



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ
ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ *Escherichia coli* O157:H7 ΣΕ ΤΥΡΙ
ΑΝΕΒΑΤΟ »**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΝΤΑΛΛΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ
ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ Escherichia coli O157:H7 ΣΕ ΤΥΡΙ
ΑΝΕΒΑΤΟ »**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΝΤΑΛΛΑ ΔΕΣΠΟΙΝΑ
ΠΤΥΧΙΟΥΧΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2018

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΓΚΟΒΑΡΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ (ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

ΠΕΞΑΡΑ ΑΝΔΡΕΑΝΑ (ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ)

ΣΟΛΩΜΑΚΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ (ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ ΠΘ)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΡΙΓΑΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΣ *Escherichia coli* O157:H7 ΣΕ ΤΥΡΙ ΑΝΕΒΑΤΟ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του παθογόνου *E.coli* O157:H7 σε τυρί «ΑΝΕΒΑΤΟ» κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε θερμοκρασία 4°C.

Σε δείγματα τυριού που συσκευάστηκαν υπό αερόβιες συνθήκες ενοφθαλμίστηκε *E.coli* O157:H7 σε πληθυσμούς 2 και 4 log cfu/g, χαμηλό και υψηλό ενοφθάλμισμα, αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστέθηκε αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0,1 και 0,2% που ήταν η ανώτερη αποδεκτή στον οργανοληπτικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε και τα δείγματα συντηρήθηκαν στην ψύξη για 1 μήνα.

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής εξέτασης έδειξαν ότι η *E.coli* O157:H7 όταν ενοφθαλμίστηκε σε χαμηλούς αρχικούς πληθυσμούς (2 log cfu/g) επιβίωσε μέχρι την 20^η, την 10^η και την 5^η ημέρα της συντήρησης στην ψύξη στα δείγματα με την προσθήκη 0%, 0,1% και 0,2% ΑΕ ρίγανης, αντίστοιχα. Ομοίως στα δείγματα του ανεβατού με το υψηλό αρχικό ενοφθάλμισμα (4log cfu/g), η *E.coli* O157:H7 επιβίωσε μέχρι την 30^η ημέρα στους μάρτυρες και μέχρι την 20^η και 15^η ημέρα όταν το ΑΕ ρίγανης προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 0,1 και 0,2%, αντίστοιχα.

Λέξεις κλειδιά: Ανεβατό, *E.coli* O157:H7, αιθέριο έλαιο ρίγανης

ABSTRACT

Aim of this work was to study the antimicrobial effect of oregano essential oil against *E.coli* O157:H7 in samples of cheese “anevato”, a traditional Greek cheese.

In control anevato samples inoculated with the pathogen, results showed that *E. coli* O157:H7 survived up to 15 and 30 days of storage inoculated with low and high populations, respectively. However, in anevato cheese treated with oregano EO at the dose of 0.1 ml/100 g, *E. coli* O157:H7 survived up to 10 and 20 days, whereas at the dose of 0.2 ml/100 g up to 5 or 15 days inoculated with low and high populations, respectively. Results showed that treatment of samples with the essential oil exhibited antibacterial activity against the pathogen.

Key-words: Anevato cheese, *E.coli* O157:H7, oregano essential oil

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	7
ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	10
1.1 Η ιστορία του τυριού	10
1.2 Προέλευση ονόματος τυριού	11
1.3 Ταξινόμηση τυριών	11
1.3.1 Ταξινόμηση ελληνικών τύπων τυριών	12
1.3.2 Τυριά ΠΟΠ & ΠΓΕ.....	14
1.3.2.1 Προδιαγραφές.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	18
ΑΝΕΒΑΤΟ.....	18
2.1 Ορισμός.....	18
2.2 Προϋποθέσεις του προς τυροκόμηση γάλακτος	18
2.3 Τεχνολογία παρασκευής τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ» (ΑΝΕΒΑΤΟ).....	19
2.4 Προέλευση ονομασίας.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	21
3.1 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά τυριών	21
3.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του τυριού «ΑΝΕΒΑΤΟ»	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	24
ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ	24
4.1 Escherichia coli.....	24
4.1.1 Ανεύρεση της E.coli.....	24
4.1.2 Η E.coli ως «δείκτης μόλυνσεως».....	25
4.1.3 Κατηγορίες των στελεχών της E. coli	26
i. Εντεροτοξινογόνα (enterotoxinogenic ETEC)	26
ii. Εντεροπαθογόνα (enteropathogenic EPEC).....	26
iii. Εντεροδιδεισδυτικά (enteroinvasive EIEC)	27
iv. Διάχυσης – προσκόλλησης (diffuse –adhering DAEC)	27
v. Εντεροσυσσωρευόμενα (enteroaggregative EAggEC)	27
vi. Εντεροαιμοραγικά (enterohemorrhagic EHEC)	27
4.1.4 Τοξίνες.....	28
4.2 E.coli O157:H7	29
4.2.1 Ιστορία της E.coli O157:H7.....	29

4.2.2 Χαρακτηριστικά E. coli O157:H7	29
4.2.3 Ανίχνευση της E.coli O157:H7	29
4.2.4 Πηγές και Τρόποι Μετάδοσης της E.coli O157:H7	30
4.2.5 Συμπτώματα	31
4.2.6 Έλεγχος της E.coli O157:H7	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	33
ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ	33
5.1 Γενικά στοιχεία για τις μεθόδους συντήρησης των τροφίμων	33
5.2 Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες	34
5.4 Χρήση και σύσταση αιθέριων ελαίων	35
5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα και την ποιότητα των αιθέριων ελαίων	39
5.6 Αντιβακτηριακή δράση αιθέριων ελαίων και μηχανισμός	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο	45
ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ	45
6.1 Η ρίγανη	45
ΠΕΙΡΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	54
2.1. Σκοπός της εργασίας	55
2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
2.2.1 Παθογόνα βακτήρια	55
2.2.2. Αιθέριο έλαιο ρίγανης	55
2.2.3. Παρασκευή των δειγμάτων	55
2.2.5. Μικροβιολογική ανάλυση	57
2.2.5. Οργανοληπτικός έλεγχος	57
2.2.5. Φυσικοχημικός έλεγχος	58
2.2.5. Στατιστική επεξεργασία	58
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	58
2.3.1. Φυσικοχημικός έλεγχος	58
2.3.2. Οργανοληπτικός έλεγχος	58
2.3.2. Μικροβιολογική εξέταση	60
2.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	63

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κύριο Σολωμάκο Νίκο (Επίκουρο Καθηγητή του ΠΘ) για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής διατριβής, τη βοήθεια και την πολύτιμη καθοδήγησή του στην εκτέλεση του πειράματος και στη σύνταξη της πτυχιακής.

Πολλές ευχαριστίες εκφράζονται στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κύριο Γκόβαρη Αλέξανδρο (Καθηγητής ΠΘ) και κυρία Πεξαρά Ανδρέα (Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΘ), για τις χρήσιμες υποδείξεις και διορθώσεις τους στη διπλωματική διατριβή.

Σε όλα τα άτομα που βρέθηκαν δίπλα μου και με στήριξαν στην προσπάθεια αυτή.

ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Ελληνικά παραδοσιακά τυριά ΠΟΠ.	Σελίδα: 16
Πίνακας 4.1: Ανεύρεση της <i>E. coli</i> σε τρόφιμα και άλλες πηγές στην Ελλάδα.	Σελίδα: 25
Πίνακας 5.1: Παρουσίαση των κυριότερων συστατικών κάποιων αιθέριων ελαίων που εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Burt, 2004) .	Σελίδα: 38
Πίνακας 6.1: Προφίλ αιθέριων ελαίων (%) ρίγανης: <i>Origanum vulgare ssp.hirtum</i> (φύλλα και ταξιανθίες). (Economou et al.,2011)	Σελίδα: 49

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1.1 Η ιστορία του τυριού

Το τυρί θεωρείται ότι έκανε την πρώτη του εμφάνιση στην Μεσοποταμία. Περίπου στα 5000 π.Χ. ανακαλύφθηκε ότι η αποθήκευση ζεστού γάλακτος σε φρέσκο στομάχι προβάτου ή κατσίκας, σχηματίζει τυρόπηγμα (Malcata, 1991). Το ένζυμο ρεννίνη που υπάρχει στο στομάχι του ζώου συμβάλλει στην πήξη του γάλακτος και στην παραγωγή τυροπήγματος.

Το τυρί ήταν επίσης γνωστό και στους αρχαίους Σουμερίους και Έλληνες τέσσερις χιλιάδες χρόνια πριν τη γέννηση του Χριστού. Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία η τέχνη της τυροκομίας δόθηκε ως πολύτιμο δώρο στους θνητούς από τους θεούς του Ολύμπου. Σύμφωνα με άλλο μύθο, η ανακάλυψη του τυριού χρεώνεται στον Αριστέα, γιο του Απόλλωνα. Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν το γάλα ιερή τροφή γιατί ο Δίας, κυνηγημένος από τον πατέρα του Κρόνο, κρύφτηκε με την βοήθεια της μητέρας του Ρέας και τράφηκε με το γάλα της ιερής κατσίκας Αμάλθειας. Επιπλέον, ο Δίας προκειμένου να θρέψει το γιο του Ηρακλή με θεϊκό γάλα ώστε να γίνει αθάνατος, προκάλεσε κατάκλιση του ουρανού από γάλα και έτσι γέμισε ο ουρανός με γαλαξίες (milk way). Ο θεός Ερμής κατατάσσεται μεταξύ των ποιμενικών θεοτήτων και αποκαλείται «Κριοφόρος», «Μηλλοσός» (προστάτης των προβάτων) και «Τηρευτής» (ο κατασκευαστής του τυριού). Η κόρη του Σαλμωνέα και της Αλκιδίκης, η Τυρώ φημιζόταν «...δια την λευκότητα και την του σώματος μαλακότητα ταύτης της προσηγορίας έτυχεν...» όπως γράφει ο Διόδωρος ο Σικελός.

Από τον Όμηρο είναι γνωστό ότι ο Οδυσσέας με τους συντρόφους του μπήκε στη σπηλιά του κύκλωπα Πολύφημου όπου είδαν τα ράφια γεμάτα τυριά και τις σκάφες πλημμυρισμένες με τυρόγαλα. Στην Παλαιά Διαθήκη αναφέρεται σε τουλάχιστον 40 σημεία το βόειο γάλα, το βούτυρο και το τυρί. Σε ελληνικά κείμενα που χρονολογούνται από το 1550 π.Χ. πολλοί Έλληνες και Ρωμαίοι συγγραφείς αναφέρουν ότι το τυρί αποτελούσε κομμάτι της διατροφής των αρχαίων. Επιπλέον, από εκείνη την περίοδο, η τυροκομία θεωρείτο μια βολική μέθοδος μετατροπής ενός μεγάλου μέρους του γάλακτος σε ένα προϊόν με καλύτερη συντήρηση, με μεγάλη θρεπτική αξία, εύγευστο και εύπεπτο. Η τέχνη της παραγωγής τυριού είχε ξεκινήσει να αναπτύσσεται και υπάρχουν κείμενα που περιγράφουν τον τρόπο παραγωγής του. Την περίοδο του 400 π.Χ. ο Έλληνας γιατρός και ιστορικός Κτησίας αναφέρει ότι κατά την παράδοση η Σεμίραμις (Βασίλισσα της Ασσυρίας που ίδρυσε τη Βαβυλώνα και τους κρεμαστούς κήπους της το 800 π.Χ.) τρεφόταν από τυρί που της το έφερναν πουλιά κλέβοντάς το από τους βοσκούς.

Στη Ρωμαϊκή εποχή, τα μεγάλα ρωμαϊκά σπίτια είχαν ξεχωριστούς χώρους, όπου το τυρί μπορούσε να ωριμάσει. Σε μεγάλες πόλεις η τυροκόμηση γίνονταν σε ειδικά κέντρα στα οποία παράγονταν και καπνιστά τυριά. Σε αυτήν την περίοδο η παραγωγή τυριού

γινόταν με δεξιοτεχνία και γνώση και έφτασε σε υψηλό επίπεδο. Η διαδικασία ωρίμανσης αναπτυσσόταν εμπειρικά και ήταν γνωστό ότι διάφορες διεργασίες και συνθήκες κατά την αποθήκευση είχαν ως αποτέλεσμα διαφορετικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά.

Από τα χριστιανικά χρόνια και μέχρι τον 15^ο αιώνα υπήρξε μία σταδιακή αύξηση στην παραγωγή γάλακτος και το τυρί εισήχθη στη διατροφή των Ευρωπαίων. Στο τέλος αυτής της περιόδου η κατανάλωση τυριού στην Ευρώπη ήταν η υψηλότερη από οποιαδήποτε άλλη περίοδο στην ιστορία του ανθρώπου που κυμαινόταν από 25-50 kg/άτομο (Ανυφαντάκης, 1993). Κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα, οι μοναχοί έγιναν καινοτόμοι και σε αυτούς χρωστάμε πολλές από τις κλασικές ποικιλίες τυριών που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά. Κατά την περίοδο της Αναγέννησης υπήρξε πτώση της απήχησης του τυριού, λόγω του ότι θεωρήθηκε ανθυγιεινό, αλλά επανέκαμψε τον 19^ο αιώνα, την εποχή που υπήρξε η μεταφορά από την οικιακή στην εργοστασιακή παραγωγή. Το 1851 αναφέρεται ότι δημιουργήθηκε η πρώτη βιομηχανία τυριού στις Η.Π.Α. και φαίνεται πως από τότε άρχισε η αλματώδης πρόοδος της τυροκομίας.

1.2 Προέλευση ονόματος τυριού

Οι αρχαίοι Έλληνες έλεγαν “τυρί” το προϊόν που προερχόταν από την πήξη του γάλακτος. Οι Λατίνοι, λόγω του σχήματος του τυριού, το ονόμασαν Caseus. Από τη λατινική αυτή λέξη προήλθε η ιταλική ονομασία του τυριού Cascio, η ισπανική Queso, η γερμανική Käse, η αγγλική Cheese, η ολλανδική Kaas, κ.λπ. Μεταγενέστερα από την ιταλική λέξη Forma (δηλαδή καλούπι) ονομάστηκε το τυρί στα ιταλικά Formaggio και στα γαλλικά Fromage.

1.3 Ταξινόμηση τυριών

Τα πολλά ονόματα και οι παραλλαγές των τυριών κάνουν την ταξινόμηση τους αρκετά δύσκολη, αν όχι αδύνατη. Περίπου 500 είδη τυριών είναι αναγνωρισμένα από τη Διεθνή Γαλακτοκομική Ομοσπονδία (International Dairy Federation, IDF). Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για την κατάταξη των τυριών σε ομάδες. Η συνεκτικότητα, η υγρασία, η υγρασία στο άνευ λίπους τυρί, η εμφάνιση, ο τρόπος παρασκευής τους, το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε, η λιποπεριεκτικότητα, το λίπος % επί της ξηράς ουσίας του τυριού, ο χρόνος ωρίμανσης, ο τρόπος πήξης του γάλακτος και πολλά άλλα έχουν προταθεί σαν κριτήρια ταξινόμησης τους (Ανυφαντάκης, 2004).

Σύμφωνα με τη μελέτη της ICAP (2010), που αφορά τα τυροκομικά προϊόντα, τα τυριά διακρίνονται ως εξής:

- Ανάλογα με το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή τους σε:

- Αγελαδινά
 - Πρόβεια
 - Κατσικίσια
 - Βουβαλίσια κτλ.
- Ανάλογα με την υγρασία που περιέχεται στην μάζα τους σε:
- Πολύ σκληρά τυριά (περιεχόμενη υγρασία λιγότερο από 32%)
 - Σκληρά τυριά (περιεχόμενη υγρασία 32-35 %)
 - Ημί-σκληρα τυριά (περιεχόμενη υγρασία 38-46 %)
 - Μαλακά τυριά (περιεχόμενη υγρασία 46-58 %)
 - Φρέσκα τυριά (περιεχόμενη υγρασία 58-75 %)
- Ανάλογα με τη λιποπεριεκτικότητα σε:
- Άπαχα τυριά (περιεκτικότητα σε λίπος επί ξηρής ουσίας χαμηλότερη του 25%)
 - Ημι-άπαχα τυριά (περιεκτικότητα σε λίπος επί ξηρής ουσίας μεταξύ 25-45%)
 - Λιπαρά τυριά (περιεκτικότητα σε λίπος επί ξηρής ουσίας υψηλότερη του 45%)
- Ανάλογα με τον χρόνο ωρίμασης σε:
- Αυτά που δεν ωριμάζουν και
 - Αυτά που ωριμάζουν
- Ανάλογα με τον τρόπο χρήσης σε:
- Επιτραπέζια
 - Τυριά για τυποποίηση ή μαγειρική χρήση

1.3.1 Ταξινόμηση ελληνικών τύπων τυριών

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης (2011), άρθρο 83, κατατάσσει τα τυριά με βάση την πρώτη ύλη από την οποία παρασκευάζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, από γάλα και από τυρόγαλα. Τα τυριά από γάλα διακρίνονται περαιτέρω, με κριτήριο την ωρίμανση, σε αυτά που ωριμάζουν και σε αυτά που δεν ωριμάζουν και έχουν αλοιφώδη υφή. Όσα ωριμάζουν κατατάσσονται σε τέσσερις κατηγορίες, πολύ σκληρά (η υγρασία τους δεν ξεπερνάει το 32%), σκληρά (η υγρασία τους δεν ξεπερνάει το 38%), ημίσκληρα (η υγρασία τους δεν ξεπερνάει το 46%) και μαλακά (η υγρασία τους δεν ξεπερνάει το 58%), τα οποία επιτρέπεται να διατίθενται στην κατανάλωση σε τέσσερις ποιότητες-εξαιρετική, πρώτη, δεύτερη και μερικώς αποβουτυρωμένη (εκτός των μαλακών λευκών τυριών άλμης) ανάλογα με την υγρασία και την λιποπεριεκτικότητά τους. Τα τυριά που δεν ωριμάζουν έχουν αλοιφώδη υφή και

επιτρέπεται να διατίθενται στην κατανάλωση στις παραπάνω ποιότητες. Τα τυριά τυρογάλακτος, με ή χωρίς ωρίμαση, διακρίνονται επίσης σε τέσσερις ποιότητες. Πιο συγκεκριμένα δίνονται οι εξής ορισμοί:

- Τυριά από γάλα με ωρίμαση «είναι τα προϊόντα ωρίμασης του πήγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν, με την επενέργεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε γάλα (νωπό ή παστεριωμένο, αγελάδος, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου και μίγματα αυτών) ή σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγμα αυτών ή/και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα)».
- Τυριά από γάλα χωρίς ωρίμαση με αλοιφώδη υφή χαρακτηρίζονται «τα φρέσκα (νωπά) τυριά που παρασκευάζονται με την επενέργεια αβλαβών οξυγαλακτικών καλλιεργειών βακτηρίων σε παστεριωμένο γάλα ή παστεριωμένο γάλα και παστεριωμένη κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα) και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 75%».
- Τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμαση χαρακτηρίζονται «τα τυριά τα οποία λαμβάνονται με ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος (με ή χωρίς οξίνιση) και με ή χωρίς προσθήκη γάλακτος (πρόσγαλα), γάλακτος και κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα) και βρώσιμου χλωριούχου νατρίου (κοινώς αλάτι), τα οποία μπορούν να διατεθούν νωπά (φρέσκα)[μερικά από αυτά μπορούν να διατεθούν και με μερική αφυδάτωση (ξερά) και άλλα κατόπιν ωρίμασης] και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%».

Επιπρόσθετα, θα πρέπει να αναφερθεί και η κατηγορία των ανακατεργασμένων ή διαφορετικά τηγμένων τυριών, τα οποία με τη σειρά τους διακρίνονται σε ανακατεργασμένα-τηγμένα τυριά και ανακατεργασμένα-τηγμένα τυριά με αλοιφώδη υφή. Ο ορισμός τους είναι ο εξής:

- Ανακατεργασμένα τυριά (processed cheese) ή τηγμένα τυριά και ανακατεργασμένα τυριά με αλοιφώδη υφή (spreadable processed cheese) ή τηγμένα τυριά με αλοιφώδη υφή χαρακτηρίζονται τα προϊόντα που παρασκευάζονται με άλεση, ανάμιξη, τήξη και γαλακτοματοποίηση διαφόρων ειδών τυριών με θέρμανση και προσθήκη γαλακτοματοποιητών και με ή χωρίς την προσθήκη προϊόντων γάλακτος και/ή άλλων τροφίμων.

1.3.2 Τυριά ΠΟΠ & ΠΓΕ

Στην Ευρώπη υπάρχει μία πληθώρα τυριών που παράγονται με ξεχωριστή μέθοδο και ιδιαίτερη γεύση, υφή και άρωμα τα οποία παίζουν σημαντικότατο ρόλο στην παράδοση κάθε τόπου.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση, παρόλη την ελεύθερη κυκλοφορία προϊόντων, υπηρεσιών και προσώπων, έχοντας αποδεχτεί τη διαφορετικότητα κάθε κράτους μέλους όσον αφορά τα έθιμα, τις παραδόσεις και την διατροφή θέσπισε τον κανονισμό 2081/192, για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων, ο οποίος αντικαταστάθηκε από τον κανονισμό 510/2006.

Σύμφωνα με τον κανονισμό αυτό, ως "Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης - ΠΟΠ" νοείται το όνομα μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται στην περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που κατάγεται από αυτήν την περιοχή, το συγκεκριμένο τόπο ή τη χώρα, και του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο γεωγραφικό περιβάλλον, που περιλαμβάνει τους φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και του οποίου η παραγωγή, η μεταποίηση και η επεξεργασία λαμβάνουν χώρα στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

Επίσης, ως "Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη - ΠΓΕ" νοείται το όνομα μιας περιοχής, ενός συγκεκριμένου τόπου ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις μιας χώρας, το οποίο χρησιμοποιείται στην περιγραφή ενός γεωργικού προϊόντος ή ενός τροφίμου που κατάγεται από αυτήν την περιοχή, το συγκεκριμένο τόπο ή τη χώρα, και του οποίου μία συγκεκριμένη ποιότητα, ή φήμη ή άλλο χαρακτηριστικό μπορούν να αποδοθούν στη γεωγραφική αυτή καταγωγή και του οποίου η παραγωγή ή και μεταποίηση ή και επεξεργασία πραγματοποιούνται στην οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή.

Όσον αφορά τα τυριά, οι φυλές των αγροτικών ζώων, ο τρόπος διαχείρισης και εκτροφής των ζώων, οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της περιοχής μαζί με την μέθοδο παρασκευής και ωρίμανσης των τυριών αποτελούν τους παράγοντες εκείνους οι οποίοι κάνουν ένα τυρί να ξεχωρίσει και να αποτελέσει τμήμα της παράδοσης μιας περιοχής.

Η προστασία των ονομασιών προέλευσης και των γεωγραφικών ενδείξεων μπορεί να αποτελέσει μοχλό ανάπτυξης των μειονεκτικών και απομακρυσμένων περιοχών, αυξάνοντας την αναγνωρισιμότητα των προϊόντων και κατά συνέπεια τα εισοδήματα των παραγωγών. Ταυτόχρονα, οι προστατευόμενες ονομασίες κατοχυρώνουν και τους καταναλωτές, σχετικά με την προέλευση και την ποιότητα των προϊόντων που αγοράζουν.

1.3.2.1 Προδιαγραφές

Οι 20 Προστατευόμενες Ονομασίες Προέλευσης των Ελληνικών τυριών έχουν ορισμένες κοινές προδιαγραφές. Παρασκευάζονται με παραδοσιακή τεχνολογία από γάλα το οποίο προέρχεται από φυλές αιγών, προβάτων ή και αγελάδων οι οποίες εκτρέφονται σε οριοθετημένη γεωγραφική περιοχή, έχουν προσαρμοστεί πλήρως στο περιβάλλον και η διατροφή τους βασίζεται στη χλωρίδα της περιοχής. Οι φυλές αυτές είναι πλήρως προσαρμοσμένες στις τοπικές συνθήκες και αξιοποιούν άριστα τους φτωχούς Ελληνικούς βοσκότοπους, με την εκπληκτική όμως ποικιλία ενδημικής βλάστησης.

Οι ντόπιες φυλές ζώων χαρακτηρίζονται για την χαμηλή γαλακτοπαραγωγή τους αλλά και για το ιδιαίτερα πλούσια χημικής σύστασης και εξαιρετικών οργανοληπτικών ιδιοτήτων γάλα τους.

Η παρασκευή και ωρίμανση των τυριών πραγματοποιούνται σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής. Κατά την παρασκευή τους απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

Οι ονομασίες στις οποίες έχει δοθεί προστασία υπάγονται σε σύστημα ελέγχου, ώστε να κατοχυρώνονται, τόσο οι παραγωγοί από απομιμήσεις, όσο και οι καταναλωτές από παραπλανητικές ενδείξεις στα τρόφιμα.

Οι έλεγχοι αφορούν στην ορθή τήρηση των προδιαγραφών και την ορθή χρήση της επισήμανσης. Απαγορεύεται η παραγωγή, εισαγωγή, εξαγωγή, διακίνηση και εμπορία τυριού με κάποια από τις Προστατευόμενες Ονομασίες Προέλευσης, εφόσον δεν πληρούνται όλες οι προδιαγραφές παραγωγής του.

1.4 Τα ελληνικά παραδοσιακά τυριά και οι τύποι αυτών

Τα ελληνικά παραδοσιακά τυριά είναι τα τυριά που παρασκευάζονται μέχρι και σήμερα με μεθόδους ή συνταγές που ακολουθούνταν στην Ελλάδα πριν τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο (1939) και την βιομηχανική επανάσταση των τροφίμων και μεταδόθηκαν με τον γραπτό ή τον προφορικό λόγο. Βέβαια, η διαδικασία παραγωγής τους προσαρμόζεται στους όρους που απορρέουν από την νομοθεσία και τις σύγχρονες τεχνολογικές εξελίξεις, με τρόπο που δεν αλλοιώνει τον παραδοσιακό τους χαρακτήρα (Trichoroulou et al. 2006). Είναι τυριά «χειροποίητα» ή μη βιομηχανοποιημένα, δηλαδή κατά την διαδικασία παραγωγής τους ακολουθούνται χειροποίητες μέθοδοι ή τεχνικές. Επιπλέον παράγονται από παραδοσιακές πρώτες ύλες (γάλα από ζώα ελεύθερης βοσκής) και δεν

χρησιμοποιούνται τεχνητά χημικά συντηρητικά αλλά παραδοσιακές μέθοδοι συντήρησης, όπως το αλάτισμα και το κάπνισμα.

Η Ελλάδα παρουσιάζει αφθονία σε παραδοσιακά τυριά εκ των οποίων τα περισσότερα χαρακτηρίζονται ως τυριά Π.Ο.Π και προστατεύονται σε κοινοτικό επίπεδο (χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης). Αυτά είναι τα εξής: Ανεβατό, Γαλοτύρι, Φέτα, Γραβιέρα Αγράφων, Γραβιέρα Κρήτης, Γραβιέρα Νάξου, Καλαθάκι Λήμνου, Κασέρι, Κατίκι Δομοκού, Κεφαλογραβιέρα, Κοπανιστή, Λαδοτύρι Μυτιλήνης, Μανούρι, Μετσοβόνη, Μπάτζος, Ξυνομυζήθρα Κρήτης, Πηχτόγαλο Χανίων, Σαν Μιχάλη, Σφέλα, Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού.

Πίνακας 1.1: Ελληνικά παραδοσιακά τυριά ΠΟΠ.

Όνομα τυριού	Περιοχή	Τύπος γάλακτος
Ανεβατό	Ν. Γρεβενών- επαρχία Βοΐου Κοζάνης	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Γαλοτύρι	Ήπειρος- Θεσσαλία	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Φέτα	Μακεδονία, Θράκη, Ήπειρος, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησος, Ν. Λέσβου, Θεσσαλία	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γίδινου έως 30% κ.β.
Γραβιέρα Αγράφων	Περιοχή Αγράφων	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γίδινου έως 30% κ.β
Γραβιέρα Κρήτης	Κρήτη	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γίδινου έως 20% κ.β.
Γραβιέρα Νάξου	Νάξος	Γάλα αγελαδινό ή μίγμα αυτού με πρόβειο και γίδινο έως 20% κ.β.
Καλαθάκι Λήμνου	Λήμνος	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γίδινου έως 30% κ.β.
Κασέρι	Μακεδονία, Θεσσαλία, Ν. Λέσβου- Ξάνθης	Γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο έως 20% κ.β.
Κατίκι Δομοκού	Δομοκός	Γάλα γίδινο ή μίγμα αυτού με πρόβειο
Κεφαλογραβιέρα	Δυτική Μακεδονία, Ήπειρος, Αιτωλοακαρνανία- Ευρυτανία	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γίδινου έως 10% κ.β.
Κοπανιστή	Κυκλάδες	Γάλα αγελαδινό, πρόβειο ή γίδινο
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	Μυτιλήνη	Γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο
Μανούρι	Θεσσαλία, Δυτική-	Τυρόγαλα από πρόβειο ή

	Κεντρική Μακεδονία	γίδινο γάλα ή μίγμα αυτών και γάλα πρόβειο ή γίδινο ή κρέμα αυτού
Μετσοβόνη	Μέτσοβο	Γάλα αγελαδινό ή μίγμα αυτού με πρόβειο και γίδινο έως 20% κ.β.
Μπάτζος	Θεσσαλία, Δυτική-Κεντρική Μακεδονία	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Ξυνομυζήθρα Κρήτης	Κρήτη	Τυρόγαλα από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Πηχτόγαλο Χανίων	Κρήτη	Γάλα γίδινο ή πρόβειο ή μίγμα αυτών
Σαν Μιχάλη	Σύρος	Γάλα αγελαδινό
Σφέλα	Ν. Μεσσηνίας- Λακωνίας	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Φορμαέλλα Παρνασσού	Αράχωβα	Γάλα γίδινο ή πρόβειο ή μίγμα αυτών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ANEBATO

Στην παρούσα εργασία γίνεται μελέτη του τυριού ανεβατό, για αυτό το λόγο είναι το μόνο από τα ελληνικά Π.Ο.Π. τυριά που περιγράφεται αναλυτικά η τεχνολογία παρασκευής του και άλλα στοιχεία που σχετίζονται με αυτό το προϊόν.

2.1 Ορισμός

Η ονομασία «ANEBATO» (ANEVATO) αναγνωρίζεται ως προστατευόμενη ονομασία προέλευσης (Π.Ο.Π.) για το τυρί που παράγεται παραδοσιακά στο Νομό Γρεβενών και στην επαρχία Βοΐου Νομού Κοζάνης, από γάλα πρόβειο, γίδινο ή μίγματα αυτών. Το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) πρέπει να προέρχεται αποκλειστικά από τις προαναφερθείσες περιοχές.

2.2 Προϋποθέσεις του προς τυροκόμηση γάλακτος

Το γάλα το οποίο χρησιμοποιείται για παρασκευή τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:

- α) Να προέρχεται από φυλές αιγών και προβάτων παραδοσιακά εκτρεφόμενων και προσαρμοσμένων στην περιοχή παρασκευής του τυριού αυτού και η διατροφή τους πρέπει να βασίζεται στη χλωρίδα της ίδιας περιοχής.
- β) Να προέρχεται από αμέλξεις, που γίνονται 10 ημέρες τουλάχιστον μετά τον τοκετό.
- γ) Να είναι καλής ποιότητας, νωπό ή παστεριωμένο
- δ) Η πήξη του γάλακτος να γίνεται εντός 48 ωρών από την άμελξη και μέχρι την πήξη να διατηρείται σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, σύμφωνα με τις κείμενες διατάξεις.

Επιπλέον απαγορεύεται η παρασκευή τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) από άλλο είδος γάλακτος πλην των καθοριζόμενων. Στο προς τυροκόμηση για παρασκευή τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) γάλα, απαγορεύεται η συμπύκνωση, η προσθήκη σκόνης ή συμπυκνώματος γάλακτος, πρωτεϊνών γάλακτος, καζεϊνικών αλάτων, χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών.

Ωστόσο, επιτρέπεται η προσθήκη παραδοσιακής πυτιάς ή άλλων ενζύμων με ανάλογη δράση, καθώς και καλλιεργείων αβλαβών οξυγαλακτικών βακτηρίων σε περίπτωση παστερίωσης του γάλακτος.

2.3 Τεχνολογία παρασκευής τυριού «ANEBATO» (ANEVATO)

1. Για την παρασκευή του τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) χρησιμοποιείται γάλα, το οποίο πρέπει να πληροί τις προϋποθέσεις του προς τυροκόμηση γάλακτος.
2. Το γάλα που προορίζεται για την παρασκευή τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) τοποθετείται σε χώρο με θερμοκρασία 18–22⁰C μέχρις ότου αποκτήσει οξύτητα 35⁰D περίπου. Στη συνέχεια τοποθετείται σε ψυκτικούς θαλάμους θερμοκρασίας 2-4⁰C, όπου παραμένει για 24 ώρες. Κατόπιν θερμαίνεται στους 12-14⁰C και προστίθεται σ' αυτό ποσότητα πυτιάς επαρκής να προκαλέσει την πήξη σε 12 περίπου ώρες. Ακολουθεί διαίρεση παραμονή του τυροπήγματος στον τυρολέβητα για 12 περίπου ώρες, στράγγιση, ξηρό επιφανειακό αλάτισμα και ωρίμανση του τυριού για δυο τουλάχιστον μήνες.
3. Η παρασκευή και ωρίμανση του τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) γίνεται σε εγκαταστάσεις που βρίσκονται εντός της περιοχής που αναφέρεται πιο πάνω.
4. Απαγορεύεται η χρήση χρωστικών, συντηρητικών και αντιβιοτικών ουσιών στο τυρί και στην άλμη.



Εικόνα 2.1: Τυπική μορφή του τυριού «ANEBATO».

Τα βασικά χαρακτηριστικά του τυριού «ANEBATO» (ANEVATO) (ποιοτικά, οργανοληπτικά, γευσιγνωστικά κ.λπ.) είναι:

Χημική σύσταση:

Μέγιστη υγρασία: 60% κατά βάρος

Ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού: 45% κατά βάρος

pH: 4.0- 4.5

Τύπος τυριού:

Μαλακό τυρί, κοκκώδους υφής.

Βάρη: Διάφορα

Μάζα τυριού: Μαλακή

Υφή: Κοκκώδης

Χρώμα: Λευκό

Άλλα κύρια χαρακτηριστικά: Μαλακό τυρί με υπόξινη ευχάριστη γεύση και άρωμα.

2.4 Προέλευση ονομασίας

Στον ορεινό όγκο από τις προαναφερθείσες περιοχές εκτρέφονταν μεγάλα κοπάδια αιγοπροβάτων. Οι βοσκοί το πρωί άρμεγαν τα ζώα, συγκέντρωναν το γάλα σε καζάνια και πρόσθεταν μικρή ποσότητα πυτιάς. Το βράδυ, μετά τη βοσκή των ζώων, το γάλα είχε πήξει και το τυρί είχε ανέβει προς τα πάνω και ξεχώριζε από το τυρόγαλο. Για το λόγο αυτό ονομάστηκε «ανεβατό». Μια φορά την εβδομάδα οι βοσκοί κατέβαιναν στα χωριά για να εφοδιαστούν με τρόφιμα και να προωθήσουν το «ανεβατό» στην αγορά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

3.1 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά τυριών

Στο τυρί απαντώνται διάφορα είδη μικροοργανισμών που προέρχονται είτε από το γάλα, είτε προστίθενται σε αυτό ως οξυγαλακτική καλλιέργεια, είτε τέλος από επιμολύνσεις κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών συμβαίνουν σημαντικές μεταβολές στους μικροβιακούς αυτούς πληθυσμούς. Οι μεταβολές αυτές αρχίζουν με την έναρξη της τυροκόμησης.

Οι θερμοκρασίες τυροκόμησης που είναι 32- 34°C καθώς και εκείνες της πρώτης φάσης ωρίμανσης των τυριών που είναι 14-18°C είναι ιδανικές για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. Όμως, για αρκετούς από αυτούς τους μικροοργανισμούς, καθώς προχωράει η διαδικασία της ωρίμανσης, το περιβάλλον του τυριού γίνεται δυσμενές για την ανάπτυξή τους. Η παραγωγή του γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της λακτόζης και η συνεπακόλουθη πτώση του pH, η μείωση της υγρασίας λόγω της στράγγισης, η αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος, ο μικροβιακός ανταγωνισμός που υπάρχει μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών και τέλος η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης, προκαλούν μείωση των περισσότερων μικροβιακών πληθυσμών. Η μείωση αυτή αφορά τόσο τους παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά και εκείνους που προκαλούν αλλοιώσεις στα τυριά.

Η συνδυασμένη επίδραση του pH και του NaCl έχει εκλεκτική δράση στα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και άλλων μικροοργανισμών που βρίσκονται στα τυριά. Τα είδη του γένους *Lactococcus* είναι σχετικά ευαίσθητα στο χαμηλό pH και τη μεγάλη συγκέντρωση του άλατος με συνέπεια ο πληθυσμός τους να μειώνεται. Τα είδη του γένους *Lactobacillus* είναι ανθεκτικά στο χαμηλό pH ενώ μερικά είδη του γένους αυτού είναι ανθεκτικά και στην υψηλή συγκέντρωση άλατος με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να παραμένει σχετικά μεγάλος (Tzanetakis and Litoroulou-Tzanetaki, 1992; Cassata et al., 1995). Ο πληθυσμός των ζυμών αυξάνεται γρήγορα και παραμένει σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη την ωρίμανση, κατά τη διάρκεια της οποίας μπορεί να εμφανίσει μικρή μείωση (Mansour and Alis, 1973). Οι ζύμες μπορούν ν' αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος pH (2,5- 8,0) και θερμοκρασίες (4-44°C). Ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται όταν η περιεκτικότητα σε NaCl αυξάνεται (Vivier et al., 1994). Γι' αυτό στα τυριά επικρατούν κυρίως ανθεκτικά στο αλάτι είδη ζυμών (Mansour and Alais, 1973). Οι Westall και Filtenborg (1998), παρατήρησαν ότι οι ίδιες ζύμες που βρέθηκαν στα τυριά βρέθηκαν και στους χώρους του τυροκομείου.

Τα κολοβακτήρια αυξάνονται στα πρώτα στάδια παραγωγής των τυριών και στη συνέχεια, μειώνονται με γρήγορο ρυθμό. Η μεγάλη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος σε συνδυασμό με το χαμηλό pH και τη χαμηλή θερμοκρασία επηρεάζουν την επιβίωση τους ενώ δεν επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του άλατος (Yanai et al, 1977). Εάν η πτώση του pH δεν είναι γρήγορη, αμέσως μετά την τυροκόμηση και η θερμοκρασία δεν

πέσει γρήγορα κάτω από τους 20°C, το τυρί εμφανίζει πολλές μικρές οπές που οφείλονται στην ανάπτυξη κολοβακτηρίων και στην παραγωγή αερίου.

Οι σταφυλόκοκκοι παρουσιάζουν μια σχετική αύξηση στην αρχή της ωρίμανσης και στη συνέχεια μειώνονται όταν το pH κατέλθει κάτω του 5. Αυτό οφείλεται στη συνδυασμένη δράση του γαλακτικού οξέος, του μικροβιακού ανταγωνισμού και των βακτηριοσινών (Litoroulou- Tzanetaki,1977;Tzanetakis and Litoroulou Tzanetaki, 1992; Erkmen, 1995).

Τα είδη του γένους *Staphylococcus* έχουν πρωτεολυτική και λιπολυτική δράση στα τυριά. Τα στελέχη του *S. aureus* που παράγουν εντεροτοξίνες, έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλασιάζονται κατά τις 2-3 πρώτες ώρες μετά την έναρξη της πήξης. Αρχικές συγκεντρώσεις μικρότερες του 10³CFU/ml γάλακτος είναι χαμηλότερες από την τιμή που απαιτείται για την παραγωγή τοξίνης. Αντίθετα, ο πληθυσμός τους μειώνεται καθώς το pHελαττώνεται και μηδενίζεται συνήθως μετά από 15- 30 ημέρες ωρίμανσης (Erkmen,1995; Μάντης,2000).

Οι εντερόκοκκοι αναπτύσσονται στα τυριά μετά την πήξη γάλακτος και προέρχονται είτε από το γάλα είτε από το περιβάλλον. Ανάλογα με το στάδιο της ωρίμανσης, η συγκέντρωση των κυττάρων μπορεί να φτάσει έως 10⁶-10⁸CFU/g τυριού (Fontecha et al.,1990; Basso et al., 1994). Οι γνώμες για την επίδραση των εντερόκοκκων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών είναι αντικρουόμενες. Η υψηλή συγκέντρωση των εντερόκοκκων μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες σε μερικά τυριά (Thompson and Marth,1986; Lopez- Diazeta.,1995). Αντιθέτως, άλλες εργασίες αναφέρουν ότι οι εντερόκοκκοι επιδρούν θετικά στην παραγωγή των τυριών.(Jensen et al., 1975b; Ordonez et a., 1978; Trovatelli and Schliesse,1987; Centeno et al.,1999).

3.2Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά του τυριού «ANEBATO

Μελέτη, στην οποία πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική εξέταση του τυριού «ANEBATO» για 60 ημέρες αποθήκευσης, σε τρεις διαφορετικές περιόδους κατά τη γαλακτική περίοδο, έδειξε τα παρακάτω αποτελέσματα: Υψηλές μέσες μετρήσεις ανά γραμμάριο τυριού για τα αερόβια βακτήρια (7.92–9.56 log CFU/g), τα οξυγαλακτικά βακτήρια (7.78–9.32 log CFU/g), τα Gram- αρνητικά βακτήρια (5.64–9.67 log CFU/g), τα ψυχότροφα(7.90–11.79 log CFU/g) και τα πρωτεολυτικά βακτήρια (7.57–9.36 log CFU/g). Τα *Enterobacteriaceae*, τα κολοβακτηρίδια και οι ζύμες ήταν σημαντικά πιο χαμηλά.

Τα *Enterobacteriaceae* και τα κολοβακτηρίδια στο τυρόπηγμα του Μαΐου ήταν χαμηλότερα κατά περίπου 3.0 log CFU/g από τις μετρήσεις του τυροπήγματος του Ιανουαρίου, που ήταν χαμηλότερα κατά περίπου 2.5 log CFU/g από εκείνα του τυριού του Μαρτίου. Αυτό συνέπεσε με χαμηλότερο pH και υψηλότερες μετρήσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων στο τυρί του Μαρτίου και του Μαΐου.

Οι πληθυσμοί των ζυμομυκήτων επηρεάστηκαν από την εποχή και ήταν υψηλότεροι το Μάιο απ' ό τι το Μάρτιο και τον Ιανουάριο.

Οι λακτόκοκοι κυριαρχούσαν στο τυρί για 15 ημέρες, αλλά οι λακτοβάκιλλοι κυριάρχησαν μετά από 30 ημέρες. Το *Lactococcus lactis* ήταν αυτό το οποίο υπήρχε σε αφθονία από όλα τα είδη των γαλακτικών βακτηρίων που βρέθηκαν στο τυρί Ανεβατό (Hatzikamari et al.).

Τα αποτελέσματα για τα τυριά του Ιανουαρίου, Μαρτίου και Μαΐου αντίστοιχα, δείχνουν ότι, γενικά, οι μικροβιακές μετρήσεις των τυριών ήταν υψηλές. Για αυτές τις αυξήσεις μπορεί να οφείλεται η παραμονή του τυροπήγματος για στράγγιση 5-6 ώρες που υποδεικνύεται από μία μείωση του pH από 5.13- 4.47 και από τη φυσική παγίδευση των μικροοργανισμών στο τυρόπηγμα (Tatini et al. 1971). Ωστόσο, τα *Enterobacteriaceae* και τα κολοβακτηρίδια μειώθηκαν κατά την στράγγιση, κατά πάσα πιθανότητα λόγω των δυσμενών συνθηκών που δημιουργούνται από την αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του κατώτερου pH (Hatzikamari et al.).

Επιπλέον, τα *Enterobacteriaceae* και τα κολοβακτηρίδια μειώνονταν σταδιακά κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Αυτά εξαφανίστηκαν γρήγορα από το τυρί του Μαΐου. Επίσης, φάνηκε ότι τα υψηλότερα αρχικά επίπεδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων και το χαμηλότερο pH στο τυρί του Μαρτίου μπορεί να συνέβαλαν στη μεγαλύτερη μείωση των πληθυσμών των *Enterobacteriaceae* και των κολοβακτηριδίων σε αυτό το τυρί απ' ό τι στο τυρί του Ιανουαρίου. Το αλάτι στο τυρί του Μαρτίου ήταν ελάχιστο (< 2%) και δεν είχε καμία επίδραση στην ανάπτυξή τους. Όμως, ο συνδυασμός του pH και του αλατιού θα μπορούσε να έχει κάποια επίδραση. Ωστόσο, το αλάτι θα μπορούσε να έχει σημαντική επίδραση στη μικροβιακή μείωση στο τυρί του Μαΐου, όπου ανιχνεύτηκε υψηλότερη συγκέντρωση άλατος (Hatzikamari et al.).

Σημαντικό επίσης είναι να σημειωθεί, ότι κατά την αποθήκευση του τυριού μπορεί να ανιχνευτεί η ύπαρξη των *Enterobacteriaceae* και των κολοβακτηριδίων, η οποία δείχνει μόλυνση μετά την επεξεργασία (Arvanitoyannis et al.).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ

Τα εντεροβακτηριοειδή αποτελούν οικογένεια Gram αρνητικών, μη σπορογόνων βακτηρίων, ακίνητων ή κινητών με περίτριχες βλεφαρίδες. Αναπτύσσονται σε κοινά θρεπτικά υλικά και διασπούν ζυμωτικά τη λακτόζη, παράγοντας οξέα ή οξέα και αέρια. Ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, είναι προαιρετικά αναερόβια και δίνουν αρνητική την αντίδραση της οξειδάσης.

Τα εντεροβακτηριοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση, διαβιούν στο έδαφος και στο νερό, αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα του εντερικού σωλήνα, ενώ σπανιότερα απαντώνται στο αναπνευστικό σύστημα του ανθρώπου και των ζώων. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει και είδη παθογόνα ή δυνητικώς παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Μερικά είδη είναι σαπρόφυτα ή παθογόνα για τα φυτά. Στην οικογένεια αυτή υπάρχουν 14 γένη: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* και *Yersinia*. (Παπαπαναγιώτου, 1994).

4.1 Escherichia coli

Η *E.coli* είναι βακτήριο αρνητικό κατά Gram κινητό ή ακίνητο. Ζυμώνει τη γλυκόζη και τη λακτόζη με παραγωγή οξέος και αερίου. Η απομόνωσή της ορολογικά πραγματοποιείται βάση τρία στρωματικά αντιγόνα από τα οποία διαθέτει 174 σωματικά (O), 56 βλεφαριδικά (H) και 80 έλυτρο (K). Τα περισσότερα γένη της *E. coli* είναι αβλαβή παράσιτα, ωστόσο όμως ορισμένα γένη της είναι παθογόνα και προκαλούν διάρροιες.

4.1.1 Ανέγερση της E.coli

Η *E.coli* βρίσκεται πάντα στα κόπρανα του ανθρώπου και των ζώων, δηλαδή είναι πάντοτε εντερικής προέλευσης και για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ως δείκτης εντερικής μόλυνσης του νερού και των τροφίμων. Έχει απομονωθεί από τον άνθρωπο, από όλα τα ζώα, το χώμα, τον αέρα, τα έντομα, τα ιχθυρά, το νερό και τα τρόφιμα. Μεταδίδεται από τα κόπρανα, τον αέρα και το νερό, καθώς επίσης και από άνθρωπο σε άνθρωπο. Τα παιδιά και οι ηλικιωμένοι είναι οι πιο ευαίσθητοι. Παρακάτω δίνονται ορισμένα παραδείγματα απομονώσεων της *E. coli* από διάφορες πηγές στην Ελλάδα.

Πίνακας 4.1: Ανεύρεση της *E. coli* σε τρόφιμα και άλλες πηγές στην Ελλάδα.

Τρόφιμα	Άλλες πηγές
Γάλα, Τυριά, Βούτυρο, Φρούτα, Γιαούρτι, Κεφίρ, Κηπευτικά, Γλυκά και Παγωτά, Κρέας, Ιχθυρά Είδη ζαχαροπλαστικής, Οστρακοειδή, Μαργαρίνες, Αλλαντικά, Ρώσικη σαλάτα, Κατεψυγμένα κρέατα, Σταφίδα σουλτανίνα, Νερό	Αέρας, Έντομα, Τσιγάρα, Θαλασσινό νερό, Απόβλητα, Κόπρανα ανθρώπων και ζώων, Στοματική κοιλότητα

4.1.2 Η *E.coli* ως «δείκτης μόλυνσεως»

Ιδιαίτερη σημασία έχει η αναζήτηση της *E.coli* στο νερό και στα τρόφιμα. Η ανεύρεση του κολοβακτηριδίου αυτού αποτελεί δείκτη κοπρανώδους μόλυνσεως από ζώα ή ανθρώπους. Κατά τη μικροβιολογική εξέταση ενός τροφίμου προσδιορίζεται ο «κολοβακτηριδιακός δείκτης», ο αριθμός δηλαδή των κολοβακτηριδίων ανά 100 ml ή g τροφίμου. Η κοπρανώδης μόλυνση είναι επικίνδυνη, γιατί μέσω αυτής είναι δυνατό να μεταφερθούν στο τρόφιμο παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι αποβάλλονται μέσω των κοπράνων από τον εντερικό σωλήνα ασθενών ή φορέων. Τέτοιοι μικροοργανισμοί, εκτός της *E.coli* είναι οι Σαλμονέλες, οι Σιγκέλλες και το Δονάκιο της χολέρας, τα οποία είναι δύσκολο να απομονωθούν. Η απόδειξη της κοπρανώδους μόλυνσεως καθώς και η πιθανή μόλυνση με παθογόνα γίνεται έμμεσα με την ανίχνευση του κολοβακτηριδίου το οποίο βρίσκεται μονίμως στον εντερικό σωλήνα (Παπαπαναγιώτου, 1994).

Επειδή η παρουσία μεγάλου αριθμού κολοβακτηριοειδών και *E.coli* στα τρόφιμα είναι ανεπιθύμητη, ενώ η απουσία τους από τα νωπά και ορισμένα επεξεργασμένα τρόφιμα είναι σχεδόν ανέφικτη, έχουν καθοριστεί μικροβιολογικές προδιαγραφές που καθορίζουν τον επιτρεπόμενο αριθμό των παραπάνω μικροοργανισμών στα τρόφιμα λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παρακάτω:

1. Υπό κατάλληλες συνθήκες συλλογής, επεξεργασίας, αποθήκευσης και μεταφοράς των τροφίμων, ποιος είναι ο χαμηλότερος δυνατός και εφικτός να διατηρηθεί σε χαμηλά επίπεδα πληθυσμός των κολοβακτηριοειδών;
2. Ποιος είναι ο πληθυσμός των κολοβακτηριοειδών ή της *E. coli* που αποτελεί ένδειξη ότι το προϊόν είναι ασφαλές;

Με βάση τα παραπάνω στα περισσότερα τρόφιμα επιτρέπεται η παρουσία χαμηλού πληθυσμού κολοβακτηριοειδών που κυμαίνεται από 1 έως 100/g ή ml.

4.1.3 Κατηγορίες των στελεχών της *E. coli*

Τα γένη της *E. coli* που προκαλούν διάρροια κατηγοριοποιούνται σε ξεχωριστές ομάδες με βάση τις μολυσματικές τους ιδιότητες, τους μηχανισμούς παθογένειας, τα κλινικά τους σύνδρομα και την αναλογία των Ο:Η αντιγόνων.

Αυτές οι κατηγορίες περιλαμβάνουν τα:

- i. Εντεροτοξινογόνα (enterotoxinogenic ETEC).
- ii. Εντεροπαθογόνα (enteropathogenic EPEC).
- iii. Εντεροδιδεισδυτικά (enteroinvasive EIEC).
- iv. Διάχυσης – προσκόλλησης (diffuse –adhering DAEC)
- v. Εντεροσυσσωρεύμενα (enteroaggregative EAaggEC)
- vi. Εντεροαιμοραγικά (enterohemorrhagic EHEC) (Βαγιωνά, 2010).

i. Εντεροτοξινογόνα (enterotoxinogenic ETEC)

Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη αποτελούν την κύρια αιτία παιδικής διάρροιας στις ανεπτυγμένες χώρες, καθώς επίσης ευθύνονται συχνά για τη λεγόμενη «διάρροια των ταξιδιωτών». Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη αποικούν στο λεπτό έντερο μέσω ινωδών αποικιακών μηχανισμών (CFA/I και CFA/II) και παράγουν μια θερμο-ασταθή ή μια θερμο-σταθερή εντεροτοξίνη, η οποία προκαλεί συσσώρευση υγρών και διάρροια. Οι συχνότερα εμφανιζόμενοι εντεροτοξινογόνοι ορότυποι είναι οι O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O85, O115, O128ac, O148, O159 και O167.

Ο άνθρωπος αποτελεί την κύρια πηγή των εντεροτοξινογόνων στελεχών που προκαλούν διάρροια.

Τα εντεροτοξινογόνα στελέχη παράγουν δύο εντεροτοξίνες: μία ευαίσθητη στη θέρμανση (LT) που περιέχει δύο υποομάδες Α και Β (LTA και LTB) και μία ανθεκτική στη θέρμανση (STa ή S-I και 5Tβ ή ST-II).

ii. Εντεροπαθογόνα (enteropathogenic EPEC).

Τα εντεροπαθογόνα στελέχη προκαλούν διάρροια. Τα κυριότερα Ο αντιγόνα που σχετίζονται με την πρόκληση διάρροιας είναι τα O55, O86, O111ab, O119, O125ac, O126, O127, O128ab και O142.

Ο άνθρωπος αποτελεί σημαντική πηγή αυτών των στελεχών. Ο πραγματικός ορισμός των εντεροπαθογόνων στελεχών είναι «διαρροιογόνα *E. coli*» και ανήκουν σε ορότυπους οι οποίοι επιδημιολογικά ενοχοποιούνται ως παθογόνα, αλλά ο μηχανισμός παθογένειάς τους δεν έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται ούτε με θερμο-ασταθείς τοξίνες, ούτε με θερμο-σταθερές τοξίνες, αλλά ούτε και με εισβολείς τύπου *Shigella*. Ωστόσο, τα εντεροπαθογόνα στελέχη έχει προσδιοριστεί ότι προκαλούν σημαντικές βλάβες στα κύτταρα στα οποία προσκολλώνται και εισβάλλουν μέσω των επιθηλιακών κυττάρων. Μερικά εντεροπαθογόνα παράγουν μία ή περισσότερες τοξίνες.

iii. Εντεροδιεισδυτικά (enteroinvasive EIEC)

Τα εντεροδιεισδυτικά στελέχη προκαλούν μη αιμορραγική διάρροια και δυσεντερία παρόμοια με αυτή που προκαλείται από τα στελέχη της *Shigella* μέσω της εισβολής και του πολλαπλασιασμού στα επιθηλιακά κύτταρα στο κόλον. Όπως και στα στελέχη της *Shigella*, η ικανότητα εισβολής των εντεροεισβάλλοντων στελεχών της *E. coli* σχετίζεται με την παρουσία ενός μεγάλου πλασμιδίου, το οποίο κωδικοποιεί τις συγκεκριμένες εξωτερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την εισβολή. Η αντιγονικότητα των εξωτερικών μεμβρανικών πρωτεϊνών συνδέεται άμεσα με αυτή των Ο αντιγόνων. Το κύριο όργανο όπου εντοπίζονται τα στελέχη αυτά είναι το κόλον, στο οποίο εισβάλλουν και πολλαπλασιάζονται στα επιθηλιακά του κύτταρα, προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο. Ο άνθρωπος αποτελεί την κύρια πηγή και οι ορότυποι οι οποίοι συνήθως συνδέονται με την πρόκληση της ασθένειας είναι οι O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164 και O167. Από αυτούς τους ορότυπους, ο O124 απαντάται συχνότερα.

iv. Διάχυσης – προσκόλλησης (diffuse –adhering DAEC)

Τα στελέχη διάχυσης- προσκόλλησης συνδέθηκαν με την πρόκληση παιδικής διάρροιας στο Μεξικό. Αυτά τα στελέχη μπορούν να προκαλέσουν ήπιας μορφής διάρροια χωρίς λευκοκύτταρα αίματος ή κοπράνων και προσδιορίζονται με τον χαρακτηριστικό διάχυσης- προσκόλλησης τύπο εισβολής στις HEp-2 και HeLa κυτταρικές γραμμές. Τα βακτήρια αυτά καλύπτουν ομοιόμορφα την επιφάνεια του κυττάρου και δεν σχετίζονται με την παραγωγή θερμικά σταθερών ή ασταθών τοξινών, ούτε με την αύξηση των επιπέδων των Shiga τοξινών, ούτε και με τους μηχανισμούς εισβολής στα επιθηλιακά κύτταρα.

v. Εντεροσυσσωρευόμενα (enteroaggregative EAggEC)

Τα εντεροσυσσωρευόμενα στελέχη σχετίζονται με την επίμονη διάρροια που εμφανίζεται σε βρέφη και παιδιά σε αρκετές χώρες παγκοσμίως. Αυτά τα στελέχη της *E.coli* διαφέρουν από τα υπόλοιπα παθογόνα στελέχη, εξ' αιτίας της δυνατότητάς τους να δημιουργούν ένα χαρακτηριστικό τύπο αθροιστικής εισβολής στα HEp-2 κύτταρα. Αυτά τα στελέχη ενώνονται με το κυτταρικό τοίχωμα των HEp-2 κυττάρων και ο τύπος τους προσδιορίζεται από ένα γονίδιο που προέρχεται από το πλασμίδιο τους. Δεν είναι ξεκάθαρο ποια από τα μέλη αυτής της ομάδας είναι παθογόνα. Στην ομάδα αυτή συμπεριλαμβάνονται οι τύποι O3:H2 και O4:H7, ενώ ο ορότυπος O44 φαίνεται ότι βρίσκεται και σε αυτά τα στελέχη και στα εντεροπαθογόνα.

vi. Εντεροαιμορραγικά (enterohemorrhagic EHEC)

Τα εντεροαιμορραγικά στελέχη ορίστηκαν ως παθογόνα για τον άνθρωπο το 1982, όταν η *E. coli* με ορότυπο O157:H7 συνδέθηκε με δύο κρούσματα αιμορραγικής κολίτιδας. Από τότε τα κοινά στελέχη και οι ορότυποι της η *E. coli*, όπως ο O26:H11, O103, O104, O111 και ο O157:H- ο οποίος ζυμώνει τη σορβιτόλη συσχετίστηκαν με περιπτώσεις

αιμορραγικής διάρροιας και ορίστηκαν ως εντεροαιμορραγικά. Ωστόσο ο ορότυπος O157:H7 είναι αυτός που δεσπόζει ως εντεροαιμορραγικό αίτιο στις ΗΠΑ καθώς και σε πολλές άλλες χώρες. Όλα τα εντεροαιμορραγικά στελέχη παράγουν κυτοτοξικές ενώσεις στα νεφρικά κύτταρα των πράσινων πιθήκων της Αφρικής και οι ενώσεις αυτές έχουν περιγραφεί ως βεροτοξίνες (VTs) ή παρόμοιες με τις Shiga τοξίνες (SLTs), επειδή η VT1 τοξίνη είναι παρόμοια με τη Shiga τοξίνη (Stx) που παράγεται από τη *Shigella dysenteriae* τύπου 1. Επακόλουθα, πολλοί ορότυποι της *E. coli* έχει αποδειχθεί ότι παράγουν βεροτοξίνες, και για το λόγο αυτό έχουν ονομαστεί VT-producing *E. coli* ή SLT-producing *E. coli*. Ωστόσο, μόνο τα στελέχη που προκαλούν αιμορραγική κολίτιδα ανήκουν στην ομάδα των εντεροαιμορραγικών. Επειδή ο ορότυπος *E. coli* O157:H7 είναι ο πιο κοινός από τα εντεροαιμορραγικά και επειδή τα περισσότερα στοιχεία είναι γνωστά για τον ορότυπο αυτό, η εργασία αυτή επικεντρώνεται σε αυτόν.

4.1.4 Τοξίνες

Ο μικροοργανισμός *Shigella dysenteriae* παράγει μία ιδιαίτερα ισχυρή τοξίνη, την ονομαζόμενη Shiga τοξίνη (από τον K. Shiga, ο οποίος πρώτος απομόνωσε και μελέτησε αυτή την τοξίνη). Οι τοξίνες των εντεροαιμορραγικών στελεχών της *E. coli* αναφέρονται ως παρόμοιες με τις Shiga τοξίνες (βεροτοξίνες, βεροκυτοτοξίνες) και είναι δύο τύπων του SLT-I και του SLT-II. Ωστόσο, με την εφαρμογή καινούργιων μεθόδων, οι τοξίνες SLT-I αναφέρονται ως Stx1 και οι SLT-II ως Stx2. Τα γονίδια για τις Stx1 και Stx2 τοξίνες κωδικοποιούνται με προσωρινούς βακτηριοφάγους σε ορισμένα εντεροαιμορραγικά στελέχη. Οι Stx1 διαφέρουν από τις Shiga τοξίνες σε 3 νουκλεοτίδια και ένα αμινοξύ και εξουδετερώνονται από αντισώματα σε Stx. Και οι δύο τοξίνες είναι κυτοτοξικές για τα βερο-κύτταρα, θανατηφόρες για τα ποντίκια και προκαλούν φλεγμονές σε κουνέλια. Επίσης, και οι δύο αποτελούνται από μία μονή A υποομάδα, ενζυμικώς δραστική, και από πολλαπλές B υποομάδες. Τα κύτταρα που είναι ευαίσθητα στις τοξίνες αυτές παράγουν τον «υποδοχέα» τοξίνης», globotriaosylceramide (Gb3), ενώ το βουτηρικό νάτριο φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων στις τοξίνες. Όταν η τοξίνη παράγει Gb3, ακολουθεί η είσοδος και η μεταφορά της στο δίκτυο-Golgi. Μέσα στο κύτταρο, η A υποομάδα δημιουργεί δεσμούς και απελευθερώνει ένα υπόλειμμα αδενίνης από το 28S rRNA του 60S της ριβοσωμικής υποομάδας και αυτό αναχαιτίζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών του κυττάρου. Οι B υποομάδες σχηματίζουν πενταμερή σε συνδυασμό με μονές A υποομάδες και έτσι βοηθούν τους δεσμούς των τοξινών με τους ουδέτερους γλυκολιπιδικούς υποδοχείς. Παρόλο που ο ορότυπος O157:H7 είναι ο κύριος αυτής της ομάδας, οι τοξίνες Stx παράγονται από τουλάχιστον 30 άλλους ορότυπους. Δεν είναι ξεκάθαρο αλλά φαίνεται ότι οι τοξίνες Stx2 εμπλέκονται περισσότερο στην αιτιολογία της αιμορραγικής κολίτιδας και του αιμολυτικού ουρεμικού συνδρόμου από ότι εμπλέκονται οι Stx1. Ένας άλλος παράγοντας τοξικότητας της *E. coli* O157:H7 είναι μια αιμολυσίνη που ονομάζεται εντεροαιμολυσίνη. Το γονίδιο

αυτής της πρωτεΐνης εκφράζεται σε ένα πλασμίδιο που ονομάζεται pO157 και περιλαμβάνει τα τμήματα του DNA (cistrons) hlyC, hlyA, hlyB και hlyC.

4.2 *E.coli* O157:H7

4.2.1 Ιστορία της *E.coli* O157:H7

Ο τύπος H7 της *E. coli* απομονώθηκε αρχικά το 1944 από ένα κρούσμα διάρροιας σε άνθρωπο, ενώ ο τύπος O157 απομονώθηκε αρχικά το 1972 από περιττώματα χοίρου που παρουσίαζε διάρροια. Ωστόσο, το πρώτο κρούσμα του στελέχους O157:H7 παρουσιάστηκε το 1975 από έναν ασθενή με αιμορραγική διάρροια. Τα πρώτα στελέχη της *E. coli* που παρήγαγαν Stx –τοξίνη προσδιορίστηκαν το 1977 στις ΗΠΑ και στον Καναδά.

4.2.2 Χαρακτηριστικά *E. coli*O157:H7

- Δεν αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες $\geq 44.5^{\circ}\text{C}$.
- Δεν ζυμώνει τη σορβιτόλη μέσα σε 24 ώρες.
- Δεν παράγει τη β-γλυκουρονιδάση.
- Μπορεί να διαθέτει το γονίδιο eae το οποίο ευθύνεται για την προσκόλληση και παθογόνο δράση του μικροοργανισμού στο έντερο.
- Είναι ανθεκτική σε όξινο περιβάλλον (pH 4 - 4.5)(Zhao&Doyle 1994).
- Είναι ευαίσθητη στην θερμική επεξεργασία (D' Aoust et al. 1988).

4.2.3 Ανίχνευση της *E.coli* O157:H7

Οι συμβατικές μέθοδοι για την ανίχνευση της *E. coli* O157:H7 είναι χρονοβόρες (2-3 ημέρες) και εργαστηριακά εντατικές. Αυτές περιλαμβάνουν συνεχή προεμπλουτισμό, εκλεκτικό εμπλουτισμό και εκλεκτικά βήματα επιστρώσεων, καθώς και επακόλουθη βιοχημική και ορολογική επιβεβαίωση.

Εξ' αιτίας των απαιτήσεων του κοινού και της βιομηχανίας τροφίμων, με στόχο τη διασφάλιση της γρήγορης και ακριβούς ανίχνευσης των κυττάρων της *E.coli* O157:H7 στα τρόφιμα, έχουν ερευνηθεί πολλές μέθοδοι ανίχνευσης. Η τεχνική της ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) έχει ευρέως μελετηθεί και εφαρμοστεί, όμως η τεχνική αυτή έχει υψηλά όρια ανίχνευσης (10^5 - 10^6 CFU/ml ή g).

Η τεχνική της αντίδρασης της αλυσίδας πολυμεράσης (polymerase chain reaction-PCR) είναι μια ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδος σε σύγκριση με τις παραδοσιακές τεχνικές.

Ωστόσο είναι μια περίπλοκη, πολλαπλών βημάτων ανάλυση με σχετικά υψηλό κόστος, η οποία απαιτεί πολύ καλά εκπαιδευμένο προσωπικό και παίρνει περισσότερο χρόνο σε σχέση με άλλες γρήγορες μεθόδους.

Μια μέθοδος που περιλαμβάνει ανοσομαγνητικό διαχωρισμό και PCR μπορεί να ανιχνεύσει 1 κύτταρο/g τροφίμου σε 10 ώρες.

Μια ημιαυτόματη φλοροσκοπική PCR μέθοδος έχει όρια ανίχνευσης 5.8 έως 580 κύτταρα και 1.2 έως 1200 κύτταρα σε βοδινό κρέας και κόπρανα, αντίστοιχα, και χρειάζεται 8 έως 10 ώρες για να ολοκληρωθεί.

Η τεχνολογία των βιοαισθητήρων έχει επιδείξει σημαντική δυναμική στην ανάπτυξη ενός γρήγορου, ευαίσθητου και φορητού συστήματος ανίχνευσης. Η ροή δια μέσου ενός συστήματος ανάλυσης ανοσοφιλτραρίσματος, με πορώδεις μεμβράνες φίλτρων παρουσιάζει δυναμικότητα της τάξεως των 100-600 κυττάρων ανά ml. Ένας αμπερομετρικός αισθητήρας που βασίζεται σε ένα ηλεκτρόδιο gel-λεπτού φιλμ μπορεί να ανιχνεύσει εντεροτοξίνη σε συγκεντρώσεις πάνω από 3 ppm. Ο βιοαισθητήρας μετάβασης κυμάτων μέσω οπτικών ινών μπορεί να ανιχνεύσει 3 έως 30 κύτταρα/ ml σε εμπλουτισμένα δείγματα βοδινού. Ένας ποτενσιομετρικός αισθητήρας κατευθυνόμενου φωτός μπορεί να ανιχνεύσει 7100 κατεστραμμένων με θέρμανση κυττάρων μικροοργανισμού ανά ml ή 25000 ζωντανών κυττάρων ανά ml.

Η τεχνική του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού (immunomagnetic separation –IMS) έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την απομόνωση βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένης και της *E. coli*. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου έγκειται στη δυνατότητα διαχωρισμού του μικροοργανισμού-στόχου κατευθείαν στα δείγματα ή στο προεμπλουτισμένο μέσο με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου χωρίς να χρειάζεται φιλτράρισμα ή φυγοκέντρηση.

Η τεχνική IMS παρόλο που είναι μία ευαίσθητη και γρήγορη μέθοδος, απαιτεί τη χρήση συμβατικών εκλεκτικών υποστρωμάτων. Η IMS τεχνική μπορεί επίσης να συνδυαστεί με άλλες ταχείες μεθόδους ανίχνευσης, όπως την ELISA και την ηλεκτροχημικοφωτομετρική μέθοδο με σκοπό τη μείωση του συνολικού χρόνου εφαρμογής.

4.2.4 Πηγές και Τρόποι Μετάδοσης της *E.coli* O157:H7

Ένας από τους σημαντικότερους τρόπους μετάδοσης της *E.coli* O157:H7 στους ανθρώπους είναι διαμέσου της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων, όπως ανεπαρκώς θερμικά επεξεργασμένου (μαγειρεμένου) κιμά βοδινού (όπως μπιφτέκια) και νωπό ή επιμολυσμένο μετά την παστερίωση γάλα. Άλλα τρόφιμα είναι το τα τυριά, τα αλλαντικά και κρεατοσκευάσματα, τα ωμά λαχανικά, ο απαστερίωτος χυμός μήλου και το νερό. Μη ενδεδειγμένες πρακτικές υγιεινής μπορούν να προκαλέσουν «διασταυρούμενη επιμόλυνση» (crosscontamination) από τα μη θερμικά επεξεργασμένα προς τα μαγειρεμένα τρόφιμα ή στα λεγόμενα «έτοιμα προς κατανάλωση» (ready-to-eat) τρόφιμα. Η λοιμογόνος δόση της *E. coli* O157:H7 θεωρείται ότι είναι πολύ χαμηλή,

πιθανόν λιγότερα από 100 κύτταρα, και αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη δημόσια υγεία.

Τα νεαρά βοοειδή που είναι φορείς του μικροοργανισμού στο έντερό τους αποτελούν την κύρια πηγή μετάδοσης της *E.coli*O157:H7, παρόλο που τελευταία έχει ανιχνευθεί και σε μικρά μηρυκαστικά όπως πρόβατα και αίγες. Κατά τη διαδικασία σφαγής, τα σφάγια μπορεί να επιμολυνθούν από το δέρμα ή κατά τη διάρκεια του εκσπλαχνισμού.

Επίσης, η *E.coli* O157:H7 έχει απομονωθεί και από ελάφια, αίγες, άλογα, χήνες και σκύλους.

Η μόλυνση στο περιβάλλον της κτηνοτροφικής μονάδας οδηγεί, πιθανόν, στη διασπορά των μικροοργανισμών και σε άλλα ζώα και ο έλεγχος της κατάστασης αυτής είναι δύσκολος. Η απ' ευθείας επαφή με τα ζώα της φάρμας οδηγεί σε σποραδικά κρούσματα. Μέσω της κατάποσης μολυσμένου νερού από πισίνες, λίμνες κλπ. Η διασπορά από άτομο σε άτομο αποτελεί έναν σημαντικό τρόπο μετάδοσης, η μετάδοση γίνεται μέσω της άμεσης επαφής με τα κόπρανα μολυσμένου ατόμου. Χώροι όπου ο κίνδυνος θεωρείται ιδιαίτερα αυξημένος είναι οι παιδικόι σταθμοί και οι οίκοι ευγηρίας (HeymannD., 2008). Η διάρκεια της απέκκρισης της *E. coli* O157:H7 από τον οργανισμό φαίνεται να είναι μεγαλύτερη σε μικρότερα παιδιά από ότι σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες. Είναι ξεκάθαρη λοιπόν η σημασία της πρόληψης της διασποράς στα διάφορα ιδρύματα και ομάδες πληθυσμού.

4.2.5 Συμπτώματα

Το αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο (Hemolytic Uremic Syndrome –HUS) και η αιμορραγική κολίτιδα (Hemorrhagic Colitis –HC) προκαλούνται από τα στελέχη της *E. coli*.

Έχει παρατηρηθεί ότι το 2-7% των κρουσμάτων της *E. coli* O157:H7 αναπτύσσουν αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο, το οποίο περιλαμβάνει αιμολυτική αναιμία, θρομβοκυτοπενία και οξεία νεφρική ανεπάρκεια. Παρόλο που το σύνδρομο αυτό δεν είχε συνδεθεί άμεσα με την *E. coli* O157:H7 μέχρι το 1985, ωστόσο είχε περιγραφεί ακόμα από το 1955. Σε μία γερμανική έρευνα κατά τη διάρκεια τη θεραπείας 53 παιδιών από *E. coli* O157:H7, τα 28 από αυτά, που είχαν αιμορραγική κολίτιδα, απέβαλλαν τον μικροοργανισμό σε 2 έως 62 ημέρες (Μ.Ο. = 13) και τα 25 από αυτά, στα οποία αναπτύχθηκε αιμολυτικούουρεμικό σύνδρομο, απέβαλλαν τον μικροοργανισμό σε 5-124 ημέρες (Μ.Ο. = 21). Το αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο αποδίδεται περισσότερο στα στελέχη που παράγουν μόνο την τοξίνη Stx2 από τα στελέχη που παράγουν Stx1 ή Stx1 και Stx2, αλλά οι λόγοι που γίνεται αυτό δεν είναι ξεκαθαρισμένοι. Το 15% των 1275 κρουσμάτων της *E. coli* O157:H7 που αναφέρθηκαν στη Μ.Βρετανία σε χρονικό διάστημα 3 ετών (1989-1991) παρουσιάστηκε αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο.

Η αιμορραγική κολίτιδα είναι μια ασθένεια που πρωτοπαρατηρήθηκε το 1982 στο Όρεγκον και το Μίσιγκαν των ΗΠΑ. Και στις δύο περιπτώσεις που αναφέρθηκαν, τα

θύματα είχαν καταναλώσει σε εστιατόρια σάντουιτς που περιείχαν μη καλοψημένο βοδινό κρέας. Από τους 43 ασθενείς, όλοι παρουσίασαν αιμορραγική διάρροια και οξείες γαστρικούς σπασμούς, το 63% αισθάνονταν ναυτία, το 49% παρουσίασε εμετούς, αλλά μόλις το 7% πυρετό. Η μέση περίοδος επώασης ήταν 3.8-3.9 ημέρες και τα συμπτώματα διήρκεσαν από 3 έως και πάνω από 7 ημέρες. Από άλλα περιστατικά ο χρόνος εμφάνισης των συμπτωμάτων κυμαίνονταν μεταξύ 3.1 και 8 ημερών.

4.2.6 Έλεγχος της *E.coli* O157:H7

Ο έλεγχος των κρουσμάτων που προκαλούνται στον άνθρωπο από τα βερο-κυτοτοξινογόνα στελέχη της *E.coli* O157:H7 προϋποθέτει ότι ο κίνδυνος εισόδου στην τροφική αλυσίδα των πιθανών μολυσμένων κρεάτων θα πρέπει να μειωθεί. Δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί το ποιες συγκεκριμένες κτηνοτροφικές πρακτικές ευθύνονται για την είσοδο στην τροφική αλυσίδα μολυσμένων ζώων, ωστόσο όμως έχει αναγνωριστεί και συνεπώς ορισμένες αλλαγές αυτών των κτηνοτροφικών πρακτικών μπορούν να αποτελέσουν μια άμεση προσέγγιση για τη μείωση των προσβολών στους ανθρώπους.

- i. Ο έλεγχος πριν τη σφαγή
- ii. Η προσεκτική διοίκηση της μονάδας εκτροφής των ζώων, καθώς και ορισμένες αλλαγές στις διαδικασίες εκτροφής αποτελούν μέτρα ελέγχου της *E.coli* O157:H7. Ο καθαρισμός των χώρων εκτροφής και η επιμέλεια στην επιλογή της τροφής μπορούν να μειώσουν το μικροβιολογικό φορτίο των ζώων.
- iii. Η χορήγηση χλωρικών σκευασμάτων στα ζώα έχει δείξει ότι μειώνει τον πληθυσμό της *E.coli* O157:H7, της *E.coli* και των υπολοίπων κολοβακτηριοειδών στο στομάχι, στον ειλεό, στο τυφλό έντερο, στο κόλον και στο απευθυσμένο. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, φαίνεται ότι η χορήγηση χλωρικών μπορεί να αποτελέσει στρατηγική μείωσης του πληθυσμού της *E.coli* O157:H7.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

5.1 Γενικά στοιχεία για τις μεθόδους συντήρησης των τροφίμων

Η συντήρηση των τροφίμων έχει σαν στόχο την παράταση του χρόνου ζωής τους. Ο χρόνος ζωής ενός τροφίμου, είναι η περίοδος μεταξύ της συγκομιδής ή της παραγωγής μέχρι την κατανάλωση, κατά την οποία το τρόφιμο παραμένει ασφαλές και υγιεινό. Ο χρόνος ζωής καθορίζεται από παράγοντες όπως το ίδιο το προϊόν και οι συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης (Ooraikul, 2003).

Συνήθως, η ανάπτυξη είτε των μικροοργανισμών αλλοίωσης είτε των παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν τροφοδηλητηριάσεις, περιορίζει τη διάρκεια του χρόνου που ένα τρόφιμο μπορεί να διατηρηθεί και γι' αυτό το λόγο όλες οι μέθοδοι συντήρησης έχουν σαν κύριο στόχο τους τη μείωση ή την αναστολή της ανάπτυξης αυτής. Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι περιορίζουν το χρόνο ζωής των τροφίμων, εκτός από τους μικροοργανισμούς, όπως η δράση των "φυσικών" ενζύμων που σχηματίζονται στα τρόφιμα ή κάποιες φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ των συστατικών των τροφίμων, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Tucker, 2003).

Έχουν αναπτυχθεί λοιπόν μέθοδοι συντήρησης, οι οποίες συνήθως χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό. Η εφαρμογή αυτή των συνδυασμών των μεθόδων αυτών χαρακτηρίζεται ως "Τεχνολογία Εμποδίων". Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται συνδυασμός των εμποδίων είναι εξαιρετικά δύσκολο να καθορισθεί η συμβολή του κάθε παράγοντα εξαιτίας της συνεργικής επίδρασης των διαφόρων μεθόδων (Tucker, 2003).

Κάποιες από τις μεθόδους συντήρησης που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι οι εξής (Tucker, 2003):

- Επίδραση υψηλής θερμοκρασίας (Αποστείρωση, Θερμική επεξεργασία-ασηπτική, Παστερίωση).
- Επίδραση χαμηλής θερμοκρασίας (Κατάψυξη και Ψύξη).
- Αφυδάτωση.
- Συντήρηση με χρήση χημικών ουσιών (Χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας, Κάπνιση, Προσθήκη άλμης, Συντήρηση σε οξέα και Ζύμωση).
- Επεξεργασία με υψηλή πίεση (HPP).
- Ακτινοβολήση και Επεξεργασία με μικροκύματα.
- Συντήρηση με χρήση φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων (Αιθέρια έλαια, ένζυμα).

Εκ των παραπάνω μεθόδων συντήρησης στη συνέχεια θα περιγραφούν οι "φυσικοί" αντιμικροβιακοί παράγοντες- αιθέρια έλαια και η συντήρηση με χρήση χημικών ουσιών- χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας.

5.2 Φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες

Τα τελευταία χρόνια οι καταναλωτές δείχνουν συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για προϊόντα τροφίμων στα οποία έχουν προστεθεί αντιμικροβιακοί και αντιοξειδωτικοί παράγοντες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως φυσικοί, σε αντίθεση μετά χημικά συντηρητικά και πρόσθετα που χρησιμοποιούν οι βιομηχανίες τροφίμων (Rybka-Rodgers, 2001). Ωστόσο, οι φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες έχουν περιορισμένο φάσμα δράσης και είναι ιδιαίτερα δραστικοί όταν προστεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις, για το λόγο αυτό είναι αποτελεσματικότεροι όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμούς (Sofos *et al.*, 1998). Τα προ-μαγειρεμένα ή έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα στις μέρες μας σχεδιάζονται έτσι ώστε να έχουν "πράσινη εικόνα", να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής και να είναι πιο ποιοτικά και ασφαλή για κατανάλωση (Bautista- Banos *et al.*, 2006).

Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες συνεισφέρουν στην συντήρηση των τροφίμων, είτε αναστέλλοντας την ανάπτυξη των μικροοργανισμών(βακτηριοστατικοί) είτε καταστρέφοντας όλους τους μικροοργανισμούς (βακτηριοκτόνοι), (Robertson, 1993). Ο τρόπος δράσης των αντιμικροβιακών συνήθως ανήκει σε μια από τις τρεις κατηγορίες: α) επίδραση των αντιμικροβιακών επί της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητάς της και την απώλεια των συστατικών της, β) απενεργοποίηση της δράσης των σημαντικών ενζύμων και γ) καταστροφή ή απενεργοποίηση του γενετικού υλικού.

Υπάρχουν δύο μεγάλες κατηγορίες αντιμικροβιακών παραγόντων που χρησιμοποιούνται για την συντήρηση των τροφίμων: αντιμικροβιακοί i) ανόργανης και ii) οργανικής φύσης (Robertson, 1993). Στους αντιμικροβιακούς παράγοντες ανόργανης φύσης ανήκουν τα άλατα, ενώ οργανικής φύσης είναι τα σάκχαρα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις τα σάκχαρα ασκούν αντιμικροβιακή δράση και επηρεάζουν τόσο το τρόφιμο όσο και τους μικροοργανισμούς. Αντιμικροβιακοί παράγοντες οργανικής φύσης είναι τα διάφορα οργανικά οξέα όπως το γαλακτικό και το οξικό οξύ. Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει στο παρελθόν τα πολλά πλεονεκτήματα που προκύπτουν από τη χρήση των φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων με μονωμένων ή σε συνδυασμό (Murcia *et al.*, 2003).

5.3 Αιθέρια έλαια- Γενικά χαρακτηριστικά

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των τροφίμων είναι και η χρήση των αιθέριων ελαίων. Η μέθοδος αυτή αποτελεί μία από τις λεγόμενες "πράσινες", δηλαδή "φυσικών" παραγόντων (Burt, 2004).

Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά, φυσικά, σύνθετα συστατικά, τα οποία χαρακτηρίζονται από ισχυρή γεύση και οσμή, ελαιώδη υγρά και παράγονται από αρωματικά φυτά ως δευτερεύοντες μεταβολίτες (Bakkali *et al.*, 2008). Τέτοια φυτά είναι τα λουλούδια, ρίζες, φύλλα, βότανα, φρούτα, κλαράκια, φλούδες από φυτά, σπόροι, ξύλα, ρίζες (Burt, 2004). Συνήθως παράγονται από αρωματικά φυτά από χώρες της Μεσογείου ή/ και τροπικές χώρες (Bakkali *et al.*, 2008). Τα αιθέρια έλαια μπορούν να παραχθούν με διάφορες μεθόδους όπως έκθλιψη, ζύμωση ή εκχύλιση. Η μέθοδος όμως η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την παραγωγή τους είναι η απόσταξη μεθ' υδρατμών και χρησιμοποιήθηκε αρχικά κατά την περίοδο του Μεσαίωνα (12ος-15ος αιώνας) από τους Άραβες (Van de Braak and Leijten, 1999).

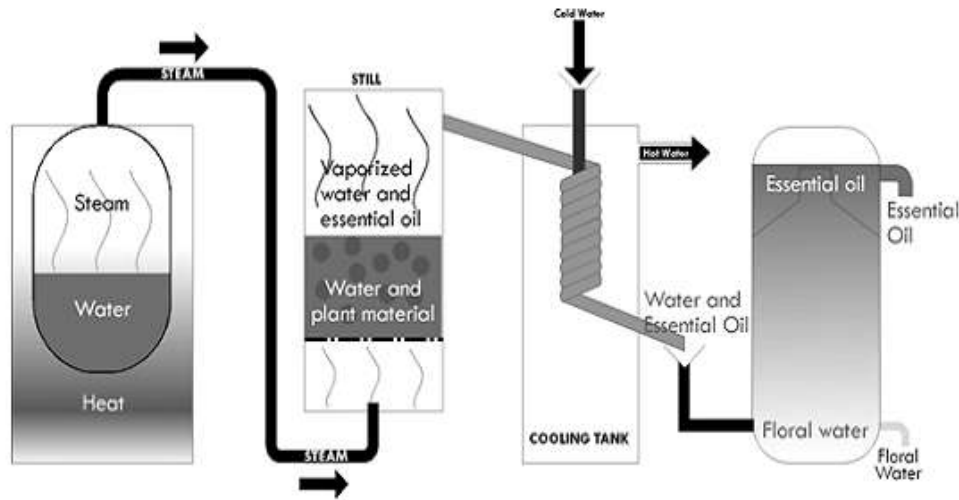
Στο τέλος του 13ου αιώνα, τα αιθέρια έλαια άρχισαν να χρησιμοποιούνται στη Φαρμακολογία (Bauer *et al.*, 2001), ενώ στην Ευρώπη η χρήση τους διαδόθηκε περίπου το τέλος του 16ου αιώνα (Crosthwaite, 1998). Η χρήση των αιθέριων ελαίων στην Ιατρική και τη Φαρμακολογία το 19ο και 20ο αιώνα άρχισε να δίνει τη θέση της στη χρήση τους ως πρόσθετα για τη βελτίωση της γεύσης και του αρώματος των τροφίμων (Guenther, 1948).

Στις μέρες μας είναι γνωστά περίπου 3000 αιθέρια έλαια, παρόλα αυτά μόνο τα 300 από αυτά χρησιμοποιούνται σε βιομηχανική κλίμακα (Van de Braak and Leijten, 1999). Η χρήση τους τα τελευταία χρόνια σαν συντηρητικά τροφίμων έχει αυξηθεί εξαιτίας των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους (Guenther, 1948; Boyle, 1995), οι οποίες έχουν μελετηθεί στο παρελθόν (Shelef, 1983; Nychas, 1995), όπως επίσης και των μπαχαρικών (Shelef, 1983), και διότι συνδέονται άμεσα με την τάση που επικρατεί για χρήση "φυσικών", πιο "πράσινων" συστατικών στη συντήρηση των τροφίμων (Nychas, 1995). Εκτός από τις αντιβακτηριακές τους ιδιότητες τα αιθέρια έλαια ή τα συστατικά τους εμφανίζουν ιδιότητες έναντι της ανάπτυξης ιών, μυκήτων, παρασίτων, καθώς επίσης και έναντι των τοξινών που παράγουν κάποια βακτήρια (Burt, 2004).

5.4 Χρήση και σύσταση αιθέριων ελαίων

Στις μέρες μας τα αιθέρια έλαια στην Ευρωπαϊκή Ένωση βρίσκουν κυρίως χρήση στα τρόφιμα σαν αρωματικά και αντιμικροβιακά, ενώ ακολουθούν τα αρώματα, ανδρικές κολόνιες, προϊόντα για make-up, προϊόντα υγιεινής, στην

Οδοντιατρική, στη Γεωργία και τα φάρμακα (για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες), (Bakkali *et al.*, 2008).

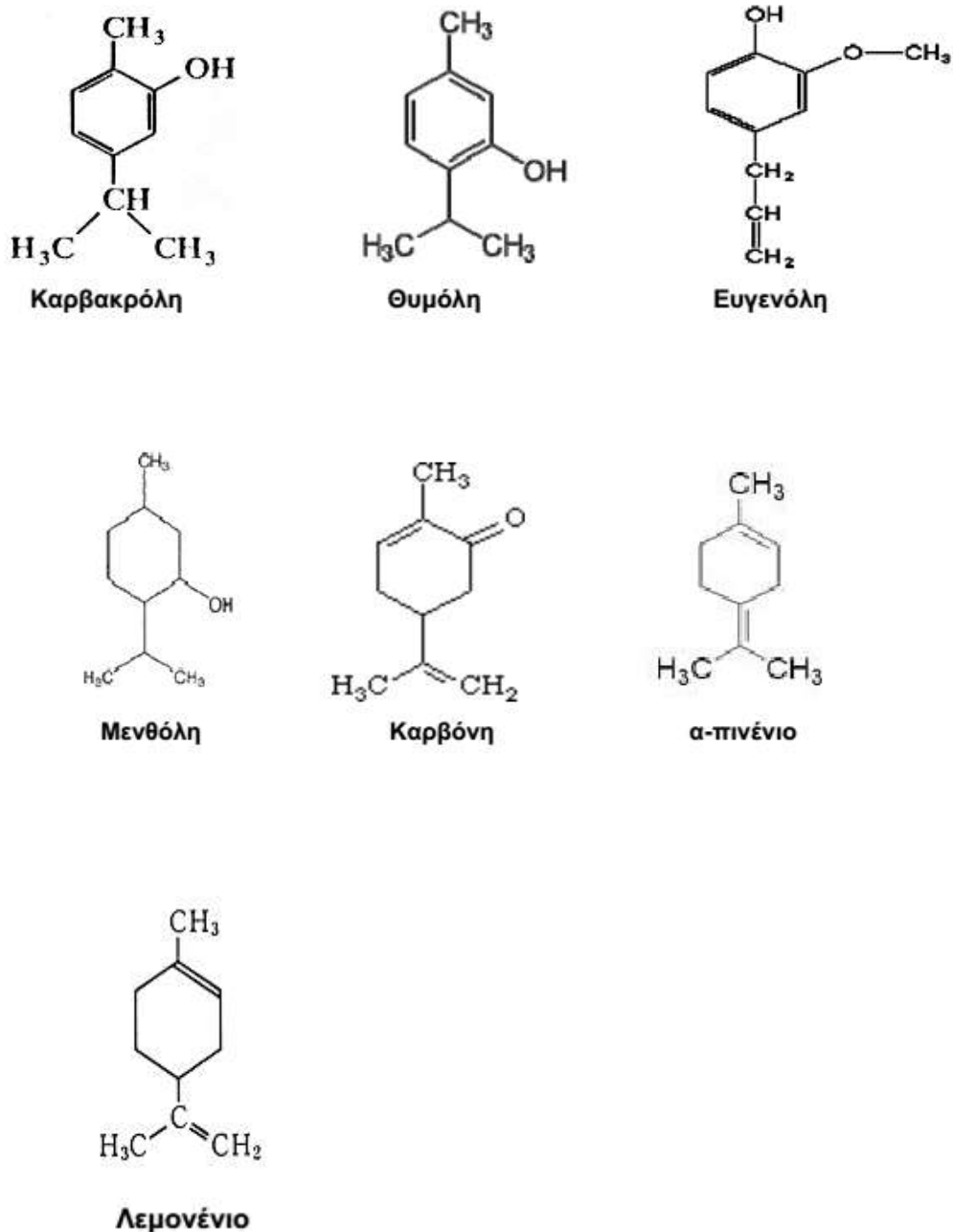


Σχήμα 5.1: Παραγωγή αιθέριων ελαίων με απόσταξη μεθ' υδρατμών (Ντζιμάνη, 2010).

Στην περίπτωση όπου κατά την εκχύλιση χρησιμοποιείται υγρό CO₂, σε χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή πίεση, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του ελαίου παρουσιάζουν πολύ καλό προφίλ, αλλά κατ' αυτό τον τρόπο η μέθοδος είναι ακριβότερη (Moyler, 1998). Οι διαφορές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αιθέριων ελαίων υποδηλώνουν ότι υπάρχουν διαφορές στη σύστασή τους, όταν παράγονται με εκχύλιση σε σχέση με την περίπτωση της απόσταξης, γεγονός το οποίο μπορεί ενδεχομένως να έχει επίδραση στις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες (Packiyasothy and Kyle, 2002). Τα αιθέρια έλαια είναι πτητικά και επομένως πρέπει να αποθηκεύονται σε αεροστεγείς συσκευασίες και στο σκοτάδι, ώστε να αποφεύγονται μεταβολές στη σύστασή τους (Bakkali *et al.*, 2008).

Στο παρελθόν έχουν καταγραφεί πολλές μελέτες που αφορούν τη μελέτη της σύστασης των αιθέριων ελαίων. Τα περισσότερα συστατικά τους έχουν εμπορικό ενδιαφέρον και συνοψίζονται στη μελέτη των Bauer *et al.* (2001). Τα αιθέρια έλαια είναι πολύπλοκα φυσικά μίγματα τα οποία περιέχουν τουλάχιστον 20-60 συστατικά σε διάφορες συγκεντρώσεις (Bakkali *et al.*, 2008). Όλα τα αιθέρια έλαια χαρακτηρίζονται από δύο ή τρία βασικά συστατικά σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης του 20-70% (πολλές φορές 85%), ενώ και άλλα συστατικά είναι παρόντα αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις (Bauer *et al.*, 2001).

Γενικά αυτά τα βασικά συστατικά καθορίζονται με βάση τις βιολογικές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων. Τα συστατικά περιλαμβάνουν δύο ομάδες, με τη μία να αποτελείται από τερπένια και τερπενοειδή, ενώ η άλλη περιλαμβάνει άλλα αρωματικά και αλειφατικά συστατικά με χαμηλό μοριακό βάρος (Pichersky *et al.*, 2006). Στο Σχήμα φαίνονται οι δομές κάποιων βασικών συστατικών αιθέριων ελαίων με αντιμικροβιακή δράση.



Σχήμα 5.2: Δομές βασικών συστατικών κάποιων αιθέριων ελαίων (Ντζιμάνη,2010).

Τα τερπένια (π.χ. π-κυμένιο, μενθόλη, καρβόνη, καμφορά, θυμόλη, καρβακρόλη κ.α.) είναι μικρά οργανικά μόρια που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Σήμερα γνωρίζουμε τη δομή χιλιάδων τερπενίων, μερικά από αυτά είναι οι υδρογονάνθρακες, άλλα περιέχουν άτομα οξυγόνου, άλλα είναι μόρια ανοιχτής αλυσίδας και άλλα περιέχουν δακτυλίους. Τα τερπένια μπορεί να θεωρηθεί ότι προέρχονται από συνένωση κεφαλής-ουράς μονάδων ισοπρενίου (2-μεθυλο-1,3-βουταδιένιο). Ο άνθρακας 1, ονομάζεται κεφαλή της ισοπρενικής μονάδας, ενώ ο

άνθρακας 4 θεωρείται η ουρά της. Άλλες αρωματικές ενώσεις είναι διάφορες αλκοόλες, κετόνες, φαινόλες, αλδεϋδες (Bakkali *et al.*, 2008).

Οι φαινολικές ενώσεις είναι κυρίως υπεύθυνες για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων (Cosentino *et al.*, 1999). Τα υπόλοιπα συστατικά τα οποία απαντούν σε ίχνη είναι εξίσου σημαντικά, διότι συνεισφέρουν στην αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων μέσω της συνεργιστικής δράσης μεταξύ των διαφόρων συστατικών τους που παράγουν.

Πίνακας 5.1: Παρουσίαση των κυριότερων συστατικών κάποιων αιθέριων ελαίων που εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Burt, 2004).

Αιθέριο Έλαιο	Λατινική ονομασία του φυτού	Κύρια συστατικά	% Σύσταση
Κόλιανδρος	<i>Coriandrum sativum</i> (φύλλα)	λιναλοόλη E-2-δεκανάλη	26 20
Κορίανδρος	<i>Coriandrum sativum</i> (σπόρια)	λιναλοόλη E-2-δεκανάλη	70 -
Κανέλλα	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	trans-κινναμαλδεϋδη	65
Ρίγανη	<i>Oreganum vulgare</i>	καρβακρόλη θυμόλη γ-τερπινένιο π-κυμένιο	Ίχνη-80 Ίχνη-64 2-52 Ίχνη-52
Δενδρολίβανο	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α-πινένιο βορνυλεστέρας καμφορά 1,8-κινεόλη	2-25 0-17 2-14 3-89
Φασκόμηλο	<i>Salvia officinalis L.</i>	καμφορά α-πινένιο β-πινένιο 1,8-κινεόλη α-τιχόνη	6-15 4-5 2-10 6-14 20-42
Γαρύφαλλο	<i>Syzygium aromaticum</i>	ευγενόλη ευγενυλεστέρας	75-85 8-15
Θυμάρι	<i>Thymus vulgaris</i>	θυμόλη καρβακρόλη γ-τερπινένιο π-κυμένιο	10-64 2-11 2-31 10-56

5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποσότητα και την ποιότητα των αιθέριων ελαίων

Η παραγόμενη ποσότητα και η χημική σύσταση των αιθέριων ελαίων επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων. Οι σημαντικότεροι εξ αυτών είναι οι εξής (Lahlou, 2004, Brenes and Roura, 2010): το είδος και το υποείδος (ποικιλία) του αρωματικού φυτού, τα γεωγραφικά χαρακτηριστικά της τοποθεσίας, οι εποχικές διακυμάνσεις και οι κλιματικές συνθήκες, η εποχή και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού κατά την συλλογή, το φυτικό μέρος και τέλος η μέθοδος παραλαβής. Αυτό εξηγείται από τον σχηματισμό των αντιμικροβιακών ενώσεων από τις πρόδρομες ενώσεις τους. Οι ενώσεις: 1 μεθυλ-4-(1-μεθυλαιθυλ)-βενζόλιο και 1-μεθυλ-4-(μεθυλαιθυλ)-1.4-κυκλοεξαδιένιο είναι οι πρόδρομες ενώσεις της καρβακρόλης (2-μεθυλ-5-(1-μεθυλαιθυλ)-φαινόλη και της θυμόλης (5-μεθυλ-2-(1-μεθυλαιθυλ)-φαινόλη), που απαντούν στη ρίγανη και το θυμάρι, αντίστοιχα (Jerkovic *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002).

Παρατηρείται υψηλή παραλλακτικότητα για φυτά του ίδιου είδους. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην εξέλιξη και την προσαρμογή των φυτών στο εκάστοτε περιβάλλον που αναπτύσσονται (Lahlou, 2004).

Όσον αφορά τις εποχικές διακυμάνσεις και τις κλιματικές συνθήκες, πχ., στην περίπτωση της Ελληνικής ρίγανης (*O.vulgare ssp.Hirtum*) το φθινόπωρο η απόδοση σε αιθέριο έλαιο μειώνεται, η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε π-κυμένιο αυξάνεται, ενώ η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε γ-τερπινένιο μειώνεται (Kokkini *et al.*, 1996). Έτσι, η περιεκτικότητα του αιθέριου ελαίου σε π-κυμένιο βρέθηκε να είναι 17,3-26,9 % σε αυτοφυή φυτά που συλλέχθηκαν το φθινόπωρο, έναντι 4,0-9,5 % σε φυτά που συλλέχθηκαν το καλοκαίρι στην Νότια Ελλάδα. Το αντίστοιχο εύρος τιμών για φυτά της βόρειας Ελλάδας ήταν 37,1-51,3 % (φθινόπωρο) και 12,0- 12,2 % (καλοκαίρι).

Όσον αφορά τη χρονική στιγμή συλλογής, η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο γενικά είναι μέγιστη στην αρχή της άνθησης και κατά την διάρκειά της (Marino *et al.*, 1999).

Όσον αφορά το συγκομιζόμενο φυτικό μέρος, σημειώνεται ότι τα αιθέρια έλαια εντοπίζονται σε όλα τα μέρη των φυτών αλλά η περιεκτικότητα είναι διαφορετική για κάθε φυτικό μέρος. Έτσι πχ., τα άνθη της ρίγανης, του θυμαριού και του μπεργαμόντου, τα φύλλα του ευκάλυπτου, ο φλοιός της κανέλλας, το ξύλο της τριανταφυλλιάς και του σανδαλόξυλου, τα ριζώματα του τζίντζερ, οι καρποί του γλυκάνισου και τα σπέρματά τους έχουν υψηλή περιεκτικότητα από τα υπόλοιπα μέρη του φυτού (Enan, 2001).

Το προφίλ των αιθέριων ελαίων εξαρτάται ακόμη και από την μέθοδο παραλαβής (Cassel *et al.*, 2009). Οι Packrysothy and Kyle (2002), έδειξαν πειραματικά για διάφορα αρωματικά φυτά, ότι το αιθέριο έλαιο που παραλαμβάνεται μέσω εκχύλισης με εξάνιο χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση από το αντίστοιχο που παραλαμβάνεται με απόσταξη. Το ίδιο ισχύει και για την απόδοση σε αιθέριο έλαιο.

Έτσι, πχ., συνδυασμός απόσταξης και υπερήχων δίνει υψηλότερη απόδοση από ότι η μέθοδος της απόσταξης.

Σημειώνεται ότι στην περίπτωση της ρίγανης, το κλίμα, η εποχή συλλογής της και τα χαρακτηριστικά του εδάφους επηρεάζουν σε μεγαλύτερο βαθμό το προφίλ του αιθέριου ελαίου από ότι η ποικιλία της (Kokkini, 1994). Επιπλέον, τα φυτά της ρίγανης σε μεγαλύτερο υψόμετρο χαρακτηρίζονται από υψηλότερη περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο (Kokkini, 1994).

5.6 Αντιβακτηριακή δράση αιθέριων ελαίων και μηχανισμός

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους έχουν μελετηθεί στο παρελθόν (Nychas, 1995; Chouliara *et al.*, 2007; Giatrakou *et al.*, 2008; Mexis *et al.*, 2009; Frangos *et al.*, 2010), αλλά ο μηχανισμός δράσης τους δεν είναι εξ' ολοκλήρου γνωστός (Lambert *et al.*, 2001). Εξαιτίας των πολλών και διαφορετικών ομάδων χημικών ενώσεων που απαντούν στα αιθέρια έλαια, είναι πιθανό οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες να αποδίδονται σε περισσότερους από ένα μηχανισμούς, οι οποίοι στοχεύουν σε περισσότερα σημεία του κυττάρου (Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002).

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό των αιθέριων ελαίων και των συστατικών τους είναι η υδροφοβικότητά τους, η οποία τους επιτρέπει να διεισδύουν στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και στα μιτοχόνδρια, μεταβάλλοντας τη δομή τους και αυξάνοντας τη διαπερατότητά της (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1994). Το αποτέλεσμα είναι η απώλεια ιόντων και άλλων συστατικών των κυττάρων η οποία οδηγεί στο θάνατο τους (Skandamis *et al.*, 2001; Carson *et al.*, 2002; Ultee *et al.*, 2002).

Έχει παρατηρηθεί γενικότερα ότι τα αιθέρια έλαια που εμφανίζουν την αποτελεσματικότερη δράση έναντι των παθογόνων βακτηρίων, περιέχουν μεγάλο ποσοστό φαινολικών ενώσεων, όπως είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη και η ευγενόλη (Dorman and Deans, 2000; Lambert *et al.*, 2001). Η χημική δομή του κάθε συστατικού των αιθέριων ελαίων επηρεάζει το μηχανισμό δράσης και τις αντιμικροβιακές ιδιότητές τους (Dorman and Deans, 2000). Η σημασία της ύπαρξης της υδροξυλικής ομάδας στις φαινολικές ενώσεις, όπως στην καρβακρόλη και τη θυμόλη είναι μεγάλη, ενώ η θέση της στο φαινολικό δακτύλιο δε φαίνεται να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή δράση (Burt, 2004). Η δράση της θυμόλης, για παράδειγμα έναντι των βακτηρίων *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*, φαίνεται να είναι συγκρίσιμη με αυτή της καρβακρόλης (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002). Παρόλα αυτά έχει αναφερθεί ότι η θυμόλη και η καρβακρόλη δρουν διαφορετικά έναντι της ανάπτυξης των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων (Dorman and Deans, 2000). Η μεγάλη σημασία του φαινολικού δακτυλίου φαίνεται από την έλλειψη των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της μενθόλης σε σχέση με την καρβακρόλη (Ultee *et al.*, 2002).

Όσον αφορά τις αλειφατικές ενώσεις των αιθέριων ελαίων, η αντιμικροβιακή δράση είναι μεγαλύτερη στα αλκένια συγκριτικά με τα αλκίνια. Παραδείγματος χάριν, το λεμονένιο είναι περισσότερο δραστικό σε σχέση με το π-κουμόλιο (Dorman and Deans, 2000).

Κάποια συστατικά των αιθέριων ελαίων πιστεύεται ότι επιδρούν στις πρωτεΐνες της κυτταρικής μεμβράνης, μέσω μηχανισμού που συμμετέχουν κυκλικοί υδρογονάνθρακες. Κάποια ένζυμα τα οποία βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες, περιβάλλονται από λιπίδια. Τα μόρια των λιπόφιλων υδρογονανθράκων είναι δυνατόν να συσσωρευτούν στη στρώση των λιπιδίων και να μεταβάλουν την αλληλεπίδραση λιπιδίου-πρωτεΐνης. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να λάβει χώρα άμεση αλληλεπίδραση των λιπόφιλων ενώσεων με υδρόφοβα μέρη της πρωτεΐνης (Juven *et al.*, 1994; Sikkema *et al.*, 1994). Έχει βρεθεί ότι ορισμένα αιθέρια έλαια συντελούν στην ανάπτυξη των ψευδομυκκυλίων σε κάποιες συγκεκριμένες ζύμες, γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι τα αιθέρια έλαια δρουν στα ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση δομικών συστατικών των κυττάρων (Burt, 2004).

Μελέτες οι οποίες εστίασαν στην επίδραση των αιθέριων ελαίων έναντι της ανάπτυξης αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από ότι τα Gram-θετικά βακτήρια (Canillac and Mourey, 2001; Demetzos and Perdetzoglou, 2001; Lambert *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2001; Cimanga *et al.*, 2002; Delaquis *et al.*, 2002; Pintore *et al.*, 2002; Harpaz *et al.*, 2003). Παρόλα αυτά, υπάρχουν μελέτες που βρήκαν ακριβώς το αντίθετο, εξαιτίας της εξωτερικής μεμβράνης που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-αρνητικών βακτηρίων και περιορίζει τη διάχυση των υδρόφοβων ενώσεων μέσω του λιποπολυσακχαρικού στρώματος (Wilkinson *et al.*, 2003). Η καρβακρόλη και η θυμόλη είναι ικανές να εισχωρήσουν στην εξωτερική στοιβάδα των Gram-αρνητικών, απελευθερώνοντας λιποπολυσακχαρίτες, αυξάνοντας ταυτόχρονα τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Helander *et al.*, 1998). Μελέτες σχετικές με το βακτήριο *B. cereus*, έδειξαν ότι η καρβακρόλη αλληλεπιδρά με την κυτταρική μεμβράνη, όπου διαλύεται στο φωσφολιπιδικό στρώμα και προσδένεται μεταξύ των αλυσίδων των αμινοξέων (Ultee *et al.*, 2002). Αυτή η αλλαγή στη φυσική δομή μπορεί να προκαλέσει αποσταθεροποίηση της μεμβράνης αυξάνοντας τη ρευστότητα και προκαλώντας αύξηση της διαπερατότητάς της (Ultee *et al.*, 2002). Η καρβακρόλη ενδέχεται να σχηματίσει "κανάλια" μέσα στη μεμβράνη πιέζοντας τις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των φωσφολιπιδίων, επιτρέποντας στα ιόντα να απομακρυνθούν από το κυτταρόπλασμα (Ultee *et al.*, 2002). Εκτός από την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των βλαστικών κυττάρων η καρβακρόλη μπορεί να παρεμποδίσει και την ανάπτυξη της τοξίνης του *B. cereus* (Ultee and Smid, 2001). Όσον αφορά τη θυμόλη, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη των *S. typhimurium* και *St.aureus*, μέσω των δεσμών υδρογόνου που δημιουργεί με τις πρωτεΐνες της μεμβράνης των κυττάρων, αλλάζοντας κατ' αυτό τον τρόπο τη διαπερατότητά της (Juven *et al.*, 1994).

Είναι πιθανό ότι η διαφορετική σύνθεση των αιθέριων ελαίων είναι ικανή να προκαλέσει διαφορετική επίδραση στο βαθμό ευαισθησίας μεταξύ των βακτηρίων. Από

τα Gram-αρνητικά βακτήρια, οι Ψευδομονάδες και ιδιαίτερα η *P. aeruginosa* (παθογόνος για τον άνθρωπο) παρουσιάζει τη μικρότερη ευαισθησία στα αιθέρια έλαια (Knobloch *et al.*, 1989; Dorman and Deans, 2000; Tsigarida *et al.*, 2000; Pintore *et al.*, 2002; Wilkinson *et al.*, 2003).

5.7 Μελέτες αντιβακτηριακής δράσης των αιθέρων ελαίων στα τρόφιμα

Στις μέρες μας, πρόσθετα τροφίμων τα οποία περιέχουν αιθέρια έλαια δεν διατίθενται σε μεγάλο αριθμό για βιομηχανική χρήση και μέχρι τις αρχές του 1990 δεν υπήρχε στη διεθνή βιβλιογραφία μεγάλος αριθμός μελετών που αφορούσαν στην αντιμικροβιακή δράση τους (Board and Gould, 1991). Παρόλα αυτά σε μελέτες των τελευταίων χρόνων έχει βρεθεί ότι απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση αιθέρων ελαίων όταν προστίθενται σε τρόφιμα σε σχέση με την αντίστοιχη που απαιτείται σε συστήματα-μοντέλα τροφίμων (food model systems), ώστε να επιτευχθεί η ίδια αντιμικροβιακή δράση (Shelef, 1983). Η αναλογία αυτή είναι διπλάσια σε βούτυρο (Karatzas *et al.*, 2001), δεκαπλάσια σε λουκάνικα από χοιρινό συκώτι (Pandit and Shelef, 1994), 50 φορές μεγαλύτερη σε σούπες (Ultee and Smid, 2001), 25 με 100 φορές μεγαλύτερη σε μαλακά τυριά (Mendoza-Yepes *et al.*, 1997). Εξαιρέση σ' αυτό αποτελεί το βακτήριο *Aeromonas hydrophila*, για το οποίο δεν απαιτείται προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης αιθέριου ελαίου σε μαγειρεμένο χοιρινό κρέας και σε λάχανο, σε σχέση με τα αντίστοιχα συστήματα- μοντέλα (Wan *et al.*, 1998).

Γενικά, έχει παρατηρηθεί ότι η ευαισθησία των μικροοργανισμών αυξάνεται καθώς ελαττώνεται το pH του τροφίμου, η θερμοκρασία συντήρησης και το ποσοστό του O₂ στον υπερκείμενο χώρο της συσκευασίας (Tassou *et al.*, 1996; Skandamis and Nychas, 2000; Tsigarida *et al.*, 2000). Σε χαμηλές τιμές pH, ο υδρόφοβος χαρακτήρας των αιθέρων ελαίων αυξάνεται με αποτέλεσμα να είναι ευκολότερη η διάλυσή του στα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου, η οποία είναι και ο στόχος της δράσης των αιθέρων ελαίων (Juven *et al.*, 1994). Γενικότερα, υψηλά επίπεδα λίπους και πρωτεΐνης στα τρόφιμα προστατεύουν τα βακτήρια από τη δράση των αιθέρων ελαίων. Όταν το αιθέριο έλαιο διαλυθεί στη λιπαρή φάση δεν θα μπορέσει να δράσει ενάντια στα βακτήρια που βρίσκονται στην υδατική φάση του τροφίμου (Burt, 2004). Επιπλέον, το χαμηλό ποσοστό νερού και άλατος στο τρόφιμο είναι δυνατόν να εμποδίσει τη δράση των αντιμικροβιακών παραγόντων στα κύτταρα των βακτηρίων (Smith-Palmer *et al.*, 2001). Οι υδατάνθρακες στα τρόφιμα δε φαίνεται να παρεμποδίζουν τη δράση των αιθέρων ελαίων, τουλάχιστον όχι στον ίδιο βαθμό όπως το λίπος και οι πρωτεΐνες (Shelef *et al.*, 1984).

Ορισμένα αιθέρια έλαια εμφανίζουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε συγκεκριμένα τρόφιμα από κάποια άλλα. Τα αιθέρια έλαια ευγενόλης, κορίανδρου, γαρύφαλλου, ρίγανης και θυμαριού έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικά σε συγκεντρώσεις των 5-20 $\mu\text{l/g}$ έναντι της ανάπτυξης *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, καθώς επίσης και στην αυτόχθονη χλωρίδα αλλοίωσης των προϊόντων κρέατος (Tsigarida *et al.*, 2000; Skandamis and Nychas, 2001), ενώ τα έλαια της μουστάρδας, του κορίανδρου και της

μέντας βρέθηκε ότι έχουν μικρότερη αποτελεσματικότητα (Shelef *et al.*, 1984; Gill *et al.*, 2002). Στα ψάρια, όπως και το κρέας, το υψηλό ποσοστό λίπους ελαττώνει την αποτελεσματικότητα της αντιβακτηριακής δράσης των αιθέριων ελαίων. Για παράδειγμα το ριγανέλαιο, το οποίο είναι πιο δραστικό από το έλαιο μέντας στα ιχθυρά, σε συγκέντρωση 0,5 μl/g (0,05 %), σε φιλέτο μπακαλιάρου ήταν πιο αποτελεσματικό έναντι του βακτηρίου *Photobacterium phosphoreum*, σε σχέση με τα φιλέτα σολομού, που θεωρείται λιπαρό ψάρι (Mejholm and Dalgaard, 2002). Αντίθετα, το έλαιο της μέντας έχει βρεθεί ότι είναι αποτελεσματικό σε συγκεντρώσεις της τάξης των 5-20 μl/g έναντι της *S. enteritidis* σε γιαούρτι με χαμηλά λιπαρά, καθώς επίσης και σε σαλάτα με βάση το αγγούρι (Tassou *et al.*, 1995). Αποδείχθηκε ότι το έλαιο αυτό καθυστερεί την ανάπτυξη των καλλιιεργειών εκκίνησης στο γιαούρτι, αλλά δεν είναι το ίδιο αποτελεσματικό με τα έλαια κανέλλας, κάρδαμου και γαρύφαλλου (Bayoumi, 1992). Όσον αφορά τα κηπευτικά έχουν χαμηλό ποσοστό σε λιπαρά, γεγονός που συμβάλλει στην επιτυχημένη χρήση των αιθέριων ελαίων. Όλα τα αιθέρια έλαια ή συστατικά τους έχουν χρησιμοποιηθεί στα κηπευτικά σε συγκεντρώσεις 0,1-10 μl/g και έχει αποδειχθεί ότι έχουν καλό αποτέλεσμα έναντι της ανάπτυξης αλλοιογόνων βακτηρίων της μικροχλωρίδας τους και των παθογόνων μικροοργανισμών (Wan *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2002).

Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με τη χρήση και αντιμικροβιακή δράση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα δημιουργήθηκε μια σειρά κατάταξής τους με βάση την αποτελεσματικότητά τους. Η σειρά αυτή, από το ισχυρότερο στο λιγότερο ισχυρό αιθέριο έλαιο, είναι η εξής: ρίγανης > γαρύφαλλου > κοριανδρου > κανέλλας > θυμαριού > μέντας > δενδρολίβανου > μουστάρδας > κόλιανδρου. Μια ανάλογη σειρά για τα συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι η εξής: ευγενόλη > καρβακρόλη > κινναμωμικό οξύ > κινναμαλδεΐδη > κιτράλη > γερανιόλη (Burt, 2004).

5.8 Συνεργιστική δράση και ανταγωνιστικότητα των συστατικών των αιθέριων ελαίων μεταξύ τους και με τις μεθόδους συντήρησης

Η εγγενής δράση ενός αιθέριου ελαίου είναι αναμενόμενο να συνδέεται με τη χημική δομή των συστατικών τους, τα ποσοστά που απαντώνται στα αιθέρια έλαια, καθώς επίσης και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (Dorman and Deans, 2000; Marino *et al.*, 2001; Delaquis *et al.*, 2002). Αθροιστική δράση θεωρείται όταν η συνδυαστική δράση είναι ίση με το άθροισμα της δράσης του κάθε συστατικού.

Ανταγωνιστικότητα παρατηρείται όταν η συνδυαστική δράση των συστατικών είναι μικρότερη από την δράση του μεμονωμένου συστατικού, ενώ συνεργιστική δράση καταγράφεται στην περίπτωση όπου το αποτέλεσμα των συνδυασμένων συστατικών είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των δράσεων των επιμέρους συστατικών (Davidson and Parish, 1989). Κάποιες μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι τα αιθέρια έλαια εμφανίζουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με την αντίστοιχη των

επιμέρους συστατικών τους, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι ακόμη και το συστατικό που απαντάται στο μικρότερο ποσοστό παίζει σημαντικό ρόλο στη δράση των αιθέριων ελαίων και μπορεί τελικά να δρα συνεργιστικά και να έχει επίδραση έναντι της ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Gill *et al.*, 2002; Mourey and Canillac, 2002).

Τα δύο σημαντικότερα συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης, η καρβακρόλη και η θυμόλη, βρέθηκε ότι έχουν συνεργιστική δράση έναντι της ανάπτυξης των *S. aureus* και *P. aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001). Επιπλέον, το π-κυμένιο (βιολογική πρόδρομη ένωση της καρβακρόλης) καθιστά πιο εύκολη τη μεταφορά της καρβακρόλης στα κύτταρα, επομένως καταγράφεται συνεργιστική δράση των δύο (Ultee *et al.*, 2000). Μίγμα από κόλιανδρο, κορίανδρο και ευκάλυπτο, σε διάφορες συγκεντρώσεις, φάνηκε από διάφορες μελέτες ότι έδρασαν τόσο συνεργιστικά όσο και ανταγωνιστικά (Delaquis *et al.*, 2002).

Όσον αφορά τη συνεργιστική δράση των αιθέριων ελαίων ή συστατικών τους με διάφορες μεθόδους συντήρησης τροφίμων, έχει βρεθεί ότι το NaCl δρα τόσο συνεργιστικά όσο και ανταγωνιστικά σε διάφορες συγκεντρώσεις. Ο πιθανός μηχανισμός δράσης είναι η αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ το NaCl στη συνέχεια εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (*L. monocytogenes*, *S. enteritidis*) με τη δράση του στα ένζυμα των κυττάρων (Burt, 2004). Επιπλέον, έχει καταγραφεί ότι τα συστατικά θυμόλη και καρβακρόλη δρουν συνεργιστικά με την Υψηλή Υδροστατική Πίεση (HHP), κυρίως έναντι της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* (Karatzas *et al.*, 2001). Τέλος, συνεργιστική δράση έχει αναφερθεί κι από το συνδυασμό της χρήσης της συσκευασίας υπό συνθήκες κενού με τη χρήση των αιθέριων ελαίων έναντι της *L. monocytogenes*, καθώς επίσης της μικροχλωρίδας βοδινού κρέατος, όπου η πτώση ήταν της τάξης περίπου των 2-3 log CFU/ g (Tsigarida *et al.*, 2000). Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν για τη συνδυαστική χρήση ριγανέλαιου και συσκευασίας σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα σε βοδινό κιμά (Chouliara *et al.*, 2007; Skandamis and Nychas, 2001).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ

6.1 Η ρίγανη

Η ρίγανη είναι γνωστή από την αρχαιότητα ως αρτυματικό φυτό. Το όνομά της προέρχεται από τις λέξεις όρος και γάνος και σημαίνει αυτός που λαμπρύνει το βουνό. Κατά την εποχή του Ομήρου επικράτησε και ο όρος του οριγανίων για όποιον κατανάλωνε ρίγανη (Σκουμπής, 1985). Σημειώνεται ότι ο Ιπποκράτης (5ος αιώνας π.Χ) χρησιμοποιούσε τη ρίγανη για θεραπευτικούς σκοπούς σε πληθώρα ασθενειών του ανθρώπου. Οι πληροφορίες αυτές αναφέρονται εκτενώς από τον Θεόφραστο (372-287 π.Χ) στο βιβλίο «Περί φυτών ιστορία» καθώς επίσης και από τον Διοσκουρίδη τον Αναζαρβέα (1ος αιώνας μ.Χ) στο βιβλίο «Περί ύλης Ιατρικής». Επιπλέον, οι αρχαίοι Έλληνες τοποθετούσαν στους τάφους ρίγανη, γιατί πίστευαν ότι βοηθούσε τους νεκρούς να κοιμούνται ήσυχα. Είναι, επίσης, χαρακτηριστικό το γεγονός ότι κατά τις γαμήλιες τελετές το αντρόγυνο φορούσε στεφάνια κατασκευασμένα από ματζουράνα (είδος ρίγανης) γιατί πίστευαν ότι προέρχεται από την Θεά Αφροδίτη.

Πιο πρόσφατα, ο ιδρυτής της «ερμητικής» ιατρικής Παράκελσος (1493-1541) την χρησιμοποιούσε για τη θεραπεία πολλών ασθενειών του ανθρώπου. Έτσι, η χρήση της ρίγανης για φαρμακευτικούς σκοπούς ταξίδεψε από τα βάθη των αιώνων και έφτασε μέχρι τις ημέρες μας (Σκουμπής, 1985). Σήμερα εξακολουθεί να χρησιμοποιείται παραδοσιακά για την θεραπεία πολλών ασθενειών όπως η ψωρίαση, η επιληψία, η τερηδόνα, οι κολικοί και η τριχόπτωση (Σκουμπής, 1985). Επίσης, χαρακτηρίζεται από τονωτική, ευστόμαχη, διεγερτική, διουρητική, καθαρτική εμμηναγωγό και ανθελμινθική δράση.

Σημειώνεται ότι η ρίγανη αυτοφύεται σε διάφορα μέρη του κόσμου όπως η Εύκρατη Ασία, η βόρεια Αφρική, η Αμερική και στις παραμεσόγειες χώρες τις Ευρώπης. Στην Ελλάδα, αυτοφυή φυτά ρίγανης υπάρχουν από το Βορά μέχρι το Νότο αλλά κυρίως σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές (Σκουμπής, 1985). Καλλιέργειες ρίγανης υπάρχουν κυρίως στους νομούς Καρδίτσας, Τρικάλων, Θεσσαλονίκης και Ροδόπης. Η ρίγανη συλλέγεται και αποξηραίνεται ενώ η ξηρά δρόγη εξάγεται κυρίως στις ΗΠΑ και την υπόλοιπη Ευρώπη (κυρίως Γερμανία) αφού η αξία της Ελληνικής ρίγανης έχει αναγνωριστεί ως η καλύτερη στον κόσμο. Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο η Ελλάδα και η Γερμανία έχουν τις περισσότερες καλλιεργήσιμες εκτάσεις ρίγανης που ανέρχονται σε 5500 και 5310 στρέμματα, αντίστοιχα (Τζουραμάνη και συν., 2012). Σημειώνεται ότι γίνεται εισαγωγή ρίγανης από την Τουρκία, τη Βουλγαρία και την Αλβανία (Τζουραμάνη και συν., 2012).

6.2 Ταξινόμηση και καλλιέργεια του φυτού

Η ρίγανη είναι πολυετής πόα η οποία κατατάσσεται στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiace) και στο γένος *Origanum* το οποίο περιλαμβάνει 7 είδη τα οποία απαντώνται στην Ελληνική χλωρίδα (Σκουμπής, 1985):

- *Origanum heracleoticum* ή *O. hirtum* ή *O. parviflorum*

Το είδος αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένο στην Ελλάδα και την Κύπρο. Ο βλαστός είναι όρθιος, τριχωτός και πολύκλαδος ενώ το ύψος του φυτού μπορεί να φτάσει τα 80 cm. Το συγκεκριμένο είδος ρίγανης αποτελεί και το κυριότερο εμπορικό είδος.

- *Origanum vulgare* (κοινώς αγριορίγανη)

Μορφολογικά, χαρακτηρίζεται από λεπτό, σκληρό, κοκκινωπό και συνάμα εύθραυστο βλαστό το ύψος του οποίου φτάνει μέχρι και 50 cm. Αυτοφύεται στην Ηπειρωτική Ελλάδα, στην Εύβοια, στην Κεφαλληνία, στην Κέρκυρα και στη Νάξο. Συλλέγεται σε μικρές ποσότητες και αναμιγνύεται με το φυτό *Origanum heracleoticum*.

- *Origanum maru* (κοινώς αγριορίγανη)

Μορφολογικά, χαρακτηρίζεται από βλαστό όρθιο, πολύκλαδο, λείο, χρώματος ανοικτού γαλάζιου. Αυτοφύεται στην Κρήτη σε ορεινές περιοχές όπου και συλλέγεται σε μικρές ποσότητες.

- *Origanum onites* (κοινώς τούρκικη ρίγανη).

Από μορφολογικής άποψης χαρακτηρίζεται από βλαστό απλό, όρθιο και τριχωτό ο οποίος μπορεί να φτάσει σε ύψος μέχρι και 30 cm. Αυτοφύεται στον νομό της Αττικής, της Αργολίδας, της Κορινθίας στην Κρήτη καθώς επίσης και στα νησιά του Αιγαίου πελάγους. Συλλέγεται σε μεγάλες ποσότητες από τα νησιά και χαρακτηρίζεται ως νησιωτική ρίγανη.

- *Origanum dubium* (κοινώς ρίγανη)

Χαρακτηρίζεται από χαμηλό βλαστό και αυτοφύεται σε ορεινές περιοχές της Νάξου.

- *Origanum majorana* (κοινώς ματζουράνα)

Χαρακτηρίζεται από πολύκλαδο, σκληρό, λεπτό, κοκκινωπό και τριχωτό με ύψος που μπορεί να φτάσει μέχρι και 40 cm.

- *Origanum dictamnus* (κοινώς δίκταμος)

Αυτοφύεται και καλλιεργείται μόνο στην Κρήτη.

Όλα τα προαναφερθέντα αυτοφυή είδη της ρίγανης αναπτύσσονται σε ποικίλες κλιματικές συνθήκες και κυρίως χαρακτηρίζονται από αντοχή στο ψύχος. Επιπλέον, παρουσιάζει αξιοσημείωτη ανθεκτικότητα στην ξηρασία. Για αυτούς τους λόγους η

ρίγανη αυτοφύεται σε όλη την Ελλάδα, ηπειρωτική, νησιωτική και από τις παραθαλάσσιες μέχρι και τις ορεινές περιοχές. Ωστόσο, για την καλλιέργεια της ρίγανης θα πρέπει να προτιμώνται περιοχές ημιορεινές, ασβεστολιθικές και με δροσερά καλοκαίρια (Dordas, 2009). Σημειώνεται ότι τα φύλλα της ρίγανης περιέχουν πολύ υψηλά ποσά ασβεστίου τα οποία ανέρχονται μέχρι και 63 mg/g ξηράς ουσίας ενώ στα περισσότερα είδη του φυτικού βασιλείου η συγκέντρωση του ασβεστίου κυμαίνεται από 10-30 mg/g ξηράς ουσίας (Dordas, 2009).

Ο πολλαπλασιασμός της ρίγανης μπορεί να γίνει εγγενώς (με σπόρο) και αγενώς (μοσχεύματα ή παραφυάδες) (Σκουμπής, 1985). Όταν χρησιμοποιείται σπόρος, απαιτούνται 10-15 g/m². Τα μοσχεύματα είναι τμήματα βλαστών μήκους 8-10 cm που λαμβάνονται καθ' όλη την βλαστική περίοδο και κυρίως Απρίλιο-Μάιο. Οι παραφυάδες λαμβάνονται κατόπιν ξεριζώματος ενός μέρους του φυτού της ρίγανης το φθινόπωρο ή την άνοιξη ενώ ακολουθεί φύτευσή τους στο χωράφι. Ο πολλαπλασιασμός με παραφυάδες οφείλεται στο γεγονός ότι η ρίγανη χαρακτηρίζεται από πολλούς βλαστούς και πλούσιο ριζικό σύστημα. Όσον αφορά την εποχή φύτευσης αναφέρεται ότι συνιστάται να γίνεται φθινόπωρο (Οκτώβριο- Νοέμβριο) ή άνοιξη (Φεβρουάριο-Μάρτιο). Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του φυτού είναι 18- 22°C με όριο ανάπτυξης 4- 33°C ενώ φυτά ηλικίας τουλάχιστον ενός έτους, αντέχουν σε θερμοκρασίες -25 έως και 42 °C. Η φύτευση είναι απλή και γίνεται σε γραμμές. Η διάρκεια της καλλιέργειας της ρίγανης διαρκεί περίπου 8- 10 χρόνια. Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι θα πρέπει να αποφεύγεται το πότισμα της καλλιέργειας της ρίγανης διότι σε ξηρικές συνθήκες η ποιότητα του αιθέριου ελαίου είναι καλύτερη. Όταν γίνεται άδρευση, αυξάνεται η παραγωγή ποσοτικά διότι τα φυτά αποκτούν μεγαλύτερο μέγεθος αλλά υποβαθμίζεται η ποιότητα του αιθέριου ελαίου. Το ίδιο συμβαίνει όταν εφαρμόζεται αζωτούχος λίπανση σε μεγάλες ποσότητες. Η συλλογή της ρίγανης γίνεται στο μέσο της άνθησης (άνθηση του 50% των οφθαλμών) δηλαδή μέσα στον Ιούλιο (Σκουμπής, 1985).

Η καλλιέργεια της ρίγανης στην Ελλάδα χαρακτηρίζεται από τα ακόλουθα πλεονεκτήματα (Τζουραμάνη και συν., 2012) :

- Καλλιέργεια με συγκριτικό πλεονέκτημα λόγω ευνοϊκών εδαφοκλιματικών συνθηκών που επικρατούν στην Ελλάδα.
- Αύξηση της ζήτησης για προϊόντα που προέρχονται από αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά λόγω των ιδιοτήτων τους.
- Δυνατότητα πολλών εφαρμογών στη βιομηχανία παρασκευής ροφημάτων, στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών (για αρωματισμό και συντήρηση), στη ζαχαροπλαστική, στη μαγειρική, στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία καλλυντικών και την αρωματοποιία.
- Μικρές απαιτήσεις σε καλλιεργητικές φροντίδες. Το φυτό μπορεί να καλλιεργηθεί ακόμα και σε υποβαθμισμένα εδάφη.
- Ανάπτυξη ευκαιριών απασχόλησης σε επίπεδο οικογενειακής εκμετάλλευσης ή μικρών εταιρικών σχημάτων πρώτης μεταποίησης, τυποποίησης και εκχύλισης- απόσταξης αιθέριων ελαίων.
- Δυνατότητα αξιοποίησης του εξοπλισμού του καπνού (φυτώριο).

- Προώθηση της καλλιέργειας από το Υπουργείο και την Ε.Ε. με δυνατότητες χρηματοδότησης.

Τα μειονεκτήματα της καλλιέργειας της ρίγανης είναι τα ακόλουθα (Τζουραμάνη και συν., 2012):

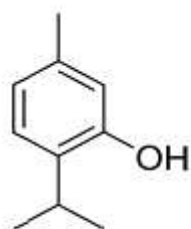
- Έλλειψη εγχώριων πιστοποιημένων σπόρων και πολλαπλασιαστικού υλικού.
- Δυσκολία στην εξασφάλιση διάθεσης της παραγωγής λόγω της ελλιπούς σύνδεσης πρωτογενούς παραγωγής και βιομηχανιών τυποποίησης/συσκευασίας ή παραγωγής αιθέριων ελαίων.
- Προβλήματα στην καταπολέμηση των ζιζανίων, ιδιαίτερα μετά τη θέσπιση περιορισμών στη χρήση αγροχημικών και την κατάργηση ορισμένων δραστικών ουσιών.
- Μη επαρκής προώθηση της καλλιέργειας μέσω καινοτόμων συσκευασιών ή/και αξιοποίησής τους από τις βιομηχανίες/ βιοτεχνίες παραγωγής αιθέριων ελαίων.
- Έλλειψη πληροφόρησης και ενημέρωσης των αγροτών για τις απαραίτητες πρακτικές και τις δυνατότητες εμπορίας της ρίγανης με αποτέλεσμα οι περισσότερες προσπάθειες να αποτυγχάνουν λόγω έλλειψης κατάλληλης επενδυτικής στρατηγικής.

6.3 Συστατικά και ιδιότητες αιθέριου ελαίου της ρίγανης

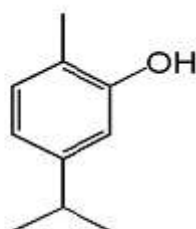
Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης μπορεί να περιέχει περισσότερα από 30 συστατικά. Από ποσοτικής άποψης κυριαρχούν η καρβακρόλη και η θυμόλη (φαινολικές ενώσεις), το άθροισμα των οποίων αποτελεί τουλάχιστον το 78% του αιθέριου ελαίου (Adam et al., 1998). Άλλα συστατικά είναι το π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο (τερπένια) τα οποία είναι οι πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση της καρβακρόλης και της θυμόλης (Ultee et al., 2002). Στην κατηγορία των τερπενίων υπάγονται και το α-πινένιο, το β-πινένιο, το θουγένιο, το α-τερπινένιο, το β-καρυοφυλλένιο, το β-μπισαμπολένιο, το φυλλανδρένιο και το σαμπινένιο. Επιπλέον, το αιθέριο έλαιο της ρίγανης περιέχει αιθέρια έλαια με αλκοολικές ομάδες όπως την κινεόλη, την λιναλοόλη, την βορνεόλη και την τερπινόλη (Daferera et al., 2000). Στον πίνακα παρουσιάζεται ένα τυπικό προφίλ ρίγανης της νοτίου Ελλάδας (νήσος Ικαρίας) σε ταξιανθίες και φύλλα ενώ στην εικόνα παρουσιάζεται η χημική δομή των κυριότερων συστατικών (θυμόλη, καρβακρόλη, π-κυμένιο, γ-τερπινένιο) του αιθέριου ελαίου.

Πίνακας 6.1: Προφίλ αιθέριων ελαίων (%) ρίγανης: *Origanum vulgare ssp.hirtum* (φύλλα και ταξιανθίες). (Economou et al.,2011)

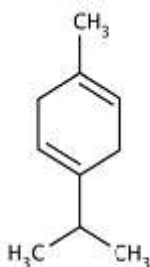
Χημική ουσία	%
α-θουγένιο	0.21
α-πινένιο	0.26
β-πινένιο	0.05
β-μυρσένιο	0.55
α-φελλανδρένιο	ίχνη
δ-καρένιο	0.45
π-κυμένιο	2.25
γ-τερπινένιο	3.09
Cis-σαμπινένιο ένυδρο	0.14
Λιναλοόλη	ίχνη
Βορνεόλη	0.16
Τερπινεν-4-όλη	0.21
Καρβακρόλη	90.29
Καρνοφυλλένιο	1.81
α-καρνοφυλλένιο	0.13
β-μπισαμπολένιο	0.14
Οξείδιο του καρνοφυλλένιου	0.06



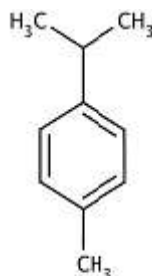
Θυμόλη



Καρβακρόλη



γ-τερπινένιο



π-κυμένιο

Σχήμα 6.1: χημική δομή των κυριότερων συστατικών του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (Ντζιμάνη,2010).

Όπως, φαίνεται και από το σχήμα αυτό, η θυμόλη και η καρβακρόλη είναι δύο ισομερείς ενώσεις οι οποίες διαφέρουν μόνο ως προς τη θέση της υδροξυλικής ομάδας. Τα οξυγονομένα αιθέρια έλαια (παρουσία υδροξυλικής ομάδας στην καρβακρόλη και τη θυμόλη) τα οποία διαθέτουν φαινολικό δακτύλιο χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (Dorman and Deans, 2000; Oh et al., 1967). Τα τερπένια όπως π.χ. το π-κυμένιο και το γ-τερπινένιο χαρακτηρίζονται από πολύ ασθενή αντιμικροβιακή δράση (Dorman and Deans, 2000; Brenes and Roura, 2010) ενώ σε μερικές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί και ενίσχυση της μικροβιακής δραστηριότητας (Wallace, 2004).

6.3.1 Αντιμικροβιακή δράση

Η καρβακρόλη και η θυμόλη παρουσιάζουν ισχυρή αντιβακτηριακή δράση (κυρίως βακτηριοκτόνο) ιδιαίτερα κατά Gram+ βακτηρίων αν και υπάρχουν ερευνητικές εργασίες στις οποίες έχει παρατηρηθεί αντιβακτηριακή δράση κατά Gram- βακτηρίων (Marino et al., 2001). Ορισμένα παραδείγματα Gram+ βακτηρίων των οποίων η ανάπτυξη παρεμποδίζεται από το ριγανέλαιο είναι τα εξής (*In vitro*): *Micrococcus spp.*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thuringiensis*, *Listeria innocua* (Marino et al., 2001) και *Bacillus subtilis* (Fan and Chen, 2001). Όσον αφορά τα Gram- βακτήρια (*In vitro*): *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratiamarcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* (Marino et al., 2001), *S. sonnei* (Fan and Chen, 2001) και *S. typhimurium* (Juven et al., 1994). Σημειώνεται ότι εκ των συστατικών της ρίγανης η καρβακρόλη και η θυμόλη χαρακτηρίζονται από ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση (Sivropoulou et al., 1996). Αντιβακτηριακή δράση έχει παρατηρηθεί και σε *in vivo* μελέτες. Η καρβακρόλη χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι του παθογόνου *Bacillus cereus* ενώ η θυμόλη έναντι των *Selemonas ruminantium* και *Streptococcus bovis* τα οποία υπάρχουν στη μικροχλωρίδα της μεγάλης κοιλίας των μηρυκαστικών (Evans and Martins, 2000).

6.3.2 Αντιμυκητιακή δράση

Τα δύο κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης (καρβακρόλη και θυμόλη), χαρακτηρίζονται από ισχυρή αντιμυκητιακή δράση ενώ η καρβακρόλη χαρακτηρίζεται από ισχυρότερη αντιμυκητιακή δράση σε σύγκριση με την θυμόλη (Daferera, 2000). Ορισμένα παραδείγματα μυκήτων των οποίων η ανάπτυξη παρεμποδίζεται από το ριγανέλαιο είναι τα εξής: *Penicillium digitatum*, *Trichosporon beigeli*, *Trichophyton rubrum*, *Malassezia furfur*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Macrophomina phaseoli*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Aspergillus parasiticus* (Daferera et al., 2000; Ozcan, 1998).

6.3.3 Αντιοξειδωτική δράση

Η ρίγανη χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση παρόμοια με του δενδρολίβανου (Milos and Makota, 2012), η οποία οφείλεται στο αιθέριο έλαιο καθώς επίσης και σε άλλα συστατικά όπως το καφεϊκό οξύ, το προκατεχοϊκό οξύ κ.α. (Kikuzaki et al., 1989) και το ροσμαρινικό οξύ (Exarchou et al., 2002). Σημειώνεται ότι εκ των αιθέριων ελαίων η θυμόλη παρουσιάζει ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση από την καρβακρόλη (Yanishlieva et al., 1999), ενώ μεταξύ θυμόλης και καρβακρόλης υπάρχει πιθανώς συνέργεια κάτι που ενδεχομένως ισχύει γενικότερα για τα οξυγονωμένα συστατικά της ρίγανης (Milos and Makota, 2012). Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης της καρβακρόλης και της θυμόλης η υδροξυλική ομάδα των ενώσεων αυτών δρα ως δότης υδρογόνου στις υπεροξειδικές ρίζες οι οποίες παράγονται κατά το πρώτο στάδιο των οξειδώσεων (Brenes and Roura, 2010).

Οι Tsimidou et al. (1995) ανέφεραν ότι 1 % ρίγανης ισοδυναμεί με 200 ppm BHA (βουτυλοϋδροξυανισόλη) κατόπιν προσθήκης μέσα σε εδάδιμο έλαιο. Η βουτυλοϋδροξυανισόλη αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο συνθετικό αντιοξειδωτικό το οποίο προστίθεται στα τρόφιμα.

6.3.4 Αντιπρωτοζωϊκή δράση

Στην περίπτωση των μηρυκαστικών ζώων τα πρωτόζωα αποτελούν το 40-50 % της μικροβιακής μάζας εντός της μεγάλης κοιλίας ενώ η ικανότητά τους να αφομοιώνουν και να μετατρέπουν τις πρωτεΐνες τροφικής και μικροβιακής προέλευσης επηρεάζει σημαντικά το ισοζύγιο του αζώτου στο μηρυκαστικό ζώο (Hristov and Jouany, 2005). Η μείωση του αριθμού των πρωτόζωων συχνά οδηγεί και σε μείωση της παραγωγής μεθανίου γιατί υπάρχει συμβιωτική σχέση μεταξύ πρωτόζωων και μεθανοβακτηρίων. Υπολογίζεται ότι το 25% των μεθανοβακτηρίων βρίσκονται σε συμβίωση με πρωτόζωα εντός της μεγάλης κοιλίας (Newbold et al., 1995). Έτσι, μείωση των πληθυσμών των πρωτόζωων (αλλά όχι εξάλειψη) μπορεί να βελτιώσει τις αποδόσεις των μηρυκαστικών ζώων. Θεωρείται ότι η παρουσία πρωτόζωων προκαλεί μείωση των πληθυσμών των βακτηρίων αλλά από την άλλη μεριά προσφέρουν πλεονεκτήματα στο μηρυκαστικό ζώο, όπως είναι η αύξηση της βιοσύνθεσης λυσίνης εντός της μεγάλης κοιλίας (Opodera, 1986).

Στην περίπτωση των μονογαστρικών ζώων, για την καταπολέμηση των κοκκιδίων (*Eimeria* spp.) που προσβάλλουν τα πτηνά, προτείνεται ο συνδυασμός εμβολιασμού και χορήγησης αιθέριων ελαίων ρίγανης ως ένας εναλλακτικός τρόπος καταπολέμησης της ασθένειας σε βιολογικές εκτροφές (Waldstedt, 2003). Οι Giannenas et al. (2003) παρατήρησαν βελτίωση των αποδόσεων σε παχυνόμενα ορνίθια κατόπιν προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης στο σιτηρέσιο τα οποία είχαν προηγουμένως μολυνθεί με

κοκκίδια (*Eimeria tenella*). Επιπλέον, παρατήρησαν σημαντική μείωσή τους στην παρουσία αίματος στα κόπρανα των πτηνών.

6.3.5 Υποχοληστερολαιμική και ηπατοπροστατευτική δράση

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι η καρβακρόλη και η θυμόλη μειώνουν τη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο αίμα σε παχυνόμενα ορνίθια ενώ ταυτόχρονα ασκούν ηπατοπροστατευτική δράση (Akkol et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα, αμφοότερες αναστέλλουν την δράση της 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλCoA-ρεδουκτάσης, η οποία είναι ένα ένζυμο το οποίο σχετίζεται με τη σύνθεση της χοληστερόλης στο ήπαρ. Με αυτό τον τρόπο διεγείρονται οι υποδοχείς των LDL με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή τους από το αίμα και κατ'επέκταση μειώνεται και η συγκέντρωση της χοληστερόλης. Επιπλέον, η θυμόλη χαρακτηρίζεται από ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στην οξείδωση των LDL και επομένως μπορεί να επιβραδύνει την αθηρομάτωση (Naderi et al., 2004).

Άλλα συστατικά του αιθέριου ελαίου της ρίγανης με παρόμοια δράση είναι η καρβακρόλη και το γ-τερπινένιο (Edris, 2007). Ακόμη, σημειώνεται ότι η κατανάλωση ρίγανης μειώνει τη συστολική πίεση του αίματος (Edris, 2007). Έτσι, κατανάλωση αιθέριου ελαίου ρίγανης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο ηπατοστεατίτιδας και καρδιαγγειακών προβλημάτων και ιδιαίτερα όταν καταναλώνονται σιτηρέσια με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και χοληστερόλη.

6.3.6 Χρήση ρίγανης στην διατροφή των παραγωγικών ζώων

Λόγω των πολυάριθμων ιδιοτήτων του αιθέριου ελαίου της ρίγανης μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην διατροφή των παραγωγικών ζώων, όπου οι επιδράσεις της διαιτητικής προσθήκης αιθέριου ελαίου ρίγανης είναι ευεργετικές στις αποδόσεις των μονογαστρικών και μηρυκαστικών ζώων.

Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι εκτός από την ενδεχόμενη βελτίωση των αποδόσεων υπάρχουν και πολλές άλλες εφαρμογές. Για παράδειγμα, η διαιτητική προσθήκη ρίγανης μπορεί να μειώσει τα περιστατικά διάρροιών σε μηρυκαστικά ζώα (Bampidis et al., 2006; Soltan, 2009) και την εκπομπή δυσάρεστων οσμών από τα κτηνοτροφικά απόβλητα μέσω μείωσης του μικροβιακού φορτίου (Varel et al., 2004).

Ενσωμάτωση ξηράς δρόγης ρίγανης σε σιτηρέσια σιών, βελτιώνει τις αναπαραγωγικές αποδόσεις αφού παρατηρείται αύξηση της γονιμότητας, αύξηση του μεγέθους της τοκετομάδας καθώς επίσης και μείωση του αριθμού των χοιριδίων που γεννιούνται

νεκρά (Allan and Bilkei, 2005). Ωστόσο, οι μηχανισμοί της επίδρασης των αιθέριων ελαίων της ρίγανης στο αναπαραγωγικό σύστημα δεν είναι επαρκώς μελετημένοι.

6.4 Νομοθεσία για τη χρήση των αιθέριων ελαίων στα τρόφιμα

Από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει καταγραφεί μεγάλος αριθμός συστατικών των αιθέριων ελαίων για χρήση ως αρωματικές ύλες στα τρόφιμα, τα οποία θεωρείται ότι δεν παρουσιάζουν κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Σύμφωνα με τους ισχύοντες Κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) (ΕΚ 1565/2000, ΕΚ 622/2002), για να καταγραφεί μια νέα ουσία στους επίσημους καταλόγους των αρωματικών ουσιών, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν τοξικολογικές και μεταβολικές μελέτες, οι οποίες είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες και δαπανηρές. Μεταξύ αυτών των ουσιών συμπεριλαμβάνονται η καρβακρόλη και η θυμόλη, ενώ κάποιες άλλες ουσίες, όπως η εστραγκόλη και η μεθυλική ευγενόλη, έχουν διαγραφεί από τη σχετική λίστα της ΕΕ, εξαιτίας της γενοτοξικότητάς τους (Burt, 2004).

Οι ουσίες οι οποίες θα εγκριθούν από την ΕΕ, θα εμφανιστούν αυτόματα στον κατάλογο EAFUS (Everything Added to Food in the US'), πράγμα που σημαίνει ότι ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (Food and Drug Administration – FDA), έχει κατατάξει τις ουσίες αυτές ως πρόσθετα τροφίμων ή ως γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλείς (Generally Recognised As Safe – GRAS) (Σολωμάκος, 2007).

Η θυμόλη και η καρβακρόλη, αν και *in vitro* φαίνεται να εμφανίζουν ήπια προς μέτρια τοξική επίδραση σε κυτταρικό επίπεδο, *in vivo* φαίνεται να μην εμφανίζουν σημαντικό πρόβλημα. Έτσι, στις ΗΠΑ, τόσο η καρβακρόλη, όσο και τα βότανα και καρυκεύματα που την περιέχουν, έχουν χαρακτηριστεί ως GRAS, από τους ειδικούς εκπαιδευμένους δοκιμαστές του Οργανισμού Παρασκευαστών Αρωμάτων και Εκχυλισμάτων (Ultee, 2000). Συνίσταται λοιπόν, να πραγματοποιούνται περισσότερο ασφαλείς και πιο ενδελεχείς μελέτες, σε περίπτωση που τα ΑΕ χρησιμοποιηθούν στο μέλλον σε μεγαλύτερες από τις παρούσες συγκεντρώσεις (Burt, 2004).

ΠΕΙΡΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά του παθογόνου *E.coli* O157:H7 σε τυρί «ΑΝΕΒΑΤΟ» κατά τη διάρκεια της συντήρησης σε θερμοκρασία 4°C.

2.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Παθογόνα βακτήρια

Για την παρασκευή του ενοφθαλμίσματος χρησιμοποιήθηκαν μίγμα από 2 στελέχη του παθογόνου από το στοκ του Εργαστηρίου Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (EDL-932 και EDL-933) σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Solomakos et al. 2008. Για το μίγμα των στελεχών των παθογόνων, τα δύο στελέχη ενώνονταν σε περίπου ίσες συγκεντρώσεις. Η καλλιέργεια χρήσεως από το μίγμα των στελεχών περιείχε τελικό βακτηριακό πληθυσμό περίπου 10^2 ή $10^4 \log$ cfu/ml.

2.2.2. Αιθέριο έλαιο ρίγανης

Το ΑΕ ρίγανης που χρησιμοποιήθηκε για τους πειραματισμούς, ήταν εμπορικό σκεύασμα, της εταιρείας ΕΚΟΦΑΡΜ ΕΛΛΑΣ ΑΒΕΕ (Κιλκίς). Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,1 % ή 0,2 % (v/wt) της ποσότητας του τροφίμου. Η συγκέντρωση 0,2 % βρέθηκε να είναι η μέγιστη που ήταν οργανοληπτικά αποδεκτή στο τυρί ανεβατό, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.2.3. Παρασκευή των δειγμάτων

Τυρί «ΑΝΕΒΑΤΟ» 2 μήνες μετά την παρασκευή του (2 συσκευασίες από 5 kg η κάθε μια) μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης του Π.Θ. υπό συνθήκες ψύξης.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά σκαφίδια (16 x 20,5 x 4,8 cm) (UBRT, Cryovac, Sealed Air S.r.l., Passiranadi Rho, Italy) και τοποθετήθηκαν 100g τυριού/σκαφίδιο.

Για την επίτευξη του σκοπού του πειράματος, δημιουργήθηκαν 2 ομάδες δειγμάτων:

- Ομάδα Α : Μικροβιολογικές εξετάσεις
- Ομάδα Β : Οργανοληπτικός έλεγχος

Κάθε μία από τις παραπάνω ομάδες περιελάμβανε τις εξής 6 παρτίδες δειγμάτων :

- Παρτίδα Α : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες χωρίς προσθήκη ΑΕ ρίγανης με υψηλό ενοφθάλμισμα παθογόνου (CONH).
- Παρτίδα Β : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες, χωρίς προσθήκη ΑΕ ρίγανης με χαμηλό ενοφθάλμισμα παθογόνου (CONL).
- Παρτίδα Γ : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες με προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,1% και με υψηλό ενοφθάλμισμα παθογόνου (ORE1H).
- Παρτίδα Δ : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες με προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,1% και με χαμηλό ενοφθάλμισμα παθογόνου (ORE1L).
- Παρτίδα Ε : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες με προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2% και με υψηλό ενοφθάλμισμα παθογόνου (ORE2H).
- Παρτίδα ΣΤ : Συσκευασία σε αερόβιες συνθήκες με προσθήκη ΑΕ ρίγανης 0,2% και με χαμηλό ενοφθάλμισμα παθογόνου (ORE2L).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε όλες τις ομάδες δειγμάτων του βακτηριακού εναιωρήματος *E.coli* O157:H7 ώστε ο πληθυσμός τους στις παρτίδες με χαμηλό ενοφθάλμισμα (CONL, ORE1L και ORE2L) να κυμαίνεται στους $2 \pm 0,5 \log$ cfu/g και στις παρτίδες με υψηλό ενοφθάλμισμα (CONH, ORE1H και ORE2H) να κυμαίνεται στους $4 \pm 0,5 \log$ cfu/g.

30 λεπτά μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων έγινε η προσθήκη του ΑΕ ρίγανης σε συγκέντρωση 0,1 ή 0,2% με ανάμιξη στο τυρί με στείρες γυάλινες ράβδους.

Όλα τα δείγματα σφραγίστηκαν υπό αερόβιες συνθήκες σε κλειστήκα μηχανή (model TSM105 Foodtech, Minipack-torreS.p.A., Dalmine, Italy) με πλαστικό φιλμ (OPET, Cryovac, Sealed Air S.r.l., Passiranadi Rho, Italy)

Τέλος, τα δείγματα από όλες τις ομάδες συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4°C για 1 μήνα.

2.2.5. Μικροβιολογική ανάλυση

Τις ημέρες 0, 5, 10, 15, 20, 25 και 30πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των πληθυσμών του παθογόνου *E.coli* O157:H7.

Ποσότητα 10 γραμμαρίων από κάθε δείγμα, τοποθετήθηκε σε σακούλα stomacher με προσθήκη ποσότητας 90 mL πεπτονούχου ύδατος (BPW-Buffered Peptone Water) ώστε να επιτευχθεί μια αρχική αραιώση 1:10. Τα δείγματα ομογενοποιούνταν στη συσκευή stomacher για 2 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Ακολουθούσαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε στείρο πεπτονούχο ύδωρ (0.1%). Στην συνέχεια γίνονταν ενοφθαλμισμός 100 μL στην επιφάνεια τριβλίων του εκλεκτικού υποστρώματος sorbitol Mac Conkey (SMAC) agar (Merck, Germany). Τέλος, τα τριβλία επωάζονταν στους 37 °C για 24-48 ώρες.

2.2.5. Οργανοληπτικός έλεγχος

Για τον οργανοληπτικό έλεγχο χρησιμοποιήθηκαν δείγματα τυριού ανεβατό που δεν είχαν ενοφθαλμιστεί με *E.coli* O157:H7.

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιούνταν από 5μελή ομάδα εκπαιδευμένων δοκιμαστών. Σε κάθε ημέρα οργανοληπτικού ελέγχου ζητούνταν από τους δοκιμαστές να αξιολογήσουν την οσμή, το χρώμα και τη γενική αποδοχή με τη χρήση 9βάθμιας κλίμακας (από το 1 έως το 9), σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Govaris *et al.* (2011). Οι χαρακτηρισμοί που αντιστοιχούσαν στον κάθε βαθμό της χρησιμοποιηθείσας κλίμακας ήταν από Εξαιρετικά ευχάριστο (9) έως Εξαιρετικά δυσάρεστο (1). Το δείγμα θεωρούνταν ως μη αποδεκτό, όταν λάμβανε αποτέλεσμα < 5, έστω και για ένα οργανοληπτικό χαρακτηριστικό, τουλάχιστον από το 50% των κριτών.

2.2.5. Φυσικοχημικός έλεγχος

Κάθε δείγμα εξετάζονταν κατά την προσκόμιση του στο εργαστήριο για τον προσδιορισμό του συντελεστή ενεργού νερού (a_w) και του pH. Η μέτρηση της τιμής του pH στα δείγματα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Tsiraki and Savvaidis (2014). Η μέτρηση έγινε με ψηφιακό pH-μετρο (Consort C860) με γυάλινο ηλεκτρόδιο μετά από αραίωση (1/10) και ομογενοποίηση του δείγματος του τυριού (25 g) με απεσταγμένο νερό (225 ml). Πραγματοποιούνταν δύο μετρήσεις και καταγράφηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

2.2.5. Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης στο γενικό γραμμικό μοντέλο με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.05 (SPSS Ltd., Woking, UK). Για τον έλεγχο των στατιστικών διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών όλων των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το επίπεδο σημαντικότητας $P < 0.05$.

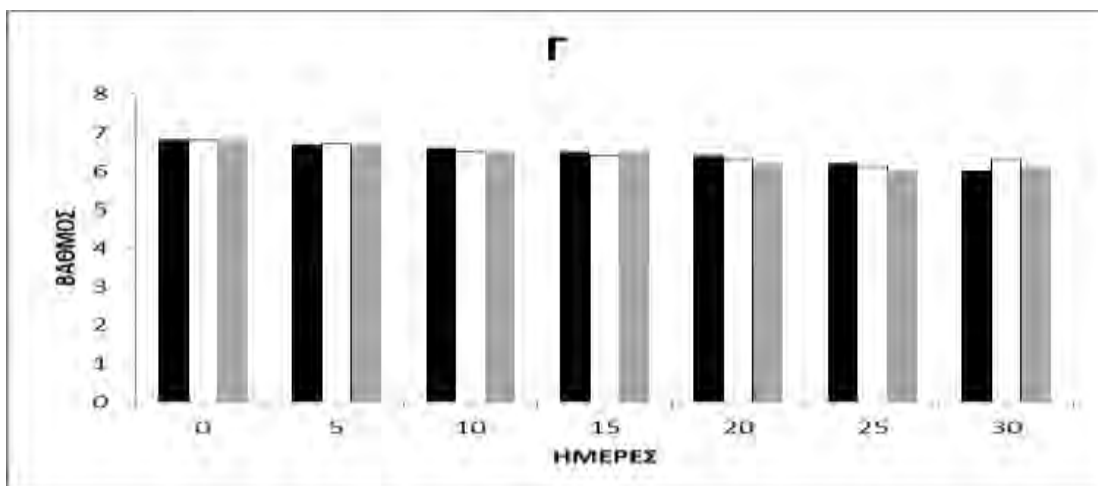
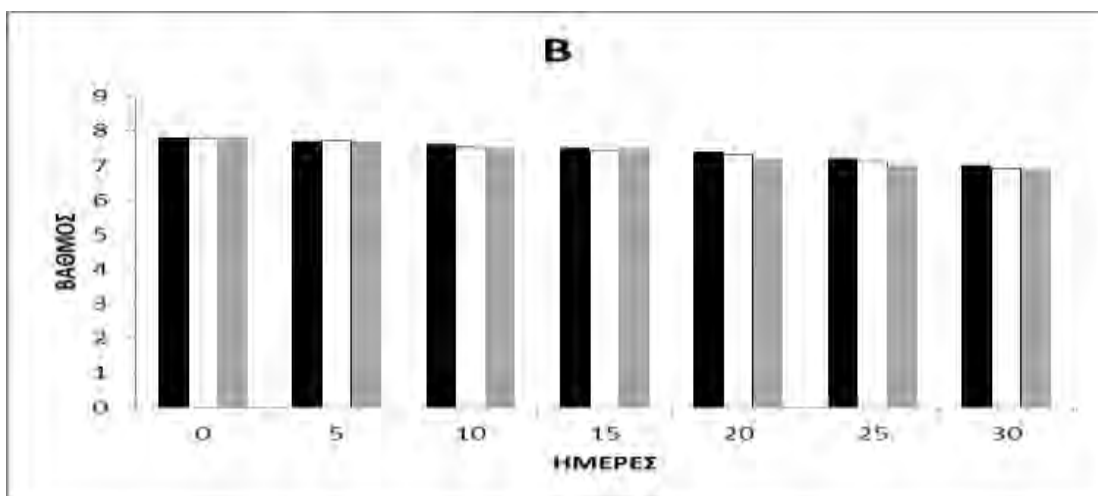
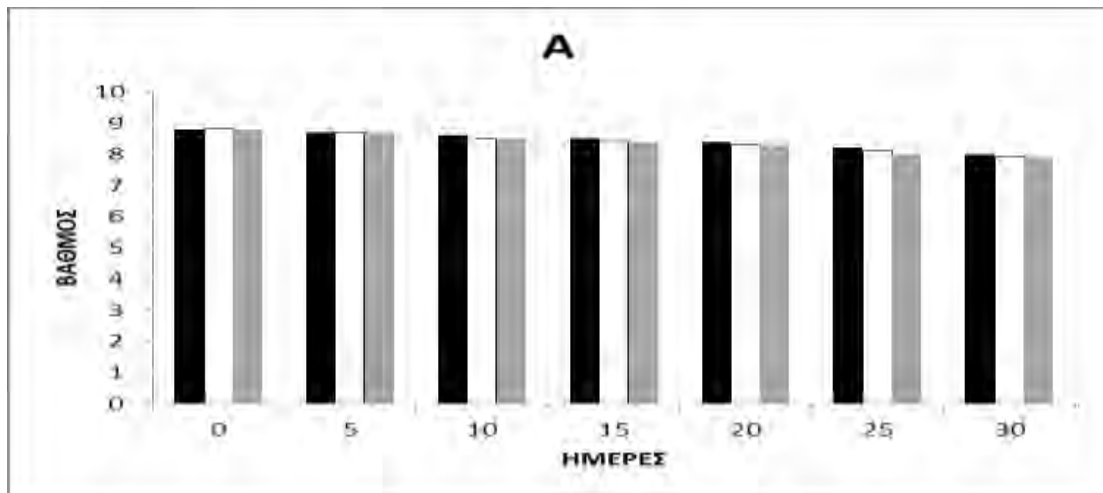
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.3.1. Φυσικοχημικός έλεγχος

Ο φυσικοχημικός έλεγχος την ημέρα 0 έδειξε τιμές για το συντελεστή ενεργού νερού (a_w) $0,902 \pm 0,03$ και για το pH $4,36 \pm 0,063$. Οι τιμές αυτές δε μεταβλήθηκαν σημαντικά ($P > 0.05$) καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης στην ψύξη.

2.3.2. Οργανοληπτικός έλεγχος

Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού έδειξαν ότι συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου ρίγανης ήταν αποδεκτές μέχρι 0,2%. Η αξιολόγηση των δειγμάτων παρέμεινε πάνω από το όριο απόρριψης για όλα τα δείγματα καθόλη τη διάρκεια της συντήρησης σε συνθήκες ψύξης και σχετίζονταν με τη συγκέντρωση του αιθέριου ελαίου (Σχήμα 2.1).

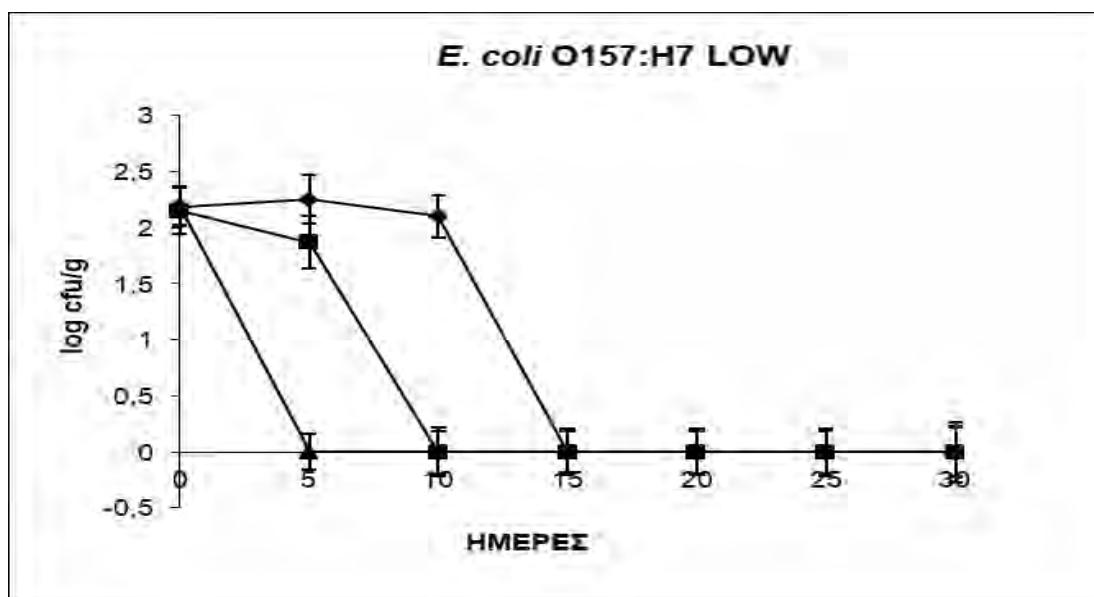


Σχήμα 2.1. Οργανοληπτική εξέταση δειγμάτων ανεβατού στα οποία προστέθηκε αιθέριο έλαιο ρίγανης σε συγκεντρώσεις 0.1% (B), 0.2% (Γ) και των μαρτύρων (A). Οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, Οσμή: στήλη μαύρου χρώματος, Γεύση: στήλη άσπρου χρώματος και Συνολική αποδοχή: στήλη γκρι χρώματος.

2.3.2. Μικροβιολογική εξέταση

Η μικροβιολογική εξέταση των δειγμάτων ανεβατού έδειξε ότι η *E.coli* O157:H7 επιβίωσε μέχρι την 15^η ημέρα, όταν ενοφθαλμίστηκε σε χαμηλούς αρχικούς πληθυσμούς (2 log cfu/g) και μέχρι την 30^η ημέρα όταν το αρχικό ενοφθάλμισμα ήταν υψηλό (4log cfu/g) (Σχήμα 1 και Σχήμα 2).

Η μείωση των πληθυσμών του παθογόνου στο τυρί ανεβατό μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες. Το ανεβατό είναι τυρί ωρίμανσης με χαμηλό pH (4,36), όμως είναι γνωστό ότι η *E.coli* O157:H7 είναι ιδιαίτερα ανθεκτική σε τέτοιες συνθήκες. Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο πρέπει να έχει η υψηλή ανταγωνιστική χλωρίδα από οξυγαλακτικά βακτήρια (Voulgari et al. 2010, Govaris et al. 2011) και η σχετικά υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι >2% (Hatzikamari et al. 1999).



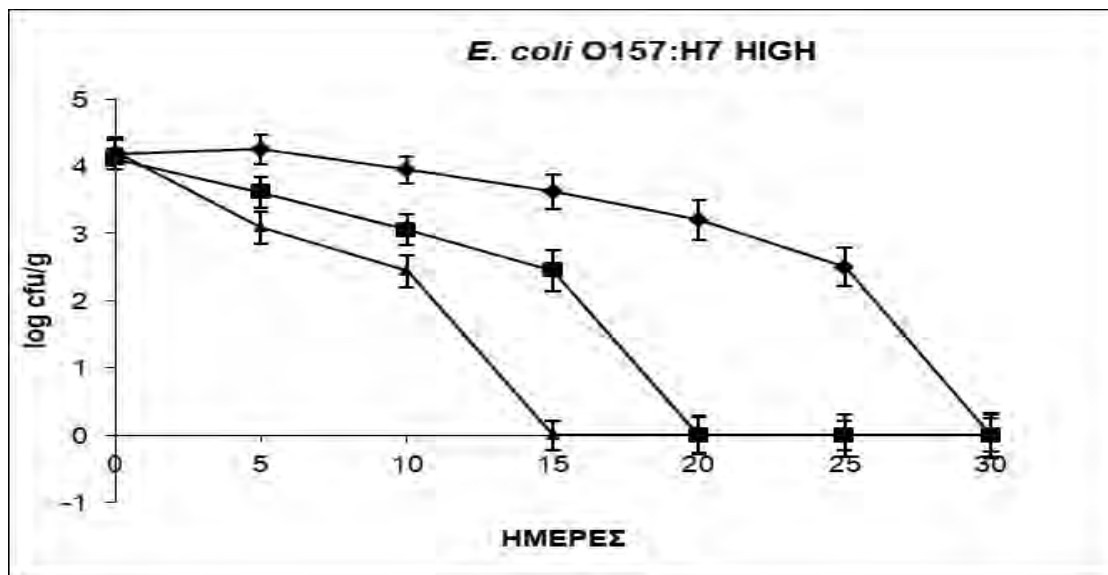
Σχήμα 2.2. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *E. coli* O157:H7 (αρχικοί πληθυσμοί 2 log cfu/g) σε τυρί ανεβατό στους 4 °C για 35 ημέρες. (-◆-) μάρτυρας, (-■-) ρίγανη 0.1% (v/wt) και (-▲-) ρίγανη 0.2% (v/wt).

Στα δείγματα τυριού που προστέθηκε το ΑΕ ρίγανης παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά της *E.coli* O157:H7, η οποία εξαρτιόταν από τη συγκέντρωση του ΑΕ. Η αντιμικροβιακή δράση του ΑΕ ρίγανης ανάλογη με τη

συγκέντρωση του κατά της *E.coli* O157:H7 αναφέρεται τόσο σε μελέτες *in vitro* (TorreS et al. 2008), όσο και σε μελέτες σε τυριά (Govaris et al. 2011, Otero et al 2014).

Στα δείγματα ανεβατού με το χαμηλό ενοφθάλμισμα, το παθογόνο επιβίωσε μέχρι τη 10^η ημέρα στα δείγματα που προστέθηκε ΑΕ σε συγκέντρωση 0,1% και μέχρι την 5^η ημέρα σε εκείνα που προστέθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση του 0,2%. Ομοίως, στα τυριά με το υψηλό ενοφθάλμισμα του παθογόνου, η επιβίωση ήταν μέχρι την 20^η και την 15^η ημέρα, σε συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου 0,1% και 0,2%, αντίστοιχα. Ανάλογα αποτελέσματα με την παρούσα μελέτη αναφέρονται από τους Govaris *et al.* (2011) σε τυρί φέτα, όπου η *E.coli* O157:H7 επιβίωσε 22 και 16 ημέρες, όταν ΑΕ ρίγανης προστέθηκε σε συγκεντρώσεις 0,1% και 0,2%, αντίστοιχα.

Επίσης, οι Otero *et al.* (2014) αναφέρουν την αναστολή της *E.coli* O157:H7 στο ισπανικό τυρί ωρίμανσης Zamorano, το οποίο παρασκευάζεται από πρόβειο γάλα. Όταν προστέθηκε αντιμικροβιακό φιλμ συσκευασίας με την προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης σε συγκεντρώσεις 6 και 8% καταγράφηκε πλήρης αναστολή του παθογόνου στο συγκεκριμένο τυρί σε συνθήκες ψύξης.



Σχήμα 2.3. Αντιμικροβιακή δράση αιθέριου ελαίου ρίγανης κατά *E. coli* O157:H7 (αρχικοί πληθυσμοί 4 log cfu/g) σε τυρί ανεβατό στους 4 °C για 35 ημέρες. (-◆-) μάρτυρας, (-■-) ρίγανη 0.1% (v/wt) και (-▲-) ρίγανη 0.2% (v/wt).

2.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προσθήκη ΑΕ ρίγανης σε δείγματα ανεβατού παρουσίασε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση κατά της *E.coli* O157:H7 τόσο σε χαμηλούς όσο και σε υψηλούς αρχικούς πληθυσμούς, η οποία ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του ΑΕ. Έτσι, στα δείγματα με τους χαμηλούς αρχικούς πληθυσμούς, το παθογόνο επιβίωσε μέχρι τη 10^η ημέρα στα δείγματα που προστέθηκε ΑΕ σε συγκέντρωση 0,1% και μέχρι την 5^η ημέρα σε εκείνα που προστέθηκε η υψηλότερη συγκέντρωση του 0,2%. Ομοίως, στα τυριά με τους υψηλότερους αρχικούς πληθυσμούς, η επιβίωση του παθογόνου ήταν μέχρι την 20^η και την 15^η ημέρα, σε συγκεντρώσεις του αιθέριου ελαίου 0,1% και 0,2%, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υπογραμμίζουν τη σημασία της χρήσης φυσικών αντιμικροβιακών προσθέτων για τον έλεγχο της *E.coli* O157:H7 στο τυρί ανεβατό κατά τη συντήρηση του στην ψύξη.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ:

- Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M.,** (1998). *Antifungal activities of Origanum vulgare subsp.hirtum, Mentha spicata, Lavandula angustifolia and Salvia fruticosa essential oils against human pathogenic fungi.* **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, 46: 1739-1745.
- Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R., & Nakamura, Y.,** (2005). **Journal of the American College of Nutrition**, 24, 257-265.
- Allan P., Bilkei G.,** (2005). *Oregano improves reproductive performance of sows.* **Theriogenology**, 63: 716–721.
- Anderson, J.W., & Gilliland, S.E.** (1999). *Effect of fermented milk (yogurt) containing Lactobacillus L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans.* **Journal of the American College of Nutrition**, 18, 43-50.
- Andrade, S., & Borges, N.** (2009). *Effect of fermented milk containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium longum on plasma lipids of women with normal or moderately elevated cholesterol.* **Journal of Dairy Research**, 76, 469- 474.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M.** (2008). *Biological effects of essential oils- A review.* **Food and Chemical Toxicology**, 46, 446-475.
- Bampidis V.A., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E.,** (2006). *Effect of dried oregano leaves versus neomycin treating newborn calves with colibacillosis.* **Journal of Veterinary Medicine A**, 53:154-156.
- Barrow, P.A., Brooker, B.E., Fuller, R., & Newport, M.J.**(1980). *The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine.* **Journal of Applied Bacteriology**, 48, 147-154.
- Bauer, K., Garbe, D. and Surburg, H.** (2001). *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses.* Wiley-VCH, Weinheim, 293.
- Beausoleil, M., Fortier, N., Guenette, S., L'ecuyer, A., Savoie, M., Franco, M., Lachaine, J., & Weiss, K.**(2007). *Effect of a fermented milk combining Lactobacillus acidophilus C11285 and Lactobacillus casei in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* **The Canadian Journal of Gastroenterology**, 21, 732-736.
- Brenes A., Roura E.,** (2010). *Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action.* **Animal Feed Science and Technology**.
- Btish, V.K., Grover, S., Pattnaik, P., & Ahmed, N.** (1999). *Fermented milk products.* In: V.K., Joshi, & A. Pandey (Eds), *Biotechnology: Food Fermentation*, Vol. 2 (pp. 781-863). Kerala, India: Educational Publishers and Distributors.
- Burt S.** (2004) *«Essential oils: their antibacterial properties and potential applications*

in foods—a review», **International Journal of Food Microbiology**, 94 : 223 – 253

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

Canillac, N. and Mourey, A. (2001). *Antibacterial activity of the essential oil of Picea excelsa on Listeria, Staphylococcus aureus and coliform bacteria*. *Food Microbiology*, 18, 261-268.

Carson, C. F., Mee, B. J. and Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1914-1920.

Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I. N. and Kontominas, M. G. (2007). *Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 oC*. *Food Microbiology*, 24, 607-617.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L. and Vlietinck, A. J. (2002). *Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo*. **Journal of Ethnopharmacology**, 79, 213-220.

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F. (1999). *In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130-135.

Crosthwaite, D. (1998). *UK trade within the flavour and fragrance industry*. *International Federation of Essential Oils and Aroma Trades-21st International Conference on Essential Oils and Aroma's*. IFEAT, London, 6-12.

Daferera D., Ziogas B.N., Polissiou M.G., (2000). GS-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agriculture & Food Chemistry**, 48: 256-2581.

Daniels, J.A., Krishnamurthi, R. and Rizvi, S.S.H. (1985) *A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality*. *J. Food Protect.*48, 532.

Davidson, P. M. and Parish, M. E. (1989). *Methods for testing the efficacy of food antimicrobials*. *Food Technology*, 43, 148-155.

Delaquis, P. J., Stanich, K., Girard, B. and Mazza, G. (2002). *Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils*. **International Journal of Food Microbiology**, 74, 101- 109.

Demetzos, C. and Perdetzoglou, D. K. (2001). *Composition and antimicrobial studies of the oils of Origanum calcaratum Juss. and O. scabrum Boiss. et Heldr. from Greece*. **Journal of Essential Oil Research**, 13, 460-462.

- Dordas C.**, (2009). *Foliar application of calcium and magnesium improves growth, yield and essential oil yield of oregano (Origanum vulgare ssp. Hirtum)*. *Industrial Crops and Products* 29:599-608.
- Dorman and Deans** (2000). *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. **Journal of Applied Microbiology** 88: 308-316.
- Dorman, H. J. D. and Deans, S. G.** (2000). *Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils*. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 308-316.
- Dugas, B., Mercenier, A., Lenoir-Wijnkoop, I., Arnaud, C., Dugas, N., & Postaire, E.**(1999). *Immunity and probiotics*. *Immunology Today*, 20,387-390.
- Edris A.E.**, (2007). *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review*. *Phytotherapy research* 21: 308-323.
- Eklund, M.W.** (1982) *Significance of Clostridium botulinum in fishery products preserved short of sterilization*. *Food Technol.*, 115, 107–112.
- Enfors, S. and Molin, G.** (1981) *The influence of temperature on the growth inhibitory effect of CO₂ on Pseudomonas fragii and Bacillus cereus*. *Can. J.Microbiol.*, 27, 15.
- Evans J., Martin S.**, (2000). *Effects of thymol non ruminal microorganisms*. *Current Microbiology*, 41: 336-340.
- Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I., Troganis A., Boskou D.**, (2002). *Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage and summer savory*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50:5294-5299.
- Faleiro, M. L., Miguel, M. G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J. C., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G. and Pedro, L. G.** (2002). *Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus*. **Letters in Applied Microbiology**, 36, 35-40
- Fan M., Chen J.**, (2001). *Studies on antimicrobial activity of extracts from thyme*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 41: 499-504.
- Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N.** (2010). *Combined effect of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets*. *Food Microbiology*, 27, 115-121.
- Fuller, R., Houghton, S.B., & Brooker, B.E.** (1981). *Attachment of Streptococcus faecium to the duodenal epithelium of the chicken and its importance in colonization of the small intestine*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 1433-1441.
- Garvie, E.I., Cole, C.B., Fuller, R., & Hewitt, D.** (1984). *The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and the metabolism of lactose in the rat*. **Journal of Applied Bacteriology**, 56, 237-245.

Giannenas I., Skoufos J., Giannakopoulos C., Wiemann M., Gortzi O., Lalas S., and Kyriazakis I., (2011). *Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes.* **J. Dairy Sci.** 94 :5569–5577.

Gitrakou, V., Kykkidou, S., Papavergou, A., Kontominas, M. G. and Savvaidis, I. N. (2008). *Potential of oregano essential oil and MAP to extend the shelf life of fresh swordfish: a comparative study with ice storage.* **Journal of Food Science**, 73, M167-M173.

Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P. and Holley, R. A. (2002). *Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham.* **International Journal of Food Microbiology**, 73, 83-92.

Gill, C.O. and Tan, K.H. (1979) *Effect of CO₂ on growth of Pseudomonas fluorescens.* *Appl. Environ. Microbiol.*,38, 237.

Gilliland, S.E., Bruce, b.b., Bush, L.J., & Stanley, T.E. (1980). *Comparison of two strains of Lactobacillus acidophilus as dietary adjuncts for young calves.* **Journal of Dairy Science**, 63, 964-972.

Gordon L. Robertson, (1993), *Food Packaging: Principles and Practice*, Marcel Dekker Inc., New York.

Guenther, E. (1948). *The Essential Oils.* D. Van Nostrand, New York.

Harpaz, S., Glatman, L., Drabkin, V. and Gelman, A. (2003). *Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater reared Asian sea bass fish (Lates calcarifer).* **Journal of Food Protection**, 66, 410-417.

Helander, I. M., Alakomi, H. -L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. and Von Wright, A. (1998). *Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria.* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 3590-3595.

Hill, J.R., Kenworthy, R., & Porter, P. (1970). *Studies of the effect of dietary lactobacilli on intestinal and urinary amines in pigs in relation to weaning and post-weaning diarrhea.* **Research in Veterinary Science**, 11, 320-326.

Hristov A.N., Ropp J.K., Grandeen K.L., Abedi S., Etter R.P., Melgar A., Foley A.E., (2005). *Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows.* **J.Anim.Sci**, 83:408-421.

<http://culinarylab-chemist.blogspot.gr/2012/03/map-modified-atmosphere-packing.html> Προσπέλαση την 18/4/2017.

http://www.control-technology.gr/bcm/uploads/upload_007.pdf Προσπέλαση την 18/4/2017.

ICAP (2010), *Κλαδική μελέτη για τυροκομικά προϊόντα*, Αθήνα

IDF (2010). *Bulletin of the International Dairy Federation: The World Dairy Situation*. [online] available from: [http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Marknadsrapporter/World% 20Dairy% 20Situation/World% 20Dairy% 20Situation% 202010.pdf](http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Marknadsrapporter/World%20Dairy%20Situation/World%20Dairy%20Situation%202010.pdf)

Jauhiainen, T., Vapaatalo, H, Poussa, T., Kyronpalo, S., Rasmussen, M., & Korpela, R.(2005). *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. **American Journal of Hypertension**, 18, 1600-1605.

Jerkovic, I., Mastelic, J. and Milos, M. (2001). *The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia*. **International Journal of Food Science and Technology**, 36, 649-654.

Josson, E., & Henningsson, S. (1991). *Establishment in the piglet gut of lactobacilli capable of degrading mixed-linked β -D-glucans*. **Journal of Applied Bacteriology**, 70, 512-516.

Juven B.J.J., Kanner F., Schved F., Weisslowicz H., (1994). *Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents*. *J. Appl. Bacteriol.*, 76:626-631.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. (1994). *Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents*. **Journal of Applied Bacteriology**, 76, 626-631.

Kandler, O., & Weiss, N. (1986). *Genus Lactobacillus*. In: P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, & J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (pp. 1209 -1234). Baltimore: Williams and Wilkins.

Karatzas, A. K., Kets, E. P. W., Smid, E. J. and Bennik, M. H. J. (2001). *The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A*. **Journal of Applied Microbiology**, 90, 463- 469.

Khumara, H.K., & Kanawjia, S.K. (2007). *Recent trends in development of fermented milks*. **Current Nutrition and Food Science**, 3,91-108.

Kikuzaki H., Nakatani N., (1989). *Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.,)*. *Agric Biol Chem.*, 53: 519-524.

King, A.D. and Nagel, C.W. (1975) *Influence of carbon dioxide up on the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa**. **J. Food Sci.**, 40, 362.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H. and Weis, N. (1989). *Antibacterial and antifungal properties of essential oil components*. **Journal of Essential Oil Research**, 1, 119 128.

Kosikowski, F. V. (1982). *Whey cheese*. In: *Cheese and Fermented Milk Foods* (eds

F.V. Kosikowski and Associates), pp. 367-373. Edwards Brothers, New York.

Kourkoutas, Y., Psarianos C., Koutinas A.A., Kanellaki M., Banat I.M., & Marchant R. (2002). Continuous whey fermentation using kefir yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2543-2547.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. and Nychas, G.-J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 453-462.

Malcata, F. X. (1991). *Hydrolysis of Butterfat by Immobilized Lipase Using Three Phase Membrane Reactors. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, Madison, WI, USA.*

Marino M., Bersani C., Comi G., (2001). *Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology*, 6: 187-195.

Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. (2001). *Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology*, 67, 187-195.

Mejlholm, O. and Dalgaard, P. (2002). *Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism Photobacterium phosphoreum in liquid media and fish products. Letters in Applied Microbiology*, 34, 27-31.

Mendoza-Yepes, M. J., Sanchez-Hidalgo, L. E., Maertens, G. and MarinIniesta, F. (1997). *Inhibition of Listeria monocytogenes and other bacteria by a plant essential oil (DMC) in Spanish soft cheese. Journal of Food Safety*, 17, 47-55.

Mexis, S. F., Chouliara, E. and Kontominas, M. G. (2009). *Combined effect of an O₂ absorber and oregano essential oil on shelf-life extension of Greek cod roe paste (tarama salad) stored at 4 °C. Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 572-579.

Milos M., Makota D., (2012). *Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and π -cymene in a model system using the Briggs Rauscher oscillating reaction. Food Chemistry* 131: 296-299.

Mourey, A. and Canillac, N. (2002). *Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers. Food Control*, 13, 289-292.

Moyler, D. (1998). *CO₂ extraction and other new technologies: an update on commercial adoption. International Federation of Essential Oils and Aroma Trades—21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT, London*, 33-39.

Mullan M. and McDowell D., (2003). *Food Packaging Technology*, Coles R., McDowell D., Kirwan M.J. (Eds). Blackwell Publishing Ltd, London, 302-339.

Muralidhara, K.S., Seggeby, G.G., Elliker, P.R., England, D.C., & Sandine, W.E. (1997). *Effect of feeding lactobacilli on the coliform and Lactobacillus flora of*

intestinal tissue and feces from piglets. Journal of Food Protection, 40, 288-295.

Murcia, M. A., Martínez-Tomé, M., Nicolás, M. C. and Vera, A. M. (2003). *Extending the shelf life and proximate composition stability of ready to eat foods in vacuum or modified atmosphere packaging. Food Microbiology*, 20, 671-679.

Nakamura, Y. (2004). *Studies on anti-hypertensive peptides in milk fermented with Lactobacillus helveticus. Bioscience Microflora*, 23, 131-138.

Narva, M., Nevala, M., Poussa, T., & Korpela, R. (2004). *The effect of Lactobacillus helveticus fermented milk on acute changes in calcium metabolism in postmenopausal women. European Journal of Nutrition*, 43, 61- 68.

Newbold C.J., McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R.J., (2004). *Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology* 114: 105-112.

Nychas, G. J.-E. (1995). *Natural antimicrobials from plants. In New Methods of Food Preservation. Gould, G. W. (ed.), Blackie Academic and Professional, London*, 58-89.

Oh H.K., Jones M.B., Longhurst W.M., (1967). *Effect of various essential oils isolated from douglas fir needles upon sheep and deer rumen microbial activity. Applied Microbiology*, 777-784.

Oluwafemi J., Pramod V., Mahajan & Fahad Al-Julanda Al-Said & Umezuruike L. (2013) «*Modified Atmosphere Packaging Technology of Fresh and Fresh-cut Produce and the Microbial Consequences—A Review*» *Food Bioprocess Technology* 6 : 303 – 329

Onodera R., (1986). *Contribution of protozoa to lysine synthesis in the in vitro rumen microbial ecosystem. Applied and Environmental Microbiology*:1350-1351.

Ozcan M., (1998). *Inhibitory effects of spice extracts on the growth of Aspergillus parasiticus NRRL2999 strain. European Food Research & Technology*, 207: 253-255.

Packiyasothy, E. V. and Kyle, S. (2002). *Antimicrobial properties of some herb essential oils. Food Australia*, 54, 384-387.

Pandit, V. A. and Shelef, L. A. (1994). *Sensitivity of Listeria monocytogenes to rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Food Microbiology*, 11, 57-63.

Phillips A. Carol «*Review: Modified Atmosphere Packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce*» *International Journal of Food Science and Technology* 1996 ; 31 : 463 – 479

Pichersky, E., Sharkey, T. D. and Gershenzon, J. (2006). *Plant volatiles: a lack of function or a lack of knowledge. Trends in Plant Science*, 11, 421.

Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R. and Casanova, J. (2002). *Chemical composition and antimicrobial activity*

of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour and Fragrance Journal**, 17, 15-19.

Ratcliffe, B., Cole, C.B., Fuller, R., & Newport, M.J. (1986) *The effect of yoghurt and milk fermented with a porcine intestinal strain of Lactobacillus reuterion the performance and gastrointestinal flora of pigs weaned at two days of age.* **Food Microbiology** , 3, 203-211.

Renault, P., Houal, L., Jacquemin, G. & Chambroy, Y. (1994). «*Gas-exchange in modified atmosphere packaging: experimental results with strawberries*». **International Journal of Food Science and Technology**, 29, 379 – 394

Rengpipat, S., Phianphak, W., Piyatiratitivorakul, S., & Menasveta, P. (1998). *Effect of probiotic bacterium on black tiger shrimp Penaeus monodon survival and growth.* **Aquaculture**, 167,301- 313.

Rodriguez-Aguilera R., Oliveira J.C., Montanez J.C., Mahajan P.V. (2011), «*Effect of modified atmosphere packaging on quality factors and shelf-life of mould surface-ripened cheese: Part II varying storage temperature*» **LWT Food Science and Technology** 44 : 337 – 342

Schaafsma, G., Meuling, W.J.A., van Dokkum, W., & C Bouley, C. (1998). *Effects of a milk product, fermented by Lactobacillus acidophilus and with fructo oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers.* **European Journal of Clinical Nutrition**, 52, 436-440.

Sellars, R.L. (1981). *Fermented dairy foods.* **Journal of Dairy Science**, 64, 1070-1076.

Shelef, L. A. (1983). *Antimicrobial effects of spices.* **Journal of Food Safety**, 6, 29-44.

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

Singh, N., Singh, R. K., Bhunia, A. K. and Stroshine, R. L. (2002). *Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing Escherichia coli O157:H7 on lettuce and baby carrots.* **Lebensmittel Wissenschaft und Technology**, 35, 720-729 .

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

Skandamis, P. N. and Nychas, G.-J. E. (2000). *Development and evaluation of a model predicting the survival of Escherichia coli O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs and oregano essential oil concentrations.* **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 1646-1653.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. (2001). *The potential application of plant*

essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiology, 18, 463-470.

Sodini, I., Lucas, A., Oliveira, M.N., Reneuf, F., & Corrieu, G. (2002). *Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and Probiotic cell counts in fermented milk processing. Journal of Dairy Science*, 85, 2479- 2488.

Soltan M.A., (2009). *Effect of essential oils supplementation on growth performance, nutrient digestibility, health condition of Holstein male calves during pre- and postweaning periods. Pakistan Journal of Nutrition* 8 (5): 642-652.

Stiles, M.E., & Holzappel, W.H.(1997). *Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology*, 36, 1- 29.

Tassou, C., Drosinos, E. H. and Nychas, G.-J. E. (1996). *Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. Journal of Food Protection*, 59, 31-34.

Thanaruttikannont, T. (1996). *Use of lactic acid bacteria as prodioticsupplement in chicken feed.* M.S. Thesis, Chulalongkorn University, Thailand.

Trichopoulou A. et al. (2006). *Trends in Food Science & Technology. Journal-Elsevier*: 498–504. [online] available from:
http://www.foodqualityorigin.org/europe/documents/Greece_Attachment%201.pdf

Tsigarida, E., Skandamis, P. and Nychas, G-J. E. (2000). *Behaviour of Listeria monocytogenes and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. Journal of Applied Microbiology*, 89, 901-909.

Tsimidou M., Papavergou E., Boskou D., (1995). *Evaluation of oregano antioxidant activity in marcerel oil. Food Res. Intern.*, 28: 431-433.

Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R., (2002). *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1561-1568.

Ultee, A. and Smid, E. J. (2001). *Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus. International Journal of Food Microbiology*, 64, 373-378.

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

Valley, G. and Rettger, L.F. (1927) *The influence of carbon dioxide on bacteria. J. Bacteriol.*, 14, 101–113.

Van de Braak, S. A. A. J. and Leijten, G. C. J.J. (1999). *Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European*

Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, 116.

Varel V.H., Miller D.N., Lindsay A.D., (2004). *Plant oils thymol and eugenol affect cattle and swine wastes emissions differently. Water Science and Technology*, 50: 207-213.

Waldenstedt L., (2003). *Effect of vaccination against coccidiosis in combination with an antibacterial oregano (Oreganum vulgare) compound in organic broiler production. Acta Agric Scand. A-Anim.Sci.* 53: 101-109.

Wallace R.J., (2004). *Antimicrobial properties of plant secondary metabolism. Proceedings of the Nutrition Society*, 63:621-629.

Wan, J., Wilcock, A. and Coventry, M. J. (1998). *The effect of essential oils of basil on the growth of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens. Journal of Applied Microbiology*, 84, 152-158.

Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T. and Cavanagh, H. M. A. (2003). *Bioactivity of Backhousia citriodora: Antibacterial and antifungal activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 76-81.

Yamamura, S., Morishima, H., Kumano-go, T., Suganuma, N., Matsumoto, H., Adachi, H., Sigedo, Y., Mikami, A., Kai, T., Masuyama, A., Takano, T., Sugita, Y., & Takeda, M. *The effect of Lactobacillus helveticus fermented milk on sleep and health perception in elderly subjects. European Journal of Clinical Nutrition*, 63,100-105.

Yanishlieva N.V., Marinova E.M., Gordon M.H., Raneva V.G., (1999). *Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. Food Chem.*, 64: 59 66.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Αγγελής Γ., (2007). *Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία*. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη.

Ανυφαντάκης, Ε. Μ. (1993). *Τυροκομία*. Εκδόσεις: Αθ. Σταμούλης, Αθήνα.

Ανυφαντάκης, Ε. Μ. (2004). *Τυροκομία: Χημεία-Φυσικοχημεία-Μικροβιολογία*, 2η έκδοση. Εκδόσεις: Αθ.Σταμούλης, Αθήνα.

Ιωάννης Σαββαΐδης, *Μάθημα Γενική Μικροβιολογία, Μικροβιολογία Υδάτινου Συστήματος και Υδατογενείς Λοιμώξεις*, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ανοιχτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα.

Κοτζεκίδου – Ρουκά Π., (2004), *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, σ. 209-214.

Κώδικας Τροφίμων Και Ποτών (2011), Κεφάλαιο ΙΧ, άρθρο 83. Διαθέσιμο στο

δικτυακό τόπο: <http://www.gcsf.gr/media/trofima/83-iss2.pdf>

Μπλούκας Ι., (2004). *Συσκευασία Τροφίμων*, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., σ.275-289.

Ντζιμάνη Αθηνά Γ.(2017), «*Μελέτη της επίδρασης φυσικών αντιμικροβιακών παραγόντων στη συντήρηση και στην ασφάλεια ημιμαγειρεμένου κρέατος πουλερικών*», **Διδακτορική διατριβή**, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Τμήμα Χημείας.

Σκουμπής Γ.Β., (1985). *Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια*. Εκτύπωση OFFSET Γιαχούδη Γιαπούλη Ο.Ε. Θεσσαλονίκη.

Σολωμάκος Νικόλαος (2007), «*Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης αιθέριων ελαίων βοτάνων και της νισίνης σε βόειο κρέας*», **Διδακτορική διατριβή**, Κτηνιατρική Σχολή ΠΘ, Εργαστήριο Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προέλευσης, Καρδίτσα.

Τζουραμάνη Ε., Ναβρουζόγλου Π., Σιντόρη Α., Λιοντάκης Α., Παπαευθυμίου Μ., Καρανικόλας Π., Αλεξόπουλος Γ., (2012). *Ρίγανη*. Ινστιτούτο Γεωργοοικονομικών και Κοινωνιολογικών Ερευνών, Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας,(ΕΘΙΑΓΕ).