έκχυση ενδοκυττάρων ουσιών όπως πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, γλυκόζης, ιόντων καλίου κ.ά (Devlieghere et.al, 2004).

Ένας ακόμη μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην δέσμευση του DNA του κυττάρου. Η εισχώρηση της χιτοζάνης στον πυρήνα του κυττάρου προκαλεί την αναστολή της λειτουργίας του mRNA και της σύνθεσης των πρωτεϊνών. (Hadwiger et.al, 1981). Η διαδικασία αυτή επιβεβαιώθηκε με την χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου χάρις στην ανεύρεση ολιγομερών μορίων χιτοζάνης μέσα στο κυτταρόπλασμα του μικροοργανισμού της *E. coli* (Liu et.al 2001). Σύμφωνα όμως με τον Raafat και τους συνεργάτες του (2008) παρόλο που αυτός ο μηχανισμός είναι κοινά αποδεκτός, η πιθανότητα να λειτουργεί η χιτοζάνη ως παράγοντας εισχώρησης στο κυτταρόπλασμα του μικροοργανισμού είναι αρκετά μικρή, ενώ φαίνεται πιθανότερο η χιτοζάνη να δρα ως παράγοντας διαταραχής της λειτουργικότητας της κυτταρικής μεμβράνης.

Ένας τρίτος μηχανισμός δράσης οφείλεται στην ένωση της χιτοζάνης με μέταλλα και άλλα απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (Roller & Covill, 1999). Είναι γνωστό ότι η χιτοζάνη έχει εξαιρετικές ικανότητες δέσμευσης μετάλλων χάρις στις ομάδες αμίνης που βρίσκονται στα μόριά της και οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόσληψη μεταλλικών κατιόντων με την διαδικασία της χηλίωσης (Helander et.al 2001, Wang et.al 2005).

Η χιτοζάνη εκτός από αντιμικροβιακή δράση παρουσιάζει και αντιμυκητιακή δράση. Ο μηχανισμός δράσης της έναντι των μυκήτων είναι παρόμοιος με αυτόν εναντίον των βακτηριακών κυττάρων και οφείλεται στην αλλαγή του τοίχους προστασίας του μικροοργανισμού από τα μόρια της χιτοζάνης (El-Gaouth et.al 1992). Η ένταση της δράσης της χιτοζάνης έναντι των μυκήτων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή της, το pH του εξωκυττάρου χώρου και το βαθμό αποακετυλίωσής της. Ακόμη, φαίνεται ότι σε τιμές αλκαλικού pH η δράση της χιτοζάνης μειώνεται (Stössel & Leuba, 1984). Επίσης, η ικανότητά της να δεσμεύει μόρια νερού από το υπόστρωμα, προτείνεται ως ένας ακόμη μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης, που δρα δεσμεύοντας μόρια νερού από τους μικροοργανισμούς, παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία των ενζυμικών τους συστημάτων (Young et al., 1982). Εκτός από την άμεση αντιμικροβιακή δράση της, επάγει μία σειρά αντιδράσεων άμυνας που σχετίζονται με ενζυμικές δραστηριότητες. Η χιτοζάνη αυξάνει την παραγωγή γλυκονοϋδρολασών, φαινολικών ενώσεων καθώς και τη σύνθεση ειδικών φυτοαλεξινών με αντιμυκητιακή δράση και προκαλεί την μείωση συγκεκριμένων ένζυμων όπως πολυγαλακτουρονάσες, πηκτάσες και μεθυλική-εστεράση. Λόγω της ικανότητάς της να σχηματίζει μία ημιπερατή επικάλυψη, η χιτοζάνη επεκτείνει τη διάρκεια ζωής των τροφίμων και μειώνει την απώλεια νερού (Muzzarelli & Muzzarelli, 2006).

1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την δράση της Χιτοζάνης

Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει πάνω στους παθογόνους μικροοργανισμούς *S. aureus* και *E. Coli*, ένας από τους παράγοντες που συνδέεται άμεσα με την δράση της χιτοζάνης είναι το μοριακό της βάρος (MW). Συγκεκριμένα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της έρευνας των Zheng και Zhu (2003) ως προς την επίδραση της χιτοζάνης με μοριακό βάρος κάτω από 305 (kDa) έναντι της *E. coli* και τον *S. aureus* (Πίνακας 1 & Πίνακας 2 του Παραρτήματος). Σύμφωνα με αυτά, δείγματα με συγκέντρωση χιτοζάνης 0,25% και μοριακό βάρος τιμών κάτω από 5 kDa εμφάνισαν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση έναντι της *E. coli* σε σχέση με άλλα, όπου η χιτοζάνη είχε μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Αυτή η δράση έναντι της *E. Coli*, η οποία ανήκει στα Gram-αρνητικά βακτήρια, μπορεί να οφείλεται στο ότι η χιτοζάνη μικρότερου μοριακού βάρους διεισδύει ευκολότερα στο βακτηριακό κύτταρο προκαλώντας σημαντικές διαταραχές στην λειτουργία του μικροοργανισμού, με αποτέλεσμα τον θάνατό του. Αντίθετα, σε ότι αφορά την δράση έναντι του *S. aureus*, που είναι ένα βακτήριο Gram-θετικό, η ίδια έρευνα έδειξε ότι όσο αυξάνουμε το μοριακό βάρος της χιτοζάνης τόσο μεγαλύτερη είναι η δράση την οποία ασκεί εναντίον του. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι η χιτοζάνη σε μικροβιακό επίπεδο σχηματίζει φιλμ γύρω από τα βακτηριακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να αποτρέπει την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών του βακτηρίου με τον εξωκυττάρου χώρο. Παράλληλα, διαπιστώνεται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της χιτοζάνης τόσο αυξάνεται η ανασταλτική της δράση. Μάλιστα, σε συγκέντρωση 1% φτάνει στο μέγιστό της και για τους δύο μικροοργανισμούς (Zheng & Zhu 2003).

Σε αυτό το σημείο, αξίζει να σημειωθεί ότι η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης με διαφορετικά μοριακά βάρη και σε ένα ευρύ πλήθος μικροοργανισμών (*B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica*, *L. monocytogenes*, *P. Aeruginosa*) έχει αποτελέσει

αντικείμενο αρκετών ερευνών, οι οποίες επιβεβαιώνουν την ισχυρότερη δράση της μικρομοριακής χιτοζάνης (Tsai et al., 2004, Jing et al., 2007). Υπάρχουν όμως και μελέτες οι οποίες εκφράζουν αντίθετες απόψεις, όπως η εργασία του Tikhonov (2006) στην οποία δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στην αντιμικροβιακή δράση της μικρομοριακής και μεγαλομοριακής χιτοζάνης ενάντια στην *E. coli* και στον *B. subtilis*. Τέλος, άλλες έρευνες (Fernandez et al, 2009) δείχνουν ότι η χιτοζάνη δρα ως αντιμικροβιακή ουσία σε μοριακά βάρη μεγαλύτερα των 628 kDa.

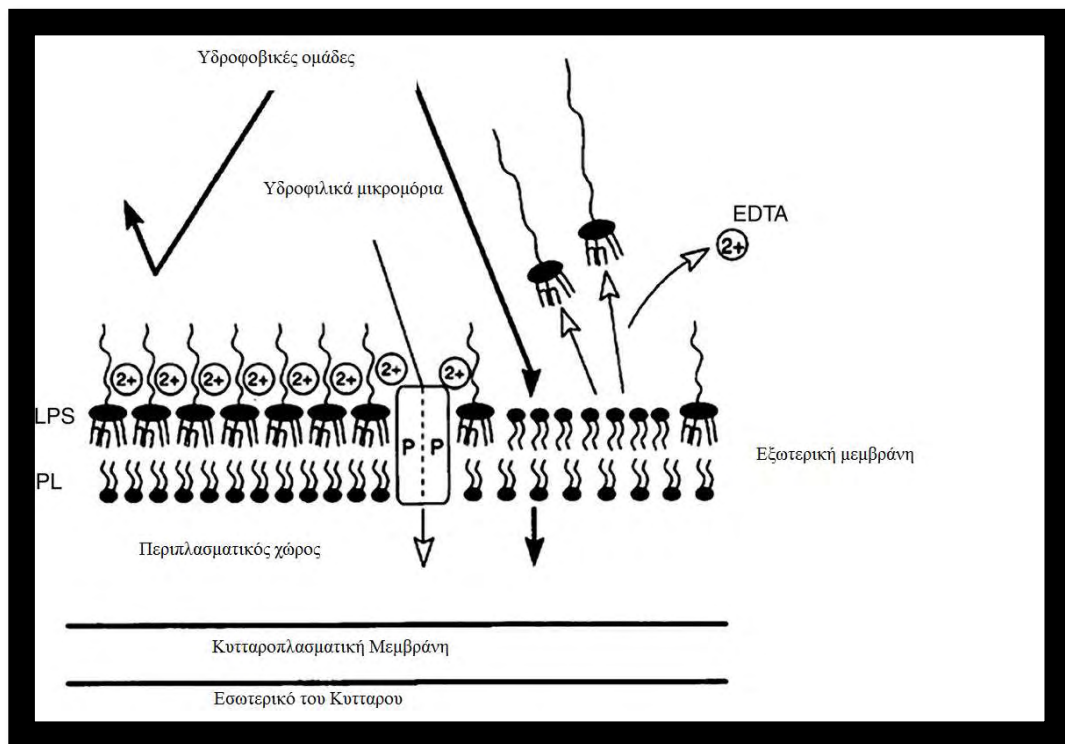
Ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης και έχει αναφερθεί σε πολλές έρευνες είναι ο βαθμός αποακετυλίωσής της. Μικροσφαιρίδια χιτοζάνης με υψηλό βαθμό αποακετυλίωσης (97,5%) έχουν υψηλότερη θετική πυκνότητα φορτίου και έτσι μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από μικροσφαιρίδια χιτοζάνης μέτριου βαθμού αποακετυλίωσης (83,7 %) έναντι του *S. aureus* (Kong et.al, 2008b). Αυτό το αποτέλεσμα, επιβεβαιώνει και μια άλλη έρευνα από τον Takahashia (2008). Αυτή έδειξε ότι αυξάνοντας τον βαθμό αποακετυλίωσης με μεγαλύτερη θετική πυκνότητα φορτίου ασκείται ιδιαίτερη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη του *S. aureus* (Takahashia, et.al 2008, Kong, et.al, 2010). Η υδροφιλικότητα και η υδροφοβικότητα είναι ακόμη δυο παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την δράση της χιτοζάνης. Τα υδρόφιλα χαρακτηριστικά της χιτοζάνης μπορούν να καθορίσουν την διαλυτότητά της στο νερό με τέτοιο τρόπο ώστε χαμηλής διαλυτότητας χιτοζάνη στο νερό να σημαίνει και μικρή αντιμικροβιακή δράση (Dutta, et al., 2004). Ωστόσο, με την χρήση χημικών τροποποιήσεων μπορούμε να βελτιώσουμε την διαλυτότητά της και των παραγώγων της (Xie et al., 2007). Η διαλυτότητά της μπορεί να αυξηθεί με σακχαροποίηση, ακυλίωση, αλκυλίωση, επιμερισμό και με μεταλλοποίησή της. Ιδιαίτερα στον επιμερισμό της, η χιτοζάνη εμφάνισε μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση (Kong et.al, 2010).

Έχει αναφερθεί επίσης, ότι η χιτοζάνη εμφανίζει αντιβακτηριδιακή δράση μόνο σε όξινο περιβάλλον (Helander et al., 2001), όμως και αυτή η υπόθεση δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι απολύτως σωστή. Η χιτοζάνη παρουσιάζει ισχυρότερη ανασταλτική δράση σε χαμηλότερες τιμές pH, αλλά και χαμηλότερη δράση καθώς αυξάνουμε το pH (Kong et al., 2008b). Η αποτυχία της χιτοζάνης να δράσει ως βακτηριοκτόνος ουσία σε pH ουδέτερο μπορεί να οφείλεται στην παρουσία μιας μεγάλης πλειοψηφίας θετικών αφόρτιστων αμινοομάδων καθώς και κακής διαλυτότητάς της (Aiedehand, 2001, Papineau et al, 1991, Sudarshan et al, 1992). Ωστόσο, το θετικό φορτίο των αμινοομάδων της χιτοζάνης δεν αποτελεί τον μοναδικό παράγοντα για την αποτελεσματικότητα της αντιμικροβιακής της δράσης (Kong et.al, 2010).

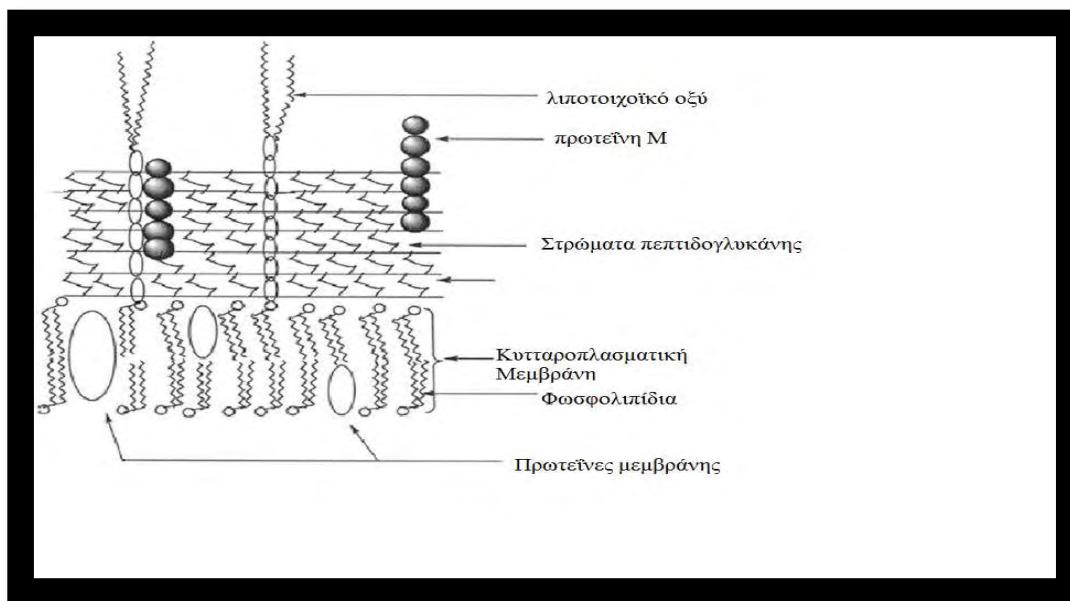
Εκτός από τους προηγούμενους παράγοντες, η δράση της χιτοζάνης εξαρτάται και από τη δομή των μικροοργανισμών. Κάθε βακτήριο έχει τις ιδιαιτερότητές του όσον αφορά την δομή της επιφάνειάς του, δηλαδή κάποια από αυτά διαθέτουν κροσσούς, μαστίγια, τριχίδια, αλλά και διαφορετική δομή κυτταρικής μεμβράνης με διαφορετικό λιποπρωτεϊνικό στρώμα πολυσακχαριτών (LPS), μυκολικά οξέα, λιποτειχοϊκό οξύ (LTA), πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες (Hancock, 1991). Τα πολυανιόντα τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων συμμετέχουν επίσης σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τη χιτοζάνη. Σε δοκιμές που έγιναν, τα αρνητικά φορτία στην κυτταρική επιφάνεια των Gram-αρνητικών βακτηρίων (Εικόνα 1) βρέθηκαν σε μεγαλύτερο αριθμό σε σχέση με αυτά των θετικών κατά Gram βακτηρίων (Εικόνα 2), οδηγώντας έτσι, στην υψηλότερη απορρόφηση τους από την χιτοζάνη και έως εκ τούτου στην υψηλότερη ανασταλτική

δράση για τα Gram-αρνητικά βακτήρια (Chung et.al.,2004). Μελέτη που έγινε με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (AFM, Atomic Force Microscope) έδειξε ότι υπήρξε συμπίεση και αλλοίωση κλίσης της επιφάνειας των κυττάρων της *E. coli* και του *S. aureus* μετά από χρήση της χιτοζάνης. Επιπλέον διαπιστώθηκε, αδυναμία στην συνεκτικότητα της κυτταρικής μεμβράνης ή και λύση του κυτταρικού τοιχώματος (Eaton et al., 2008, Kong et.al, 2010).

Τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι περισσότερο ευαίσθητα στη δράση της χιτοζάνης, όπως προαναφέρθηκε, χωρίς ωστόσο τα βιβλιογραφικά δεδομένα να συμφωνούν, αφού υπάρχουν έρευνες οι οποίες είναι υπέρ της μεγαλύτερης ευαισθησίας των Gram-θετικών βακτηρίων (Goy et al., 2009). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι συγκέντρωση χιτοζάνης 1%, σε υπόστρωμα με pH 5,5, ήταν αρκετή για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης τόσο του *S. aureus* όσο και της *E. coli* (Wang, 1992). Οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις της χιτοζάνης έναντι των διαφόρων μικροοργανισμών αναφέρονται στον Πίνακα 3 του Παραρτήματος.



[Εικόνα 1](#). Δομή κυτταρικού τοιχώματος Gram⁻ βακτηρίου (Helander et al., 1997)



[Εικόνα 2.](#) Δομή κυτταρικού τοιχώματος Gram+ βακτηρίου (Kong et.al, 2010).

1.5. Η Αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης

Η λιπιδική οξείδωση αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την ποιότητα του κρέατος και των προϊόντων του, αφού προκαλεί ανεπιθύμητες αλλοιώσεις στο χρώμα, την οσμή και την διατροφική αξία του τροφίμου και παράλληλα δημιουργεί επικίνδυνες τοξικές ενώσεις (Love & Pearson, 1971). Για την αντιμετώπιση της λιπιδικής οξείδωσης γίνεται χρήση αντιοξειδωτικών ουσιών και χηλικών παραγόντων συνήθως χημικής φύσεως. Αύτη όμως η αντιμετώπιση μπορεί να αντικατασταθεί από την φυσικής προέλευσης χιτοζάνη λόγω της αντιοξειδωτικής της δράσης (Park et al, 2011).

Έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί για την αντιοξειδωτική δράση της χιτοζάνης, όταν αυτή αλληλοεπιδρά με τις ελεύθερες ρίζες ή τα χηλικά ιόντα μετάλλων από τη δωρεά ενός υδρογόνου ή με τα μονήρη ζεύγη ηλεκτρονίων. Η αλληλεπίδραση της χιτοζάνης με ιόντα μετάλλων θα μπορούσε να συμπεριλάβει πολλές σύνθετες ενέργειες, όπως αυτή της προσρόφησης, ανταλλαγής ιόντων και αποσιδήρωσης. Οι ομάδες υδροξυλίου (OH^-) και οι αμινοομάδες (NH_2) της χιτοζάνης είναι οι βασικές λειτουργικές ομάδες, στις οποίες οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση της. Ωστόσο, η ημι-κρυσταλλική δομή της διερευνώμενης ουσίας εμποδίζει τον διαχωρισμό της με ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου (Rajalakshmi et al, 2013). Ακόμη, ένας μηχανισμός με τον οποίο δρα αντιοξειδωτικά η χιτοζάνη είναι η δέσμευση των ελεύθερων υπεροξειδικών ομάδων, εξαιτίας της δράσης του αζώτου στη θέση C-2 του μορίου της, αποτρέποντας την περαιτέρω συμμετοχή τους στη συνέχιση των οξειδωτικών φαινομένων (Park et.al 2004).

1.6. Η χρήση της χιτοζάνης στην βιομηχανική παραγωγή

Οι βιομηχανίες τροφίμων τα τελευταία χρόνια προσπαθούν να εκμεταλλευτούν στην παραγωγή τροφίμων την αντιμικροβιακή δράση και τη μη τοξικότητα της χιτοζάνης όταν αυτή καταναλώνεται από τους ανθρώπινους και ζωϊκούς οργανισμούς.

Ιδιαίτερο βιομηχανικό ενδιαφέρον έχει αποσπάσει η μικροκρυσταλλική χιτοζάνη η οποία (Microcrystalline Chitosan, MCC) η οποία διαθέτει γαλακτοματοποιητικές ιδιότητες, υψηλή πάχυνση και χρησιμοποιείται ως φυτική ίνα σε ψημένα τρόφιμα συμβάλλοντας σημαντικά στην σταθεροποίηση του τροφίμου. Η MCC μπορεί επίσης να λύσει κάποια προβλήματα στη γεύση των τροφίμων, στη διάρκεια ζωής και στο χρώμα, ιδιαίτερα αυτών με φυτικές ίνες. Η χρήση της χιτοζάνης στην Ινδία σε επίπεδα εκτροφής πουλερικών μείωσε την κατανάλωση τροφής από τα πουλερικά και αύξησε το βάρος τους κατά 12% σε σχέση με το συνηθισμένο σιτηρέσιο. Οι έρευνες αυτές έδειξαν αύξηση κάποιων ενδογαστρικών ευεργετικών βακτηρίων από την χρήση της χιτοζάνης και την αύξηση ενζύμων για την διάσπαση της λακτόζης στους ζωϊκούς οργανισμούς (Dutta et.al, 2004).

Η χιτοζάνη επίσης λόγω του πολυκατιονικού της χαρακτήρα μπορεί να δράσει ως κροκιδωτικό μέσο, χηλικός παράγοντας και ως παγίδα συγκράτησης βαρέων μετάλλων. Με αυτό τον τρόπο βρίσκει εφαρμογή στον κλάδο της ανακύκλωσης των αποβλήτων επεξεργασίας τροφίμων. Η χιτοζάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί με συνθετικές ρητίνες για την εξυγίανση του νερού από βαρέα μέταλλα (Sridhari & Dutta, 2000). Επίσης, αποδείχτηκε αποτελεσματική στην απομάκρυνση πετρελαίου και προϊόντων του από λύματα. Εκτός από τα παραπάνω, έχει αναφερθεί και η ικανότητα της χιτοζάνης στην απομάκρυνση των οξέων και την χρησιμοποίησή της στην βιομηχανία παραγωγής του καφέ, στην παραγωγική διαδικασία ποτών, όπως το κρασί, η μύρα και οι χυμοί φρούτων (Dutta et.al, 2004). Η ευρεία βιομηχανική χρήση της χιτοζάνης λόγω των ιδιοτήτων της αποτυπώνεται στα παραδείγματα του Πίνακα 4 του Παραρτήματος.

1.7. Χρήση της χιτοζάνης και νομοθεσία

Η χρήση της χιτοζάνης ως πρόσθετου τροφίμων, εγκρίθηκε για πρώτη φορά το 1983, στην Ιαπωνία (Weiner, 1992) και σταδιακά άρχισε να εμφανίζεται και στις λίστες άλλων χωρών, όπως η Κορέα, η Ιταλία και η Φινλανδία (KFDA, 1995, Illum, 1998). Το 1983 επίσης, αναγνωρίστηκε ως GRAS ουσία (Generally Regarded As Safe) από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), για τη χρήση της ως πρόσθετο στη διατροφή των ζώων και την επέκτασή της στις ζωοτροφές. Η Αμερικανική Αρχή Προστασίας του Περιβάλλοντος (USEPA), ενέκρινε το 1986, τη χρήση της χιτοζάνης σε εφαρμογές για εξυγίανση του νερού ώστε να καταστεί πόσιμο (Knoor, 1986), ενώ μετά από χρόνια το Υπουργείο Υγείας της Ιαπωνίας επέτρεψε την χιτίνη, τη χιτοζάνη και τα παράγωγά τους, ως λειτουργικά συστατικά των τροφίμων (Shahidi & Abuzaytoun, 2005). Το 2005 για πρώτη φορά υποβλήθηκε στον FDA μελέτη και αίτημα για να χαρακτηριστεί

GRAS κάποιος τύπος χιτοζάνης που προερχόταν από γαρίδες, έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο τροφίμων ζωικής προέλευσης (No, et al., 2007). Η απάντηση του FDA, σύμφωνα με την υπ' αριθ. GRN 0001 - 70 αναφορά, υπήρξε αρνητική (US FDA/CFSAN, 2006). Το 2009 όμως ένα άλλο προϊόν χιτοζάνης με την εμπορική ονομασία ChitoClear κατάφερε να χαρακτηριστεί GRAS, ως προς τη χρήση του στη βιομηχανία τροφίμων (Baldrick, 2010), με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ελπίδα για χρησιμοποίησή της στο μέλλον. Παρ' όλα αυτά, τόσο η χιτοζάνη, όσο και η χιτίνη δεν ανήκουν ακόμα στα πρόσθετα των τροφίμων, ούτε έχει εγκριθεί η χρήση τους στην βιομηχανία τροφίμων από την ΕΕ, εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν ακόμη ενδείξεις για τις μακροχρόνιες τοξικολογικές επιδράσεις τους (Efsa Europe 426e).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. Σουτζούκι Καισαρείας

Το σουτζούκι Καισαρείας ανήκει στην κατηγορία των παραδοσιακών λουκάνικων που προέρχονται από την Τουρκία και τη Μέση Ανατολή, και είναι γνωστό στην ευρύτερη περιοχή της βαλκανικής χερσονήσου και της Ευρώπης. Σύμφωνα με την τουρκική γλώσσα η ονομασία "σουτζούκι" περιγράφει τη γέμιση των εντέρων του προβάτου με κιμά αναμεμιγμένο με μπαχαρικά (Hüdayi & Özkal, 2010). Ανήκει στην κατηγορία των αλλαντικών αέρος που παράγονται από κρέας βοοειδούς, έχει έντονη ιδιάζουσα γεύση και ιδιαίτερα καυτερή. Το μήκος του σουτζουκιού μπορεί να φτάσει τα 24 cm ενώ η διάμετρος του τα 7 cm και το βάρος του μπορεί να κυμανθεί μεταξύ 200-400 γραμμαρίων (miran.gr 25/5/2016). Τα σουτζούκια κατατάσσονται στην κατηγορία των λεπτοτεμαχισμένων αλλαντικών αέρος. Τα συστατικά (Πίνακας 5 του Παραρτήματος) από τα οποία αποτελείται το σουτζούκι είναι βοδινό κρέας λιποπεριεκτικότητας 12% από ελιά ή σπάλα, βοδινό λίπος σκληρό, αλάτι, ζάχαρη, σκόρδο, μπαχάρι, κόκκινο πιπέρι γλυκό, πιπέρι μαύρο, κανέλα, γαρύφαλλο.

Η διαδικασία παρασκευής του ακολουθεί τα παρακάτω βήματα:

1^η Ημέρα

- Τεμαχισμός του κρέατος σε κιμαδομηχανή με δίσκο διαμέτρου τρυπών 5 mm.
- Ανάμιξη όλων των υλικών εκτός από το λίπος και παραμονή στο ψυγείο για 24 ώρες.

2^η Ημέρα

- Τεμαχισμός παγωμένου λίπους στο κούτερ σε μέγεθος σπυριού.
- Ανάμιξη με το κρέας και τα υπόλοιπα συστατικά.
- Γέμισμα σε εδώδιμες θήκες (έντερα) διαμέτρου 28-30 mm.
- Παραμονή σουτζουκιών για δύο μέρες σε θάλαμο θερμοκρασίας 12-14 °C και υγρασίας <80%.
- Τοποθέτηση σουτζουκιών σε θάλαμο θερμοκρασίας 22 °C και ωρίμαση για ακόμη 5 ημέρες.

Για την σωστή παραγωγή του σουτζουκιού είναι σημαντική επίσης και η προετοιμασία των πρώτων υλών που θα χρησιμοποιηθούν και κυρίως του άπαχου κρέατος και του λίπους. Όσον αφορά το λίπος, αυτό θα πρέπει να έχει θερμοκρασία γύρω στους -15°C ώστε να τεμαχιστεί σωστά και να αποφευχθεί η ρευστοποίησή του, η δε θερμοκρασία του άπαχου κρέατος, θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ -1 °C και 3 °C ή να είναι

καταφυγμένο για λεπτοτεμαχισμό. Το παραδοσιακό σουτζούκι συνήθως ωριμάζει από τον Σεπτέμβριο μέχρι και τον Μάρτιο στην Τουρκία. Οι συνθήκες αυτές είναι αρκετά ιδανικές για την ωρίμασή του. Οι θερμοκρασίες που επικρατούν είναι μεταξύ 10-15 °C και η σχετική υγρασία (RH) κυμαίνεται μεταξύ 50-80%. Ο χρωματισμός του είναι μαύρος ενώ η υφή του μπορεί να είναι είτε μαλακή είτε πολύ σκληρή και η γεύση του ξεχωριστή (Hui & Özgül, 2012).

Βασική προϋπόθεση για την παραγωγή του παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας είναι η επιλογή και προετοιμασία των σωστών συστατικών και υλικών που θα χρησιμοποιηθούν. Το βόειο κρέας που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει χαμηλό μικροβιακό φορτίο και να μην είναι τύπου DFD (μαύρο-σκληρό-στεγνό) ή PSE (εξιδρωματική μυοπάθεια), γιατί στις περιπτώσεις αυτές θα παραχθεί προϊόν μη αποδεκτό από τον καταναλωτή (Hui & Özgül, 2012). Κρέας με υψηλό pH όπως είναι το DFD διαθέτει υψηλή ικανότητα συγκράτησης ύδατος με αποτέλεσμα την δημιουργία ευνοϊκού περιβάλλοντος για την ανάπτυξη μικροοργανισμών επηρεάζοντας αρνητικά την παραγωγή του σουτζουκιού και να οδηγήσει σε:

1. Δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για την ανάπτυξη παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών.
2. Μη αποδεκτό χρωματισμό του προϊόντος και κατ' επέκταση στην ποιοτική υποβάθμιση του.
3. Στην μη μετουσίωση των πρωτεϊνών της κρεατόπαστας και της σχηματοποίησής της (Γεωργάκης και συν., 2002).

Επίσης, κρέας με χαμηλό pH και χαμηλή ΙΣΥ (Ικανότητα Συγκράτησης Ύδατος) όπως είναι το PSE (Pale Soft Exudative), οδηγεί στην ταχύτερη απώλεια υγρασίας και αφυδάτωσης δημιουργώντας παράλληλα και πρόβλημα χρωματισμού του προϊόντος (μυογλοβίνη) υποβαθμίζοντάς το ποιοτικά και σε αυτήν την περίπτωση (Hui & Özgül, 2012). Η χρήση του άπαχου βόειου κρέατος ενδείκνυται να είναι από ενήλικα ζώα διότι είναι «στεγνό» σε αντίθεση με νεαρά ζώα που διαθέτουν κρέας με υψηλή ΙΣΥ και προτιμώνται για παραγωγή προϊόντων θερμικής επεξεργασίας (Γεωργάκης, και συν., 2002). Οι συνθήκες θερμοκρασίας συντήρησης του κρέατος θα πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλό επίπεδο και σε άριστες συνθήκες τιμών pH από 5,6-6,0. Οι τιμές του συντελεστή ενεργού νερού (a_w) είναι πολύ σημαντικές για την παραγωγή των προϊόντων αλλαντοποιίας και κατ' επέκταση του παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας και σε μεγάλο βαθμό κρίνουν και την επιτυχία της παραγωγής του. Ειδικότερα, τιμές a_w χαμηλότερες του 0,980 δημιουργούν δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, συνθήκη που επιτυγχάνεται με την μερική αφυδάτωση του κρέατος για 2 ημέρες (Γεωργάκης και συν., 2002).

Το παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας ως προϊόν ζύμωσης, υφίσταται βιολογικές και φυσικοχημικές μεταβολές που έχουν ως αποτέλεσμα:

1. Την πτώση του pH.
2. Την αναστολή της ανάπτυξης των αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών.
3. Την ανάπτυξη χαρακτηριστικού χρώματος.
4. Την μείωση του συντελεστή ενεργού νερού (a_w).
5. Την δημιουργία ελκυστικού αρώματος.
6. Απώλεια βάρους με την αποβολή νερού.

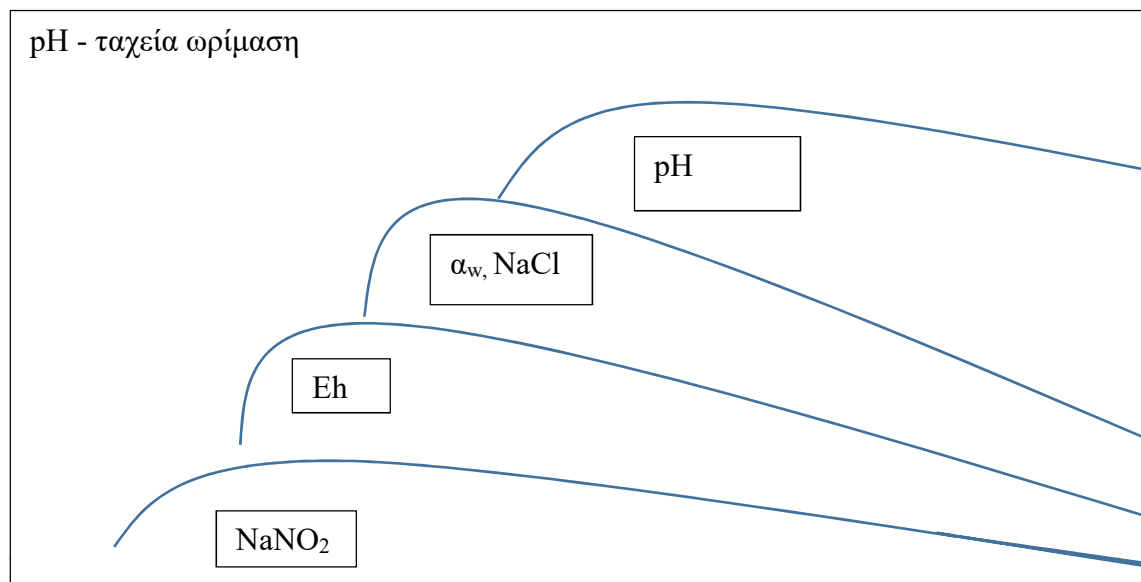
7. Την πήξη των πρωτεϊνών με στόχο την καλύτερη συνοχή της κρεατόπαστας και την καλύτερη προώθηση του ως προϊόν προς κατανάλωση.
8. Την αφυδάτωση της εξωτερικής επιφάνειας και την αύξηση της σκληρότητας του προϊόντος (Γεωργάκης, και συν., 2002).

2.2. Ωρίμαση αλλαντικών αέρος-Διεργασίες

Σημαντικό για την ωρίμαση των αλλαντικών αέρος είναι η εξασφάλιση σταθερών συνθήκων στο θάλαμο ωρίμασης, όπως η θερμοκρασία του, η υγρασία και η ταχύτητα κυκλοφορίας του αέρα. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζονται οι απαραίτητες συνθήκες για την ασφάλειά του, η ανάπτυξη των ιδανικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και η αύξηση του χρόνου συντήρησής του.

Οι παραπάνω παράμετροι και η προσθήκη αλάτος (NaCl), νιτρωδών αλάτων, σε συνδυασμό με τη χαμηλή τιμή του pH τροφίμου, του συντελεστή ενεργού νερού και δυναμικού οξειδοαναγωγής (Eh), δημιουργούν εμπόδια στην ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών (Εικόνα 3) (Leistner, 1996, Γεωργάκης και συν., 2002).

Τα πρώτα εμπόδια στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών είναι τα νιτρώδη άλατα τα οποία αναστέλλουν μικροοργανισμούς όπως *Salmonella* spp. και *Clostridium* spp. Ως δεύτερο εμπόδιο λειτουργεί το χλωριούχο νάτριο, το οποίο προκαλεί την δέσμευση του νερού μειώνοντας τον a_w . Το δυναμικό οξειδοαναγωγής αποτελεί το επόμενο εμπόδιο λόγω της ταχείας ανάπτυξης αερόβιων βακτηρίων και της κατανάλωσης του διαθέσιμου οξυγόνου, με αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής του και την αναστολή ανάπτυξης κυρίως ψευδομονάδων και εντεροβακτηρίων. Όμως στην περίπτωση της ταχείας ωρίμασης αλλαντικών διάρκειας 10 ημερών, η τιμή του pH και η ραγδαία πτώση του σε τιμές γύρω στο 5 διαδραματίζει τον καθοριστικότερο ρόλο σε σχέση με τα υπόλοιπα εμπόδια (Γεωργάκης, και συν., 2002). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά την τεχνολογία παραγωγής του παραδοσιακού σουτζουκιού, που ακολουθεί αυτόν τον τρόπο ωρίμασης, δεν πραγματοποιείται η χρήση νιτρωδών αλάτων.



Εικόνα 3. Θεωρία εμποδίων, παράγοντες που επηρεάζουν την υγιεινή αλλαντικών αέρος ταχείας ωρίμασης σύμφωνα με (Leistner, 1996, Γεωργάκης και συν., 2002).

2.3. Μικροβιολογικές μεταβολές κατά την ωρίμαση

Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που συμμετέχουν στην διαδικασία ωρίμασης των αλλαντικών αέρος είναι τα γένη *Lactobacillus*, *Micrococcus* και *Staphylococcus*. Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών αυτών αυξάνονται σημαντικά κατά την ωρίμαση των αλλαντικών αέρος. Ο *Lactobacillus plantarum* αποτελεί τον κυρίαρχο πληθυσμό κατά την ωρίμαση του σουτζουκιού (Adıgüzel & Atasever, 2009, Kaban & Kaya, 2008). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί σε έρευνες ότι ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων κυμαίνεται μεταξύ 4.68–9.28 log cfu/g (Çon & Gökalp, 1998), και 4.12–6.43 log cfu/g (Erkmen & Bozkurt, 2004). Σε περιπτώσεις που δεν χρησιμοποιούνται καθαρές καλλιέργειες, υπεύθυνοι για την οξίνιση της κρεατόμαζας είναι οι μικροοργανισμοί *Lactobacillus sake* και *Lactobacillus curvatus*, επηρεάζοντας παράλληλα και την ανάπτυξη του χρώματος και της υφής του αλλαντικού (Γεωργάκης, και συν., 2002, Güzin Kaman, 2013). Τα είδη των λακτοβακίλλων που έχουν βρεθεί σε σουτζούκι Καισαρείας είναι *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis ssp.lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides sbp. mesenteroides / dextranicum* and *Leuconostoc lactis* (Adıgüzel & Atasever, 2009, Çon & Gökalp, 2000, Bozoğlu, & Weiss, 1995, Kaban & Kaya, 2008, Özdemir, 1999).

Οι πληθυσμοί των γενών *Micrococcus* και *Staphylococcus* κυμαίνονται μεταξύ 10^3 με 10^4 cfu/g και μπορούν να αναπτυχθούν ταχέως τις 3 πρώτες μέρες της ωρίμασης. Η απότομη οξίνιση του σουτζουκιού μπορεί να προκαλέσει την αργή ανάπτυξή τους. Οι κύριες λειτουργίες που επιτελούν οι μικροοργανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν τον σχηματισμό χρώματος, τη σταθεροποίηση του τροφίμου και την εμφάνιση επιθυμητού αρώματος μέσω της καταλάσης. Ακόμη, έχει διαπιστωθεί ότι οι σταφυλόκοκκοι αυτοί κατέχουν σημαντικό πληθυσμό από τον πληθυσμό των καταλάση θετικών κόκκων στο σουτζούκι. Μάλιστα οι *Staphylococcus xylosus* και *Staphylococcus saprophyticus* είναι από τα πιο κυρίαρχα είδη (Kaban & Kaya, 2008, Kaban & Kaya, 2009a).

Ο αριθμός εντεροβακτηριοειδών στο σουτζούκι και σε άλλα παρόμοια ζυμωμένα προϊόντα με βάση το κρέας, μειώνεται καθώς προχωράει η διαδικασία της ωρίμασης, λόγω της οξίνισης της κρεατόμαζας (Lücke, 1985, Kaban & Kaya, 2009a,β). Ωστόσο, οι υψηλές αρχικές τιμές a_w και pH, σε συνδυασμό με χαμηλές συγκεντρώσεις ζυμώσιμων υδατανθράκων, χαμηλό αρχικό πληθυσμό *Lactobacillus spp.*, χαμηλή συγκέντρωση νιτρικών και νιτρωδών και υψηλές θερμοκρασίες ωρίμασης, καθιστούν ένα περιβάλλον που ευνοεί την ανάπτυξη των εντεροβακτηριοειδών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Lücke, 1985, Lücke & Hechelmann, 1985).

Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι αναλόγως των συνθηκών υγρασίας και της ταχύτητας κίνησης του αέρα στο θάλαμο ωρίμασης μπορεί να αναπτυχθούν εκτός από ζύμες (π.χ. *Debaryomyces*) και μύκητες του γένους *Penicillium*, λειτουργώντας ευεργετικά στην ποιότητα του τελικού προϊόντος, μειώνοντας την τάγγιση του λίπους και συμβάλλοντας επίσης στην σταθερότητα του χρώματος (Γεωργάκης και συν, 2002).

2.4. Φυσικοχημικές μεταβολές κατά την ωρίμαση

Σημαντικό ρόλο κατά την διάρκεια της ωρίμασης έχουν οι μικροοργανισμοί που κατά την ανάπτυξή τους μπορούν να αλλάξουν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της κρεατόμαζας των αλλαντικών αέρος. Από τις αλλαγές αυτές οι πιο σημαντικές είναι ανάπτυξη του ερυθρού χρώματος, η αφυδάτωση, η οξίνιση, η στερεοποίηση της μάζας και η διαμόρφωση της υφής του αλλαντικού (Kotter et.al., 1962).

Η οξίνιση του αλλαντικού και η ραγδαία πτώση της τιμής του pH παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία παραγωγής αλλαντικών αέρος με την διαδικασία της ζύμωσης, την σταθερότητα του προϊόντος αλλά και την εξυγιάνσή του. Οι κυριότεροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τις τιμές του pH του τροφίμου είναι:

1. Η προσθήκη εύκολα ζυμούμενων σακχάρων η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ραγδαία μείωση της τιμής του pH λόγω της ζύμωσής του από τους λακτοβάκιλλους.
2. Η αύξηση της θερμοκρασίας ωρίμασης του αλλαντικού οδηγεί στην ταχύτερη ζύμωση των σακχάρων από τους λακτοβάκιλλους. Ιδιαίτερη όμως προσοχή χρειάζεται να μην αυξηθεί η θερμοκρασία άνω των 25 °C διότι θα υπάρξει ανάπτυξη μη επιθυμητών μικροοργανισμών στο αλλαντικό.
3. Ο αριθμός και η χρήση καθαρής καλλιέργειας λακτοβάκιλλων θα βοηθήσουν στην γρηγορότερη πτώση του pH.
4. Η διάμετρος του προϊόντος. Η παραγωγή των αλλαντικών με μεγαλύτερες θήκες διαμέτρου βοηθά στην αργή αποβολή της υγρασίας μέσα στον θάλαμο σε σχέση μικρότερου διαμέτρου θηκών, με αποτέλεσμα την αυξημένη τιμή του a_w για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα, κάτι που ευνοεί την ανάπτυξη των λακτοβάκιλλων (Γεωργάκης, και συν., 2002).

Η αφυδάτωση είναι μια φυσικοχημική μεταβολή που παρατηρείται κατά την παραγωγή των αλλαντικών αέρος κατά την διαδικασία της ωρίμασης και είναι αποτέλεσμα της διαφοράς της σχετικής υγρασίας του θαλάμου ωρίμασης και του αλλαντικού και δευτερευόντως της ταχύτητας κίνησης του αέρα. Κατά την παραγωγή των αλλαντικών αέρος είναι σημαντικό να υπάρχει διαφορά στην τιμή της υγρασίας μεταξύ αλλαντικού και θαλάμου ωρίμασης 2-4% RH για να μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανταλλαγή υδρατμών και κατά συνέπεια να μπορέσει το προϊόν να χάσει την υγρασία του. Μεγαλύτερη διαφορά σε τιμές υγρασίας του θαλάμου και του προϊόντος μπορεί να οδηγήσει στην έντονη αφυδάτωση του τελευταίου, ενώ υπάρχει ο κίνδυνος το αλλαντικό να οδηγηθεί σε μια κατάσταση που περιγράφεται ως «πέτσωμα». Σε αυτήν την περίπτωση, η επιφάνεια του αλλαντικού μπορεί να αποξηραθεί λόγω της μη εξόδου της υγρασίας από το εσωτερικό του αλλαντικού. Η κατάσταση αυτή έχει αρνητικά αποτελέσματα καθώς κρατά σε υψηλές τιμές τον συντελεστή a_w , που ευνοεί την ανάπτυξη των παθογόνων και των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Επίσης, παρατηρούνται αλλοιώσεις στην όψη και την σύσταση της μάζας (αδυναμία ανάπτυξης ερυθρού χρώματος). Η αφυδάτωση που προκαλείται μπορεί να επιφέρει επίσης αύξηση της σκληρότητας του αλλαντικού και μείωση του a_w σε επίπεδα έως 0,86. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι σε περίπτωση επιμόλυνσης του προϊόντος με *S. aureus*, ο

συγκεκριμένος μικροοργανισμός, έχει την δυνατότητα ανάπτυξης ακόμα και σε τέτοιες τιμές a_w (Γεωργάκης και συν, 2002).

Η ανάπτυξη του ερυθρού χρώματος, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η χρήση νιτροδών και νιτρικών αλάτων, η προσθήκη σακχάρων και καλλιέργεια εκκίνησης, η προσθήκη γλυκονικής-γ-λακτόνης, για την πτώση της τιμής του pH και τέλος η θερμοκρασία ωρίμασης. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι για την περίπτωση του παραδοσιακού σουτζουκιού το χρώμα που αποκτά είναι σκούρο μαύρο (Bozkurt & Erkmen, 2004) και κατά την παραγωγή του δεν χρησιμοποιούνται νιτρικά ή νιτρώδη άλατα ώστε να επηρεάσουν το χρώμα του ούτε προστίθεται καλλιέργεια εκκίνησης. Η κατεύθυνση προς την οποία αναπτύσσεται το χρώμα είναι πάντα από το εσωτερικό της κρεατόμαζας προς την επιφάνεια του αλλαντικού (Pezacki, 1999). Η απόκτηση του ερυθρού χρώματος στο αλλαντικό μπορεί να διαρκέσει από λίγες μέρες έως και μία εβδομάδα ή και κάποιες μέρες περισσότερο.

Συνοψίζοντας η ωρίμαση των αλλαντικών αέρος μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε τρία στάδια:

1. Το στάδιο της προσαρμογής, όπου θερμοκρασία αλλαντικού και θερμοκρασία χώρου ωρίμασης γίνονται ίδιες.
2. Το στάδιο της ζύμωσης, το οποίο εξαρτάται από την μέθοδο ωρίμασης και μπορεί να διαρκέσει από λίγες μέρες έως δύο εβδομάδες.
3. Το στάδιο της αφυδάτωσης, που εξαρτάται άμεσα από την μέθοδο ωρίμασης και θα πρέπει η διαφορά υγρασίας μεταξύ αλλαντικού και θαλάμου να είναι 2-4% RH, με λιγότερη τιμή να σημειώνει ο θάλαμος ώστε να επιτυγχάνεται ομαλή απώλεια υγρασίας από το αλλαντικό 1,5%-2,5% ημερησίως.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. Μικροχλωρίδα του Σουτζουκιού και *Staphylococcus aureus*

3.1.1. Γενικά

Η μικροβιακή χλωρίδα του σουτζουκιού αποτελείται από πολλούς μικροοργανισμούς. Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που απαρτίζει την χλωρίδα του σουτζουκιού είναι άμεσα συνδεδεμένος με τον τρόπο με τον οποίο τεχνολογικά παράγεται. Η μικροβιακή χλωρίδα του βοδινού κρέατος, το οποίο χρησιμοποιείται, αποτελεί το κυριότερο και μεγαλύτερο μέρος της χλωρίδας του σουτζουκιού. Οι συνθήκες ωρίμασης, που προαναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα, επηρεάζουν με την σειρά τους, άμεσα τη μικροβιακή του χλωρίδα.

Μεγάλη ποικιλία Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων, συνιστούν την αρχική μικροβιακή χλωρίδα του νωπού κρέατος (Stanbridge & Davies, 1998). Η πλειονότητα των συχνότερα εμφανιζόμενων δυνητικά αλλοιογόνων μικροοργανισμών συγκαταλέγεται σε κάποιο από τα παρακάτω είδη: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Brochothrix*, *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Clostridium*, ζύμες και μύκητες (Sofos, 1994). Πληθώρα παραγόντων επιδρά στη σύνθεση της μικροχλωρίδας του κρέατος, υπαγορεύοντας κατ' επέκταση την επικρατούσα χλωρίδα και το είδος των εμφανιζόμενων μικροβιακών αλλοιώσεων σε αυτό.

Δυνητικά παθογόνα βακτήρια, που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τη Δημόσια Υγεία, έχουν απομονωθεί από την επιφάνεια του βόειου κρέατος, με σημαντικότερα τη *Salmonella* spp., τον *Staphylococcus aureus*, τη *Yersinia enterocolitica*, το *Clostridium botulinum*, το *Clostridium perfringens*, το *Campylobacter* spp. και τη *Listeria monocytogenes* (Kotula et al., 1987). Σύμφωνα με τους Ahmet Yaman και τους συνεργάτες του (1998) κατά την ζύμωση, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών του γένους *Lactobacillus* spp. διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο, καθώς μπορεί να αυξηθεί σημαντικά και να αναστείλει άλλους πληθυσμούς μικροοργανισμών, όπως τα εντεροβακτηριοειδή και την *Listeria monocytogenes*. Σε μελέτη που έγινε από τους Barazi και Erkmén (2008) σε σουτζούκια, έδειξε ότι η *Listeria monocytogenes* δεν επιβίωσε μετά από 20 ημέρες ωρίμασης. Τέλος, ο *Staphylococcus aureus* είναι ένα πολύ συνηθισμένο βακτήριο το οποίο ανευρίσκεται σε τεμαχισμένα προϊόντα κρέατος αλλά και σε διάφορα είδη λουκάνικων που έχουν υποστεί ζύμωση και προκαλεί σοβαρά προβλήματα κατά την διαδικασία παραγωγής των σουτζουκιών (Gökalp et.al., 1998, González-Fandos et al., 1999, Erkmén, 2009).

3.1.2. Εντεροβακτηριοειδή

Τα εντεροβακτηριοειδή αποτελούν έναν ακόμη σημαντικό πληθυσμό στο σουτζούκι Καισαρείας καθώς μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την ασφάλεια του. Ο πληθυσμός των εντεροβακτηριοειδών, σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει πάνω στο σουτζούκι από τους Kaban & Kaya (2012) κυμαίνεται στο πρώτο πείραμα στα 10^2 cfu/gr, ενώ σε επόμενο πείραμα μετά από τρεις μέρες ωρίμασης, παρατηρείται μείωση του πληθυσμού κάτω από 10^2 cfu/gr. Σε παρόμοιο πείραμα που πραγματοποίησαν οι ίδιοι, ο πληθυσμός των εντεροβακτηριοειδών δεν μπορούσε να ανιχνευτεί με ακρίβεια σε όλες τις μέρες των μετρήσεων. Πάντως, σε κάθε περίπτωση τα εντεροβακτηριοειδή δεν μπορούν να αναπτυχθούν στο σουτζούκι λόγω της ωρίμασής του αλλά και ειδικότερα λόγω του ότι είναι ευαίσθητα σε συνθήκες χαμηλού pH και a_w (Kaban & Kaya 2006, Yalinkilic et.al 2012). Παρ' όλα αυτά, η *E.coli*, αν και εντεροβακτηριοειδής, μπορεί να επιζήσει και να αναπτυχθεί και κάτω από δυσμενείς συνθήκες χαμηλού pH (McLeod et.al, 2016). Τα πλέον συνήθη εντεροβακτηριοειδή που μπορούμε να ανιχνεύσουμε σε παραδοσιακά προϊόντα, όπως λουκάνικα ή αλλαντικά είναι τα εξής: *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter braakii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella terrigena*, *Rahnella aquatilis*, *Salmonella arizonae*, *Citrobacter youngae*, *Escherichia coli* (Lorenzo et.al, 2010).

Το αρχικό μικροβιακό φορτίο του κρέατος και κατά συνέπεια της κρεατόμαζας του σουτζουκιού, εξαρτάται και από τις συνθήκες σφαγής και προετοιμασίας του σφάγιου, το βαθμό της καταπόνησης που δέχεται το ζώο πριν τη σφαγή, καθώς και την εφαρμογή ή όχι συνθηκών ορθής υγιεινής πρακτικής κατά τη συντήρηση, διακίνηση και επεξεργασία του κρέατος (Gill, 2004).

3.1.3. *Lactobacillus* spp.

Οι λακτοβάκιλλοι αποτελούν την πλέον σημαντική χλωρίδα για την παρασκευή των σουτζουκιών λόγω του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζουν κατά την διαδικασία ωρίμασης, όπως προαναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο. Το γένος των *Lactobacillus* αποτελείται από ένα μεγάλο και ποικίλο φάσμα βακτηριακών ειδών, τα οποία σε γενικές γραμμές είναι μη παθογόνα και θεωρούνται μέρος της ανθρώπινης μικροχλωρίδας. Οι λακτοβάκιλλοι είναι μη-σπορογόνοι μικροοργανισμοί, κατατάσσονται στα Gram θετικά βακτήρια, είναι μικροαερόφιλα και καταλάση αρνητικά (Raquel Martinez, 2014). Οι λακτοβάκιλλοι έχουν αναγνωριστεί ως συμβιωτική μικροχλωρίδα, που λειτουργεί ευεργετικά για τον άνθρωπο, καθώς αναστέλλει την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων, παράγοντας αντιμικροβιακές ουσίες, όπως γαλακτικό οξύ, υπεροξείδιο του υδρογόνου, και βακτηριοκίνες (Cribby et.al, 2008) και αυτά αποτελούν την κύρια χλωρίδα για την παρασκευή των προβιοτικών (π.χ. τρόφιμα και διαιτητικά συμπληρώματα που περιέχουν ζωντανά βακτήρια) (Verna & Lucak 2010). Ο ρόλος των *Lactobacillus* spp. στα τρόφιμα έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνών εδώ και περισσότερο από 100 χρόνια,

ενώ έχουν αναγνωρισθεί τα ευεργετικά του αποτελέσματα για την υγεία και τη μακροζωία (Raquel Martinez, 2014). Τα είδη των λακτοβάκιλλων που έχουν βρεθεί σε σουτζούκι Καισαρείας είναι *Lactobacillus pentosus*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus*, *Lactococcus lactis ssp. lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides/dextranicum* και *Leuconostoc lactis* (Adıgüzel & Atasever, 2009, Çon & Gökalp, 2000, Gürakan, Bozoğlu & Weiss, 1995, Kaban & Kaya, 2008, Özdemir, 1999).

3.1.4. *Staphylococcus aureus*

Ο *S. aureus* έχει ενοχοποιηθεί για τροφικές δηλητηριάσεις με κύρια συμπτώματα γαστρεντερικές διαταραχές, όπως διάρροιες και έμετους, και με το ενδεχόμενο εξέλιξής τους σε νευρολογικής φύσεως συμπτωματολογία. Οι περισσότερες τροφιμογενείς τοξινώσεις στην Ευρωπαϊκή Ένωση προέρχονται από τον *Staphylococcus aureus* στην σύμφωνα με τον EFSA 2013. Οι σταφυλόκοκκοι μπορούν να βρεθούν σχεδόν παντού στο περιβάλλον και ειδικότερα στον αέρα, στην σκόνη, στις επιφάνειες αντικειμένων, στο νερό, στους ανθρώπους και στα ζώα. Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος αποτελεί φυσιολογική χλωρίδα στο δέρμα και στις βλεννώδεις εκκρίσεις ανθρώπων, θηλαστικών ζώων και πουλιών. Από μικροβιολογικής άποψης κατατάσσεται στα προαιρετικά αναερόβια, Gram-θετικά, μη σπορογόνα βακτήρια και ανήκει στην κατηγορία των κόκκων. Είναι μη κινητό βακτήριο και παρουσιάζει βιοχημικές ιδιότητες όπως ότι είναι θετικό στην καταλάση και την πηκτάση. Το κυτταρικό του τοίχωμα είναι ανθεκτικό στην λυσοζύμη και ευαίσθητο στην λυσοσταφίνη. Επίσης, ορισμένοι σταφυλόκοκκοι μπορούν να παράγουν σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες (Staphylococcal Enterotoxins, SEs) που αποτελούν και τον αιτιολογικό παράγοντα μιας τροφιμογενούς δηλητηρίασης (Hennekinne, et.al, 2012).

Συνήθως μια σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση (Staphylococcal Food Poisoning, SFP) εμφανίζεται από την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν προσχηματισμένη τοξίνη του *S. aureus*, ο οποίος συνήθως έχει επιμολύνει το τρόφιμο μετά από ακατάλληλο χειρισμό και αποθήκευσή του σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι άνθρωποι φέρουν τον *S. aureus* στην μικροχλωρίδα του σώματός τους και περίπου 20- 30% των ανθρώπων φέρουν *S. aureus* ως συμβιωτικό οργανισμό στο δέρμα τους και στους βλεννογόνους τους. Ως εκ τούτου, υπάρχει ο κίνδυνος επιμόλυνσης του τροφίμου κατά τη διάρκεια παρασκευής του από φορέα του σταφυλόκοκκου στο συγκεκριμένο τρόφιμο (Kluytmans & Wertheim, 2005, Argudin et al., 2010). Σχεδόν τις περισσότερες φορές οι σταφυλόκοκκοι που απομονώθηκαν από ανθρώπους ήταν εντεροτοξινογόνα στελέχη (Becker et al., 2003). Τα τρόφιμα που ευνοούν την ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων και έχουν ενοχοποιηθεί για κρούσματα τροφοδηλητηριάσεων είναι κυρίως τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, όπως το γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το κρέας και τα προϊόντα του, σαλάτες, προϊόντα αρτοποιίας και ιδιαίτερα γλυκίσματα και κέικ με γέμιση κρέμας και τέλος τα σάντουιτς (Hennekinne et al., 2012, Fetsch et.al, 2014).

Ο *S. aureus* αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά βακτήρια που προκαλούν τροφιμογενή νοσήματα από κατανάλωση σουτζουκιών και άλλων προϊόντων ζύμωσης του κρέατος

(Turantas, 1991, Kang & Fung, 2000). Σε έρευνες σε σουτζούκια στη λιανική πώληση στην Τουρκία, έχουν αναφερθεί υψηλοί πληθυσμοί *S. aureus* (Gökalp et.al., 1998.). Διάφοροι τύποι λουκάνικων όπως τα Ισπανικού τύπου «chorizo» και «salchichon» που έχουν υποστεί ζύμωση έχουν εμπλακεί σε τροφιμογενείς λοιμώξεις λόγω του *S.aureus* (Lücke, 1985, González-Fandos et al., 1999). Ο *S. aureus* βρέθηκε επίσης σε ψιλοκομμένο κρέας και μείγματα κρέατος και στις μονάδες επεξεργασίας κρέατος (εξοπλισμός, προσωπικό των εργοστασίων, κ.λπ.). Λόγω της ικανότητάς του να αναπτύσσεται σε υψηλή συγκέντρωση άλατος και σε ένα ευρύ φάσμα δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως σε τιμές a_w 0,86, είναι πιθανή η εύκολη ανάπτυξή του κατά τη διάρκεια του αρχικού σταδίου της ζύμωσης σε αλλαντικά αέρος, όπως και το παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας (González-Fandos et al., 1999, Osman Erkmen, 2009).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός και Πρωτοτυπία της Έρευνας

Η χιτοζάνη, σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον του επιστημονικού κόσμου και της βιομηχανίας τροφίμων λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων της. Παρά την δυναμική που έχει ως φυσική βιοσυντηρητική ουσία στον τομέα των τροφίμων, διαπιστώνεται ότι μέχρι στιγμής δεν έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις της στο νωπό βόειο κρέας και ιδιαίτερα στα προϊόντα του, όπως αντίστοιχα έχει γίνει για το ορνίθιο και το χοίρειο κρέας, καθώς και για ορισμένα ιχθυηρά (Κομοδρόμος, 2012).

Σκοπός της παρούσας έρευνας είναι η μελέτη της επίδρασης της χιτοζάνης στην ανάπτυξη του *S. aureus* κατά την ωρίμαση του σουτζουκιού Καισαρείας, καθώς και στην ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας που συμβάλλει στην ωρίμαση, ασφάλεια, συντήρηση και ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών αυτού του παραδοσιακού προϊόντος.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Παρασκευή διαλύματος χιτοζάνης

Στην παρούσα πειραματική εργασία χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη με τη μορφή μικρόκοκκων, υψηλού μοριακού βάρους ($MW > 800.000$ Da, Aldrich, Germany), προερχόμενη από κελύφη καβουριών, με βαθμό αποακετυλίωσης 75% (προδιαγραφές κατασκευαστή). Η επιλογή υψηλού μοριακού βάρους χιτοζάνης, έγινε με κριτήριο την επίδρασή της στους Gram-θετικούς οργανισμούς, όπως οι σταφυλόκοκκοι, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία (Tikhonov, 2006; Fernandez et al, 2009) Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα οξικού οξέος 1% v/v, το οποίο παρασκευάστηκε στο εργαστήριο. Ποσότητα διαλύματος χιτοζάνης 200 ml, παρασκευάστηκε έπειτα από διάλυση 2g χιτοζάνης σε 200 ml διαλύματος οξικού οξέος 1% v/v και έπειτα από συνεχή ανάδευση 5 ωρών με μαγνητικό αναδευτήρα, σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Συνεπώς, η τελική συγκέντρωση του διαλύματος χιτοζάνης ήταν 1% w/v, ενώ η τιμή του pH ήταν 4,00 στους 25 °C, όπως προσδιορίστηκε από ψηφιακό πεχάμετρο. Το οξικό οξύ αναγνωρίζεται ως ουσία γενικά ασφαλής για χρήση στα τρόφιμα (Generally Recognized As Safe - GRAS), ενώ για τη χιτοζάνη, η οποία τελεί υπό καθεστώς έγκρισης, αναμένεται να μελετηθούν οι μακροχρόνιες τοξικολογικές της επιδράσεις στους ζωντανούς οργανισμούς, προτού επιτραπεί η χρήση της στη βιομηχανία τροφίμων.

2.2. Προετοιμασία δειγμάτων

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε βόειο κρέας (ελιά νωπού κρέατος) και βόειο λίπος ελληνικής προελεύσεως. Η μεταφορά τους έγινε σε ισοθερμικό δοχείο με παγοκύστες σε θερμοκρασία 5 °C. Η διαδικασία παραγωγής του σουτζουκιού έγινε στο εργαστήριο Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, της Κτηνιατρικής Σχολής, του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η παραγωγή του σουτζουκιού στηρίχθηκε στην συνταγή παραδοσιακών σουτζουκιών Καισαρείας σύμφωνα με τον Πίνακα 6 του Παραρτήματος.

Η προετοιμασία των σουτζουκιών έγινε ως εξής:

- Το βόειο κρέας τεμαχίστηκε σε μικρά τεμάχια, τα οποία κατόπιν περάστηκαν από κιμαδομηχανή με δίσκο οπών διαμέτρου 5 mm.
- Ζυγίστηκαν οι ανάλογες με τη συνταγή ποσότητες των μπαχαρικών και των άλλων συστατικών, πλην του λίπους και της χιτοζάνης, και αναμίχθηκαν με τον κιμά. Ακολούθως η κρεατόπαστα μεταφέρθηκε σε ψυκτικό θάλαμο και παρέμεινε μέχρι την επόμενη ημέρα.
- Την επομένη ημέρα προστέθηκε στη κρεατόμαζα το λίπος και αναμίχθηκε στην κιμαδομηχανή.
- Στην συνέχεια, η κρεατόπαστα χωρίστηκε σε 4 ισόποσες ομάδες που τοποθετήθηκαν ξεχωριστά σε 4 διαφορετικές αποστειρωμένες λεκάνες
- Οι λεκάνες με τις 4 ομάδες της κρεατόπαστας αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο για 24 ώρες.
- Την επομένη ακολούθησε ενοφθαλμισμός 2 ομάδων με σταφυλόκοκκο, στη μία εκ των οποίων προστέθηκε και διάλυμα χιτοζάνης ώστε η τελική περιεκτικότητα του μίγματος να είναι 1% w/w. Μετά τον ενοφθαλμισμό και την προσθήκη της χιτοζάνης ακολούθησε η ενθήκευση της κρεατόμαζας και η σχηματοποίηση των σουτζουκιών σε ζωική θήκη (έντερο) υπό κενό.
- Την ίδια μέρα οι άλλες δύο ομάδες κρεατόμαζας ενθηκεύτηκαν κατά τον ίδιο τρόπο σε ζωική θήκη και σχηματοποιήθηκαν τα σουτζούκια. Η μία ομάδα σουτζουκιών εμβαπτίστηκε στο διάλυμα της χιτοζάνης και αναρτήθηκε για να στεγνώσει και να σχηματισθεί εδώδιμη μεμβράνη της χιτοζάνης. Ακολούθως και οι δύο αυτές ομάδες σουτζουκιών, ενοφθαλμίστηκαν επιφανειακά με σταφυλόκοκκο.

- Εκτός των ανωτέρω ομάδων, παρασκευάστηκαν και δύο άλλες ομάδες σουτζουκιών. Η μία με χιτοζάνη και η άλλη χωρίς χιτοζάνη. Οι ομάδες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τις οργανοληπτικές εξετάσεις με σκοπό την αξιολόγηση της αποδοχής ή μη των σουτζουκιών που περιείχαν το διάλυμα χιτοζάνης.

2.2.1. Προετοιμασία ενοφθαλμίσματος *Staphylococcus aureus*

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *S.aureus* από τη συλλογή του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζ.Π. του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ. τα οποία συντηρούνταν σε ζωμό τρυπτόνης εμπλουτισμένο με 15% γλυκερόλη σε θερμοκρασία - 80 °C (Tryptone Soy Broth + 15% Glycerol).

Οι μικροοργανισμοί ανακαλλιεργήθηκαν δύο συνεχόμενες φορές σε Tryptone Soy Broth για 18h στους 35 °C. Μετά τη δεύτερη καλλιέργεια και πριν τον πειραματισμό, οι ζωμοί φυγοκεντρήθηκαν, απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό, και προστέθηκε αποστειρωμένο διάλυμα πεπτόνης 1% στο βακτηριακό ίζημα. Στη συνέχεια ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση. Μετά το πέρας της δεύτερης φυγοκέντρησης και την απόρριψη του υπερκείμενου υγρού, προστέθηκε και πάλι ποσότητα διαλύματος πεπτόνης 1% στο βακτηριακό ίζημα, τόση ώστε ο τελικός πληθυσμός του *S.aureus* να είναι 6 log cfu/ml.

2.2.2. Κατηγοριοποίηση και ωρίμαση των δειγμάτων

Στην κρεατόμαζα της 1ης ομάδας προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα ενοφθαλμίσματος *S. aureus* έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του μικροοργανισμού να είναι περίπου 10^4 cfu/g μίγματος. Στην συνέχεια έγινε η ενθήκευση σε εδώδιμες θήκες εντέρων.

Στην κρεατόμαζα της 2ης ομάδας προηγήθηκε η ανάμιξή της με το διάλυμα της χιτοζάνης περιεκτικότητας 1% w/v και κατόπιν προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα ενοφθαλμίσματος *S. aureus*, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του μικροοργανισμού να είναι της τάξης 10^4 cfu/g μίγματος. Ακολούθησε η ενθήκευση σε εδώδιμες θήκες εντέρων.

Για τη δημιουργία της 3^{ης} ομάδας η κρεατόμαζα ενθηκεύτηκε, και σχηματοποιήθηκαν σουτζούκια βάρους περίπου 50g και συνολικού εμβαδού επιφανείας 50 cm² και κατόπιν ενοφθαλμίστηκαν επιφανειακά με καλλιέργεια *S.aureus* έτσι ώστε ο πληθυσμός τους να είναι περίπου της τάξεως των 10^3 cfu/cm².

Για τη δημιουργία της 4^{ης} ομάδας ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρεται στην 3^η ομάδα, με τη διαφορά ότι μετά τη σχηματοποίηση των σουτζουκιών, αυτά εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα χιτοζάνης, στέγνωσαν σε θάλαμο νηματικής ροής και κατόπιν ενοφθαλμίστηκαν επιφανειακά με *S.aureus* έτσι ώστε ο τελικός πληθυσμός τους να είναι 10^3 cfu/cm².

Για η δημιουργία των ομάδων σουτζουκιών που θα χρησιμοποιούνταν για την οργανοληπτική αξιολόγηση, χρησιμοποιήθηκε η κρεατόμαζα με χιτοζάνη και χωρίς χιτοζάνη, αλλά χωρίς τον ενοφθαλμισμό καλλιέργειας σταφυλόκοκκου.

Η κατηγοριοποίηση και η κωδικοποίηση των ομάδων έγινε ως εξής:

- Η πρώτη ομάδα που περιείχε μόνο ενοφθαλμισμό *S.aureus* στην μάζα των σουτζουκιών χαρακτηρίστηκε ως MI.
- Η δεύτερη ομάδα περιείχε ενοφθαλμισμό *S.aureus* και χιτοζάνη στη μάζα των σουτζουκιών χαρακτηρίστηκε ως MIC
- Η τρίτη ομάδα η οποία ενοφθαλμίστηκε επιφανειακά με *S. aureus* χαρακτηρίστηκε ως SI.
- Η τέταρτη ομάδα η οποία εμβαπτίστηκε σε διάλυμα χιτοζάνης και ενοφθαλμίστηκε επιφανειακά με *S. aureus* χαρακτηρίστηκε ως SIC.
- Οι ομάδες των σουτζουκιών που προορίζονταν για οργανοληπτική αξιολόγηση, χαρακτηρίστηκαν ως M η ομάδα που δεν περιείχε στην κρεατόμαζα χιτοζάνη και ως MC αυτή που περιείχε.

Αμέσως μετά την επισήμανση των ομάδων, τα σουτζούκια τοποθετήθηκαν αναρτημένα σε ράβδους για ωρίμαση σε θάλαμο θερμοκρασίας 15°C και υγρασίας χαμηλότερης του 80% RH για δύο ημέρες. Κατόπιν, οι ομάδες των σουτζουκιών μεταφέρθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 22 °C για 5 ακόμη ημέρες ώστε να συμπληρωθεί η ωρίμασή τους.

2.3. Μικροβιολογικές εξετάσεις

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της χιτοζάνης στην ανάπτυξη των σταφυλόκοκκων και τις μικροβιακής χλωρίδας του παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας, έγινε καταμέτρηση των πληθυσμών σε τακτά χρονικά διαστήματα. Οι μετρήσεις αυτές αφορούσαν τους πληθυσμούς της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), των λακτοβακίλλων, των εντεροβακτηριοειδών και του χρυσίζοντα σταφυλόκοκκου.

Για την καταμέτρηση των πληθυσμών αυτών στα σουτζούκια των οποίων η μάζα είχε ενοφθαλμιστεί με σταφυλόκοκκο, λαμβάνονταν άσηπτα 25 γραμμάρια δείγματος σουτζουκιού σε σάκουσ Stomacher. Στην συνέχεια ομοιογενοποιήθηκαν με 225 ml 0,1% πεπτονόχο νερό για 2 λεπτά σε συσκευή Stomacher. Ακολούθως, πραγματοποιούνταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στο ίδιο αραιωτικό υγρό. Από τις αραιώσεις αυτές γινόταν επιφανειακή εξάπλωση 0,1 ml από κάθε αραιώση σε διπλές σειρές τρυβλίων με Tryptone Soya Agar (TSA) για τον υπολογισμό της OMX, με Man Rogosa & Sharpe Agar (MRS) για τον υπολογισμό των λακτοβάκιλλων, με Baird Parker Agar (BP) για την καταμέτρηση των σταφυλόκοκκων και με Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) για τον υπολογισμό των κολοβακτηριοειδών. Ακολουθούσε επώαση των ενοφθαλμισμένων τρυβλίων σε συνθήκες και χρόνους σύμφωνα με τις απαιτήσεις του κάθε μικροοργανισμού.

Η μικροβιολογική εξέταση των ομάδων με επιφανειακή μόλυνση (SI) και επιφανειακή προσθήκη χιτοζάνης (SIC) γινόταν με την άσηπτη λήψη ολόκληρων των σουτζουκιών από κάθε ομάδα και την τοποθέτηση τους σε σάκους Stomacher. Στη συνέχεια προστίθονταν 100 ml 0,1% πεπτονόχο νερού στο σάκο Stomacher και αφήνονταν το δείγμα για 2 λεπτά ώστε να υγρανθεί η επιφάνεια του, ώστε να αποκολληθούν εύκολα οι μικροοργανισμοί, και ακολουθούσε ισχυρή μάλαξη και ανακίνηση των σουτζουκιών. Ακολούθως, πραγματοποιούνταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στο ίδιο αραιωτικό υγρό και ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες σποράς που προαναφέρθηκαν και επώαση με τις συνθήκες που απαιτούνται για κάθε μικροοργανισμό. Οι συνθήκες αυτές ήταν οι εξής:

- Για την καταμέτρηση των κολοβακτηριοειδών η επώαση γινόταν στους 37 °C για 48 ώρες.
- Για την καταμέτρηση των λακτοβάκιλλων η επώαση γινόταν στους 30 °C για 5 ημέρες.
- Για την καταμέτρηση των σταφυλόκοκκων η επώαση γινόταν στους 37 °C για 24-48 ώρες.
- Για την καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας η επώαση γινόταν στους 37 °C για 24-48 ώρες.

Οι μικροβιολογικές εξετάσεις ξεκίνησαν από την πρώτη μέρα της ωρίμασης d 0 και επαναλαμβάνονταν κάθε 7 ημέρες έως την 21 ημέρα (d 7, d 14, d 21).

2.4. Φυσικοχημικές Εξετάσεις

Παράλληλα με τις μικροβιολογικές εξετάσεις, εξετάζονταν στα ίδια τακτά χρονικά διαστήματα, και ορισμένες φυσικοχημικές παράμετροι που συμβάλλουν στην ωρίμαση και ασφάλεια του προϊόντος. Οι εξετάσεις αυτές αφορούσαν στο συντελεστή ενεργού νερού και στην ενεργό οξύτητα των σουτζουκιών.

2.4.1. Προσδιορισμός του συντελεστή ενεργότητας νερού (a_w) του σουτζουκιού

Η μέτρηση του συντελεστή ενεργού νερού γινόταν με τη λήψη ποσότητας σουτζουκιού απαραίτητης για την πλήρωση των κυψελών του οργάνου μέτρησης (AQUA LAB, CX-2, Decagon Devices Inc., Washington, USA). Ο υπολογισμός του γινόταν υπό σταθερή θερμοκρασία 25 °C. Για κάθε ομάδα σουτζουκιών και σε κάθε χρονικό διάστημα εξετάζονταν δύο δείγματα.

2.4.2 Προσδιορισμός της ενεργού οξύτητας (pH)

Η τιμή του pH προσδιοριζόταν μετά από ομογενοποίηση δύο δειγμάτων από κάθε ομάδα σουτζουκιών, βάρους 10 g με 90 ml αποσταγμένου νερού, με τη χρήση ηλεκτρονικού πεχάμετρου (HANNA pH 211, HANNA Instruments, USA).

2.5. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η εκτίμηση των μακροσκοπικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των δειγμάτων έγινε μετά την ολοκλήρωση της ωρίμασης των σουτζουκιών. Τα δείγματα προσφέρθηκαν κωδικοποιημένα προς αξιολόγηση. Η εκτίμηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών γινόταν με τη βαθμολόγηση κάθε χαρακτήρα σε δεκάβαθμη ηδονική κλίμακα (1-10), με το 1 να αντιπροσωπεύει τη χειρότερη και το 10 την καλύτερη δυνατή αξιολόγηση (1-2 «απαράδεκτο», 2-4 «πολύ κακό», 4-5 «κακό», 5-6 «αποδεκτό», 6-7 «πολύ καλό», 8-10 «εξαιρετικό»). Βαθμολογίες κάτω του μέσου όρου (<5) παρέπεμπαν σε μη αποδεκτά αντίστοιχα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

2.6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων έγινε χρησιμοποιώντας το μοντέλο της γραμμικής συσχέτισης. Με την προαναφερθείσα μεθοδολογία διερευνήθηκαν οι πιθανές επιδράσεις των διαφορετικών μεταχειρίσεων των δειγμάτων στις εξεταζόμενες παραμέτρους καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμασης. Για τον υπολογισμό του βαθμού

συσχέτισης μεταξύ των διαφόρων εξεταζόμενων παραμέτρων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης κατά Spearman. Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο IBM SPSS Statistics version 21.0.0.0 32-bit edition. Τέλος, η κατασκευή των γραφημάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Office Excel 2013, Version 15.0.4823.1004 for Windows 10 student 64bit edition, Microsoft Corporation, Redmond, U.S.A.).

3. Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικών εξετάσεων

Οι μεταβολές των μικροβιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν (OMX, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillaceae*) αφορούσαν όλα τα δείγματα (MI, MIC, SI, SIC) κατά την διάρκεια της ωρίμασης του σουτζουκιού και αποτυπώνονται στα Γραφήματα 1 έως 4. Επιπρόσθετα τα επιμέρους αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων, παρατίθενται στον Πίνακα 7 του Παραρτήματος.

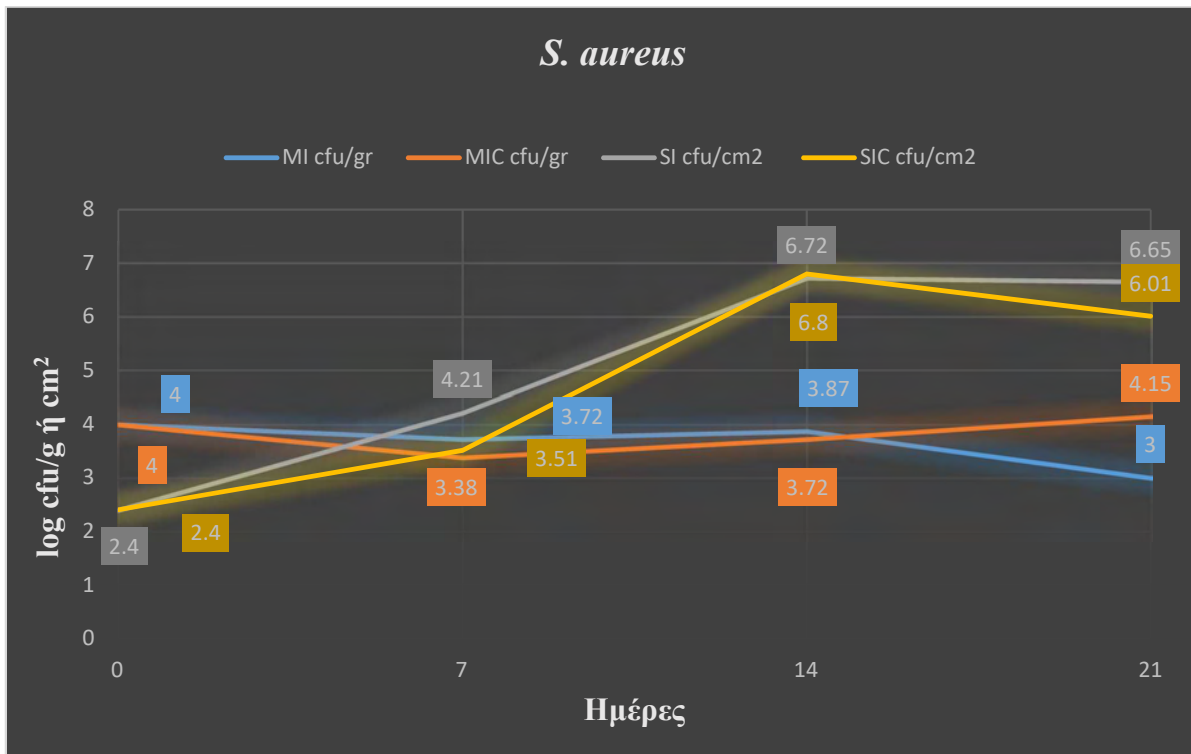
Κατά την πρώτη μέρα του πειράματος d 0 οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών και στις 4 ομάδες δειγμάτων δεν διέφεραν σε σημαντικό στατιστικό επίπεδο ($P>0,05$). Αυτή η σύγκριση εξασφάλισε ένα κοινό σημείο αναφοράς που θα επέτρεπε την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων των επόμενων μετρήσεων. Εξαιρέση αποτελούν οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων και της OMX οι οποίοι παρουσίασαν σταθερή ανάπτυξη ($P>0,05$) λόγω της ωρίμασης χωρίς να τους επηρεάσει η χιτοζάνη. Οι πληθυσμοί τέλος του *S. aureus* δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$) στην μάζα του σουτζουκιού παρά μόνο στην επιφάνειά του την d 7 ημέρα του πειράματος σε σχέση με την δράση της χιτοζάνης ($P<0,01$).

Πιο συγκεκριμένα ο πληθυσμός του *S. aureus* (Γράφημα 1) των ομάδων MI και MIC δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με την δράση της χιτοζάνης ($P>0,05$). Ειδικότερα, η καταμέτρηση που πραγματοποιήθηκε την d 0 έδειξε ότι οι ομάδες είχαν κοινό σημείο εκκίνησης με πληθυσμό της τάξης του 4 log cfu/gr. Την d 7 παρατηρήθηκε πτώση του πληθυσμού κατά 0,28 log cfu/gr για την ομάδα MI και 0,49 log cfu/gr για την ομάδα της MIC. Ο πληθυσμός τους σημείωσε άνοδο κατά 0,15 log cfu/gr για την ομάδα MI και 0,21 για την ομάδα της MIC την d 14 χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$). Την d 21 παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού της MIC σε σχέση με την MI κατά 1,15 log cfu/g χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική ως προς την δράση της χιτοζάνης ($P>0,05$).

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά της έρευνας των Kaban & Kaya (2006) οι οποίοι μελέτησαν τη δράση του *S. aureus* σε διαφορετικού τύπου σουτζούκι και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ωρίμαση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού και ότι μια αργή μείωση του pH χωρίς την χρήση αρχικής καλλιέργειας λακτοβάκιλλων μπορεί να αυξήσει αρχικά τον πληθυσμό του σταφυλόκοκκου. Η έρευνά τους έδειξε ότι η χρήση αρχικής καλλιέργειας μείωσε τον αρχικό πληθυσμό του σταφυλόκοκκου περίπου κατά 0,70 log cfu/gr την έβδομη μέρα του πειράματός τους. Επίσης, ο αριθμός των λακτοβακίλλων με τη χρήση αρχικής καλλιέργειας ήταν 7,1 log cfu/gr ενώ χωρίς καλλιέργεια ήταν 3,5 log cfu/gr την 0 ημέρα του πειράματός τους. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξε και η έρευνα του Turantas (1991), η οποία αναφέρει ότι η χρήση αρχικής καλλιέργειας μείωσε τον πληθυσμό του σταφυλόκοκκου κάτω από τα όρια ανίχνευσής του την έκτη μέρα του πειράματος του. Οι

έρευνες αυτές συμπέραναν ότι η προσθήκη αρχικής καλλιέργειας λακτοβακίλλων βοηθά στην απότομη πτώση του pH με αποτέλεσμα την δυσκολία ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατά την ωρίμασή του. Παρόλο που δεν χρησιμοποιήθηκε αρχική καλλιέργεια λακτοβάκιλλων στην παρούσα πειραματική εργασία, σημειώθηκε απότομη πτώση του pH σύμφωνα με το Γράφημα 6. Αυτό πιθανότατα συνέβη από τον αριθμό των λακτοβακίλλων που ήταν 5,7 log cfu/gr για την MI και 5,65 log cfu/gr για την MIC την d 0. Αυτός ο αριθμός ήταν αρκετός για μειώσει και να σταθεροποιήσει τον πληθυσμό των σταφυλόκοκκων.

Αντίθετα, στις ομάδες SI και SIC παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,01$) κατά την διάρκεια της ωρίμασης στον πληθυσμό του *S. aureus*, υποδεικνύοντας την δράση της χιτοζάνης. Ο αρχικός πληθυσμός των ομάδων SI και SIC ξεκίνησε την d 0 από τον ίδιο αριθμό, δηλαδή 2,4 log cfu/cm². Την d 7 παρατηρήθηκε διαφορά 0,83 log cfu/cm² μεταξύ των ομάδων στατιστικά σημαντική ($P < 0,01$) ως προς την δράση της χιτοζάνης. Από την d 7 μέχρι την d 14 ημέρα παρατηρούμε σύγκλιση των πληθυσμών των δύο ομάδων, για να καταλήξει στην διαφορά των 0,64 log cfu/cm² την d 21 ημέρα του πειράματος, με την ομάδα της χιτοζάνης SIC να βρίσκεται σε χαμηλότερη πληθυσμιακή τιμή.

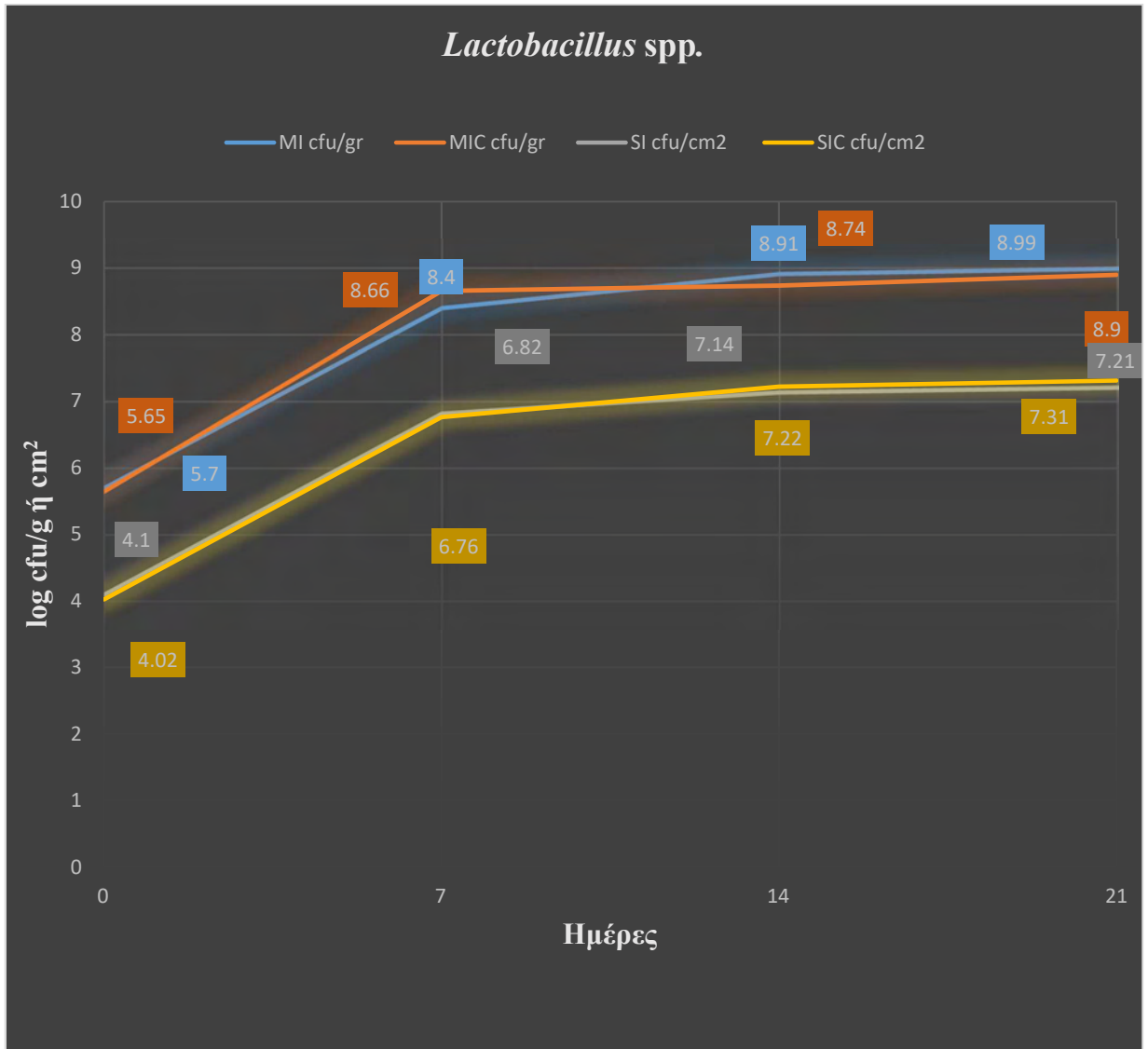


Γράφημα 1. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού *Staphylococcus aureus* στο παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας.

Οι μικροβιακοί πληθυσμοί των λακτοβάκιλλων όσον αφορά στη μάζα του σουτζουκιού (Γράφημα 2), ξεκίνησαν από 5,7 log cfu/gr στην ομάδα MI και 5,65 log cfu/gr για την ομάδα MIC για να καταλήξουν την 21 μέρα στην τιμή 8,99 log cfu/gr και 8.9 αντίστοιχα. Η ανοδική τάση που δείχνουν οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων στην μάζα του

σουτζουκιού είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας ωρίμασής του και έρχεται σε συμφωνία με την προαναφερθείσα έρευνα των Kaban & Kaya (2006).

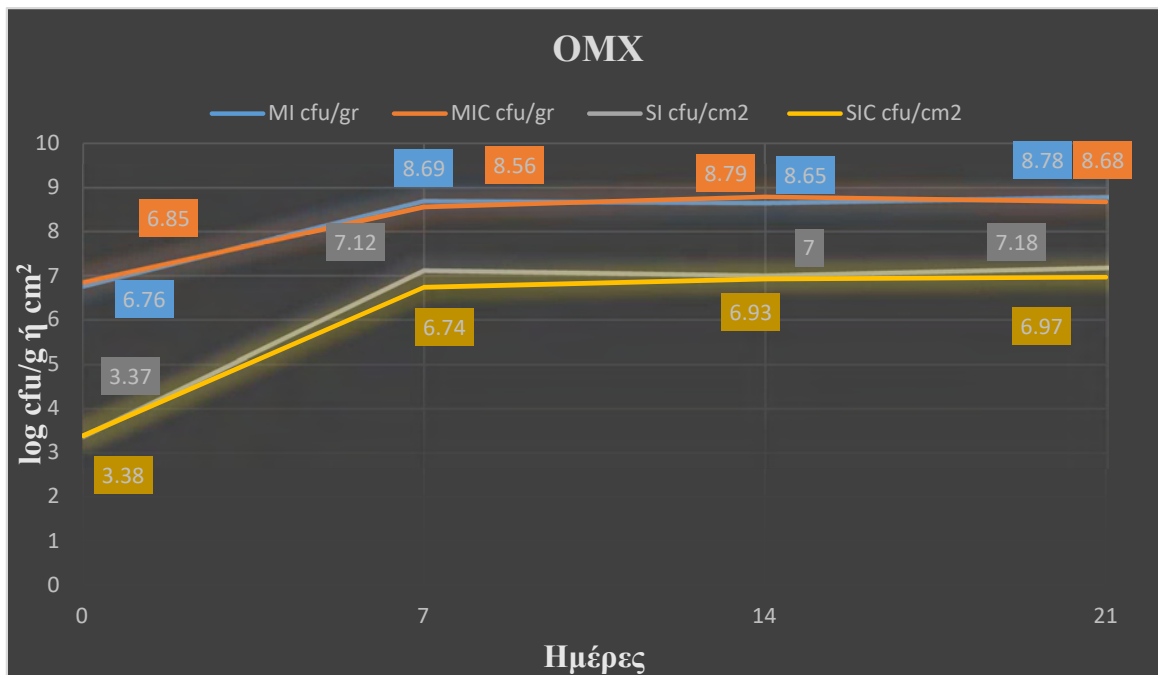
Παρόμοια εικόνα παρουσιάζεται και στην επιφάνεια του σουτζουκιού για τις ομάδες SI και SIC, με την εκκίνηση του πληθυσμού να είναι στα 4,1 και 4,02 log cfu/cm² αντίστοιχα και να φτάνει τα 7,21 και 7,31 log cfu/cm² αντίστοιχα χωρίς όμως στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P>0,05$). Ως εκ τούτου και στις δυο περιπτώσεις η χιτοζάνη δεν επηρέασε τον πληθυσμό των λακτοβακίλλων και κατ' επέκταση την διαδικασία



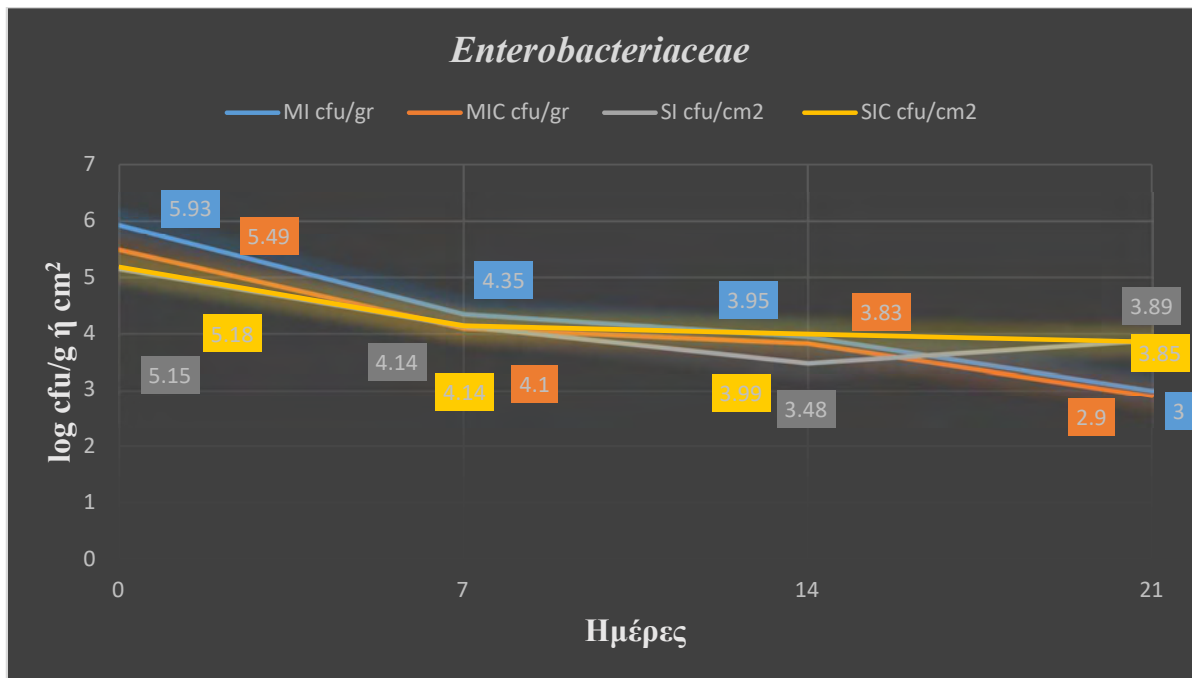
Γράφημα 2. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού λακτοβακίλλων στο παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας.

ωρίμασης χωρίς να προκαλέσει τεχνολογικά προβλήματα κατά την παρασκευή του. Η ομαλή αυξητική τάση του πληθυσμού από την d 0 μέχρι d 21 είναι απόδειξη της ομαλής διαδικασίας ωρίμασης.

Κατά τη διαδικασία ωρίμασης, ο πληθυσμός της OMX (Γράφημα 3) εμφάνισε μια αύξηση και στις 4 ομάδες, που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική ($P>0,05$). Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η χιτοζάνη δεν έδρασε πάνω στην μικροβιακή χλωρίδα της OMX. Η αυξητική τάση που παρατηρείται και στις 4 ομάδες από την d 0 μέχρι και την d 7 δικαιολογείται λόγω της διαδικασίας ωρίμασης. Η μη ανασταλτική δράση της χιτοζάνης έναντι του πληθυσμού της OMX έρχεται να συμφωνήσει με τις έρευνες των Gokmen & Ümit (2011), των Soultos και των συνεργατών του (2008) και των Tao & Linchun (2009), οι οποίοι αναφέρουν ότι η ανασταλτική της δράση εξαρτάται από τον τύπο του προϊόντος που χρησιμοποιείται στην έρευνα, τον βαθμό αποακετυλίωσης της χιτοζάνης καθώς και το pH του τροφίμου. Η αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης σύμφωνα με τον Aider (2010) ενισχύεται όταν το pH του τροφίμου είναι μικρότερο του 6 καθώς αυξάνεται η διαλυτότητά της και ο κατιονικός της χαρακτήρας. Στην παρούσα έρευνα το pH του τροφίμου παρέμεινε σταθερά κάτω από 6 χωρίς όμως να αυξηθεί η δράση της χιτοζάνης. Χιτοζάνη χαμηλού μοριακού βάρους $MW<10$ kDa και υψηλού βαθμού αποακετυλίωσης $DD>97.5$ ασκεί μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση λόγω καλύτερης διαλυτότητάς της σύμφωνα με τους Dutta και τους συνεργάτες του (2009). Στην δικιά μας έρευνα η χιτοζάνη που χρησιμοποιήθηκε είναι υψηλού μοριακού βάρους ($MW>800.000$ Da) και μέτριου βαθμού αποακετυλίωσης (75% DD), οπότε δικαιολογείται και η ασθενής επίδρασή της έναντι του πληθυσμού της OMX.



Γράφημα 3. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού OMX στο παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας.

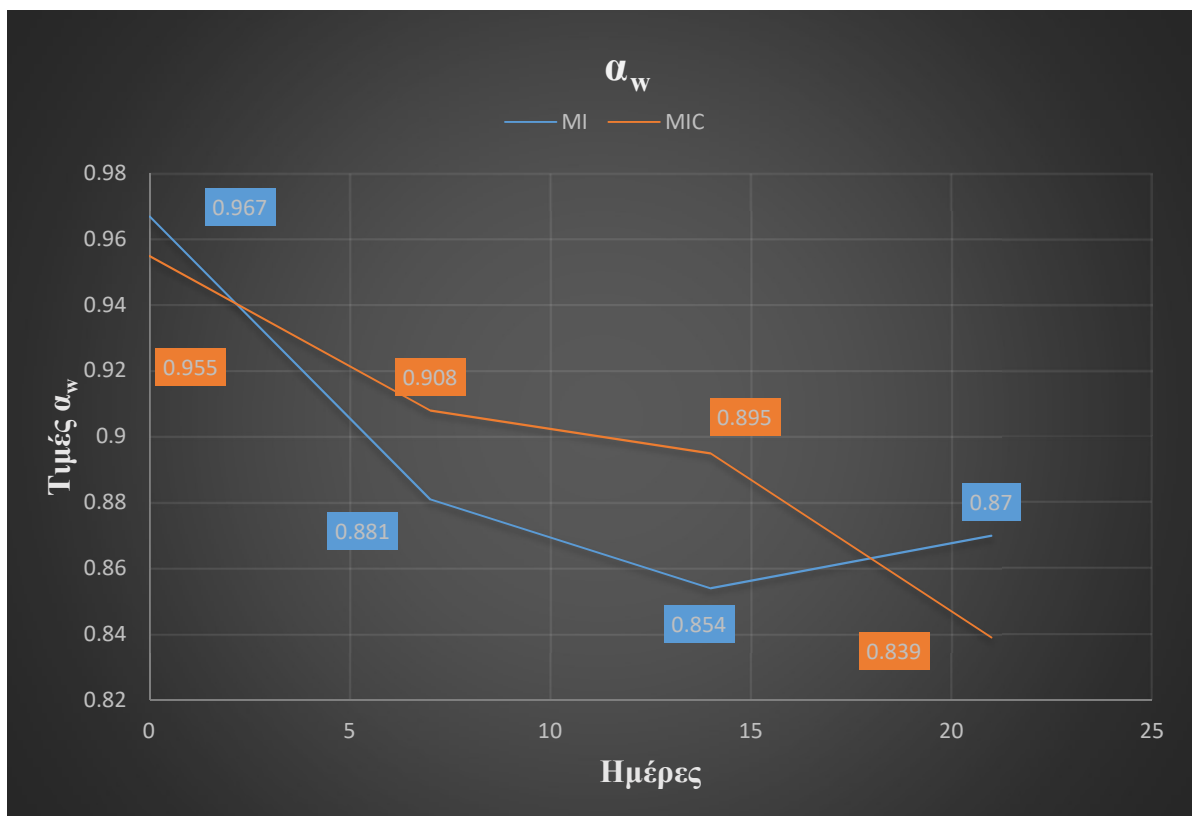


Γράφημα 4. Μεταβολές μικροβιακού πληθυσμού κολοβακτηριοειδών στο παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας.

Όσον αφορά τον μικροβιακό πληθυσμό των εντεροβακτηριοειδών (Γράφημα 4), δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές κατά την διάρκεια του πειράματος στις ομάδες MI και MIC ($P>0,05$) χωρίς όμως διαφορές μεταξύ των ομάδων. Επίσης, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μετρήσεις των ομάδων SI και SIC ($P>0,05$). Στη μάζα του σουτζουκιού παρατηρούμε την μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών κατά $-3 \log \text{ cfu/gr}$ και στις δυο ομάδες MI και MIC από την d 0 μέχρι και την d 21. Όσον αφορά την δράση της χιτοζάνης στις ομάδες MI και MIC, δεν παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών ($P>0,05$). Το αποτέλεσμα αυτό διαφωνεί με την έρευνα Gokmen & Ümit (2011). Σύμφωνα με την έρευνα αυτή, έγινε χρήση της χιτοζάνης και παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών κατά $1,05 \log \text{ cfu/gr}$ μεταξύ των ημερών 7 έως 15 του πειράματός τους. Παρόμοια αποτελέσματα έγιναν και σε Ελληνικού τύπου λουκάνικο στους 4°C με χιτοζάνη για 28 ημέρες, με την χρήση της χιτοζάνης να μειώνει τον πληθυσμό των εντεροβακτηριοειδών κατά $0,96 \log \text{ cfu/gr}$ την έβδομη μέρα του πειράματός τους και $1,01 \log \text{ cfu/gr}$ την 14 μέρα σύμφωνα με την έρευνα των Soultos και των συνεργατών του (2008). Η παρούσα έρευνα με τις ομάδες MI και MIC κατέγραψαν διαφορές στους πληθυσμούς τους κατά 1,58 για την ομάδα MI και 1,39 για την ομάδα MIC τις πρώτες 7 μέρες της ωρίμασης. Η έρευνα των Darmadjji & Izumimoto (1994), αναφέρει ότι η χρήση της χιτοζάνης σε αναλογία 1% προκαλεί τη μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών και ιδιαίτερα της *E. coli* κατά $1,12 \log \text{ cfu/gr}$ σε κρέας το οποίο βρισκόταν σε συντήρηση 30°C μετά από 48 ώρες. Οι ομάδες SI και SIC κατέγραψαν μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών κατά $1,26 \log \text{ cfu/cm}^2$ περίπου, χωρίς όμως να φαίνεται η δράση της χιτοζάνης από την d 0 του πειράματος μέχρι την d 21 ($P>0,05$).

3.2. Συντελεστής ενεργότητας νερού (a_w)

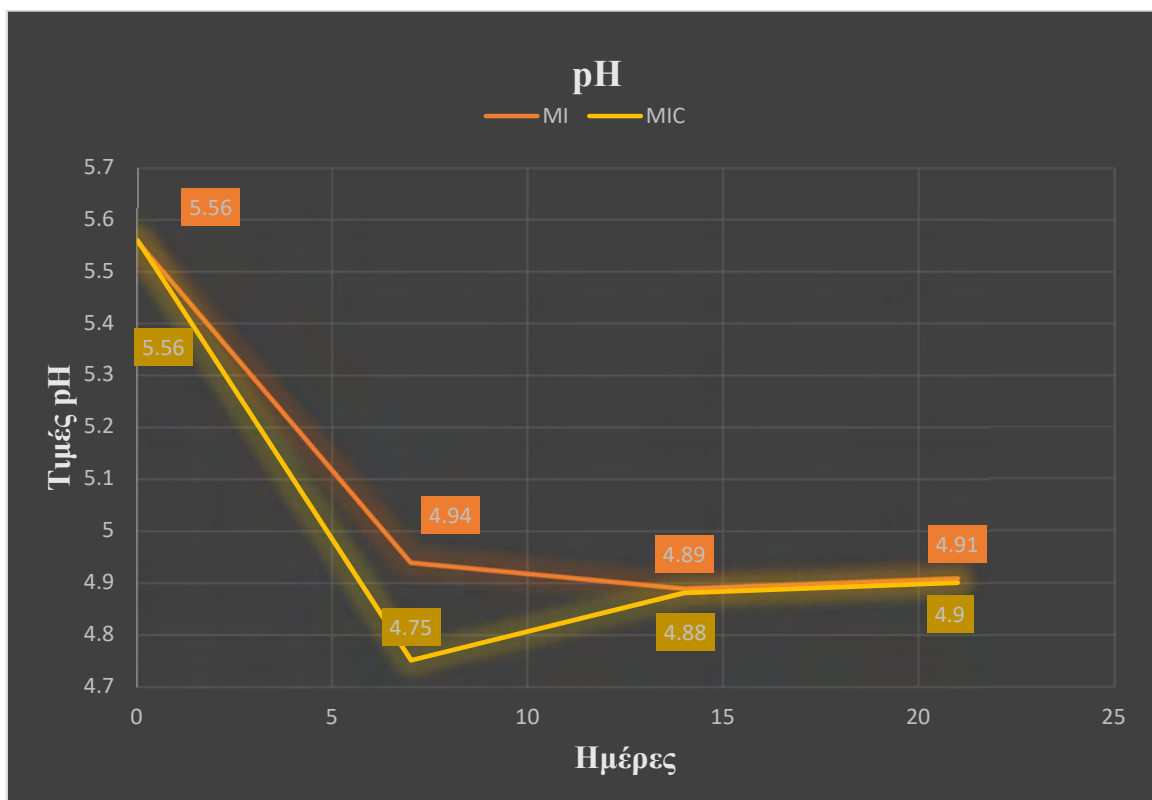
Η μέτρηση του συντελεστή ενεργού νερού έγινε στις ομάδες MIC και MI. Στο πείραμα που διενεργήσαμε φαίνεται ότι την πρώτη ημέρα πειραματισμού d 0 υπήρξε διαφορά 0,12 στις τιμές του συντελεστή ενεργού νερού με την ομάδα MI να σημειώνει την υψηλότερη τιμή 0,967 και την ομάδα MIC 0,955. Στην συνέχεια η διαφορά που προέκυψε υπέρ της MIC παρέμεινε σταθερή κατά την διάρκεια του πειράματος χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική ($P>0,05$). Σύμφωνα με τον Young και τους συνεργάτες του (1982), η χιτοζάνη επηρεάζει το συντελεστή ενεργότητας του νερού δεσμεύοντας μόριά του. Στην παρούσα πειραματική εργασία τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά δείχνοντας ότι η δράση της δεν επηρέασε το συντελεστή ενεργού ύδατος (Γράφημα 5).



Γράφημα 5. Μεταβολή τιμών συντελεστή ενεργού νερού ομάδων MI και MIC κατά την διαδικασία ωρίμασης στο παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας.

3.3 Μεταβολές της ενεργού οξύτητας (pH)

Οι μετρήσεις του pH έγιναν στις ομάδες ΜΙ και ΜΙC (Γράφημα 6). Η τιμή του pH και για τις δύο ομάδες ήταν 5,56 κατά την έναρξη του πειράματος. Τις επόμενες μέρες παρατηρήθηκε πτώση του pH και για τις δύο ομάδες. Συγκεκριμένα, η ομάδα ΜΙ εμφάνισε τιμή pH 4,94 και η ομάδα ΜΙC 4,75 την έβδομη μέρα. Το pH σταθεροποιήθηκε κατά την 14^η και 21^η μέρα του πειράματος και στις δύο ομάδες. Η αρχική πτώση του pH έρχεται να δικαιολογηθεί και βιβλιογραφικά από τους Γεωργιάκης και τους συνεργάτες του (2002), αλλά και στην έρευνα των Kaban & Kaya (2006) κατά την οποία στα σουτζούκια που χρησιμοποιήθηκαν με χρήση αρχικής καλλιέργειας το pH από 5,9 σημείωσε απότομη πτώση, με την τιμή του να κατεβαίνει στις 4,6 μονάδες παρουσιάζοντας μέσα σε 7 ημέρες. Παρόμοιες τιμές και μεταβολές σημειώθηκαν και στην δική μας έρευνα κατά την ίδια χρονική περίοδο. Στην έβδομη μέρα παρατηρείται μεταβολή της τιμής του pH, με την ομάδα ΜΙC να καταγράφει τιμή 4,75, ενώ η ομάδα ΜΙ να καταγράφει τιμή 4,94 που είναι μη στατιστικά σημαντική ($P>0,05$) ως προς την δράση της χιτοζάνης. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η χιτοζάνη δεν επηρέασε το pH στις ομάδες αυτές.



Γράφημα 6. Μεταβολή τιμών pH των ομάδων ΜΙ και ΜΙC κατά την διαδικασία ωρίμασης στο παραδοσιακό σουτζούκι Καισαρείας.

3.4. Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η διερεύνηση της επίδρασης της προσθήκης κάποιων ουσιών επί των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών παραμέτρων ενός τροφίμου αποτελεί σημαντική διαδικασία που τα αποτελέσματά της λαμβάνονται υπόψη πριν την εφαρμογή τους στη βιομηχανική παραγωγή ενός τροφίμου. Εξίσου σημαντική και αποφασιστικής σημασίας είναι η επίδραση που ασκεί η υπό διερεύνηση ουσία και στην προκείμενη περίπτωση η χιτοζάνη, στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τροφίμου, διότι καθορίζει την αποδοχή ή μη του προϊόντος από τους καταναλωτές και τελικά τη δυνατότητα να σταθεί εμπορικά. Οι παράμετροι όπως η γεύση, η εμφάνιση, το χρώμα και γενικότερα η συνολική αποδοχή του προϊόντος αποτελούν σημαντικές συνιστώσες της ποιότητας του τροφίμου, όπως τις αντιλαμβάνεται ο καταναλωτής και επομένως βασικά κριτήρια αποδοχής ή απόρριψης του τροφίμου.

Οι αντίστοιχες βαθμολογίες των οργανοληπτικών χαρακτήρων γεύση, άρωμα, χρώμα, συνολική αποδοχή παρατίθενται στον Πίνακα 8 του Παραρτήματος. Οι οργανοληπτικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν την d 7 και την d 21 μέρα του πειραματισμού. Η πρώτη αξιολόγηση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών έγινε στα σουτζούκια των ομάδων Μ και ΜC. Οι ομάδες που είχαν χιτοζάνη στην επιφάνειά τους (SC) δεν εξετάστηκαν γιατί θα έπρεπε να γίνει η αφαίρεση της θήκης τους πριν την κατανάλωσή τους. Η πρώτη αξιολόγηση την d 7 αποτέλεσε τη βάση για όλες τις περαιτέρω συγκρίσεις μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων. Όλες οι εξεταζόμενες παράμετροι έλαβαν αρκετά υψηλή βαθμολογία (>7,5) και για τις δύο ομάδες, δείχνοντας την καλή ποιότητα τεχνολογίας παραγωγής του. Επίσης, όλες οι εξεταζόμενες τιμές και στις δύο μετρήσεις δεν διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο ως προς την δράση της χιτοζάνης ($P>0,05$).

Οι Darmadji και Izumimoto (1994) αναφέρουν ότι η προσθήκη χιτοζάνης σε βόειο κιμά βελτιώνει τους οργανοληπτικούς του χαρακτήρες και αυξάνει την αποδοχή του από τους καταναλωτές. Ομοίως, ο Saultos και οι συνεργάτες του (2008) καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη χιτοζάνης σε νωπά λουκάνικα παραδοσιακού τύπου, βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους. Σύμφωνα με την έρευνα των Gokmen & Ümit (2011) φαίνεται ότι συγκεντρώσεις χιτοζάνης 0,05%, 0,1% και 0,5 % βοηθούν στην βελτίωση των οργανοληπτικών και μικροβιολογικών χαρακτηριστικών, ενώ η χρήση χιτοζάνης σε ποσοστό άνω του 1%, μπορεί να επιδράσει αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αλλά και να δημιουργήσει προβλήματα στην διαδικασία παραγωγής του σουτζουκιού. Στην παρούσα έρευνα η χρήση χιτοζάνης 1% δεν φαίνεται να επηρέασε το προϊόν αρνητικά όσον αφορά τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα έρευνα, εξετάστηκε η επίδραση της χιτοζάνης στον έλεγχο της ανάπτυξης του *S. aureus* κατά την ωρίμαση του παραδοσιακού σουτζουκιού Καισαρείας.

Η δράση της χιτοζάνης ενάντια στον *S. aureus* αλλά και της υπόλοιπης μικροβιακής χλωρίδας κατά την ωρίμαση του σουτζουκιού βασίστηκε στις μικροβιολογικές, φυσικοχημικές και οργανοληπτικές εξετάσεις που έγιναν. Τα συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν ήταν:

- Η χιτοζάνη στη μάζα του σουτζουκιού δεν εμπόδισε την ανάπτυξη του *S. aureus* των λακτοβακίλλων, της OMX και των κολοβακτηριοειδών.
- Αντίθετα η δημιουργία βιομεμβράνης της χιτοζάνης στην επιφάνεια των σουτζουκιών φάνηκε να επιδρά antimicrobικά επί του *S. aureus* μέχρι την 7^η ημέρα. Δηλαδή κατά τα πρώτα κυρίως στάδια της ωρίμασης των σουτζουκιών, κατά τα οποία είναι πιο αυξημένος ο κίνδυνος πολλαπλασιασμού του εφόσον δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως τα μικροβιολογικά και φυσικοχημικά (pH, aw) εμπόδια.
- Η χιτοζάνη δε φάνηκε να επηρεάζει τον πληθυσμό των φυσικώς απαντώμενων στο κρέας λακτοβακίλλων οι οποίοι ανεμπόδιστα πολλαπλασιάστηκαν και συνέβαλαν στην ωρίμαση των σουτζουκιών και στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών του χαρακτηριστικών. Η οργανοληπτική εξέταση μάλιστα, έδειξε πως δεν επηρεάστηκαν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με την παρουσία της χιτοζάνης στη κρεατόμαζα των σουτζουκιών τα οποία ήταν ικανοποιητικά αποδεκτά από τους δοκιμαστές.

Συνοψίζοντας, με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, εν αναμονή της αξιολόγησης των πιθανών ή μη τοξικών επιδράσεων της και δεδομένου μάλιστα του παραδοσιακού χαρακτήρα του προϊόντος, δεν θα προτείναμε τη χρήση της ακόμη και ως βιομεμβράνης στην εξωτερική επιφάνεια των σουτζουκιών. Ιδιαίτερα για τη χρήση της ως προστατευτικής βιομεμβράνης, θα θεωρούσαμε λογικό να γίνουν επιπλέον έρευνες και με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς που αφορούν στη δημόσια υγεία και που μπορεί να μολύνουν τα σουτζούκια τύπου Καισαρείας.

Βιβλιογραφία

Ξένη Βιβλιογραφία

Adıgüzel, G., & Atasever, M. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4130–4138.

Aiedeh, K., Taha, M.O. (2001), Synthesis of iron-crosslinked chitosan succinate and iron cross linked hydroxamated chitosan succinate and their in vitro evaluation as potential matrix materials for oral theophylline sustained-release beads, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 159–168.

Anette, McLeod, Ingrid Mage, Even Heir, Lars Axelsson, Askild L. Holck (2016), Effect of relevant environmental stresses on survival of enterohemorrhagic Escherichia coli in dry-fermented sausage, *International Journal of Food Microbiology* 229, 15–23.

Apaydın, G., Ceylan, Z. G., & Kaya, M. (2009), the behavior of E. coli O157:H7 in sucuk, *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 827–836.

Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., N. Acosta, G. G. (2009), Functional characterization of chitin and chitosan, *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.

Argudin, M.A., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R. (2010), Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins, *Toxins* 1751–1773.

Arvanitoyannis, I.S., Nakayama A., Aiba, S. (1998). Chitosan and gelatine based edible Films: state diagrams, mechanical and permeation properties, *carbohydrate Polymers* 37, 371–382.

Aykut B., Erkenn O. (2008), Survival of *Listeria monocytogenes* in Sucuk during Manufacturing and Storage Periods at Different Modified Atmosphere, Vol. 13, No. 5, p. 49-58.

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

Bangladesh, J. Agril. (2014), Production and characterization of chitosan from shrimp waste, *Univ. J* 12(1): 153–160.

Baris Yalinkilic, Güzin Kaban, Mükerrerem Kaya. (2012), the effects of different levels of orange fiber and fat on microbiological, physical, chemical and sensorial properties of sucuk, *Food Microbiology* 29 (2012) 255-259.

Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters, G., Von Eiff, C. (2003), Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1434–1439.

Chung, Y.C., Su, Y.P., Chen, C.C., Jia, G., Wang, H.L., Wu, J.C.G., Lin, J.G. (2004), Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall, *Acta Pharmacologica Sinica* 25, 932–936.

Con, A. H., & Gökalp, H. Y. (1998), Türkiye pazarındaki sucukların bazı kimyasal ve mikrobiyolojik nitelikleri, *Gıda*, 23(5), 347–355.

Cribby S, Taylor M, Reid G. (2008), vaginal microbiota and the use of probiotics, *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2008:256490

Darmadji P, Izumimoto M. (1994), Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Sci*, 38, 243-254.

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, p.703-714.

Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S. (2004), Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research* 63, 20–31.

Eaton P., Fernandes, J., Pereira, E., Pintado, M., & Xavier-Malcata, F. (2008), Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosan's on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Ultramicroscopy*, 1128-1134.

EFSA. (2013), the European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011, *EFSA J*, 3129.

El-Gaouth, A., Arul, J., Asselin, A., & Benhamou, N. (1992), Antifungal activity of Chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological Alterations in *Rhizopus stolonifer*. *Mycological Research*, 96 (9), 769-779.

Erkmen, O., & Bozkurt, H. (2004), Quality characteristics of retailed Sucuk (Turkish Dry-fermented sausage), *Food Technology and Biotechnology*, 41(1), 63–69.

European Union Reference Laboratory for Coagulase Positive Staphylococci, Maisons-Alfort, France.

Fernández-López, J., Sayas-Barberá, E., Muñoz, T., Sendra, E., Navarro, C., & Pérez-Álvarez, J. (2008), Effect of packaging conditions on shelf-life of ostrich. *Meat Science*, 78, 143-152.

Fetsch A., M. Contzen, K. Hartelt A. Kleiser , S. Maassen, J. Rau, B. Kraushaar, F. Layer, B. Strommenger (2014), *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream, *International Journal of Food Microbiology* 187 (2014) 1–6.

French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses), Food Safety Laboratory of Maisons-Alfort.

Furusaki, E., Ueno, Y., Sakairi, N., Nishi, N., & Tokura, S. (1996), facile preparation and inclusion ability of a chitosan derivative bearing carboxymethyl- β -cyclodextrin. *Carbohydrates Polymers*, 9, 29-34.

Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G., Georgakis S. (2007), Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C, *Meat Science* 76, 172–181.

Gill, C. (2004), Microbiological spoilage of meat. In R. Robinson, C. Batt, & P. Patel, *Encyclopedia of food microbiology* (pp. 1324-1330), London, UK: Academic Press.

Gokmen Mukadderat, Ümit gurbuz. (2011), Use of Chitosan in Turkish Sausage (Sucuk) Production and Effects on Quality, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*17 (Suppl A): S67-S71

Gonzalez-Fandos, M.E., Sierra, M., Garcia-Lopez, M.L., Garcia-Fernandez, M.C. and Otero, A. (1999), the influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spanish dry sausages (chorizo and salchichon). *Meat Sci*, 52: 411–419.

Guan, Y., Fu, Q., & Zhu, L. (1997). *Application and Explore*, 2, 35.

Gükalp, Hiisnii Yusuf, Ahmet, Yaman, & Con, Ahmet Hilmi (1998), Some Characteristics of Lactic Acid Bacteria Present in Commercial Sucuk Samples, *Meat Science*, Vol. 49, No. 4, 387-397

Gürakan, G. C., Bozoğlu, T. F., & Weiss, N. (1995), Identification of Lactobacillus strains from Turkish-style dry fermented sausages, *LWT—Food Science and Technology*, 28, 139–144.

Güzin Kaman, (2013), Sucuk and pastırma: Microbiological changes and formation of volatile compounds, *Meat Science* 95, 912–918.

Hadwiger, L. A. Kendra, D. G. Fristensky, B. W. & Wagoner, W. (1981), Chitosan both activated genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi, in: “Chitin in nature and technology”. *Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C. & Gooday, G. W. (Eds.)*, Plenum, New York.

Hamed, I., Ozugul, F., Regenstein, J.M. (2015), Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitoooligosaccharides): A review, *Trends in Food Science & Technology*, doi: 10.1016.

Hancock, S., Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., Rouxhet, P.G. (Eds.). (1991), Cell surface analysis, *VCH Publishers, Weinheim*, p. 23.

Helander I.M, Nurmiaho-Lassila EL, Ahvenainen R, Rhoades J, Roller S. (2001), Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of gram-negative bacteria, *Int J Food Microbiol.* 2001 71(2-3):235-44.

Helander, I.M., Wright, A.V., Mattila-Sandholm, T.M. (1997), Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria, *Trends in Food Science and Technology* 8, 146–150.

Hennekinne Jacques-Antoine, Marie-Laure De Buyser & Sylviane Dragacci. (2012), *Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation*, *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Jul, 36(4):815-36

Hüdayi Ercoskun, Sami Gökhan Özkal. (2010), Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation, *Food Control* 22 (2011) 165-172.

Hui Y. H., Özgül E. Evranuz. (2012), *Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition*, CRC Press, May 2012.

Huseyin Bozkurt and Osman Erkmén. (2004), Effect of nitrate/nitrite on the quality of sausage (sucuk) during ripening and storage, *J Sci Food Agric* 84:279 – 286.

Jane. D. Love, A. M. Pearson. (1971), Lipid oxidation in meat and meat products-A review, *Journal of the American Oil Chemists' Society, Volume 48, Issue 10*, pp 547-549.

Jiang Z., Neetoo H., Chen H. (2011), Control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using based-chitosan antimicrobial coatings and films, *Journal of food Science* Vol. 76, Nr.1.

Jing, Y.-J., Hao, Y.-J., Qu, H., Shan, Y., Li, D.-S., & Du, R.-Q. (2007), Studies on the antibacterial activities and mechanisms of chitosan obtained from cuticles of housefly larvae. *Acta Biologica Hungarica*, 58, 75-86.

Jo C., Lee J.W., Lee K.H., Byun M.W. (2001), Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer, *Meat Science* 59, 369–375.

José M. Lorenzo, Aida Cachaldora, Sonia Fonseca, María Gómez, Inmaculada Franco, Javier Carballo. (2010), Production of biogenic amines “in vitro” in relation to the growth phase by Enterobacteriaceae species isolated from traditional sausages, *Meat Science* 86, 684–691.

Illum, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharmaceutical Research*, 15 (9), 1326-1331

- Kaban, G., & Kaya, M.** (2008), Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (Sucuk), *Journal of Food Science*, 73, M385–M388.
- Kaban, G., & Kaya, M.** (2009a), the effects of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on the quality characteristics of dry fermented sausage “Sucuk”. *Journal of Food Science*, 74(1), S58–S63.
- Kaban, G., & Kaya, M.** (2009b), Effects of *Staphylococcus carnosus* on quality characteristics of sucuk (Turkish dry fermented sausage) during ripening, *Food Science and Biotechnology*, 18, 150–156.
- Kaban, G., Kaya, M.** (2006), Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. *Food Cont.* 17 (10), 797-801.
- Kang, D.H. and Fung, D.Y.C.** (2000), Stimulation of starter culture for further reduction of foodborne pathogens during salami fermentation. *J Food Protect*, 63(11): 1492–1495.
- KFDA.** (1995), *Food additives code*, Korea Food and Drug Administration, (pp. 449-451) Seoul, Korea: KFDA.
- Kluytmans, J.A.J.W., Wertheim, H.F.L.** (2005), Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. *Infection* 3–8.
- Knorr, D.** (1986). Nutritional quality, food processing, and biotechnology aspects of chitin and chitosan: A review. *Process Biochemistry*, 6, 90-92.
- Kong, M., Chen, X.G., Liu, C.S., Yu, L.J., Ji, Q.X., Xue, Y.P., Cha, D.S., Park, H.J.** (2008b), Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing System. *Frontiers of Materials Science in China* 2, 214–220.
- 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, 51-63.
- Kotter, L., G. Terplan und Gervasani G.** (1962), Physikalisch-chemische Vorgänge bei der Fabrikation schnittfester Rohwurst, II, Mitteilung, *Fleischwirtschaft* 14, 175.
- Kotula, A., Berry, B., & Emswiler-Rose, B.** (1987), Microbiology of restructured meat and poultry products. In A. Pearson, & T. Dutson, *Advances in Meat Research* (Vol. 3, pp. 161-220).
- Krki N., Sojic B., Lazic V., Petrovic L., Mandic A., Sedej I., Tomovic V.** (2013), Lipid oxidative changes in chitosan-oregano coated traditional dry fermented sausage Petrovská klobása, *Meat Science* 93, 767-770.

Leistner L. (1996), Hurden-Technologie für die Herstellung stabile Fleischerzeugnisse *Mitteilungblatt der BAFF* Nr.84, 5882.

Lin K-W., Chao J.Y. (2001), Quality characteristics of reduced-fat Chinese-style sausage as related to chitosan's molecular weight, *Meat Science* 59,343–351.

Lior Y.L., Baron, F. & Gautier M. (2003), *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic and Molecular Research*, 2, 63–76.

Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li Z & Yao K. D. (2001), Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan, *Appl. Polymer Sci.*, 79, p. 1324-1335.

Lucke, F. K., & Hechelmann, H. (1985), Starterkulturen für Rohwurst und rohschinken zusammensetzung und wirkung, *Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken*, Kulmbach: Bundesanstalt für Fleischforschung, (pp. 193–218).

Mohamed E. I. Badawy, Entsar I. Rabea. (2011), A Biopolymer Chitosan and Its Derivatives as Promising Antimicrobial Agents against Plant Pathogens and Their Applications in Crop Protection, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*.

Muzzarelli, R. & Muzzarelli C. (2006), Chitosan as a dietary supplement and a food Technology agent. In C. Biliaderis, & M. Izydorczyk, *Functional Food Carbohydrates* (pp. 215-247). Boca Raton, USA: CRC Press.

Muzzarellia R., Boudrantb J., Meyerc D., Mannod N., DeMarchisd M., Paoletti M. (2012), Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial, *Carbohydrate Polymers* 87, 995– 1012.

No, H., Meyers, S., 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.

Orgaz B., Lobete M.M., Puga C.H., San Jose C. (2011), Effectiveness of Chitosan against Mature Biofilms Formed by Food Related Bacteria, *International Journal of Molecular Sciences*,12(1), 817-828.

Osman Erkmen, Hüseyin Bozkurt. (2004), Quality Characteristics of Retailed Sucuk, *Food Technol. Biotechnol.* 42 (1) 63–69.

Osman Erkmen. (2009), Survival of *Staphylococcus aureus* and aerobic bacteria in sucuks made from starter culture and *Thymbra spicata* during manufacturing and storage, *food and bioproducts processing* 87, 62–67.

Özdemir, H. (1999), Türk fermente sucuğunun florasındaki dominant laktobasil türlerinin sucuğun organoleptik nitelikleri ile ilişkisi, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 46, 189–198.

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

Park P.-J., Je J.-Y., & Kim, S.-W. (2004), Free radical scavenging activities of Different, deacetylated chitosans using an ESR spectrometer, *Carbohydrate Polymers*, 55, 17-22.

Park, P.-J., Koppula, S., & Kim, S.-K. (2011), Antioxidative activity of chitosan, chitooligosaccharides and their derivatives, Kim, *Chitin, chitosan, oligosaccharides and their derivatives* (pp. 241-250), Boca Raton, USA: CRC Press.

Pezacki W. (1999), Technologische Steuerung des Aromas und Geschmacks von Rohwuersten, *Fleischwirtschaft* 72, 1935.

Pradip Kumar Dutta, Joydeep Dutta and V S Tripathi. (2004), Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications, *Journal of Scientific & Industrial Research Vol. 63*, pp 20-31.

Raafat, D, von Bargaen, K.; Haas, A. & Sahl, H. G. (2008), Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound, *Appl. Environ. Microbiol.* 74, p.3764-3773.

Rajalakshmi A., N. Krithiga and A. Jayachitra. (2013), Antioxidant Activity of the chitosan Extracted from Shrimp Exoskeleton, *Middle-East Journal of Scientific Research* 16 (10): 1446-1451.

Ravi-Kumar, M. (2000), A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.

Rejane C. Goy, Douglas de Britto, Odilio B. G. Assis. (2009), A Review of the antimicrobial activity of chitosan, *Polimeros Ciência e Tecnologia*, vol. 19, nº 3, p. 241-247.

Rinaudo M. (2006), Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31, 603-632.

Rodriguez-Nunez J., Lopez-Cervantes J., Sanchez-Machado D., Ramirez-Wong B., Torres-Chavez P. & Cortez-Rocha M.O. (2012), Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Food Science and Technology* , 47, 2127–2133.

Roller S., Covill N. (1999), the antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice, *International Journal of Food Microbiology.*, 1; 47(1-2):67-77.

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.

Shahidi, F., & Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan and co-products: Chemistry, productions, applications and health effects. *Advances in Food and Nutrition Research*, 49, 93-135

Shahidi, F., Arachchi, J., & Jeon, Y. (1999), food applications of chitin and chitosans, trends in food science and technology, 10, 37-51.

Siripatrawan U., Noipha N. (2012), Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages, *Food Hydrocolloids*, 27, 102-108.

Soultos N, Tzikas Z, Abraham A, Georgantelis D, and Ambrosiadis I. (2008), Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages. *Meat Sci*, 80, 1150-1156.

Sridhari T R & Dutta P K. (2000), Synthesis and characterization of maleilated chitosan for dye house effluent, *Indian J ChemTech*, 7, 198.

Stossel P, J. L. Leuba. (1984), Effect of Chitosan, Chitin and some Aminosugars on Growth of Various Soilborne Phytopathogenic Fungi, *Journal of phytopathology Volume* 111, Issue 1, pages 82–90.

Sudarshan, N.R., Hoover, D.G., Knorr, D. (1992), Antibacterial action of chitosan, *Food Biotechnology* 6, 257–272.

Takahashia, T., Imaia, M., Suzukia, I., Sawai, J. (2008), Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated by the deacetylation degree, *Biochemical Engineering Journal* 40, 485–491.

Tao W, Linchun M. (2009), Application of chitosan to maintain the quality of kamaboko gels made from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) during storage, *J Food Process Pres*, 33, 218-230.

Tikhonov, V., Stepnova, E., Babak, V., Yamskov, I., Palma-Guerrero, J., Jansson. H.-B. (2006), Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives, *Carbohydrate Polymers*, 64 (1), 66-72.

Toan N.V, Hanh T.T., and Thien P.V.M. (2013), Antibacterial Activity of Chitosan on Some Common Food Contaminating Microbes, *the Open Biomaterials Journal*, 4, 1-5.

Toan, N.V. (2009), Production of Chitin and Chitosan from Partially Autolyzed Shrimp Shell Materials. *The Open Biomaterials Journal*. 1:21-24.

Tsai, G., Zhang, S., & Shieh, P. (2004), antimicrobial activity of a low-molecular weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan, *Journal of Food Protection*, 67 (2), 396-398.

Turantas F. (1991), the effect of usage Glucono-Delta-lacton, saccarose, nitrite, garlic and starter culture on the survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Turkish soudjouk. *PhD Thesis, Ege Univ. Graduate Institute of Science, Izmir, Volume 2011*, Article ID 460381, 29 pages.

Wang GH. (1992), Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan, *J Food Protect*, 55, 916-919.

Wang X, Yumin Du, Lihong Fan, Hui Liu, Ying Hu. (2005), Chitosan- metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study, *Polymer bulletin, Volume 55*, Issue 1, pp 105-113.

Weiner, M. (1992), an overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. In C. Brine, P. Sandford, & J.Zikakis, *Advances in chitin and chitosan* (pp. 663–670), London, UK: Elsevier.

Verna EC, Lucak S. (2010), Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap. Adv. Gastroenterol.* 3:307–319

Xia, W. S., Y. N. Wu. (1996), Functional properties of chitooligosaccharides, *J. Wuxi University Light Industry*, 15: 297-302

Xie Y.J., Liu, X.F., Chen, Q. (2007), Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity, *Carbohydrate Polymers* 69,142–147.

Young, D. H. & Kauss, H. (1983) - *Plant Physiol.*, 73, p.698-702.

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

Zheng L.-Y., Zhu J.-F. (2003), Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights, *Carbohydrate Polymers* 54, 527–530.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Γεωργάκης, Σ., Βαρελτζής, Κ. , & Αμβροσιάδης, Ι. (2002). *Τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης*. Θεσσαλονίκη, Ελλάδα: Σύγχρονη Παιδεία.

Κομοδρόμος, Δημήτριος Ι. (2012), *Συνδυαστική επίδραση των μεμβρανών ιόντων Ag⁺-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, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Διαδικτυακή βιβλιογραφία

<http://www.miran.gr>, Προσπέλαση την 25/5/2016.

<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/426e>, Προσπέλαση την 6/6/2016.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης έναντι της *E.coli*. (Zheng & Zhu, 2003) (Σελ. 4).

MW (kDa)	Ρυθμός μείωσης			
	Συγκέντρωση χιτοζάνης			
	0.25%	0.5%	0.75%	10%
<5	50	60	90	100
48.5	30	80	90	100
72.4	5	10	50	100
129	0	5	90	100
166	0	40	80	100
305	0	40	50	100

Πίνακας 2. Αντιμικροβιακή δράση της χιτοζάνης έναντι του *S.aureus* (Zheng & Zhu, 2003) (Σελ. 4).

MW (kDa)	Ρυθμός μείωσης			
	Συγκέντρωση χιτοζάνης			
	0.25%	0.5%	0.75%	1.0%
0,5	0	0	0	0
48,5	0	95	99	100
72.4	0	96	99	100
129	40	100	99	100
166	95	100	100	100
305	99	100	100	100

Πίνακας 3. Ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις χιτοζάνης έναντι διαφόρων μικροοργανισμών (Goy et al., 2009) (Σελ. 6).

Μικροοργανισμός - Στόχος	Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (ppm)
Gram -	
<i>Escherichia coli</i>	>20-1000
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	>250-1000
<i>Salmonella enterica</i>	>2000-3000
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1000-2000
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	>150-1000
Gram +	
<i>Bacillus cereus</i>	>800
<i>Listeria monocytogenes</i>	>150-800
<i>Staphylococcus aureus</i>	>20-1250
Μύκητες & Ζύμες	
<i>Candida albicans</i>	>500-1250
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>2000

Πίνακας 4. Εφαρμογές χιτοζάνης στην βιομηχανία σύμφωνα με (Hamed et.al,2015) (Σελ. 8).

Πεδία εφαρμογής της χιτοζάνης στην βιομηχανία	Παραδείγματα εφαρμογών
Φαρμακοβιομηχανία	<ul style="list-style-type: none"> -Φαρμακευτικό συστατικό -Μη ικός φορέας για μεταφορά γονιδίων -Γονίδια και ενεργή προστασία, ενθυσλάκωση - Βελτίωση στη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων σε τραύματα - Σταδιακή απελευθέρωση φαρμακευτικών ουσιών
Βιοιατρική	<ul style="list-style-type: none"> -Στην αναγέννηση ιστών - Φραγμός στη μόλυνση ιστών από μικρόβια -Χειρουργικά ράμματα
Τρόφιμα	<ul style="list-style-type: none"> -Προστατευτικός φραγμός έναντι της αλλοίωσης των τροφίμων - Πρόσθετα συντηρητικά τροφίμων και σχηματισμό βιομεμβράνης (βρώσιμη συσκευασία) - Σταθεροποιητές και πυκνωτικές ενώσεις - Ως πρεβιοτικά (διαιτητικές ίνες) συστατικά
Υφαντουργία	<ul style="list-style-type: none"> - Αντιμικροβιακές και μη αλλεργιογόνες ίνες - Πηκτικός και κροκκιδοτικός παράγοντας για βαφές και χημική απομάκρυνση χημικών αποβλήτων υφαντουργίας -Χηλικός παράγοντας που απομακρύνει τα βαρέα μέταλλα από μολυσμένο νερό
Γεωργία	<ul style="list-style-type: none"> - Επικάλυψη σπόρων - Ενίσχυση των φυτών στην άμυνα και την προστασία έναντι των παρασίτων και μικροοργανισμών - Αντικατάσταση χημικών φυτοφαρμάκων - Επιτάχυνση στην ανάπτυξη των σπόρων βλάστησης
Παραγωγή χαρτιού	<ul style="list-style-type: none"> - Ενίσχυση της αντοχή του χαρτιού στην υγρασία - Βιοδιασπώμενες συσκευασίες για τρόφιμα

Ένζυμα- ακινητοποίηση	-Αδρανοποίηση ενζύμων σε υλικά με βάση χιτοζάνη/χιτίνη (κρασί, ζάχαρη, και υγρά απόβλητα επεξεργασίας για αφαίρεση ρύπων) - Βιοαισθητήρες κατασκευής για in situ μετρήσεις των περιβαλλοντικών ρύπων και τον έλεγχο των μεταβολιτών σε τεχνητά όργανα
-----------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Πίνακας 5. Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή του σουτζουκιού Καισαρείας (Σελ. 10).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΓΙΑ 10 Kg
Βοδινό κρέας (λιποπεριεκτικότητας 12%), ελιά ή σπάλα	8,2 Kg
Βοδινό λίπος σκληρό	1,8 Kg
Αλάτι	175 g (έως το πολύ 250g)
Ζάχαρη	50 g
Σκόρδο φρέσκο	200 g
Μπαχάρι	111 g
Κίμινο	111 g
Κόκκινο πιπέρι γλυκό	107 g
Πιπέρι μαύρο	53 g
Κανέλα	11 g
Γαρύφαλλο	3 g

Πίνακας 6. Συνταγή σουτζουκιού στο 1 Kg (Σελ. 22).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΓΙΑ 1 Kg
Βοδινό κρέας (λιποπεριεκτικότητα 12%), ελιά ή σπάλα	0,82 Kg
Βοδινό λίπος σκληρό	0,18 Kg
Αλάτι	17,5 g
Ζάχαρη	5 g
Σκόρδο φρέσκο	20 g
Μπαχάρι	11,1 g
Κίμινο	11,1 g
Κόκκινο πιπέρι γλυκό	10,7 g
Πιπέρι μαύρο	5,3 g
Κανέλα	1,1 g
Γαρύφαλλο	0,3 g

Πίνακας 7. Μεταβολές των πληθυσμών του *S. aureus* και των άλλων υπό εξέταση μικροοργανισμών κατά την διάρκεια ωρίμασης των παραδοσιακών σουτζουκιών Καισαρείας (Σελ. 28).

Ημέρα	Δείγμα	Πληθυσμός			
		OMX	<i>Enterobacteria ceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
0	MI	6,76±0,347	5,93±0,025	4±0,0	5,7±0,56
	MIC	6,85±0,84	5,49±0,055	4±0,0	5,65±0,048
	SI	3,37±0,01	5,15±0,321	2,4±0,01	4,1±0,12
	SIC	3,38±0,015	5,18±0,293	2,4±0,01	4,02±0,02
7	MI	8,69±0,067	4,35±0,325	3,72±0,091	8,4±0,017
	MIC	8,56±0,073	4,1±0,382	3,38±0,141	8,66±0,082
	SI	7,12±0,209	4.14±0.5	4,21±0,113	6,82±0,0322
	SIC	6,74±0,188	4.14±0.5	3,51±0,102	6,76±0,028
14	MI	8,65±0,125	3,95±0,398	3,87±0,032	8,91±0,031
	MIC	8,79±0,283	3,83±0,424	3,72±0,014	8,74±0,052
	SI	7±0,609	3,48±0,088	6,72±0,428	7,14±0,088
	SIC	6,93±0,55	3,99±0,033	6,8±0,064	7,22±0,217
21	MI	8,78±0,081	3±0,022	3±1,65	8,99±0,056
	MIC	8,68±0,215	2,9±0,028	4,15±0,062	8,9±0,038
	SI	7,18±0,299	3,89±0,093	6,65±0,024	7,21±0,077
	SIC	6,97±0,128	3,85±0,04	6,01±0,074	7,31±0,167

-οι πληθυσμοί MI και MIC εκφράζονται σε log cfu/gr.

-οι πληθυσμοί SI και SIC εκφράζονται σε log/cm².

-κάθε τιμή αποτελεί τον (ΜΟ) 2 πειραμάτων και 2 σειρών εξέτασης για κάθε μικροοργανισμό.

-τις τιμές αυτές ακολουθεί το τυπικό στατιστικό σφάλμα.

Πίνακας 8. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα βαθμολογιών των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών της ομάδας των εξεταστών (Σελ. 35).

Ημέρα	Δείγμα	Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά				
		Γεύση	Χρώμα	Εμφάνιση	Συνολική αποδοχή	Μέσος όρος παραμέτρων
7	M	7,8±0,23	7,76±0,28	8,1±0,2	7,9±0,25	7,89±0,13
	MC	7,75±0,23	7,68±0,28	8±0,2	7,85±0,25	7,82±0,12
21	M	7,6±0,22	7,63±0,32	7,42±0,23	7,49±0,21	7,54±0,08
	MC	7,52±0,22	7,55±0,33	7,56±0,23	7,51±0,21	7,6±0,02

-Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο (ΜΟ) της βαθμολογίας, δώδεκα (n=12) διαφορετικών αξιολογητών.