

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Μικροβιακή αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής, μαριναρισμένης
σάρκας σαλιγκαριών (*Cornu aspersum*) κατά την αερόβια συντήρηση υπό ψύξη»**

ΕΛΙΝΑ ΒΑΛΑΡΟΥΤΣΟΥ

ΒΟΛΟΣ, 2017

«Μικροβιακή αλλοίωση και εμπορικός χρόνος ζωής, μαριναρισμένης σάρκας σαλγκαριών (*Cornu aspersum*) κατά την αερόβια συντήρηση υπό ψύξη»

Διμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. **Ιωάννης Σ. Μποζιάρης**, Επιβλέπων, Αναπληρωτής Καθηγητής, Παν/μίου Θεσσαλίας
2. **Πολύμερος Κωνσταντίνος** Αναπληρωτής Καθηγητής, Παν/μίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ένα μεγάλο, επίπονο, κοπιαστικό μια συνάμα εντυπωσιακό, ευχάριστο και βαθυστόχαστο ταξίδι στο χώρο της γνώσης και στο ναό της ελεύθερης έκφρασης των ιδεών τελειώνει με την ολοκλήρωση, εκπόνηση και παρουσίαση της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας, μα ένα άλλο, πιο σημαντικό, αρχίζει.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κ. Ιωάννη Μποζιάρη, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξη του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και του μέλους της εξεταστικής επιτροπής κ. Κωνσταντίνο Πολύμερο Αναπληρωτή Καθηγητή Π.Θ.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Φωτεινή Παρλασπάνη, για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθειά της, όσου αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την αμέριστη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς επίσης και για τις χρήσιμες συμβουλές,

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ και στο Γεώργιο Βέρδο, συμφοιτητή και φίλο, ο οποίος με βοήθησε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος με τις γνώσεις του, αλλά και με τη συγγραφή της παρούσας προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας με τον οποίο είχα την τιμή, την χαρά και την ευκαιρία να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο, καθώς και σε όλους τους συμφοιτητές μου με τους οποίους διήνυσα μια εκπληκτική πορεία όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της τύχης της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας αλλά και των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.*, Οξυγαλακτικά (LAB) και *Enterobacteriaceae* κατά τη συντήρηση μαριναρισμένης σάρκας σαλιγκαριών υπό ψύξη στους 2 °C. Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η διερεύνηση των μικροβιολογικών και οργανοληπτικών μεταβολών για την τεκμηρίωση του εμπορικού χρόνου ζωής των ελαφρά επεξεργασμένων σωμάτων σαλιγκαριού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης.

Ολόκληρα ενήλικα σαλιγκάρια συνολικού βάρους 5 Kg, από τοπική εταιρία, μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Αρχικά τα σαλιγκάρια τοποθετήθηκαν σε δοχεία κάτω από τρεχούμενο νερό ώστε να επανέλθουν από τη διαχείμαση στην οποία βρισκόντουσαν, να αποκολληθεί το επίφραγμα από το περιστόμιο του κελύφους τους και να καθαριστούν από τα περιττώματα. Στη συνέχεια τα σαλιγκάρια τοποθετήθηκαν σε ανοξείδωτο σκεύος και έβρασαν για 7 λεπτά σε 2,5 lt νερό με ποσότητα ξυδιού 10 ml/lt και αλατιού 3 gr/lt ώστε να θανατωθούν. Αφού τα σαλιγκάρια θανατώθηκαν και ξεχωρίστηκε η σάρκα, τοποθετήθηκαν ξανά σε ανοξείδωτο σκεύος και έβρασαν σε 2 lt νερό με ποσότητα ξυδιού 10 ml/lt και αλατιού 3 g/lt. Εφόσον επήλθε ο βρασμός των σωμάτων, τα σώματα χωρίστηκαν σε 5 ίσες ομάδες για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της θερμής και ψυχρής οξίνισης (μαριναρίσματος). Το οξινισμένο προϊόν εσωκλείστηκε σε πλαστικά δοχεία και τοποθετήθηκε στη συντήρηση στους 2 °C για 39 ημέρες. Έλαβε χώρα η οργανοληπτική αλλά και η μικροβιολογική ανάλυση όπου απαριθμήθηκαν τα *Pseudomonas spp.* σε CFC, Οξυγαλακτικά (LAB) σε MRS, *Enterobacteriaceae* σε VRBGA καθώς και η Ολική μεσόφιλη χλωρίδα σε TSA. Επίσης έγινε μέτρηση της τιμής του pH ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Οι τιμές του pH παρουσίασαν σημαντική πτώση αμέσως μετά την οξίνιση σε σχέση με το δείγμα του μάρτυρα αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα. Οι μικροοργανισμοί *Pseudomonas spp.* αποτέλεσαν τους κύριους μικροοργανισμούς αλλοίωσης του προϊόντος κατά το πέρας της περιόδου αποθήκευσης με τιμές $>7 \log_{10} \text{cfu/gr}$. Η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα φάνηκε να έχει σταθερές τιμές μέχρι και την 6 ημέρα ενώ

ξεπέρασε τους 7 $\log_{10}\text{cfu/g}$ μετά από 33 ημέρες (792 h) αποθήκευσης, ενώ τα οξυγαλακτικά βακτήρια αλλά και τα βακτήρια του γένους *Enterobacteriaceae* δεν βρέθηκαν πάνω από το όριο ανίχνευσης των 2 $\log_{10}\text{cfu/gr}$ και 1 $\log_{10}\text{cfu/g}$ αντίστοιχα, καθ' όλη τη διάρκεια.

Τα προοριζόμενα για κατανάλωση σαλιγκάρια περιέχουν σχετικά υψηλούς πληθυσμούς μικροοργανισμών ο οποίος όμως είναι δυνατό να μειωθεί με την εφαρμογή κατάλληλης θερμικής επεξεργασίας, της τεχνικής του μαρινάρισματος και με τη τήρηση των κανόνων Ορθής Υγιεινής Πρακτικής σε αποδεκτά επίπεδα, έτσι ώστε ο εμπορικός χρόνος ζωής του προϊόντος να αυξηθεί.

Τα αποτελέσματα της μελέτης καταδεικνύουν ότι ο εμπορικός χρόνος ζωής των προϊόντων, αποθηκευμένων υπό ψύξη, είναι οι 33 ημέρες (792h).

Λέξεις-Κλειδιά: μαρινάρισμα, οξίνιση, σαλιγκάρια, λεμόνι, ξύδι, *Pseudomonas spp.*, TVC, οξυγαλακτικά βακτήρια, *Enterobacteriaceae*, εμπορικός χρόνος ζωής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1	Γενικά στοιχεία για τη σαλιγκαροτροφία	7
1.2	Στοιχεία βιολογίας και παραγωγής του είδους <i>Helix aspersa</i>	8
1.3	Διατροφική αξία σαλιγκαριών	9
1.4	Αλλοίωση σαλιγκαριών	10
1.5	Ποιοτικός έλεγχος σαλιγκαριών	11
1.6	Συντήρηση σαλιγκαριών υπό ψύξη	12
1.7	Οξίνιση.....	13
1.8	Εμπόριο σαλιγκαριών	13
1.9	Μεταποίηση σαλιγκαριών	14
1.10	Σκοπός της εργασίας	15
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1	Γενικά	16
2.2	Επεξεργασία δειγμάτων	16
2.3	Οργανοληπτική αξιολόγηση	17
2.4	Μικροβιολογική ανάλυση.....	19
2.4.1	Προετοιμασία θρεπτικών υλικών	19
2.4.2	Προετοιμασία δειγμάτων για καταμέτρηση μικροβιακής χλωρίδας.....	24
2.4.3	Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών.....	25
2.5	Μέτρηση pH	26
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27
3.1	Οργανοληπτική ανάλυση.....	27
3.2	Μικροβιολογική αξιολόγηση.....	28
3.3	Ανάλυση pH.....	34
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
5.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	39
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	40
6.1	Ξενόγλωσση βιβλιογραφία	40
6.2	Ελληνική βιβλιογραφία.....	44
	ABSTRACT	45

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά στοιχεία για τη σαλιγκαροτροφία

Το σαλιγκάρι αποτελεί τρόφιμο το οποίο καταναλώνεται από εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο. Η εντατική κατανάλωση των σαλιγκαριών ξεκίνησε από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, εξαιτίας κυρίως της μεγάλης γαστρονομικής του απήχησης. Στην Ευρώπη οι πιο γνωστοί καταναλωτές σαλιγκαριών είναι οι Γάλλοι, οι Ιταλοί και οι Ισπανοί. Επίσης μεγάλη κατανάλωση παρατηρείται σε Αυστραλία και Καναδά. Όλα τα μεγάλα σαλιγκάρια είναι εδώδιμα, αλλά μόνο λίγα χρησιμοποιούνται σε εμπορική κλίμακα. (S. Serrano *et al.* 2004).

Όσον αφορά το γένος *Cornu aspersum*, περιλαμβάνει πολλά είδη αλλά μόνο λίγα διατίθενται στο εμπόριο. Στην Ελλάδα, τα σημαντικότερα είδη εδώδιμων σαλιγκαριών είναι ο κρητικός κοχλίας (*Helix aspersa*), το μαύρο σαλιγκάρι (*Helix lucorum*), το σαλιγκάρι των αμπελιών (*Helix pomatia*), και το λιανοσαλίγκαρο (*Eobania vermiculata*), ενώ στην Κύπρο πολύ γνωστό είδος αποτελεί το *Helix melanostoma*.

Η εκτροφή των σαλιγκαριών έχει μεγάλη οικονομική σημασία και απαιτεί μεγάλη επένδυση σε χρόνο, πόρους, και εξοπλισμό. Υπάρχουν τρεις τύπου εκτροφής :

1) Ανοιχτή ή εκτατική εκτροφή.

Εκτροφή σε ανοιχτό ακάλυπτο χώρο (γνωστό και ως Ιταλικό μοντέλο). Χαρακτηρίζεται από μικρή απόδοση και είναι ευάλωτη τόσο στις κλιματολογικές συνθήκες όσο και στους φυσικούς εχθρούς. Το κύριο πλεονέκτημα της εκτατικής εκτροφής είναι το χαμηλό κόστος επένδυσης.

2) Κλειστή ή πλήρως ελεγχόμενη εκτροφή

Η εκτροφή λαμβάνει χώρα σε κτίριο και σε θερμοκήπιο όπου όλες οι συνθήκες είναι ελεγχόμενες. Έχει υψηλό κόστος παραγωγής και συνήθως εφαρμόζεται για ερευνητικούς σκοπούς. Το κύριο πλεονέκτημα είναι το μεγάλο ποσοστό απόδοσης.

3) Ημιεντατική εκτροφή (γαλλικό μοντέλο)

Ο συγκεκριμένος τύπος εκτροφής διακρίνεται σε δυο στάδια. Για το πρώτο στάδιο (ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ) απαιτούνται πλήρως ελεγχόμενες συνθήκες λόγω των απαιτήσεων των ζώων. Το δεύτερο στάδιο (ΠΑΧΥΝΣΗ) λαμβάνει χώρα σε διχτυοκήπια ή εξωτερικά πάρκα.(Μ. Χατζηγιάννου,2003)

1.2 Στοιχεία βιολογίας και παραγωγής του είδους *Cornu aspersum*

Το σώμα των σαλιγκαριών διακρίνεται σε τέσσερα τμήματα: στην κεφαλή, στο πόδι, στο μανδύα και στη σπλαγχνική μάζα. Υπάρχουν δύο ζευγάρια κεραιών, όπου στα άκρα του μεγαλύτερου ζευγαριού υπάρχουν οι απλοί οφθαλμοί. Στο επάνω τμήμα του ζώου βρίσκεται η αναπνευστική κοιλότητα.

Ο πεπτικός σωλήνας είναι καλά αναπτυγμένος και η στοματική κοιλότητα είναι εφοδιασμένη με ειδικό ξύστρο που αποτελείται από πολλά μικροσκοπικά δόντια.

Η αναπαραγωγική δραστηριότητα περιλαμβάνει μια προσυζευκτική διαδικασία, η έναρξη της οποίας καθορίζεται από την εκτόξευση του ακοντίου. Το ακόντιο αποτελεί μια ασβεστολιθική κατασκευή, της οποίας ο τρόπος δράσης δεν είναι απόλυτα γνωστός αλλά φαίνεται να υποκινεί το άλλο σαλιγκάρι στην ανταλλαγή ποσοτήτων σπέρματος.

Το είδος *Cornu aspersum* είναι ένα από τα πιο γνωστά είδη εδώδιμων σαλιγκαριών. Μερικά από τα πιο κοινά ονόματα που έχουν δοθεί στο συγκεκριμένο είδος είναι στα αγγλικά brown garden nail (καφέ σαλιγκάρι των κήπων), στα γαλλικά petit gris (μικρό γκρι σαλιγκάρι), ενώ στην Ελλάδα είναι γνωστό ως κρητικός κοχλίας.(Aupinel, P. and Bonnet, J.C. 1996)

Το κέλυφος του είδους έχει σχήμα σφαιρικό με τη μεγαλύτερη διάμετρο να κυμαίνεται από 25 έως 40 mm και το ύψος από 25 έως 35 mm. Περιελίσσεται δεξιόστροφα, σχηματίζοντας 4-5 σπείρες χωρίς να σχηματίζει ομφαλό. Ο χρωματισμός τους βάση του κελύφους τους ποικίλλει από ανοιχτό κίτρινο μέχρι και σκούρο καφέ. Το κέλυφος αποτελείται από επιμήκεις ζωνώσεις το χρώμα των οποίων εξαρτάται κυρίως από περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Το *Cornu aspersum* αποτελεί ένα από τα πιο πετυχημένα εξελικτικά είδη λόγω της εξαιρετικής του προσαρμοστικότητας. Γενικά, προτιμάει υγρές περιοχές με ήπιο κλίμα, μαλακό έδαφος και χαμηλό υψόμετρο. Τα μέρη στα οποία μπορεί να εντοπιστεί είναι οι κήποι, τα πάρκα, οι αγροί, οι διαχωριστικοί φράκτες και τα δάση. Κυρίως προτιμά τα ασβεστούχα εδάφη για τη λήψη ασβεστίου.

1.3 Διατροφική αξία σαλιγκαριών

Όσον αφορά στην κατανάλωση των σαλιγκαριών παρατηρείται μεγάλη αύξηση στην Ελλάδα, την Κύπρο αλλά και σε χώρες του εξωτερικού. Τα σαλιγκάρια αποτελούν μία εύπεπτη, νόστιμη και θρεπτική τροφή. Η θερμιδική αξία του κρέατός τους είναι 60-90 Kcal ανά 100 gr κρέατος έτοιμου προς κατανάλωση. Το περιεχόμενό τους σε νερό είναι περίπου 73-89 %. Τη θρεπτική αξία του κρέατος σαλιγκαριού ενισχύει το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που περιέχει αποτελούνται από αμινοξέα που είναι χρήσιμα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η σύσταση των λιπιδίων που περιέχονται στο κρέας τους έχει υψηλό ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Σύμφωνα με μελέτες, το κρέας του *Cornu aspersum* είναι πηγή πρωτεΐνης με χαμηλό περιεχόμενο λίπους που έχει σημαντικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στη σύνθεσή του με περισσότερα από 20 άτομα άνθρακα.

Το κρέας σαλιγκαριών αποτελεί επίσης μια καλή πηγή ιχνοστοιχείων όπως πχ το σελήνιο, παρέχοντας περίπου το 50% της συνιστώμενης ημερήσιας ποσότητας αλλά και ανόργανων αλάτων όπως το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το νικέλιο, το κοβάλτιο, το αλουμίνιο, το θείο και το ιώδιο. (Eurocaracol 2002? Mayordomo 2003). Εκτός από ιχνοστοιχεία και ανόργανα άλατα, το κρέας τους αποτελεί και μια σημαντική διαιτητική πηγή βιταμινών. Η νιασίνη που αποτελεί μια υδροδιαλυτή βιταμίνη του συμπλέγματος Β και έχει ευεργετική επίδραση στο νευρικό και καρδιαγγειακό σύστημα βρίσκεται σε περιεκτικότητα 1,4 mg/100 gr βρώσιμης

σάρκας και αντιστοιχεί σε κατανάλωση 50 gr τυριού και 150 gr γιαουρτιού. Τα ιχνοστοιχεία, τα ανόργανα άλατα σε συνδυασμό με τις βιταμίνες καθιστούν το κρέας σαλιγκαριών μία σχεδόν πλήρη τροφή για τον άνθρωπο.

1.4 Αλλοίωση σαλιγκαριών

Αλλοίωση ενός τροφίμου, γενικότερα, εννοούμε την μείωση της ποιότητάς του όσον αφορά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, όπως η γεύση, η οσμή, η εμφάνιση και η υφή (Ashie et al., 1996). Ένα τρόφιμο θεωρείται αλλοιωμένο όταν έχουν πραγματοποιηθεί αλλαγές σε αυτό που το καθιστούν μη αποδεκτό για ανθρώπινη κατανάλωση (Huis in't Veld, 1996) λόγω μικροβιακής δραστηριότητας (Gill, 1986; Lambert et al., 1991; Gram and Dalgaard, 2002).

Τα τρόφιμα γενικά θεωρούνται ως φθαρτά προϊόντα τα οποία κατά τη διατήρησή τους κάτω από ορισμένες συνθήκες υφίστανται αλλοίωση και ποιοτική υποβάθμιση, το μέγεθος των οποίων εξαρτάται από το είδος του προϊόντος και τις συνθήκες διατήρησής του (Μπλούκας, 2004). Τα αίτια που προκαλούν ποιοτική υποβάθμιση και αλλοιώσεις στα τρόφιμα είναι :

- Τα μηχανικά αίτια, όπως χτύπημα κ.α
- Οι μικροοργανισμοί όπως τα βακτήρια, οι μύκητες, οι ζύμες
- Τα ενδογενή ένζυμα
- Οι φυσικοί παράγοντες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία, το οξυγόνο και το φως

Το μικροβιακό φορτίο των ζωντανών σαλιγκαριών προέρχεται από τη χλωρίδα που υπάρχει φυσιολογικά σε αυτά και από τη χλωρίδα επιμόλυνσης που προέρχεται από το περιβάλλον στο οποίο ζουν καθώς και από τη χλωρίδα των φυτών και του εδάφους που καταναλώνουν (Parlapani *et al.* 2014).

Όσον αφορά στο μικροβιακό φορτίο των σαλιγκαριών που έχουν υποστεί επεξεργασία προέρχεται από τη χλωρίδα των ίδιων των ζώων, των πρόσθετων υλικών όπως αλάτι και διάφορα καρυκεύματα, καθώς και από τη χλωρίδα επιμόλυνσης από την επαφή των επεξεργασμένων ζώων με τα χέρια του προσωπικού, με τις επιφάνειες εργασίας, με τα εργαλεία επεξεργασίας, με τα κελύφη κλπ (Wallace *et al.* 1974).

Το προσωπικό είναι δυνατόν να επιμολύνει το προϊόν ανάλογα με το αν τηρεί ή όχι τους κανόνες ορθής υγιεινής πρακτικής. Η ρινική κοιλότητα, ο φάρυγγας, οι πληγές στα χέρια και οι θηλές των τριχών στους ανθρώπους φιλοξενούν παθογόνους σταφυλόκοκκους ενώ το είδος E.coli βρίσκεται στον εντερικό σωλήνα. Έτσι, χωρίς την τήρηση υγιεινής από το προσωπικό (π.χ. πλύσιμο των χεριών), τα είδη αυτά είναι αρκετά εύκολο να φθάσουν και να επιμολύνουν το προοριζόμενο προϊόν (EC-ASEAN Economic Cooperation Programme on Standards, Quality & Conformity Assessment, 2005).

1.5 Ποιοτικός έλεγχος σαλιγκαριών

Ο ποιοτικός έλεγχος των σαλιγκαριών αποτελείται από 2 στάδια, το μακροσκοπικό και το μικροσκοπικό έλεγχο. Στο μακροσκοπικό έλεγχο, που πραγματοποιείται σε ζωντανά σαλιγκάρια, στόχος είναι η διαπίστωση του είδους και η κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα σαλιγκάρια π.χ αν είναι ζωντανά ή νεκρά, άρρωστα, ετοιμοθάνατα ή σε κατάσταση σήψης. Όσον αφορά στο μικροσκοπικό έλεγχο αυτός λαμβάνει χώρα στο μικροβιολογικό εργαστήριο και πραγματοποιείται αμέσως μόλις θανατωθούν τα σαλιγκάρια αλλά και κατά τη διάρκεια της όποιας επεξεργασίας τους για τη διαπίστωση της υγειονομικής τους κατάστασης όπως π.χ την παρουσία ή μη παθογόνων βακτηρίων και μικροοργανισμών που συμβάλλουν στην υποβάθμιση της ποιότητας των επεξεργασμένων σαλιγκαριών.

Επίσης, σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες (Gram and Dalgaard, 2002), οι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του χρόνου ζωής των τροφίμων είναι οι Ειδικοί Αλλοιωγόνοι Μικροοργανισμοί (EAM). Αρχικά, οι EAM μπορεί να βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα και να αποτελούν ένα μικρό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας (Αρβανιτογιάννης Σ.Ι., Τζούρος Η.Ν., 2004). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης, οι EAM αναπτύσσονται με πιο μεγάλο ρυθμό από ότι η υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα και παράγουν αυτούς τους μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία δυσάρεστων οσμών κι επομένως την οργανοληπτική απόρριψη (Huis in't Veld).

1.6 Συντήρηση σαλιγκαριών υπό ψύξη

Συντήρηση τροφίμων (food preservation) ορίζεται η λήψη μέτρων για την αντιμετώπιση των αιτιών που προκαλούν την ποιοτική υποβάθμιση ή την αλλοίωση των τροφίμων, έτσι ώστε αυτά να είναι αποδεκτά από τον καταναλωτή και ασφαλή για την υγεία του για καθορισμένο χρονικό διάστημα, όταν διατηρούνται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Μπλούκας,2004). Οι μέθοδοι συντήρησης για την εμπορευματοποίηση του κρέατος σαλιγκαριών έχουν αναπτυχθεί σε χώρες όπως η Αργεντινή, η Βραζιλία, το Περού και η Γαλλία και σε άλλες, οι οποίες εξάγουν τα προϊόντα τους τόσο κατεψυγμένα όσο και κονσερβοποιημένα (Morin 1999? Eurocaracol 2002), αν και τα δεδομένα για την τεχνική επεξεργασία τους δεν έχουν δημοσιευθεί ανοιχτά.

Διάφορα πειράματα προτείνουν παραπλήσιες μεθόδους για την αρχική επεξεργασία οι οποίες περιλαμβάνουν την τοποθέτηση των σαλιγκαριών σε κρύο νερό με μια χούφτα άλατος και έναν ψεκάσμο με ξύδι για 1 με 2 ώρες συνεχίζοντας με διαδοχικές εκπλύσεις με νερό χρησιμοποιώντας μια βούρτσα για την αφαίρεση ξένων υλικών (Anon 2002b, 2004).

Ως ψύξη (cold storage) εννοούμε τη διατήρηση των τροφίμων σε περιβάλλον με θερμοκρασίες από ~ 16 έως - 2 °C (Montivelle and Matthews, 2010). Η ψύξη είναι ένα μέσο για τη διατήρηση των σωμάτων των σαλιγκαριών πριν την περαιτέρω επεξεργασία ή την κατανάλωση. Όταν ένα σαλιγκάρι αποθηκεύεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, η μικροβιακή ανάπτυξη επιβραδύνεται (Μπλούκας,2004).

Επίσης, διάρκεια ζωής ορίζεται ως το χρονικό διάστημα κάτω από καθορισμένες συνθήκες αποθήκευσης για το οποίο ένα προϊόν διατροφής παραμένει ασφαλές και κατάλληλο προς χρήση (Erkan, 2007; Sallam, 2007).

Εν κατακλείδι, η αποθήκευση σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι μία μέθοδος συντήρησης που χρησιμοποιείται για την επιβράδυνση της μικροβιακής αλλοίωσης από τα μέσα του 19ου αιώνα. Έχει το πλεονέκτημα της διατήρησης της νωπότητας και των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, όμως η αδυναμία της να θανατώσει πλήρως τους μικροοργανισμούς, εγκυμονεί κινδύνους για την υγεία (Ashie *et al.*, 1996). Έτσι, οι

χαμηλές θερμοκρασίες επιβραδύνουν τη βακτηριακή ανάπτυξη και παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των τροφίμων (Lambert *et al.*, 1991).

1.7 Οξίνιση

Η συντήρηση με οξίνιση (μαρινάρισμα), είναι μία τεχνική συντήρησης που βασίζεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οργανικών οξέων. Η οξίνιση πραγματοποιείται συνήθως με μαγειρικό ξύδι, το οποίο περιέχει 3-6 % οξικό οξύ. Η οξίνιση πραγματοποιείται είτε εν ψυχρώ είτε εν θερμώ. Τέλος τα προϊόντα αποθηκεύονται σε δροσερό μέρος ή σε θερμοκρασία ψύξης (Μποζιάρης 2009).

1.8 Εμπόριο σαλιγκαριών

Στην Ελλάδα οι εξαγωγές σαλιγκαριών με προορισμό τη Γαλλία ξεκίνησε από τις αρχές του 1960. Λόγω του ότι κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 70 η αύξηση των εξαγωγών ήταν ραγδαία, ξεκίνησε η ίδρυση εμπορικών επιχειρήσεων και βιοτεχνικών μονάδων επεξεργασίας σαλιγκαριών. Το μεγαλύτερο μέρος των σαλιγκαριών οδηγούνται στα εργοστάσια μεταποίησης για επεξεργασία και στη συνέχεια για εξαγωγή. Το *H. aspersa* προέρχεται από ελληνικούς φυσικούς πληθυσμούς όπου το 20% της ποσότητας διατίθεται νωπό για εγχώρια κατανάλωση, το 45% εξάγεται νωπό ενώ το 35% προωθείται για μεταποίηση και στη συνέχεια για εξαγωγή (Μάνδαλος Η.Α 2008).

Μια επιπλοκή στην εμπορική επεξεργασία του κρέατος σαλιγκαριών είναι η παραγόμενη βλέννα ή «λάσπη» που εκκρίνεται από τα σαλιγκάρια, η οποία χρησιμοποιείται στη μετακίνηση, την άμυνα, την κατακράτηση νερού και άλλες φυσιολογικές δραστηριότητες (Gallo 2002). Η βλέννα που εκκρίνεται από τα σαλιγκάρια περιέχει σημαντικές ποσότητες κολλαγόνου, ελαστίνης και άλλα βιοχημικά συστατικά χρήσιμα στη βιομηχανία καλλυντικών (Fontanillas και Garcia 2002), και στην ιατρική (Borja 2001?. Pimentel et al 2003).

Ο κλάδος της εμπορίας και μεταποίησης σαλιγκαριών στη χώρα μας βασίστηκε κυρίως στην αφθονία ελληνικών φυσικών πληθυσμών. Η εξέλιξη του κλάδου

βασίστηκε, για παραπάνω από τρεις δεκαετίες, και στη συλλογή πληθυσμών από γειτονικές βαλκανικές χώρες λόγω του χαμηλού κόστους συλλογής. Παρ' όλα αυτά η συρρίκνωση στο μεταποιητικό κλάδο επήλθε λόγω της έλλειψης στρατηγικής, της οικονομικής κατάστασης της χώρας αλλά και την έλλειψη νωπών σαλιγκαριών υψηλής ποιότητας, από φυσικούς πληθυσμούς.

Όπως είναι αναμενόμενο, για τη διατήρηση του κλάδου είναι αναγκαίο να δημιουργηθεί παραγωγική βάση εκτροφής σαλιγκαριών με σκοπό την εξασφάλιση σαλιγκαριών υψηλής ποιότητας, σε σταθερές ποσότητες, με καθορισμένες ημερομηνίες παράδοσης, πρώτα στη βιομηχανία και μετά στον καταναλωτή που είναι και ο άμεσα ενδιαφερόμενος.

1.9 Μεταποίηση σαλιγκαριών

Από τα 12 είδη εδώδιμων σαλιγκαριών που υπάρχουν ελεύθερα στην Ευρώπη, μόνο 4-5 είναι εμπορεύσιμα, από τα οποία το *Cornu aspersum* αποτελεί το 40% του εμπορίου, το *Helix pomatia* το 28%, το *Helix lucorum* το 22% και τέλος το είδος *Eobania vermiculata* που καλύπτει το υπόλοιπο 8,5 %.

Τα σαλιγκάρια διακινούνται ζωντανά, ημιεπεξεργασμένα, επεξεργασμένα ή σε κονσέρβες κυρίως στις παρακάτω μορφές:

1. Νωπά – ζωντανά σε ξύλινα ή πλαστικά κιβώτια των 20-25 κιλών.
2. Κατεψυγμένα με κέλυφος : η σάρκα αφαιρείται και εφόσον υποστεί επεξεργασία, επανατοποθετείται μέσα στο κέλυφος με βούτυρο, μαϊντανό, σκόρδο και άλλα καρυκεύματα.
3. Σώματα σαλιγκαριών ημιεπεξεργασμένα διατηρούνται σε άλμη και διακινούνται σε μεγάλες συσκευασίες στη βιομηχανία.
4. Κονσέρβες που περιέχουν σώματα σαλιγκαριών επεξεργασμένα. Τα κελύφη τοποθετούνται ξεχωριστά, μαζί με την κονσέρβα.
5. Άδεια κελύφη έχουν μεγάλη εμπορική αξία και προωθούνται στη βιομηχανία για να γεμιστούν με κρέας σαλιγκαριών.
6. Χαβιάρι σαλιγκαριών.

1.10 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας Προπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας ήταν η διερεύνηση των μικροβιολογικών και οργανοληπτικών μεταβολών για την τεκμηρίωση του εμπορικού χρόνου ζωής των ελαφρά επεξεργασμένων σωμάτων σαλιγκαριού, αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικά

Ολόκληρα ενήλικα σαλιγκάρια συνολικού βάρους 5 Kg, από τοπική εταιρία, μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο Εμπορίας και Τεχνολογίας Αλιευτικών Προϊόντων και Τροφίμων του τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν μέσα σε σταθερό δίχτυ και μέσα σε χάρτινα κιβώτια στις 03/04/2014. Τα σαλιγκάρια βρίσκονταν στο στάδιο της διαχείμασης για 4 μήνες με φανερό το επίφραγμα που είχε κλείσει το περιστόμιο του κελύφους τους.

Τα σαλιγκάρια υπέστησαν μαρινάρισμα, τοποθετήθηκαν σε συσκευασία και αποθηκεύτηκαν στους 2 °C.

Καταμετρήθηκαν, ανά τακτά χρονικά διαστήματα (εις διπλούν), η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC), καθώς και οι πληθυσμοί μερικών από τους πιο αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, *Pseudomonas spp.*, Οξυγαλακτικά (LAB) και *Enterobacteriaceae*.

Επιπλέον έλαβε χώρα ένας γενικός οργανοληπτικός έλεγχος (χρώμα, γεύση, οσμή, εμφάνιση κτλ), για να προσδιοριστεί ο εμπορικός χρόνος ζωής των προϊόντων και να συσχετισθεί με τις μικροβιακές αλλαγές που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

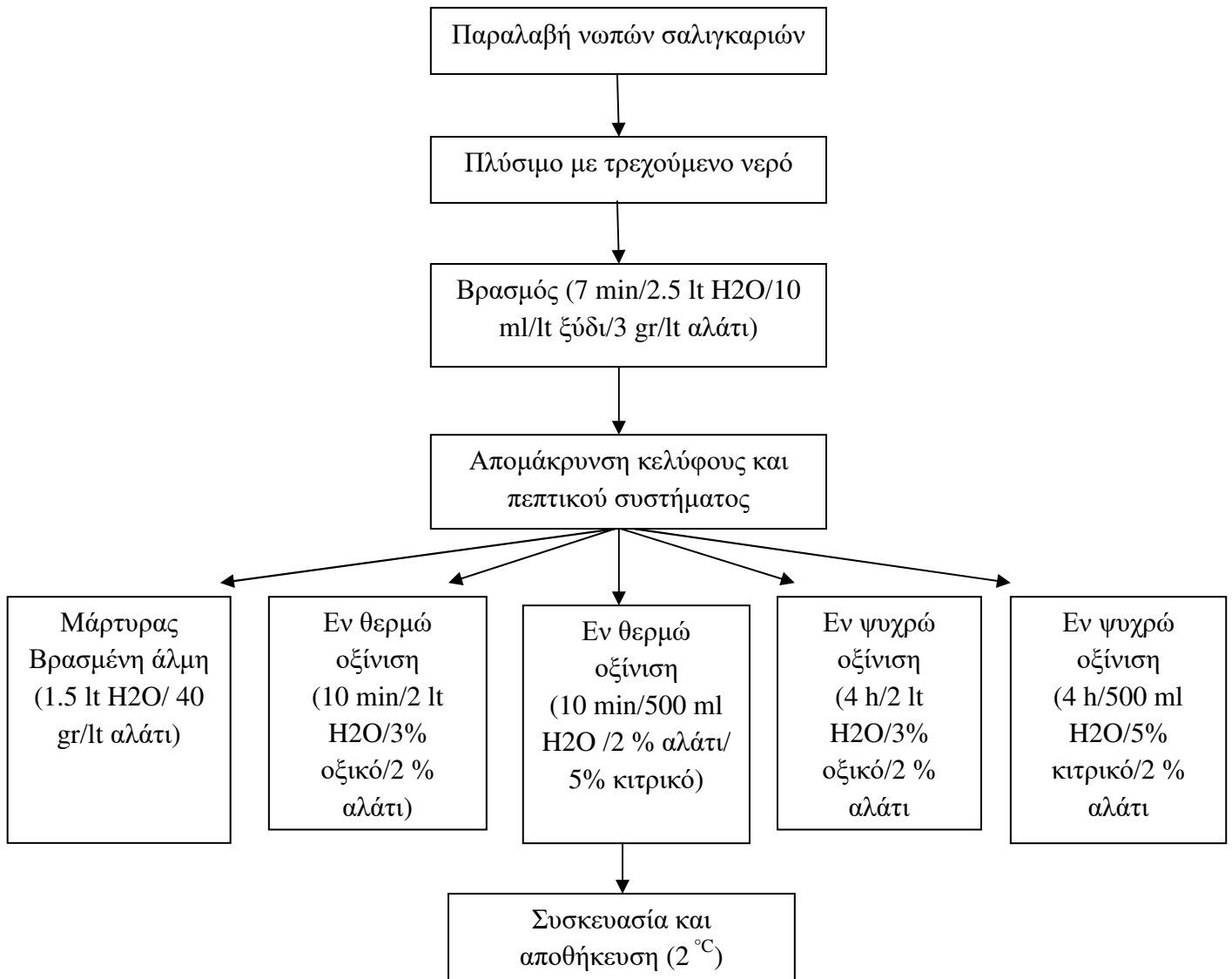
2.2 Επεξεργασία δειγμάτων

Αρχικά τα σαλιγκάρια τοποθετήθηκαν σε δοχεία κάτω από τρεχούμενο νερό ώστε να επανέλθουν από τη διαχείμαση στην οποία βρισκόντουσαν, να αποκολληθεί το επίφραγμα από το περιστόμιο του κελύφους τους και να καθαριστούν από τα περιττώματα. Στη συνέχεια τα σαλιγκάρια τοποθετήθηκαν σε ανοξείδωτο σκεύος και έβρασαν για 7 λεπτά σε 2,5 lt νερό με ποσότητα ξυδιού 10 ml/lt και αλατιού 3 gr/lt ώστε να θανατωθούν. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε λόγω της μεγάλης ποσότητας σαλιγκαριών. Στη συνέχεια αποκελυφώθηκαν με τη βοήθεια λαβίδας. Εν συνεχεία με τη βοήθεια ενός νυστεριού ξεχωρίστηκε η σάρκα από το κεφάλι και τα

σπλάγχνα των σαλιγκαριών. Τα σώματα των σαλιγκαριών τοποθετήθηκαν ξανά στο ανοξείδωτο σκεύος και έβρασαν για 7 λεπτά, σε 2 lt νερό με ποσότητα ξυδιού 10 ml/lt και αλατιού 3 g/lt. Εφόσον επήλθε ο βρασμός των σωμάτων, τα σώματα χωρίστηκαν σε 5 ίσες ομάδες. Η 1η ομάδα χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας και τοποθετήθηκε σε πλαστικό δοχείο με άλμη βρασμένη σε 1,5 lt νερό και 40 gr/lt αλάτι. Η 2η ομάδα υπέστη εν θερμώ οξίνιση για 10 λεπτά σε 2 lt νερό και ποσότητα 3% οξικό και 2% αλάτι. Η 3η ομάδα υπέστη εν θερμώ οξίνιση για 10 λεπτά σε 500 ml νερό, 2% αλάτι και 5% κιτρικό. Η 4η ομάδα υπέστη εν ψυχρώ οξίνιση για 4 ώρες σε 2 lt νερό με ποσότητα 3% οξικό και 2% αλάτι. Η πέμπτη και τελευταία ομάδα υπέστη εν ψυχρώ οξίνιση για 4 ώρες σε 500 ml νερό, με ποσότητα 5% κιτρικό και αλάτι 2%. Τα σώματα των σαλιγκαριών που υπέστησαν εν θερμώ οξίνιση τοποθετήθηκαν αμέσως σε πλαστικά δοχεία με άλμη βρασμένη σε 1,5 lt νερό και 40 g/ lt αλάτι. Μετά το πέρας των 4 ωρών, τοποθετήθηκαν σε όμοια πλαστικά δοχεία με την ίδια ποσότητα άλμης και τα σώματα των σαλιγκαριών που υπέστησαν εν ψυχρώ οξίνιση. Εν συνεχεία, τα πλαστικά δοχεία τοποθετήθηκαν στη συντήρηση στους 2 °C.

2.3 Οργανοληπτική αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση πραγματοποιούνταν σε κάθε δειγματοληψία πριν την έναρξη των αναλύσεων. Στην απεικόνιση των αποτελεσμάτων το “Άριστο” αντιστοιχεί με το 5 , το “πολύ καλό” με το 4, το “ αποδεκτό” με το 3, το “ μη αποδεκτό” με το 2 και το “απαράδεκτο” με το 1.



Σχήμα 2.3 1. Διάγραμμα ροής επεξεργασίας σάρκας σαλιγκαριών

2.4 Μικροβιολογική ανάλυση

2.4.1 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

Τα μικροβιολογικά υλικά προέρχονταν από την LAB M(Lancashire, UK).

1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX)

Το TSA είναι ένα θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την αύξηση σχεδόν όλων των μικροοργανισμών που μπορούν να αναπτυχθούν σε εργαστηριακά υλικά. Είναι κατάλληλο για την καλλιέργεια τόσο αερόβιων όσο και αναερόβιων βακτηρίων. Οι πεπτόνες καζεΐνης και σόγιας παρέχουν άζωτο (N), βιταμίνες και μέταλλα. Τα φυσικά σάκχαρα της πεπτόνης σόγιας προάγουν την ανάπτυξη. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) χρησιμεύει ως ρυθμιστής της ωσμωτικής πίεσης. Η σύνθεση του θρεπτικού φαίνεται παρακάτω:

Συστατικά: g/1000 ml

Tryptone	15.0
Soy Peptone	5.0
Sodium Chloride	5.0
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37 g θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστέθηκαν 1000 ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min και στη συνέχεια η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού, όπου μικρή ποσότητα μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH του θρεπτικού ήταν 7.3 ± 0.2 .

2. Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* spp.

Το θρεπτικό μέσο (Cetrimide, Fucidin, Cephaloridine) παρέχει όλα εκείνα τα συστατικά (π.χ. αμινοξέα, βιταμίνες, κτλ) που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των βακτηρίων του συγκεκριμένου είδους, ενώ η προσθήκη αντιβιοτικού κάνει το θρεπτικό εκλεκτικό για *Pseudomonas* spp. Η πεπτόνη ζελατίνης και η καζεΐνη από ενζυματική πέψη παρέχουν το άζωτο, το θείο και τις βιταμίνες που χρειάζονται οι μικροοργανισμοί. Το χλωριούχο μαγνήσιο ($MgCl_2$) και το θειικό κάλιο (K_2SO_4) παράγουν χρωστική. Η γλυκερόλη συμπληρώνεται ως πηγή άνθρακα (C). Οι αντιμικροβιακοί παράγοντες Sodium Nalidixate, Fucidin και Cephaloridine είναι εκλεκτικά υλικά και χρησιμοποιούνται για να αναστείλουν Gram⁺ και ορισμένα Gram⁻ βακτήρια.

Συστατικά: g/1000 ml

Gelatin Peptone	16.0
Potassium Sulphate	10.0
Enzymatic Digest of Casein	10.0
Magnesium Chloride	1.4
Bacteriological Agar	13.0

Συστατικά εκλεκτικού μέσου CFC

(κάθε φιαλίδιο περιέχει ποσότητα mg/500 ml θρεπτικού)

Cetrimide	5.0
Fucidin	5.0
Cephaloridine	25.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 25.2 g θρεπτικού υλικού και συμπληρώθηκαν 500 ml απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια συμπληρώθηκαν 5 ml γλυκερόλης και πραγματοποιήθηκε ανάδευση σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθεί το θρεπτικό. Το θρεπτικό αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min. Το τελικό pH ήταν 7.1 ± 0.2 στους 25 °C. Στη συνέχεια το θρεπτικό αφέθηκε

να κρυώσει σε υδατόλουτρο μέχρι τους 45 έως 50 °C και προστέθηκε ένα φιαλίδιο με εκλεκτικό υλικό CFC, αφού πρώτα διαλύθηκε σε 5 ml αποστειρωμένο νερό με 50 % αιθανόλη. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία ενσωμάτωσης, όπου μικρή ποσότητα θρεπτικού μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία 8 έως 15 °C για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 2.4.1: Θρεπτικό υπόστρωμα CFC (www.eolabs.com)

3. Βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*

Ο προσδιορισμός των *Enterobacteriaceae* γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, LAB088). Χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση εντεροβακτηριδίων σε τρόφιμα. Είναι εκλεκτικό υλικό χάρη στη δράση των χολικών 34 αλάτων (biles) και του κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) και έτσι αναπτύσσονται μόνο τα βακτηρίδια της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Η ζελατίνη από ενζυματική πέψη παρέχει άζωτο (N), αμινοξέα και άνθρακα (C). Το εκχύλισμα ζύμης προσφέρει τις απαραίτητες βιταμίνες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Η δεξτρόζη παρέχει υδατάνθρακες (H/C). Η αντίδραση των βακτηρίων με τη δεξτρόζη χρωματίζει τις αποικίες κόκκινες με ένα κόκκινο-μωβ φωτοστέφανο παρουσία δείκτη pH (Ουδέτερο κόκκινο, Neutral red).

Συστατικά : g/1000 ml

Yeast	3.0
Extract	
Peptone	7.0
Sodium Chloride	5.0
Bile Salts	1.50
Glucose	10.0
Neutral Red	0.03
Crystal Violet	0.002
Agar	12.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 38.5 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό θερμάνθηκε μέχρι να ομογενοποιηθεί το μίγμα (δεν χρειάζεται περαιτέρω αποστείρωση). Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 °C, στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH ήταν 7.4 ± 0.2 .

4. Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB)

Ο προσδιορισμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα de Man - Rogosa - Sharpe agar (MRS, LAB093). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) καθώς και το βασικό pH καταστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Η ενζυματική πέψη ζωικού ιστού καθώς και το εκχύλισμα βοδινού και ζύμης είναι οι πηγές άνθρακα (C), αζώτου (N) και βιταμινών. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμούμενος 35 υδατάνθρακας (H/C). Το οξικό νάτριο ($C_2H_3NaO_2$) είναι ανασταλτικός παράγοντας, ενώ μαζί με το

κιτρικό αμμώνιο (C₆H₁₇N₃O₇) δρουν ως εκλεκτικοί παράγοντες. Το φωσφορικό κάλιο (K₃PO₄) δρα ως ρυθμιστικός παράγοντας, ενώ το θειικό μαγνήσιο (MgSO₄) και το θειικό μαγγάνιο (MnSO₄) παρέχουν θετικά ιόντα για τον μεταβολισμό. Το πολυσορβικό (Polysorbate, Tween ® 80) είναι επιφανειοδραστικό, διευκολύνοντας την πρόσληψη των θρεπτικών από τους μικροοργανισμούς. Το άγαρ χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής.

Συστατικά: g/1000 ml :

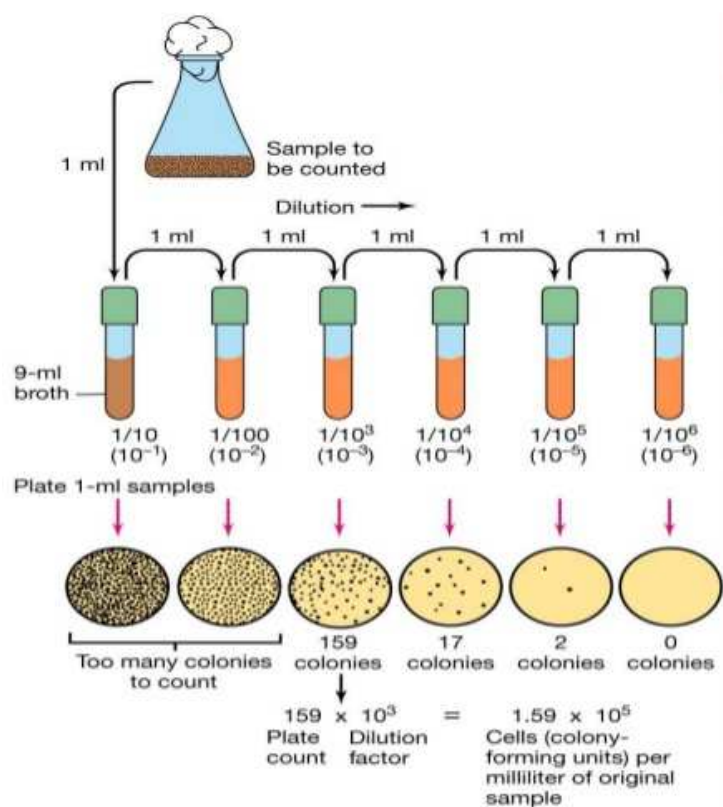
Mixed	10.0
Peptones	
Yeast Extract	5.0
Beef Extract	10.0
Glucose	20.0
Dipotassium	2.0
Phosphate	
Sodium	5.0
Acetate	
Triammonium	2.0
Citrate	
Magnesium	0.2
Sulfate	
Manganese	0.05
Sulfate	
Tween ® 80	1.08
Agar	15.0

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 70.0 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό θερμάνθηκε μέχρις ότου ομογενοποιηθεί και έπειτα αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min. Αφού το θρεπτικό κρύωσε μέχρι τους 45 έως 50 °C, ρυθμίστηκε το pH στα 6.4 ± 0.2 και στη συνέχεια μοιράστηκε σε τρυβλία Petri.

2.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων για καταμέτρηση μικροβιακής χλωρίδας

Λήφθηκαν ασηπτικά ανά 3 και στη συνέχεια ανά 6 ημέρες, 10 g σάρκας σαλιγκαριών και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη σακούλα Stomacher. Στη συνέχεια προστέθηκαν 90 ml αραιωτικού διαλύματος MRD (Maximum Recovery Diluent, 0.85 % w/v NaCl, 0.1 % w/v reptime) και η σακούλα οδηγήθηκε σε συσκευή ομογενοποίησης (BagMixer 400 VW, Interscience, London, UK), όπου τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν για 30 sec. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των δειγμάτων (Εικόνα 2.4.2) με μεταφορά 1 ml από κάθε αραιώση στον επόμενο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε εννεαπλάσια ποσότητα αραιωτικού μέσου.



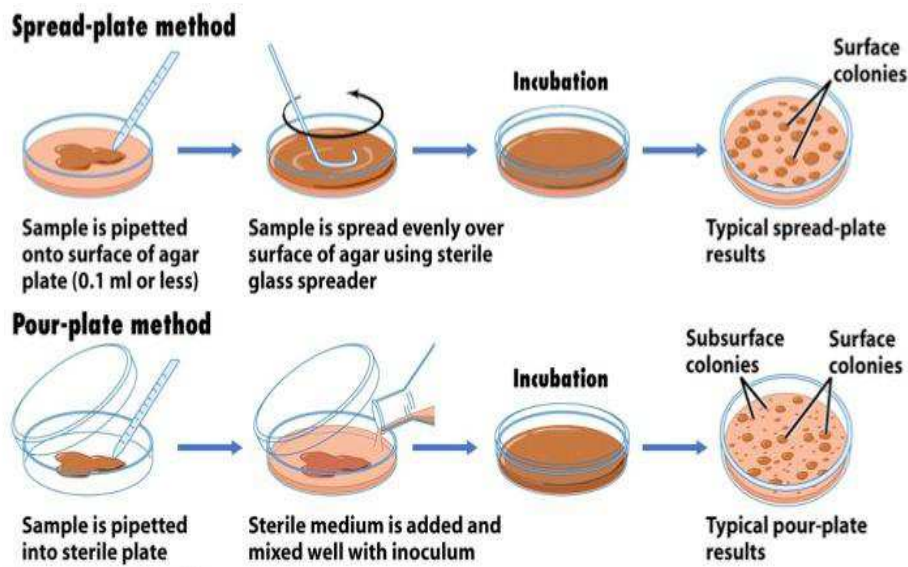
Εικόνα 2.4.2. Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος. (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2007)

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ενοφθαλισμός του βακτηριακού εναιωρήματος από κάθε αραιώση σε θρεπτικό υπόστρωμα με 2 τεχνικές, αυτή της επίστρωσης και αυτή της ενσωμάτωσης. **(Εικόνα 2.4.3).**

Στην πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) για τα θρεπτικά υλικά TSA, CFC. Η τεχνική αυτή αφορά την εξάπλωση γνωστού όγκου (0.1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό με τη βοήθεια ειδικού διανομέα. Εφαρμόζεται, γενικά, στους αερόβιους μικροοργανισμούς. Στην δεύτερη περίπτωση πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της ενσωμάτωσης (pour plate technique) για τα θρεπτικά υλικά VRBGA, MRS. Αρχικά γίνεται ενοφθαλισμός γνωστού όγκου (1 ml) από το βακτηριακό εναιώρημα του δείγματος σε τρυβλίο και στην συνέχεια γίνεται μετάγγιση τηγμένου θρεπτικού υλικού, θερμοκρασίας 45^{°C} περίπου. Στη συνέχεια, και αφού το θρεπτικό υλικό έχει στερεοποιηθεί, μεταγγίζεται επιπλέον ποσότητα θρεπτικού υλικού (overlay). Εφαρμόζεται, γενικά, στους μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς

2.4.3 Επώαση δειγμάτων και απαρίθμηση μικροβιακών πληθυσμών.

Οι μικροοργανισμοί που απαριθμήθηκαν ήταν : α) Ολικός Μεσόφιλος Πληθυσμός σε TSA, μετά από επώαση των τριβλύων στους 25^{°C} για 48 έως 72 h β) *Pseudomonas spp.* σε CFC, με καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους 25^{°C} για 48 h. γ) Enterobacteriaceae σε VRBGA, με καταμέτρηση των μωβ αποικιών με δακτύλιο μετά από επώαση στους 37^{°C} για 24 h, δ) Οξυγαλακτικά βακτήρια σε MRS Agar, με καταμέτρηση των αποικιών μετά από επώαση στους 25^{°C} για 48 h.



Εικόνα 2.4.3 Μέθοδοι μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας βακτηρίων με καταμέτρηση αποικιών επί τριβλύο. (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2007).

2.5 Μέτρηση pH

Πραγματοποιήθηκε μέτρηση pH της σάρκας των σαλιγκαριών ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της συντήρησης. Ως μέτρηση pH ορίστηκε η μέτρηση που λαμβάνονταν κατά την πρώτη αραίωση του ομογενοποιημένου δείγματος. Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού πεχάμετρου, τύπου pH 730 inoLab WTW GmbH series (Weilheim, Germany), πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της πρώτης αραίωσης που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά για την επίστρωση των τριβλύων. Το πεχάμετρο καθαριζόταν κάθε φορά, πριν και μετά τη χρήση του, με απιονισμένο νερό, για να αποφευχθεί η μεταφορά δείγματος που θα επηρέαζε το pH των υπόλοιπων δειγμάτων. Κατά τη διάρκεια του πειράματος το pH των σαλιγκαριών μετρήθηκε συνολικά 4 φορές.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Οργανοληπτική ανάλυση

A. Μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών (μάρτυρας)

Μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση, τα μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών(μάρτυρας) που είχαν αποθηκευτεί υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), την ημέρα 1 (24 h) καθώς και την ημέρα 3 (72h) αξιολογήθηκαν ως “Άριστα”. Κατά τη διάρκεια της συντήρησης άρχισε να λαμβάνει χώρα υποβάθμιση, με αποτέλεσμα τις ημέρες 6 (144h), 10 (240h), 17 (408h) η κατάσταση των σωμάτων σαλιγκαριών να χαρακτηρίζεται ως “Αποδεκτή”. Τέλος, τις ημέρες 33 (792h) και 39 (936h) χαρακτηρίστηκαν ως “ μη αποδεκτά ”.

B. Μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών (θερμής οξίνισης με ξύδι και αλάτι)

Τα μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών (θερμής οξίνισης με ξύδι και αλάτι) τις ημέρες 1 (24h), 3 (72h), 6 (144h) καθώς και την ημέρα 10(240h) χαρακτηρίστηκαν ως “Άριστα”. Τις ημέρες 17 (408h) και 33 (792) έλαβε χώρα μικρό ποσοστό υποβάθμισης και η κατάσταση των σωμάτων χαρακτηρίστηκε ως “Πολύ καλή”. Τέλος την ημέρα 39 (936h) τα δείγματα αποδείχθηκαν “αποδεκτά”.

Γ. Μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών (θερμής οξίνισης με λεμόνι και αλάτι)

Τα μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών (θερμής οξίνισης με λεμόνι και αλάτι) τις ημέρες 1 (24h), 3 (72h), 6 (144h) καθώς και την ημέρα 10 (240h) χαρακτηρίστηκαν ως “Άριστα”. Τις ημέρες 17 (408h) και 33 (792) έλαβε χώρα μικρό ποσοστό υποβάθμισης και η κατάσταση των σωμάτων χαρακτηρίστηκε ως “Πολύ καλή”. Τέλος την ημέρα 39 (936h) τα δείγματα αποδείχθηκαν “ αποδεκτά”.

Δ. Μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών (ψυχρής οξίνισης με λεμόνι και αλάτι)

Τα μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών(ψυχρής οξίνισης με λεμόνι και αλάτι) τις ημέρες 1 (24h), 3 (72h), 6 (144h) 10 (240h) καθώς και την ημέρα 17 (408h) χαρακτηρίστηκαν ως “Άριστα”. Τις ημέρες 33 (792) και 39 (936h) έλαβε χώρα η υποβάθμιση και η κατάσταση των σωμάτων χαρακτηρίστηκε ως “Πολύ καλή και “ αποδεκτή” αντίστοιχα.

Ε.Μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών (ψυχρής οξίνισης με ξύδι και αλάτι)

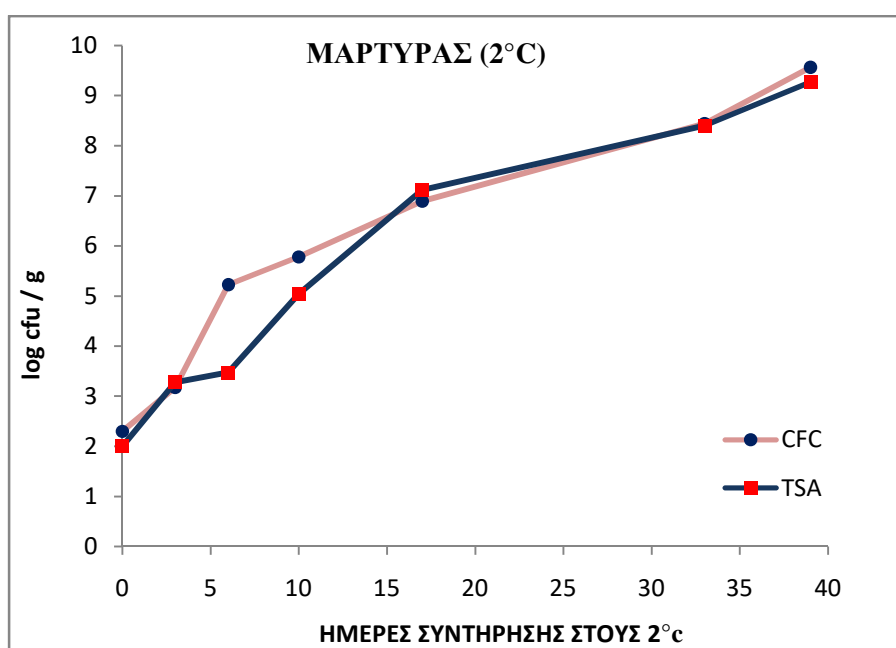
Τα μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών(ψυχρής οξίνισης με ξύδι και αλάτι) τις ημέρες 1 (24h), 3 (72h), 6 (144h) 10 (240h) καθώς και την ημέρα 17 (408h) χαρακτηρίστηκαν ως “Άριστα”. Τις ημέρες 33 (792) και 39 (936h) έλαβε χώρα η υποβάθμιση και η κατάσταση των σωμάτων χαρακτηρίστηκε ως “Πολύ καλή και “ αποδεκτή” αντίστοιχα.

3.2 Μικροβιολογική αξιολόγηση

Κατά τη συντήρηση των σωμάτων σαλιγκαριών όσων αφορά το δείγμα μάρτυρα και στο πέρας του εμπορικού χρόνου τα *Pseudomonas spp.* αποτέλεσαν τους κυρίαρχους

αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς, με πληθυσμούς $2,30 \log_{10}\text{cfu/g}$ (ημέρα 1, 24 h), $8,43 \log_{10}\text{cfu/g}$ (ημέρα 33,792 h) την ημέρα που προσδιορίστηκε ως εμπορικός χρόνος ζωής και $7,51 \log_{10}\text{cfu/g}$ στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας(ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.1**

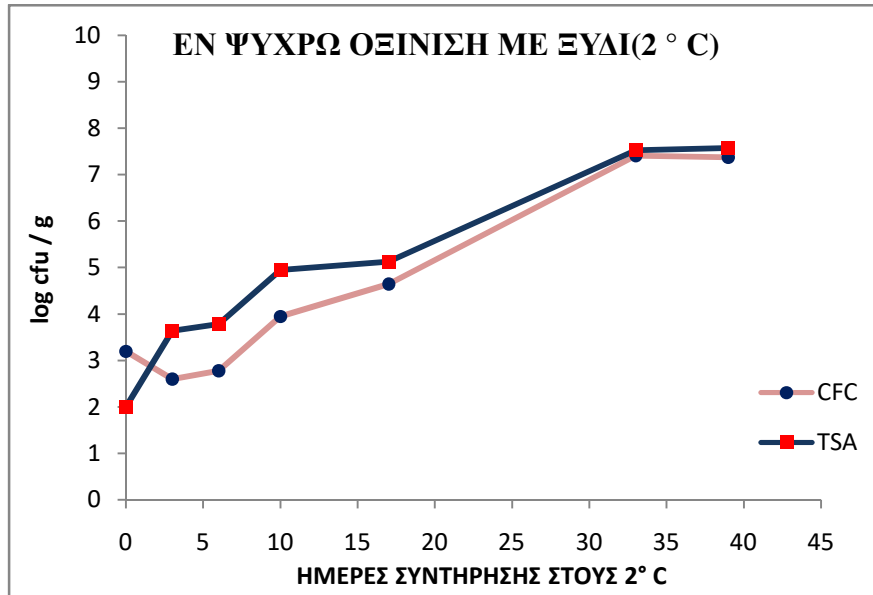
Η OMX στην αρχή του πειράματος ήταν στους $2 \log_{10}\text{cfu/g}$ (ημέρα 1, 24 h), έφτασε στους $8,39 \log_{10}\text{cfu/g}$ (ημέρα 33, 792 h), ενώ στο πέρας του πειράματος άγγιξε τους $9,26 \log_{10}\text{cfu/g}$. (ημέρα 39, 936 h).**Σχήμα 3.2.1**



Σχήμα 3.2.1 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (TSA) αλλά και των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.* (CFC) σε σώματα σαλιγκαριών που δεν έχουν υποστεί οξίνιση (μάρτυρας), κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης ($2 \pm 12^\circ\text{C}$).

Για το δείγμα των σωμάτων που υπέστησαν εν ψυχρώ οξίνιση με ξύδι και αλάτι, οι πληθυσμοί των *Pseudomonas spp.* έφτασαν στην αρχή του πειράματος τους $3,20 \log_{10}\text{cfu/g}$ (ημέρα 1, 24 h), $7,41 \log_{10}\text{cfu/g}$ (ημέρα 33, 792 h) στον εμπορικό χρόνο ζωής, ενώ στο πέρας του πειράματος τους $7,38 \log_{10}\text{cfu/g}$. (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.2**

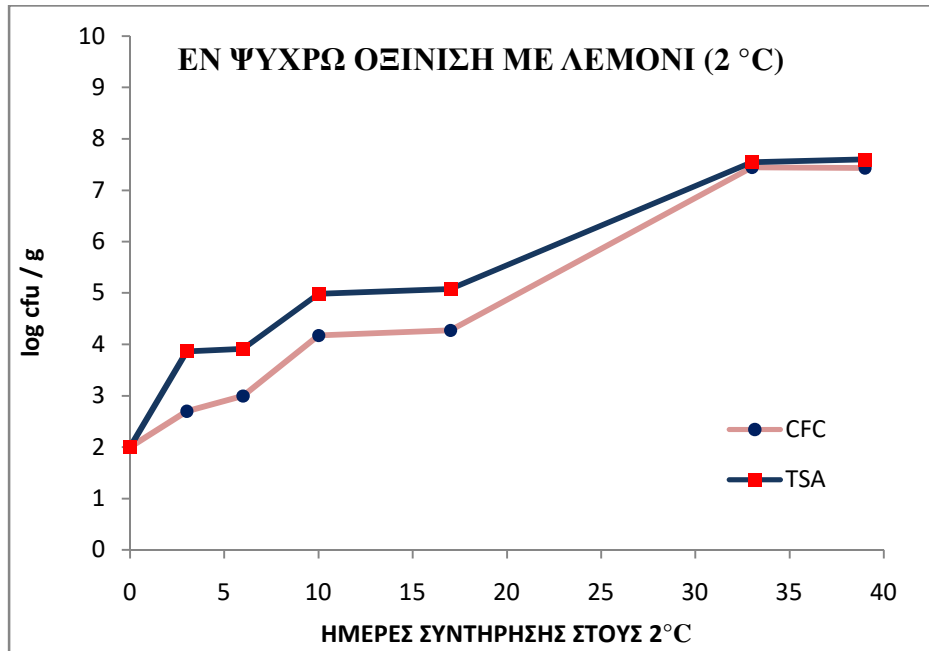
Η OMX στην αρχή του πειράματος ήταν στους 2 log₁₀cfu/g (ημέρα 1, 24 h), έφτασε στους 7,53 log₁₀cfu/g (ημέρα 33, 792 h), ενώ στο πέρας του πειράματος άγγιξε τους 7,57 log₁₀cfu/g. (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.2**



Σχήμα 3.2.2 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (TSA) αλλά και των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.* (CFC) σε μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών που έχουν υποστεί εν ψυχρώ οξίνιση με ξύδι και αλάτι, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης ($2 \pm 1^\circ\text{C}$).

Όσον αφορά το δείγμα που υπέστη εν ψυχρώ οξίνιση με λεμόνι και αλάτι οι πληθυσμοί των *Pseudomonas spp.* έφτασαν στην αρχή του πειράματος τα 2 log₁₀cfu/g (ημέρα 1, 24 h), 7,44 log₁₀cfu/g (ημέρα 33, 792 h) στον εμπορικό χρόνο ζωής, ενώ στο πέρας του πειράματος τους 7,43 log₁₀cfu/g (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.3**

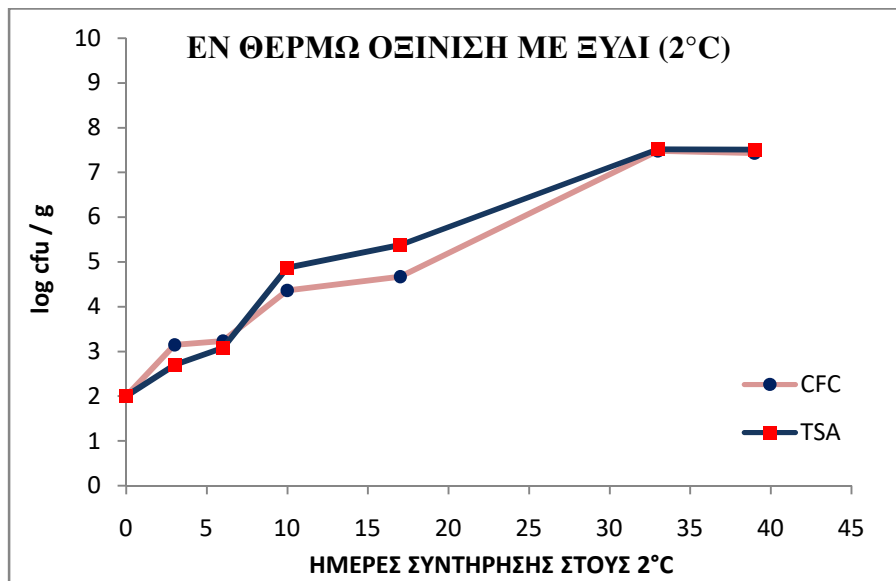
Η OMX στην αρχή του πειράματος ήταν στους 2 log₁₀cfu/g (ημέρα 1, 24 h), έφτασε στους 7,54 log₁₀cfu/g (ημέρα 33, 792 h), ενώ στο πέρας του πειράματος άγγιξε τους 7,60 log₁₀cfu/g. (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.3**



Σχήμα 3.2.3 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (TSA) αλλά και των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.* (CFC) σε μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών που έχουν υποστεί εν ψυχρώ οξίνιση με λεμόνι και αλάτι ,κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

Τα δείγματα που υπέστησαν εν θερμώ οξίνιση με ξύδι και αλάτι κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους (2 ± 11 °C) , οι πληθυσμοί των *Pseudomonas spp.* ξεκίνησαν την ημέρα 1, 24 h στους $2 \log_{10} \text{cfu/g.}$, την ημέρα που προσδιορίστηκε σαν εμπορικός χρόνος ζωής $7,48 \log_{10} \text{cfu/g.}$ (ημέρα 33, 792 h) ενώ στο πέρας του πειράματος $7,43 \log_{10} \text{cfu/g.}$ (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.4**

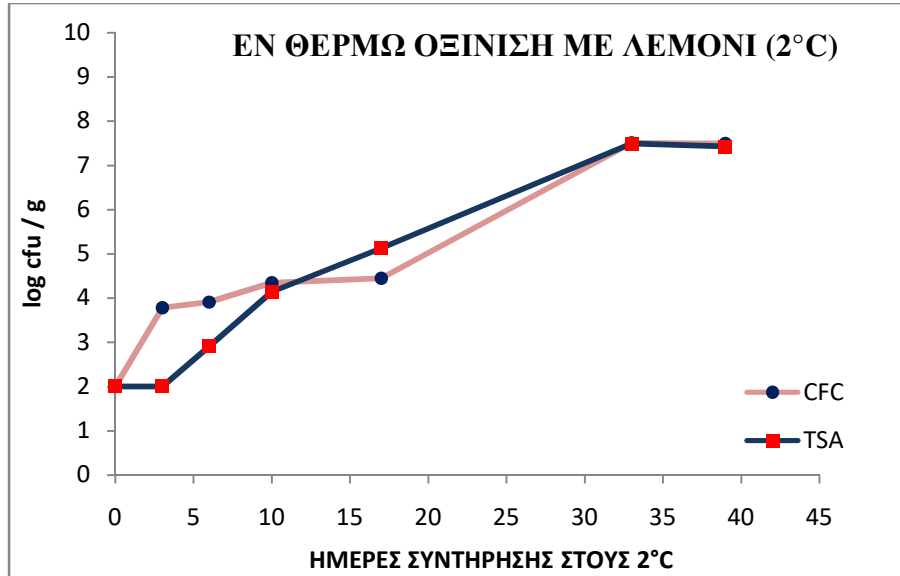
Η OMX του συγκεκριμένου δείγματος ξεκίνησε με $2 \log_{10} \text{cfu/g}$ (ημέρα 1,24 h), $7,51 \log_{10} \text{cfu/g}$ (ημέρα 33, 792 h) στον εμπορικό χρόνο ζωής και στο πέρας του πειράματος $7,50 \log_{10} \text{cfu/g}$ (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.4**



Σχήμα 3.2.4 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (TSA) αλλά και των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.* (CFC) σε μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών που έχουν υποστεί εν θερμώ οξίνιση με ξύδι και αλάτι, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

Τέλος, το δείγμα που υπέστη εν θερμώ οξίνιση με λεμόνι και αλάτι κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους (2 ± 1 °C), οι πληθυσμοί των *Pseudomonas spp.* ξεκίνησαν την ημέρα 1, 24 h στους 2 \log_{10} cfu/g., την ημέρα που προσδιορίστηκε σαν εμπορικός χρόνος ζωής 7,50 \log_{10} cfu/g. (ημέρα 33, 792 h) ενώ στο πέρας του πειράματος 7,49 \log_{10} cfu/g (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.5**

Η OMX του δείγματος ξεκίνησε με 2 \log_{10} cfu/g (ημέρα 1,24 h), 7,48 \log_{10} cfu/g (ημέρα 33, 792 h) στον εμπορικό χρόνο ζωής και στο πέρας του πειράματος 7,43 \log_{10} cfu/g (ημέρα 39, 936 h). **Σχήμα 3.2.5**



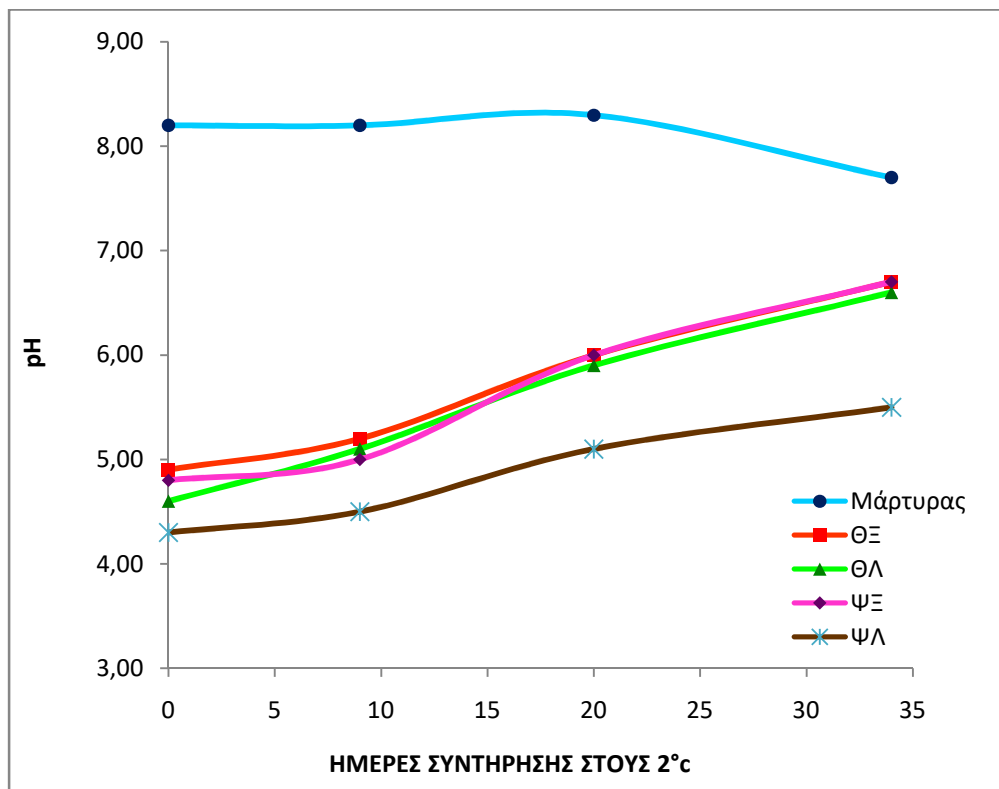
Σχήμα 3.2.5 Πληθυσμιακές μεταβολές της OMX (**TSA**) αλλά και των κυριότερων αλλοιογόνων μικροοργανισμών *Pseudomonas spp.* (**CFC**) σε μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών που έχουν υποστεί εν θερμώ οξίνιση με λεμόνι και αλάτι, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια και τα βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* βρέθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης των $2 \log_{10}\text{cfu/gr}$ και $1 \log_{10}\text{cfu/g}$ αντίστοιχα.

3.3 Ανάλυση pH

Η διακύμανση των τιμών των μαριναρισμένων σωμάτων σαλιγκαριών κατά τη διάρκεια της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C), παρουσιάζεται στο

Σχήμα 3.3.1



Σχήμα 3.3.1 Διακύμανση του pH για όλα τα δείγματα μαριναρισμένης σάρκας σαλιγκαριών κατά τη συντήρησή τους υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

(ΘΞ→θερμής οξίνισης με ξύδι)

(ΘΛ→θερμής οξίνισης με λεμόνι)

(ΨΞ→ψυχρής οξίνισης με ξύδι)

(ΨΛ→ψυχρής οξίνισης με λεμόνι)

Σύμφωνα με το σχήμα 3.3.1 οι τιμές του pH της μαριναρισμένης σάρκας σαλιγκαριών παρουσίασε αξιοσημείωτες μεταβολές. Συγκεκριμένα, οι τιμές, την ημέρα

της έναρξης του πειράματος ήταν 8,2 (μάρτυρας), 4,9 (θερμής οξίνισης με ξύδι), 4,6 (θερμής οξίνισης με λεμόνι), 4,8 (ψυχρής οξίνισης με ξύδι) και 4,3 (ψυχρής οξίνισης με λεμόνι). Την ημέρα 9 (216h) οι τιμές ήταν 8,2(μάρτυρας), 5,2 (θερμής οξίνισης με ξύδι), 5,1 (θερμής οξίνισης με λεμόνι), 5 (ψυχρής οξίνισης με ξύδι) και 4,5 (ψυχρής οξίνισης με λεμόνι). Ακολούθησε η ημέρα 20 (480h) με τιμές 8,3 (μάρτυρας), 6 (θερμής οξίνισης με ξύδι), 5,9 (θερμής οξίνισης με λεμόνι), 6 (ψυχρής οξίνισης με ξύδι) και 5,1 (ψυχρής οξίνισης με λεμόνι). Την ημέρα 34 (816h) που ήταν και η τελευταία μέτρηση pH που πραγματοποιήθηκε, οι τιμές της μαριναρισμένης σάρκας σαλιγκαριών ήταν 7,7 (μάρτυρας), 6,7 (θερμής οξίνισης με ξύδι), 6,6 (θερμής οξίνισης με λεμόνι), 6,7 (ψυχρής οξίνισης με ξύδι) και 5,5 (ψυχρής οξίνισης με λεμόνι).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αλλοίωση του κρέατος προσδιορίζεται από τις οργανοληπτικές αλλαγές (οσμή, χρώμα, υφή, κτλ) που συμβαίνουν στη σάρκα τους αλλά και τη μικροβιακή αλλοίωση.

Η συντήρηση με οξίνιση είναι ένας τρόπος συντήρησης που βασίζεται στις αντιμικροβιακές ιδιότητες των οργανικών οξέων. Ασθενή οργανικά οξέα μικρού μοριακού βάρους όπως το οξικό, το κιτρικό, το προπιονικό οξύ, περιλαμβάνονται μεταξύ των κυριότερων χημικών ουσιών με αντιμικροβιακή δράση που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη συντήρηση των τροφίμων, λόγω της διαλυτότητάς τους, της χαμηλής τοξικότητάς τους και της γεύσης τους (Sallam, K. I. (2007)). Έχει παρατηρηθεί ότι τα ασθενή οργανικά οξέα είναι πιο αποτελεσματικά σε όξινο παρά σε ουδέτερο περιβάλλον, γεγονός που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα οξέα αυτά είναι δραστικά έναντι των μικροοργανισμών κυρίως στην αδιάστατη μορφή τους, καθώς έχουν τη δυνατότητα να διαπερνούν στη κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών και να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων (Gould et al. 1989).

Η παρουσία αλατιού, χυμό λεμονιού και ξυδιού λειτούργησε ευεργετικά στην ποιότητα των δειγμάτων και στη συντήρησή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα (>30ημέρες) στους ($2 \pm 1^{\circ}\text{C}$) και παράτεινε κατά 10 ημέρες την ποιότητα των προϊόντων απ ότι αν δεν είχαν υποστεί οξίνιση.

Μετά την οργανοληπτική αξιολόγηση των μαριναρισμένων σωμάτων σαλιγκαριών αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης ($2 \pm 1^{\circ}\text{C}$), ο εμπορικός χρόνος ζωής των ιχθύων αυτών προσδιορίστηκε στις 33 ημέρες (792 h). Ωστόσο οι τεχνικές οξύνισης και θερμικής επεξεργασίας σαλιγκαριών που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ποικίλουν, γι αυτό το λόγο και το μικροβιακό φορτίο της μαριναρισμένης σάρκας σαλιγκαριού ποικίλει. Υπήρξαν άλλες προτεινόμενες μέθοδοι, οι οποίες περιλαμβάνουν την τοποθέτηση των σαλιγκαριών να μουλιάσουν για 1 με 2 ώρες σε κρύο νερό με μία χούφτα άλατος και έναν ψεκασμό ξυδιού (Anon 2002b,2004). Άλλες μελέτες παρέχουν περαιτέρω πληροφορίες συμπεριλαμβανομένης της προσθήκης $\frac{1}{2}$ του φλιτζανιού άλατος και $\frac{1}{4}$ του φλιτζανιού ξύδι για κάθε 50 σαλιγκάρια αφήνοντάς τα για 4 ώρες (Murphy 2001). Τέλος σύμφωνα με τους (Anon2003a) προτείνεται μούλιασμα για 2 ώρες σε ζεστό νερό με 3 χούφτες χοντρό αλάτι συν 1 φλυτζάνι ξύδι .

Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα σε ωμά σαλιγκάρια κυμαίνεται από 6-8 $\log_{10}\text{cfu/g}$. Η μείωση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας κατά τη διάρκεια των βημάτων επεξεργασίας

του κρέατος σαλιγκαριών στο πείραμα είναι σημαντική επειδή ο συνολικός μικροβιακός πληθυσμός είναι σημαντικός δείκτης ποιότητας σε προϊόντα διατροφής αφού η μείωση της TVC καθυστερεί την αλλοίωση των τροφίμων.

Στην παρούσα μελέτη η ολική μεσόφιλη χλωρίδα και τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* ήταν οι κύριοι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί των μαριναρισμένων σωμάτων σαλιγκαριών αποθηκευμένων υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης (2 ± 1 °C).

Πιο συγκεκριμένα, οι κύριοι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί ήταν τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas spp.* με πληθυσμούς την ημέρα απόρριψης $7,41 \log_{10}\text{cfu/g}$, ενώ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης τους $7,38 \log_{10}\text{cfu/g}$ για τα σώματα που υπέστησαν εν ψυχρώ οξίνιση με ξύδι, $7,44 \log_{10}\text{cfu/g}$ την ημέρα απόρριψης και $7,43 \log_{10}\text{cfu/g}$ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης για τα σώματα σαλιγκαριών που υπέστησαν εν ψυχρώ οξίνιση με λεμόνι, $7,48 \log_{10}\text{cfu/g}$ την ημέρα απόρριψης και $7,43 \log_{10}\text{cfu/g}$ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης για τα δείγματα που υπέστησαν εν θερμώ οξίνιση με ξύδι και τέλος $7,50 \log_{10}\text{cfu/g}$ την ημέρα απόρριψης και $7,49 \log_{10}\text{cfu/g}$ στο πέρας του χρόνου αποθήκευσης για τα δείγματα που υπέστησαν εν θερμώ οξίνιση με λεμόνι.

Ακόμη, η αρχική OMX της παρούσας μελέτης για τα μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών αποθηκευμένα υπό αερόβιες συνθήκες ψύξης στους 2°C σημείωσε χαμηλές σταθερές τιμές για τουλάχιστον 6 ημέρες που κυμαινόταν από 2-3 $\log_{10}\text{cfu/g}$ σε όλα τα δείγματα. Σχετικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στη μελέτη της (Παρλαπάνη, 2009) όπου η OMX σε μεταποιημένα πόδια σαλιγκαριών σε συνθήκες ψύξης στους 5°C παρέμεινε σταθερή για 5-6 ημέρες και μετά το πέρας των 6 ημερών σημείωσε αύξηση.

Σύμφωνα με τους Adams και Moss (1995) η ανάπτυξη των μεσόφιλων βακτηρίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20°C με 25°C) ευνοείται σε σχέση με τους 2°C διότι είναι πιο κοντά στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους ενώ οι 5°C αποτελούν την χαμηλότερη θερμοκρασία ανάπτυξής τους.

Αρκετά μεσόφιλα βακτήρια καθώς και της οικογένειας *Enterobacteriaceae* ανήκουν στα Gram αρνητικά βακτήρια για τα οποία είναι γνωστό ότι είναι ευαίσθητα σε θερμοκρασίες ψύξης (Κοτζεκίδου – Ρουκά, 2000). Οπότε, η αποθήκευση στους 2°C καθυστερεί την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων και η αλλοίωση επιτυγχάνεται όταν τα

βακτήρια φθάσουν σε σχετικά υψηλούς αριθμούς (107 - 108 cfu/g) (Huis in't Veld, 1996).

Επίσης τα μειωμένα επίπεδα των βακτηρίων της οικογένειας *Enterobacteriaceae* τα οποία αποτελούν τμήμα της OMX, είναι πολύ σημαντικά διότι η οικογένεια αυτή τα συνολικά κολοβακτηριοειδή τα οποία χρησιμοποιούνται ως μικροοργανισμοί δείκτες για την ανίχνευση κοπρανώδους μόλυνσης και για την πιθανή παρουσία παθογόνων μικροβίων στα τρόφιμα (Cakir et al., 2002).

Τέλος, τα οξυγαλακτικά βακτήρια, στην παρούσα μελέτη, δεν ξεπέρασαν το όριο ανίχνευσης των 2 λογαρίθμων, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος για τα μαριναρισμένα σώματα σαλιγκαριών. Επιπλέον, αναπτύσσονται βραδέως σε αερόβιες συνθήκες ψύξης (Huis in't Veld, 1996).

Δεν βρέθηκαν ανάλογες έρευνες για να είναι δυνατή η σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων.

Επιπρόσθετα το pH στην παρούσα μελέτη κατέγραψε χαμηλότερες τιμές μετά από την οξίνιση σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα αλλά και τα δείγματα που είχαν υποστεί οξίνιση με λεμόνι είχαν χαμηλότερες τιμές pH σε σχέση με τα δείγματα που είχαν υποστεί οξίνιση με ξύδι, δεδομένου ότι το λεμόνι έχει χαμηλότερο pH από το ξύδι, γεγονός που εξηγεί και την καλή κατάσταση του προϊόντος για τόσο μεγάλο χρονικό διάστημα. Η αύξηση στις τιμές του pH πιθανώς οφείλεται στα προϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων του γένους *Pseudomonas spp.* και συγκεκριμένα στην παραγωγή αμμωνίας/αμμινών.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρουσία μικροοργανισμών στα τρόφιμα μπορεί να οφείλεται στην επεξεργασία των τροφίμων. Ο κίνδυνος για τους καταναλωτές αυξάνεται με την κατανάλωση μη θερμικώς επεξεργασμένων προϊόντων (Antonello Cicero et al. 2015). Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα υποδεικνύει το επίπεδο μικροβιακής μόλυνσης ενός προϊόντος (Maturin and Peeler, 1998). Αν και αυτό μπορεί να μην σχετίζεται άμεσα με τον κίνδυνο για την ασφάλεια των τροφίμων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υποδείξει την ποιότητα, τη διάρκεια ζωής και τη μόλυνση μετά τη συγκομιδή των τροφίμων. Στο πείραμα, η οξίνιση (μαρινάρισμα) του προϊόντος επέδρασε ευεργετικά κυρίως σε οργανοληπτικό επίπεδο και έτσι η εμπορική αξία της μαριναρισμένης σάρκας σαλιγκαριού διήρκησε για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα δεδομένου ότι δεν υπήρχαν εμφανή δείγματα αλλοίωσης του προϊόντος.

Η θερμική επεξεργασία μπορεί να διασφαλίσει την μικροβιακή ασφάλεια των προϊόντων. Ωστόσο, τα βήματα που ακολουθούν την διαδικασία της θερμικής επεξεργασίας μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση του προϊόντος με παθογόνους παράγοντες εάν δεν υπάρχουν επαρκείς πρακτικές υγιεινής. Για το λόγο αυτό, η παραγωγή ασφαλών τροφίμων πρέπει να βασίζεται στην εφαρμογή της GHP, ορθή πρακτική παρασκευής (GMP) και εφαρμογή του συστήματος HACCP.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

6.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

Adams M.R. and Moss M.O. (1995). Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry.

Anonymous. (2003a). Caracoles (Helicicultura). Agroconnection S.A., Buenos Aires, Argentina.

Anonymous. (2002b). Cría de Caracoles o Helicicultura. Desarrollo de unidad de información y comunicaciones (UNICO). Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile.

Anonymous. (2004). Biología del Caracol (*Helix aspersa*). Sociedad Agrícola San Juan Ltda. Microempresa adscrita a la Corporación industrial para el desarrollo regional del Bio-Bio (CIDERE Bio Bio). Concepción, VIII Región, Chile

Antonello Cicero, Giuseppe Giangrosso, Gaetano Cammilleri, Andrea Macaluso, Vittoria Curro, Lucia Gluppo, Daniela Vargetto, Domenico Vicari, Vincenzi Ferrantelli (2015). Microbiological and chemical analysis of land snails commercialized in Sicily. Italian journal of food safety 28. 4(2): 4196

Ashie, I. N. A., Smith, J. P., Simpson, B. K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 36 (1 & 2): 87-121.

Aupinel, P. and Bonnet, J.C. (1996). Influence de la photopériode sur l'activité saisonnière de l'escargot Petit-gris (*Helix aspersa* Müller). Effet spécifique sur la croissance et la reproduction. INRA Prod. Anim. 9(1), 79–83.

Borja, D. (2001). Estudio de Prefactibilidad de la Cría de Escargot, pp. 1–73, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Quito, Ecuador

Cakir I., Douan H. B., Bappinar E., Keven F. and Halkman A. K. (2002). The Need for Confirmation in Coliform and E. coli Enumeration in Foods. *Turk J Vet Anim Sci.*, 26: 1049-1053.

Erkan, N. (2007). Sensory, chemical, and microbiological attributes of sea bream (*Sparus aurata*): Effect of washing and ice storage. *International Journal of Food Properties* 10: 421-434.

Eurocaracol. (2002). *Caracoles de Tierra Vivos y Congelados*. B.C. Eurocaracol S.L., Carretera Madrid, Cádiz, Spain.

Fontanillas, J. and Garcia, I. (2002). *El Caracol y la Helicicultura*, p. 300, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain.

Foteini F Parlapani, Christos Neofitou and Ioannis S Boziaris*(2013). Microbiological quality of raw and processed wild and cultured edible snails. *J Sci Food Agric* 2014; 94: 768–772

Gallo, G. (2002). *El Caracol. Cría y Explotación*, 2nd edn, p. 184, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, Spain

Gill, C. O. (1996). Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats. *Meat Science*. Vol. 43, No. 5, S99-S109.

Gould G.W. ed. (1989). *Mechanisms of Action of Food Preservation Producers*. Elsevier Science Publishers, UK.

Gram, L. and Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria - problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology* 13. 262-266.

Huis in't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33. 1-18.

Karen H. Bartlett And T. J. Trust*.(1976). Isolation of Salmonellae and other potential pathogens from the freshwater aquarium snail *Ampullaria*. Applied and environmental microbiology, May1976, p. 635-639

Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. (1991). Shelf-life extension and microbiological safety of fresh meat: a review. Food Microbiology 8. 267-297.

Madigan, M., T., Martinko, J., M., Parker, J. (2007). Βιολογία των μικροοργανισμών. Κεφάλαιο 6: Μικροβιακή Αύξηση. σελ. 168-169. Τόμος I. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Mayordomo, I. (2003). Cría Biológica del Caracol, p. 222, Edit. Ediciones Agrotécnicas, Jeréz, Spain.

Montville, J. T. and Matthews, K. R. (2010). Μικροβιολογία Τροφίμων. Κεφάλαιο 6: Μικροοργανισμοί Δείκτες και Μικροβιολογικά Κριτήρια. σελ. 85-86. Κεφάλαιο 24: Φυσικές Μέθοδοι Συντήρησης Τροφίμων. σελ. 390.

Morin, R. (1999). Élevagé de L'escargot. Station Technologique Piscicole des Eaux Douces. Document d' information. Direction générale des pêches et de l'aquaculture commerciales, pp. 1–10, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Quebec, Canada.

Murphy, B. (2001). Breeding and Growing Snails Commercially in Australia. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Project No. ARH-1A. RIRDC Publication No. 00/188. ISBN 0 642 58219 X. ISSN 1440-6845, p. 44. Australian Heliculture Research Centre, Moruya, New South Wales, Australia.

Pedro Cerezal Mezquita , Paula Escobar Madariaga and Yanina Marin Segovia(2009) .A practical approach to preparation and meat preservation by refrigeration or freezing of the land snail(*helix aspersa muller*). Journal of Muscle Foods 20 (2009) 401–419.

Pimentel, J.M., Patino, A.R. and Lanchuecha, F. (2003). Instalación de granja para escargot de exportación. Resumen Ejecutivo, Criadero de Caracoles de Tierra, Proinversión, pp. 1–12, Agencia de Promoción de la Inversión Privada, Lima, Peru.

Sallam, K. I. (2007). Chemical, sensory and shelf life evaluation of sliced salmon treated with salts of organic acids. Food Chemistry 101. 592-600.

S. Serrano,1 L. M. Medina,1 M. Jurado,2 AND M. Jodral1*(2004). Microbiological Quality of Terrestrial Gastropods Prepared for Human Consumption. Journal of Food Protection, Vol. 67, No. 8, 2004, Pages 1779–1781

Wallace H. Andrews,* Clyde R. Wilson, Aida Romero, And Paul L. Poelma. (1974) The Moroccan food snail, *helix aspersa*, as a source of salmonella. Applies microbiology p. 328-330

6.2 Ελληνική βιβλιογραφία

Αρβανιτογιάννης Σ.Ι., Τζούρος Η.Ν., (2004). Επιλογή, Συντήρηση και Μεταχείριση Τροφίμων. Οδηγός Καταναλωτή για Ασφαλή Μεταχείριση Τροφίμων. Εκδόσεις Σταμούλη: 145-147.

Καράμπελας Δημήτριος. (2013).Επίδραση αιθέριου ελαίου δενδρολίβανου στη συντήρηση και στην ασφάλεια μαρινάτου γαύρου(*Engraulis encrasicolus*)

Κοτζεκίδου – Ρουκά, Π. (2000). Μικροβιολογία Τροφίμων. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.

Μάνδαλος Η.Α .(2008). Η δυναμική της προσφοράς των ελληνικών σαλιγκαριών στην αγορά της Ε.Ε .Προπτυχιακή διπλωματική εργασία. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Βόλος.

Μπλούκας, Ι. Γ. (2004). Επεξεργασία και Συντήρηση Τροφίμων. Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή. 21-43. Κεφάλαιο 9: Ψύξη. 219-246. Εκδόσεις Σταμούλη

Μποζιάρης, Ι. Σ. (2010). Υγιεινή και Συντήρηση Εδώδιμων Αλιευμάτων. Έκδοση 2. Κεφάλαιο 2: Μεταθανάτιες μεταβολές. 36. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών. Τμήμα Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος.

Χατζιωάννου Μάγια. (2003). Lectures on ‘cultivation of snails’ (in Greek). University of Thessaly Printing Office, Volos, Greece, pp. 1–18 .

Παρλαπάνη Φωτεινή (2009). «Χαρακτηρισμός της μικροβιακής χλωρίδας και επίδρασή της στην ασφάλεια και στο χρόνο ζωής των μεταποιημένων καλλιεργούμενων σαλιγκαριών»

ABSTRACT

The aim of the present study was the monitoring of the total mesophilic counts and the spoilage microorganisms populations such as *Pseudomonas* spp., lactic acid bacteria and the *Enterobacteriaceae* during the storage at 2°C of marinated snail meat. Additionally the organoleptic changes and the documentation of shelf life was conducted. Snail meat was taken from cultivated *Cornu aspersum* boiled and marinated using acetic or citric acid. Then the processed snail meat was stored aerobically at 2°C. *Pseudomonas* spp., were the main microorganisms of the product at the end of shelf-life and reached the spoilage level of 7 log₁₀cfu/gr. The mesophilic counts exceeded 7 log₁₀cfu/gr after 33 days (792 hr) of storage while both the lactic acid bacteria and the *Enterobacteriaceae* were found below the limit of 2 log₁₀cfu/gr and 1 log₁₀cfu/gr respectively. The results of the study indicate that the shelf life of refrigerated products was at least 33 days. Snails intended for consumption include relatively high populations of micro-organisms which may be reduced by applying appropriate heat treatment, marinating techniques and compliance with Good Hygiene Practice rules to acceptable levels so that the shelf life of the product can increase.

Key-words : acidification, snails, vinegar, lemon juice, *Pseudomonas* spp., TVC, lactic acid bacteria, *Enterobacteriaceae*, shelf life