



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μιμίδου Φωτεινής

**«Μεταβολή κατά την συντήρηση υπό ψύξη των βιογενών αμινών και των
μικροβιολογικών ομάδων σε ζυμούμενα αλλαντικά (αέρος) παραγόμενα
στην Ελλάδα»**

ΛΑΡΙΣΣΑ 2013

Μεταβολή κατά την συντήρηση υπό ψύξη των βιογενών αμινών και των μικροβιολογικών ομάδων σε ζυμούμενα αλλαντικά (αέρος) παραγόμενα στην Ελλάδα»

Συμβουλευτική Επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος (Επιβλέπων) : Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαβέργου Αικατερίνη (Συνεπιβλέπουσα) : Επίκουρη καθηγήτρια
Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ

Σούλτος Νικόλαος : Αναπληρωτή καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής
Προελεύσεως, Τμήμα Κτηνιατρικής Α.Π.Θ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια απονομής Μεταπτυχιακού Διπλώματος του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας της σχολής Επιστημών Υγείας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Το πειραματικό μέρος εκπονήθηκε στο εργαστήριο Τεχνολογίας Προϊόντων Ζωικής Προέλευσης της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή φυσιολογίας ζώων κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ευγενική του συμβολή στην μεταφορά του πειραματικού μέρους της διατριβής μου στην Κτηνιατρική Σχολή της Θεσσαλονίκης. Την συνεπιβλέπουσα Επίκουρη καθηγήτρια Τεχνολογία Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως κ. Παπαβέργου Αικατερίνη για την ουσιαστική και αμέριστη, βοήθεια, συμβολή και συμπαράσταση της στην δημιουργία, εκπλήρωση και συγγραφή του πειραματικού τμήματος της διατριβής μου. Τον καθηγητή Τεχνολογίας Προϊόντων Ζωικής Προελεύσεως κ. Αμβροσιάδης Ιωάννης για τις επιστημονικές του συμβουλές την βοήθεια του στην επικοινωνία με τις αλλαντοβιομηχανίες. Τον Αναπληρωτή καθηγητή Υγιεινής Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως κ. Σούλτος Νικόλαος για την ουσιαστική καθοδήγηση του στις μικροβιολογικές αναλύσεις. Τον καθηγητή στον Τομέα Ειδικής Υποδομής κ. Πετρίδη Δημήτριο για την ουσιαστική συμβολή του στην στατιστική ανάλυση. Τον Λέκτορα Υγιεινής τροφίμων ζωικής προέλευσης Σεργκελίδης Δανιήλ για την βοήθεια του σε ορισμένες μικροβιολογικές αναλύσεις. Την κ. Ζέτου Φανή μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π. για την βοήθεια της στο εργαστήριο. Δεν θα ήθελα να παραλείψω την φίλη και συνεργάτιδα διδακτορική φοιτήτρια Μάγρα Ταξιαρχούλα για την πολύτιμη βοήθεια της κατά την διάρκεια του πειράματος.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την μητέρα μου για την αμέριστη υποστήριξη (ψυχολογική, συμβουλευτική, οικονομική) όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 Θεωρητικό μέρος	7
1.1 Εισαγωγή	7
1.2 Τεχνολογία παραγωγής αλλαντικών ωρίμανσης από σύγκοπτο κρέας (σαλάμι αέρος)	12
1.2.1 Εισαγωγή	12
1.2.2 Πρώτες ύλες	15
1.2.3 Πρόσθετες ουσίες	17
1.2.4 Παρασκευή κρεατόπαστας	24
1.2.5 Ενθήκευση κρεατόπαστας	25
1.2.6 Στάδια ωρίμανσης αλλαντικών αέρος	26
1.2.7 Μεταβολές κρεατόμαζας των αλλαντικών	28
1.2.7.1 Μικροβιολογικές, φυσιολογικές και οργανοληπτικές μεταβολές	28
1.3 Βιογενείς αμίνες	31
1.3.1 Εισαγωγή	31
1.3.2 Βιολογικός ρόλος	34
1.3.3 Τοξικολογική δράση των βιογενών αμινών	36
1.3.4 Βιογενείς αμίνες στο κρέας	38
1.3.5 Βιογενείς αμίνες στα αλλαντικά αέρος	41
1.3.6 Βιογενείς αμίνες ως δείκτης ποιότητας στο κρέας και στα προϊόντα του	48
1.4 Η παρούσα εργασία	50
2. Πειραματικό Μέρος	52
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός	52
2.2 Υλικά & Μέθοδοι	55

2.2.1 Μικροβιολογικές εξετάσεις	55
2.2.1.1 Αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	56
2.2.1.2 Αρίθμηση των Ζυμών - Μυκήτων.....	56
2.2.1.3 Αρίθμηση των Μικρόκοκκων – Σταφυλόκοκκων που παράγουν πυκτάση	57
2.2.1.4 Αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών.....	57
2.2.1.4 Αρίθμηση των εντεροκόκκων.....	57
2.2.1.6 Αναζήτηση – αρίθμηση της <i>Listeria monocytogenes</i>	57
2.2.1.6 Ταυτοποίηση της <i>Listeria monocytogenes</i>	59
2.2.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	60
2.2.2.1 Βασική χημική ανάλυση.....	60
2.2.2.2 Προσδιορισμός συντελεστή ενεργού ύδατος.....	62
2.2.2.3 Προσδιορισμός της ενεργού οξύτητας (pH).....	62
2.2.2.4 Προσδιορισμός της μηλονικής διαλδεΐδης (MDA) ή αριθμού θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA).....	62
2.2.2.5 Προσδιορισμός βιογενών αμινών.....	64
2.2.3 Στατιστική Ανάλυση.....	67
3 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	68
3. 1 Μικροβιολογικές Εξετάσεις.....	68
3.1.1 Οξυγαλακτικά Βακτήρια (LAB).....	71
3.1.2 Μικρόκοκκοι – Σταφυλόκοκκοι.....	73
3.1.3 Εντερόκοκκοι.....	75
3.1.4 Εντεροβακτηριοειδή.....	77
3.1.5 Ζύμες – Μύκητες.....	78
3.1.6 Λιστέρια.....	79
3.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις.....	81
3.2.1 Βασική χημική ανάλυση.....	81

3.2.2	pH.....	82
3.2.3	Συντελεστής ενεργού νερού (a_w).....	83
3.2.4	Οξείδωση.....	84
3.2.5.	Βιογενείς αμίνες.....	86
3.2.5.1	Τυραμίνη.....	94
3.2.5.2	Πουτρεσκίνη.....	97
3.2.5.3	Καδαβερίνη.....	100
3.2.5.4	Ισταμίνη.....	102
3.2.5.5	β – φαινυλαιθυλαμίνη.....	105
3.2.5.6	Τρυπταμίνη.....	107
3.2.5.7	Σπερμιδίνη-Σπερμίνη.....	109
4.	Συμπεράσματα.....	112
5.	Βιβλιογραφία.....	113
6.	Παράρτημα.....	124

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επεξεργασία του νωπού κρέατος προς προϊόντα που μπορούν να συντηρηθούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό άρχισε από τους προϊστορικούς ακόμη χρόνους. Πιθανόν, το πρώτο επεξεργασμένο προϊόν που παράχθηκε ήταν κρέας που υπέστη ξήρανση στον ήλιο και πολύ αργότερα ξήρανση σε σιγανή φωτιά με καπνό (Μπλούκας, 1998). Οι Κινέζοι ήταν οι πρώτοι που αναφέρθηκαν στην παραγωγή ακατέργαστων αλλαντικών (Houghton, 1982), αλλά επίσης και άλλοι αρχαίοι συγγραφείς περιέγραψαν τη διαδικασία παραγωγής τέτοιων προϊόντων (Zeuthen, 2007). Ο Όμηρος μιλάει για τα αλλαντικά στην Οδύσσεια (Μπλούκας, 1998). Αυτά ήταν επίσης γνωστά στη ρωμαϊκή αυτοκρατορία. Παρασκευάζονταν κυρίως από αίμα, λίπος και υπολείμματα κρέατος και μαγειρεύονταν, έτσι ώστε δεν είχαν σχέση με τα ξηρά ζυμούμενα αλλαντικά. Επίσης, οι Ρωμαίοι κρεοπάλες τεμάχιζαν το βοδινό και το χοιρινό κρέας σε μικρά κομμάτια, πρόσθεταν αλάτι και μπαχαρικά, ενθήκευαν το μίγμα σε δέρματα και τα τοποθετούσαν σε ειδικούς χώρους για να αποξηρανθούν. Με βάση την εμπειρία τους, πίστευαν ότι τα αλλαντικά θα διατηρούνταν καλύτερα αν αποθηκεύονταν και ξηραίνονταν με αυτόν τον τρόπο (Zeuthen, 2007). Εξ άλλου, η λέξη σαλάμι που χρησιμοποιείται σήμερα για συγκεκριμένο τύπο αλλαντικών φαίνεται να προέρχεται από την αρχαία ελληνική πόλη της Σαλαμίνας, στην ανατολική ακτή της Κύπρου (Pederson, 1979). Παρά το γεγονός ότι η Σαλαμίνα καταστράφηκε το 450 π.χ. τα αλλαντικά ήταν ευρέως γνωστά, εκτιμήθηκαν από τότε, και φαίνεται ότι ήταν ο προάγγελος πολλών δημοφιλών ευρωπαϊκών ποικιλιών. Η παραγωγή των αλλαντικών και γενικότερα των προϊόντων κρέατος (κρεατοσκευάσματα) αναπτύχθηκε σταδιακά στις Μεσογειακές χώρες, στις χώρες της Β. Ευρώπης και αργότερα στις χώρες του νέου κόσμου. Σήμερα αποτελούν μία από τις σημαντικότερες ομάδες τροφίμων.

Στην Ελλάδα εκτιμάται ότι παράγονται περισσότερο από 300 είδη κρεατοσκευασμάτων. Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών

(άρθρο 91) τα προϊόντα με βάση το κρέας ταξινομούνται σε δύο ομάδες: Στα προϊόντα αλλαντοποιίας και στα λοιπά προϊόντα. Ως αλλαντικά χαρακτηρίζονται τα προϊόντα κρέατος που έχουν υποστεί ειδική τεχνολογική επεξεργασία και παρασκευάζονται από κρέας ή/και βρώσιμα παραπροϊόντα κρέατος σε κομμάτια ή όχι, στα οποία μπορεί να προστεθούν πρώτες, βοηθητικές και πρόσθετες ύλες και τα οποία μπορεί να είναι ή όχι ενθηκευμένα σε φυσικά ή τεχνητά περιβλήματα ή να διατίθενται σε αυτοτελή κομμάτια. Για να διατηρήσουν την μικροβιολογική τους σταθερότητα τα αλλαντικά μπορεί να υποβληθούν σε θέρμανση, ψύξη, ζύμωση, ωρίμανση, κάπνιση κ.λ.π. Στα λοιπά προϊόντα ταξινομούνται όλα τα υπόλοιπα προϊόντα κρέατος όπως ζωμοί, σούπες κρέατος, ζελατίνη, εκχυλίσματα κρέατος, οπός κρέατος, σκόνη κρέατος, σάλτσες κρέατος, κρέας και προϊόντα με βάση το κρέας σε συνδυασμό με άλλα εδώδιμα προϊόντα (Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, Άρθρο 91 Π 1β). Αυτή όμως η ομαδοποίηση των κρεατοσκευασμάτων δεν ικανοποιεί ούτε την μελέτη τους ούτε τον έλεγχο τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία προβλημάτων κυρίως στις ελεγκτικές αρχές. Επιπλέον δεν περιλαμβάνει σειρά προϊόντων με ευρεία κατανάλωση όπως τα σουβλάκια, ο γύρος, τα μπιφτέκια κ.α. Από την πράξη έχει φανεί ότι η ταξινόμηση των κρεατοσκευασμάτων μπορεί να στηριχθεί κυρίως στην τεχνολογία παραγωγής τους. Έτσι τα προϊόντα κρέατος μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις ομάδες όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Τα κρεατοσκευάσματα της κάθε ομάδας χαρακτηρίζονται από την ίδια τεχνολογία παραγωγής και από το ότι τα έτοιμα προϊόντα έχουν παρόμοια μακροσκοπικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα (Αμβροσιάδης & Γιωργάκης, 2005).

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 1 μια σημαντική κατηγορία αλλαντικών είναι τα προϊόντα που γίνονται από σύγκοπτο κρέας στο οποίο προστίθενται διάφορες πρώτες, βοηθητικές και πρόσθετες ύλες και στη συνέχεια ενθηκεύονται σε φυσικά ή τεχνητά περιβλήματα. Τα προϊόντα αυτά ανάλογα με την επεξεργασία στην οποία υποβάλλονται ύστερα από την ενθήκευση τους διακρίνονται στις εξής τέσσερις κατηγορίες :

1) Προϊόντα αλλαντοποιίας βραστά από σύγκοπτο κρέας (λουκάνικα Φρανκφούρτης, πάριζα, μορταδέλλα, σαλάμι Bologna κ.λ.π.). Τα αλλαντικά αυτά μετά τον τεμαχισμό του νωπού ή κατεψυγμένου κρέατος και λίπους, την παραγωγή και ενθήκευση της κρεατόπαστας, υφίστανται πάντοτε θερμική επεξεργασία η οποία

αποβλέπει στην εξυγίανση τους (Αμβροσιάδης & Γεωργάκης, 2005). Η θερμική επεξεργασία συνοδεύεται πολλές φορές και από κάπνιση. Τα αλλαντικά αυτά καταναλώνονται είτε άμεσα είτε συντηρούνται με διάφορες μεθόδους όπως ψύξη, κατάψυξη, κονσερβοποίηση.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση των προϊόντων κρέατος

1. ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΛΛΑΝΤΟΠΟΙΪΑΣ

Βραστά ή θερμικής επεξεργασίας

- από σύγκοπτο κρέας
- από αυτούσια τεμάχια κρέατος
- από τεμάχια κρέατος και σύγκοπτο κρέας και/ή λίπος

Αέρος ή ζύμωσης

- από σύγκοπτο κρέας
- από αυτούσια τεμάχια κρέατος
- από σύγκοπτο κρέας επαλειφόμενα

Ημίξηρα μερικής ωρίμανσης παραγόμενα από σύγκοπτο κρέας

Νωπά ή ωμά αλλαντικά ή χωριάτικα λουκάνικα

Λοιπά προϊόντα (πατέ, αλλαντικά αίματος, πηκτές)

2. ΚΟΝΣΕΡΒΕΣ ΚΡΕΑΤΟΣ Ή ΜΕ ΚΡΕΑΣ

- Κονσέρβες κρέατος
 - Κονσέρβες προϊόντων αλλαντοποιΐας (θερμικής επεξεργασίας)
 - Κονσέρβες έτοιμων φαγητών
-

3. ΛΟΙΠΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΚΡΕΑΣ

- Μιττωτός
 - Σουβλάκι
 - Γύρος
 - Μπιφτέκι, σουτζουκάκι και χάμπουργκερ
 - Μορφοποιημένο κρέας
-

ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΚΡΕΑΣ Ή/ΚΑΙ ΑΠΟ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΡΕΑΤΟΣ

- Σούπες, ζωμοί κρέατος
 - Ζελατίνη
 - Εκχυλίσματα κρέατος
 - Οποί κρέατος
 - Σκόνη κρέατος και αφυδατωμένο κρέας
 - Σάλτσες κρέατος
-

2) **Προϊόντα αλλαντοποίησης νωπά** (χωριάτικα λουκάνικα). Αυτά, κατά την παραγωγή της κρεατόπαστας υφίστανται ήπια μάλαξη. Κατόπιν ενθηκεύονται σε φυσικές θήκες και υποβάλλονται σε ελαφριά αφυδάτωση και ενδεχομένως και κάπνιση. Συντηρούνται υποχρεωτικά υπό ψύξη και καταναλώνονται αφού τηγανιστούν ή ψηθούν γιατί το μικροβιακό τους φορτίο είναι σχετικά υψηλό.

3) **Προϊόντα αλλαντοποίησης από σύγκοπτο κρέας παραγόμενα με ζύμωση και ωρήμανση** (σαλάμι αέρος Λευκάδας, Θάσου, Ευρυτανίας κ.λ.π., σουτζούκια). Τα αλλαντικά αυτά μετά τον τεμαχισμό του κρέατος και του λίπους, την παραγωγή και ενθήκευση της κρεατόπαστας υφίστανται ωρίμανση σε ειδικούς θαλάμους χωρίς να υποβληθούν σε θερμική επεξεργασία. Αυτά διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα συνήθως υπό ψύξη και δεν μαγειρεύονται πριν καταναλωθούν.

4) **Προϊόντα αλλαντοποίησης ημίξερα ή μερικής ωρίμανσης** (σαλάμι μύρας, σαλάμι Σερρών κ.λ.π.). Τα προϊόντα της ομάδας αυτής κατατάσσονται μεταξύ των προϊόντων θερμικής επεξεργασίας και των αέρος διότι μετά την παρασκευή της κρεατόπαστας και την ενθήκευση, αφενός μεν υφίστανται μερική ζύμωση αφ' ετέρου όμως υποβάλλονται σε θέρμανση η οποία έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή όλων των μικροοργανισμών οπότε διακόπτεται και η οποιαδήποτε περαιτέρω διαδικασία της ζύμωσης. Τα προϊόντα καταναλίσκονται είτε αμέσως μετά την θερμική τους επεξεργασία ή αφού υποστούν αφυδάτωση (Αμβροσιάδης & Γεωργάκης, 2005).

Τα αλλαντικά ωρίμανσης από σύγκοπτο κρέας (σαλάμι αέρος) είναι λόγω της υφής και της πικάντικης γεύσης τους πολύ δημοφιλή και αρεστά στην Ελλάδα όπου καταναλώνονται κυρίως σαν Delicatessen. Ωστόσο, έχουν κατηγορηθεί κατά καιρούς ως ανθυγιεινά λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε λίπος και αλάτι (Muguerza et al., 2004) και της πιθανής παρουσίας υψηλών επιπέδων κάποιων βιολογικά και τοξικολογικά δραστικών βιογενών αμινών σε αυτά (Suzzi & Gardini, 2003). Η παρούσα εργασία ασχολείται με τον σχηματισμό βιογενών αμινών κατά την αποθήκευση και συντήρηση αλλαντικών αέρος παραγομένων από δύο ελληνικές αλλαντοβιομηχανίες.



Εικόνα 1 : Αλλαντικά Λευκάδας



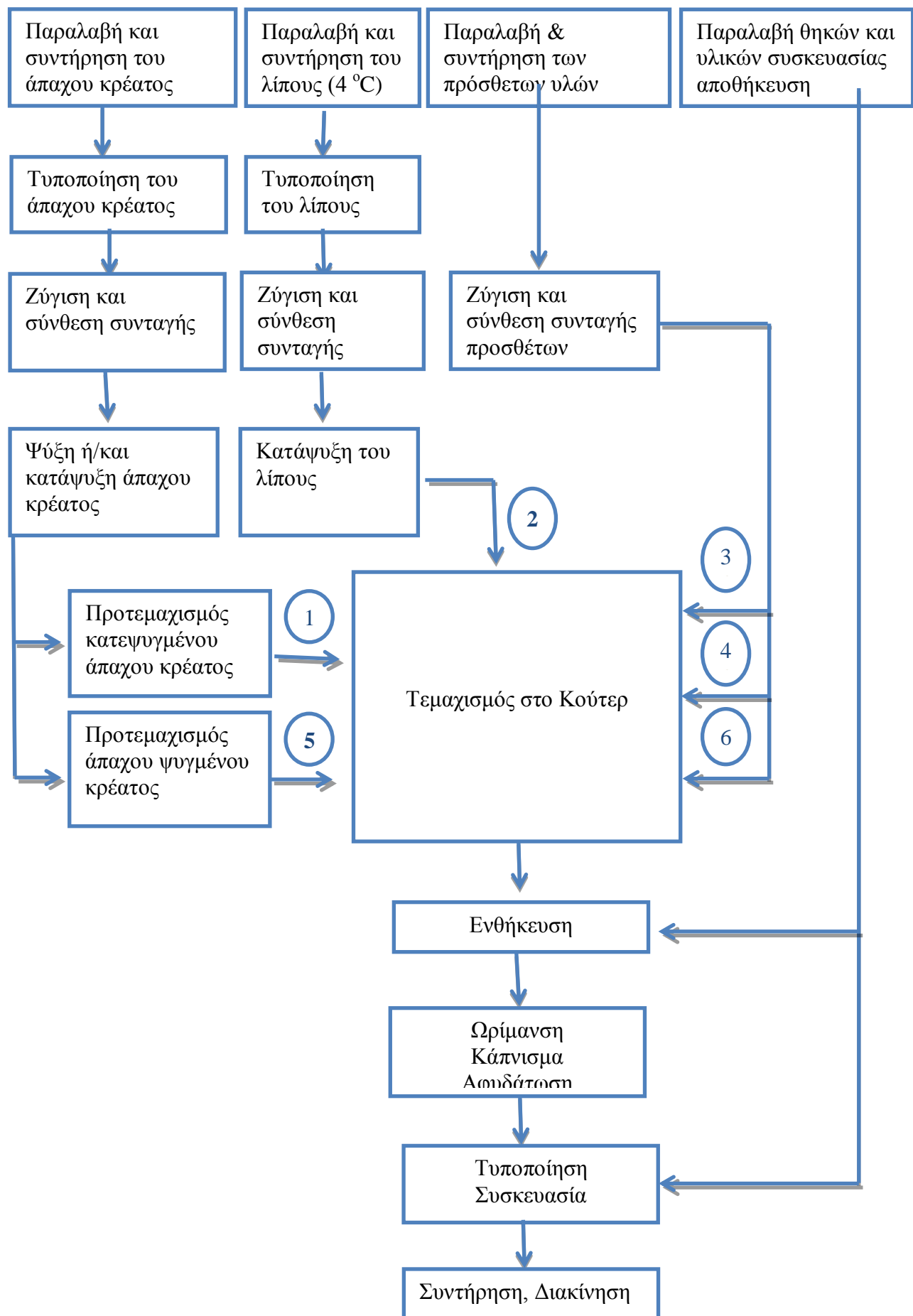
Εικόνα 2 : αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας

1.2 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΛΛΑΝΤΙΚΩΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΑΠΟ ΣΥΓΚΟΠΤΟ ΚΡΕΑΣ (ΣΑΛΑΜΙ ΑΕΡΟΣ)

1.2.1 Εισαγωγή

Τα αλλαντικά ωρίμανσης από σύγκοπτο κρέας παρασκευάζονται από κρέας χοίρων, βοοειδών ή / και προβάτων και χοιρινό λίπος τα οποία τεμαχίζονται σε ειδικές συσκευές και συγχρόνως προστίθενται χλωριούχο νάτριο, νιτρικά και νιτρώδη άλατα, ζάχαρα, μπαχαρικά και άλλες βοηθητικές ουσίες. Η παραγόμενη κρεατόπαστα ενθηκεύεται σε φυσικές ή τεχνητές θήκες και το προϊόν υφίσταται την ενδεδειγμένη ζύμωση, ωρίμανση-αφυδάτωση σε φυσικό ή τεχνητό περιβάλλον (κλιματισμός), ενδεχόμενα δε και κάπνιση. Σαν αποτέλεσμα το προϊόν αποκτάει βαθμιαία χαρακτηριστικό χρώμα, άρωμα, γεύση και υφή, σταθεροποιείται και κατά το τέλος της περιόδου ωρίμανσης αυτό είναι έτοιμο να καταναλωθεί (Σχήμα 1: Αμβροσιάδης & Γεωργιάκης, 2005).

Σαλάμι αέρος παράγεται και καταναλώνεται εδώ και αιώνες σε πολλά και διαφορετικά μέρη του κόσμου. Με βάση τη φυσική μικροχλωρίδα του κρέατος παρασκευάζεται ένα ευρύ φάσμα προϊόντων με διαφορετικές αναλογίες κρέατος και αλατιού καθώς και καρυκευμάτων. Για το λόγο αυτό το σαλάμι αέρος παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλία γεύσεων και υφής και αυξάνει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον των καταναλωτών σε όλο τον κόσμο που επιδιώκουν νέες γευστικές εμπειρίες (Toldra, 2007). Στην Ελλάδα το σαλάμι αέρος παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα αλλά και από μικρότερες βιοτεχνικές επιχειρήσεις συνήθως σύμφωνα με τοπικές παραδοσιακές συνταγές. Σύμφωνα με εκτιμήσεις της ελληνικής βιομηχανίας κρέατος η παραγωγή σαλαμιού αέρος στην Ελλάδα ανέρχεται περίπου στους 9.000 τόνους το χρόνο ήτοι στο ένα πέμπτο της συνολικής παραγωγής προϊόντων κρέατος ετησίως (NSSG, 2007).



Σχήμα 1: Διάγραμμα ροής παραγωγής αλλαντικών αέρος (Αμβροσιάδης & Γεωργάκης, 2005)

Κατά τη διάρκεια της παρασκευής των αλλαντικών ωρίμανσης από σύγκοπτο κρέας γίνονται διάφορες φυσικές και φυσικοχημικές μεταβολές όπως βαθμιαία αφυδάτωση, ζύμωση των υδατανθράκων, οξίνιση, ανάπτυξη χρώματος, λιπόλυση, οξείδωση των λιπιδίων και πρωτεόλυση (Ordoñez et al. 1999). Αυτές οι αλλαγές οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (υφή, άρωμα, γεύση, χρώμα) των τελικών προϊόντων, λαμβάνουν χώρα, εν μέρει, λόγω της δραστηριότητας των διαφόρων μικροβιακών ομάδων (κυρίως των μικρόκοκκων, των σταφυλόκοκκων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων) οι οποίες αναπτύσσονται στα αλλαντικά κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και της ωρίμανσης (Ordoñez et al. 1999). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια εξασφαλίζουν επίσης, την ασφάλεια των προϊόντων μέσω της παραγωγής από αυτά διαφόρων αντιμικροβιακών ενώσεων όπως το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διοξειδίο του άνθρακα και οι βακτηριοσίνες (Aymerich et al. 2000) και αναστέλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών λόγω της πτώσης του pH και της ανταγωνιστικότητας για τα θρεπτικά υλικά (Schillinger & Lücke, 1990).

Τα αλλαντικά ωρίμανσης από σύγκοπτο κρέας διακρίνονται σε διατμητά και επαλειφόμενα. Η διάκριση αυτή γίνεται με βάση την συνοχή τους, η οποία είναι αποτέλεσμα της διαφορετικής τεχνολογίας παρασκευής της κρεατόμαζας των αλλαντικών. Τα διατμητά αλλαντικά αέρος είναι σκληρά και συμπαγή και διακρίνονται από το γεγονός ότι μπορούν να κοπούν σε λεπτές φέτες, στις οποίες διακρίνονται ευκρινώς τα τεμαχίδια του λίπους. Αντίθετα, τα επαλειφόμενα έχουν μαλακή σύσταση και χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να επαλείφονται πάνω σε φέτα ψωμιού (Μπλούκας, 1998).

Επίσης τα αλλαντικά αέρος διακρίνονται, με βάση την διάρκεια της ωρίμανσης τους, σε αλλαντικά ταχείας ωρίμανσης (η ωρίμανση διαρκεί το πολύ 2 εβδομάδες και τα τελικά προϊόντα έχουν $pH = 4,8 - 5,2$ και $a_w = 0,90 - 0,95$), ενδιάμεσης, καθώς και μακράς περιόδου ωρίμανσης (η ωρίμανση διαρκεί από 4 - 10 εβδομάδες και τα τελικά προϊόντα έχουν $pH = 5,3 - 5,8$ και $a_w = 0,85 - 0,90$).

Σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων και ποτών η υγρασία στα αλλαντικά αέρος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 35% για προϊόντα που ενθηκούνται σε περιβλήματα διαμέτρου μικρότερης ή ίσης των 60 mm και το 40% για προϊόντα που ενθηκούνται σε περιβλήματα διαμέτρου μεγαλύτερης των 60 mm. Επίσης η περιεκτικότητα σε

λίπος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 45% επί του έτοιμου προϊόντος ως έχει (Άρθρο 91 Π 1β)

1.2.2 Πρώτες ύλες

● Κρέας

Βασική προϋπόθεση για την επιτυχία της παραγωγής αλλαντικών αέρος είναι η ορθή επιλογή και προετοιμασία των πρώτων υλών (Αμβροσιάδης, 2000). Ως πλέον κατάλληλο για την παραγωγή των αλλαντικών αέρος θεωρείται το κρέας που προέρχεται από υγιή ζώα με σωστή διατροφή, τα οποία δεν έχουν καταπονηθεί πριν από την σφαγή τους (Μπλούκας, 1998). Το κρέας που θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να έχει συντηρηθεί για όσο το δυνατόν μικρότερο χρόνο και υπό άριστες συνθήκες υγιεινής, ενώ το pH αυτού πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 5,6 και 6,0. (Αμβροσιάδης, 2000)

Κρέας με υψηλό pH όπως το DFD – κρέας, έχει ως συνέπεια την καθυστέρηση ή και την παρεμπόδιση της πτώσης της τιμής του pH της κρεατόπαστας με αποτέλεσμα την δημιουργία ευνοϊκών συνθηκών για τον πολλαπλασιασμό ανεπιθύμητων μικροοργανισμών με συνέπεια ενίοτε τη σήψη των προϊόντων, τη μη κανονική ανάπτυξη χρώματος και την παρεμπόδιση της μετουσίωσης των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια της συνοχής τους. (Αμβροσιάδης, 2000)

Κρέας με χαμηλό pH και χαμηλή ικανότητα συγκράτησης ύδατος όπως το PSE – κρέας δεν μπορεί να χρησιμοποιείται σε ποσοστό πλέον του 30% του βάρους της τελικής συνταγής καθόσον ευνοεί την ταχύτατη απώλεια υγρασίας από τα εξωτερικά στρώματα του προϊόντος με αποτέλεσμα την δημιουργία λεπτής, σκληρής και συμπαγούς επιφανειακής στοιβάδας η οποία εμποδίζει την περαιτέρω αφυδάτωση και οδηγεί στην παραγωγή ελαττωματικού προϊόντος (Αμβροσιάδης, 2000).

Ο συντελεστής ενεργού ύδατος (a_w) του κρέατος επηρεάζει επίσης την επιτυχία της παραγωγής των αλλαντικών αέρος. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της a_w ($< 0,980$), τόσο δυσμενέστερες γίνονται οι συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό των ανεπιθύμητων βακτηρίων. Μείωση της τιμής a_w επιτυγχάνεται με ελαφριά

αφυδάτωση του άπαχου κρέατος ύστερα από παραμονή στο ψυγείο επι μία έως δύο ημέρες (Αμβροσιάδης, 2000).

Για την παραγωγή αλλαντικών αέρος πολλές φορές γίνεται επιλογή του τύπου του κρέατος. Σε ορισμένες χώρες όπως η Ιταλία, η Ουγγαρία και η Γαλλία, για την παραγωγή αλλαντικών αέρος υψηλής ποιότητας χρησιμοποιείται αποκλειστικά χοιρινό κρέας, εξαιτίας της γεύσης και του ανοιχτού ερυθρού χρώματος που προσδίδει στο τελικό προϊόν. Στην Γερμανία, για την παραγωγή των αλλαντικών αέρος χρησιμοποιείται βοδινό, χοιρινό κρέας και χοίρινο λίπος σε αναλογία το καθένα 1/3, γιατί συμβάλλουν ώστε τα αλλαντικά να γίνουν περισσότερο ξηρά και πιο σκούρου χρώματος. Στις Μουσουλμανικές χώρες, για θρησκευτικούς και μόνο λόγους, χρησιμοποιείται βοδινό κρέας στην παραγωγή των αλλαντικών αέρος καθώς και λίπος από παχύουρα αρνιά (Μπλούκας, 1998). Τέλος μεγάλη απήχηση στις προτιμήσεις των καταναλωτών βρίσκουν τα αλλαντικά αέρος που παράγονται από κρέας γαλοπούλας (Αμβροσιάδης, 2000).

● Λίπος

Η ποιότητα του λίπους που χρησιμοποιείται επηρεάζει εξίσου σημαντικά την παραγωγή και κατ' επέκταση την ποιότητα των τελικών προϊόντων. Ως πλέον κατάλληλο θεωρείται το σκληρό και πλούσιο σε συνδετικό ιστό χοιρινό λίπος, που προέρχεται από τον τράχηλο και την ράχη του ζώου (Αμβροσιάδης, 2000). Το πολύ μαλακό χοιρινό λίπος έχει περισσότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα, η οξείδωση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε γρηγορότερη ανάπτυξη της τάγγισης με αποτέλεσμα να εμφανίζονται αποκλίσεις στην γεύση και ελαττώματα στο χρώμα των αλλαντικών (Μπλούκας, 2008). Το λίπος αυτό ρευστοποιείται κατά τον τεμαχισμό του λόγω της θερμότητας που αναπτύσσεται από την τριβή των μαχαιριών στο κουτερ. Το ρευστοποιημένο λίπος περιβάλλει τα τεμαχίδια του κρέατος και εμποδίζει την συνοχή τους. Ταυτόχρονα αποφράσσει τις μικροδιόδους στη μάζα του προϊόντος και δημιουργεί ένα λεπτό υμένιο κάτω από την θήκη, εμποδίζοντας την έξοδο της υγρασίας και κατά συνέπεια την ομαλή αφυδάτωση της κρεατόπαστας (Girard et al 1989).

Το χοιρινό λίπος πρέπει να διαχωρίζεται από το σφάγιο όσο το δυνατόν ταχύτερα και να ψύχεται αμέσως. Υπό ψύξη μπορεί να συντηρηθεί έως και 3 ημέρες. Εάν καταψυχθεί ο χρόνος συντήρησης αυξάνει στις 90 ημέρες. (Αμβροσιάδης, 2000)

1.2.3 Πρόσθετες ουσίες

Οι ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των αλλαντικών αέρος είναι το χλωριούχο νάτριο, τα νιτρώδη και νιτρικά άλατα, άλατα ασκορβικού οξέος, ζάχαρα, η γλυκονική – δ – λακτόνη (GdL), το σορβικό κάλιο και τα καρυκεύματα.

◆ Χλωριούχο Νάτριο (αλάτι)

Το χλωριούχο νάτριο αποτελεί την πλέον απαραίτητη βοηθητική ύλη. Συμβάλλει στη συντήρηση και στη γεύση των έτοιμων προϊόντων, καθώς και την εκχύλιση μικρής ποσότητας μυϊκών πρωτεϊνών (το αλάτι μαζί με το νερό που περιέχει το κρέας σχηματίζει πυκνό αλατούχο διάλυμα στο οποίο διαλυτοποιούνται οι μυϊκές πρωτεΐνες), οι οποίες στη συνέχεια με την χημική μετουσίωση και την πήξη που θα υποστούν λόγω της πτώσης του pH, θα επιφέρουν τη σύνδεση των τεμαχιδίων κρέατος και του λίπους (Αμβροσιάδης, 2000).

Το χλωριούχο νάτριο είναι ο πρώτος ανασταλτικός παράγοντας, γιατί προστίθεται στην κρεατόπαστα και μειώνει τον συντελεστή ενεργού ύδατος γεγονός που δυσχεραίνει την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών ενώ ευνοεί την ανάπτυξη της επιθυμητής μικροχλωρίδας (Μπλούκας, 1998)

Η ποσότητα του χλωριούχου νατρίου που συνιστάται για την παραγωγή των αλλαντικών αέρος ανέρχεται σε ποσοστό (2,5 – 3%). Σε ποσοστό μικρότερο από 2% καθιστά προβληματική την σύνδεση της κρεατόπαστας, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από το 3% επιμηκύνει την περίοδο ζύμωσης των αλλαντικών και ευνοεί την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών π.χ *S. aureus*.

Η συνήθης περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο στα τελικά προϊόντα των αλλαντικών αέρος ανέρχεται, στα επαλειφόμενα αλλαντικά αέρος σε 2,8 – 3,5% και στα διατμητά αλλαντικά αέρος σε 3,5 – 4,5% (Μπλούκας, 1998)

◆ Νιτρώδη και νιτρικά άλατα

Τα νιτρώδη και τα νιτρικά άλατα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την διατήρηση του ερυθρού χρώματος, την δημιουργία του χαρακτηριστικού αρώματος και γεύσης και την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ανεπιθύμητων και παθογόνων βακτηρίων στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης, όταν οι άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες δεν μπορούν να επιδράσουν (pH και a_w , αφυδάτωση). Τα νιτρικά άλατα δρουν αφού πρώτα αναχθούν σε νιτρώδη με την δράση νιτροαναγωγικών βακτηρίων, που είναι κυρίως οι μικρόκοκκοι και μερικά είδη στρεπτοκόκκων. Επειδή όμως η δραστηριότητα των βακτηρίων αυτών αναστέλλεται σε pH χαμηλότερο από 5,5, τα νιτρικά άλατα δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται στην παραγωγή προϊόντων ταχείας ωρίμανσης. Στα προϊόντα αυτά η ταχύτητα πτώσης του pH αναστέλλει την ανάπτυξη και δράση των νιτροαναγωγικών βακτηρίων, με αποτέλεσμα η αναγωγή των νιτρικών σε νιτρώδη να είναι ανεπαρκής και ο χρωματισμός του προϊόντος ελαττωματικός (Acton & Dick, 1977).

Στην χώρα μας οι ισχύουσες διατάξεις για την χρήση νιτρικών και νιτρωδών αλάτων στα τρόφιμα βρίσκονται στο άρθρο 33 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών το οποίο τροποποιήθηκε σε εναρμόνιση με την οδηγία 2006/52/EK του Ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου (Απόφαση ΑΧΣ 449/25-7-2007, με ΦΕΚ 190B/7-2-2008). Σύμφωνα με την τροποποίηση αυτή, τα μέγιστα επιτρεπόμενα επίπεδα των νιτρωδών και νιτρικών αλάτων στα μη θερμικός επεξεργασμένα ή στα θερμικώς επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος, στο τυρί και στα ψάρια πρέπει να ορίζονται ως προστιθέμενες ποσότητες, καθώς η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) σε γνωμοδότησή της θεωρεί ότι στην ανασταλτική δράση κατά του κατά του *C. botulinum* συμβάλλει η προστιθέμενη ποσότητα νιτρωδών αλάτων και όχι η ποσότητα καταλοίπων. Κατ' εξαίρεση ωστόσο, για ορισμένα προϊόντα κρέατος που παρασκευάζονται με παραδοσιακό τρόπο ορίζονται μέγιστα επίπεδα καταλοίπων, υπό τον όρο ότι τα προϊόντα προσδιορίζονται και επισημαίνονται δεόντως. Η ανώτατη προστιθέμενη ποσότητα νιτρωδών αλάτων κατά την παρασκευή των αλλαντικών αέρος είναι 150mg/kg ζυμούμενων αλλαντικών (εκφρασμένα ως NaNO_2) και των νιτρικών αλάτων είναι 150mg/kg (εκφρασμένα ως NaNO_3).

◆ Υδατάνθρακες (σάκχαρα)

Οι υδατάνθρακες προστίθενται σε μικρές ποσότητες στην κρεατόπαστα των αλλαντικών αέρος γιατί η περιεκτικότητα του κρέατος σε ζάχαρα και γλυκογόνο είναι ελάχιστη και αποσκοπούν στην βελτίωση της γεύσης και του χρώματος τους και εξασφαλίζουν ομαλή μείωση του pH. Επίσης έχουν μια ιδιαίτερη σημασία για τα αλλαντικά αέρος γιατί χρησιμεύουν ως πηγή ενέργειας για τους επιθυμητούς και απαραίτητους για την κανονική πορεία της ζύμωσης μικροοργανισμούς. Τα διάφορα οργανικά οξέα που παράγονται κατά την αποδόμηση των σακχάρων προκαλούν πτώση του pH της κρεατόπαστας με αποτέλεσμα την μετουσίωση των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια την σταθεροποίηση του τελικού προϊόντος. Τα οργανικά αυτά οξέα συμβάλλουν επίσης και στη δημιουργία του χαρακτηριστικού αρώματος των τελικών προϊόντων. Παράλληλα δημιουργούν κατάλληλες συνθήκες pH για την αναγωγή των νιτρωδών σε μονοξείδιο του αζώτου (NO) και ευνοούν την παραγωγή και σταθεροποίηση του ερυθρού χρώματος. Τέλος με την πτώση του pH αναστέλλεται σταδιακά η ανάπτυξη των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, καθώς και των αερόβιων σπορογόνων, ενώ ευνοείται αυτή των επιθυμητών (π.χ. οξυγαλακτικά). Η παρουσία των ζαχάρων εμποδίζει εν μέρει και την αποδόμηση των πρωτεϊνών, γιατί προσφέρονται άμεσα ως πηγή ενέργειας στα διάφορα πρωτεολυτικά βακτήρια. (Αμβροσιάδης , 2000)

Η ποσότητα και το είδος των ζαχάρων που προστίθενται στην κρεατόπαστα εξαρτάται από το αρχικό pH της κρεατόπαστας, τον επιδιωκόμενο ρυθμό μείωσης του pH και την τελική τιμή στην οποία πρέπει να διαμορφωθεί το pH στο τελικό προϊόν (Μπλούκας, 1998).

◆ Γλυκονική – δ – λακτόνη

Η γλυκονική – δ- λακτόνη, γνωστή και ως Gdl, είναι ο εσωτερικός ανυδρίτης του γλυκονικού οξέος που προκύπτει από την οξείδωση της γλυκόζης, ανήκει στους υδατάνθρακες και με υδρόλυση δίνει γαλακτικό οξύ (Μπλούκας 1998).

Η Gdl χρησιμοποιείται σε ποσοστό 0,6 – 0,7% επί του βάρους την νωπής κρεατόμαζας και προκαλεί ταχεία πτώση του pH (Baum et al., 1968).

◆ Ασκορβικά άλατα

Τα άλατα ασκοβικού οξέος είναι αναγωγικές ουσίες που συμβάλλουν στην καλύτερη ανάπτυξη και διατήρηση του χρώματος και εμποδίζουν την οξειδωση του λίπους. Αυτά αντιδρούν με τα νιτρώδη άλατα μετατρέποντας τα σε NO το οποίο αντιδρά με την μυοσφαιρίνη και σχηματίζονται οι δύο χρωστικές του αλιπαστωμένου κρέατος η νιτροζομυοσφαιρίνη και το νιτροζομυοχρωμογόνο. Ο ρόλος τους στα αλλαντικά αέρος ταχείας ωρίμανσης δεν είναι και τόσο σημαντικός όσο για τα αλλαντικά μακράς περιόδου ωρίμανσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα αλλαντικά αέρος ταχείας ωρίμανσης η μείωση του pH ευνοεί την αποικοδόμηση των νιτρωδών αλάτων σε μονοξείδιο του αζώτου που είναι απαραίτητο για το σχηματισμό του χρώματος. Αντίθετα στα αλλαντικά μακράς περιόδου ωρίμανσης το pH διατηρείται σε υψηλές τιμές που δεν ευνοούν την αποικοδόμηση των νιτρωδών αλάτων σε μονοξείδιο του αζώτου και καθιστούν απαραίτητη την χρήση των ασκορβικών. Συνήθως προτιμάται η χρήση του ασκορβικού νατρίου γιατί αντιδρά βραδύτερα με τα νιτρώδη και πιο ήπια (μετατρέποντας τα σε NO) και παρέχει καλύτερο και σταθερότερο χρωματισμό σε σχέση με το ασκορβικό οξύ. Η ποσότητα των ασκορβικών αλάτων που συνίσταται για την παραγωγή των αλλαντικών αέρος ανέρχεται σε 0,4 – 0,5g/kg κρεατόμαζας.

◆ Σορβικό κάλιο

Το σορβικό κάλιο επιτρέπεται μόνο για εξωτερική χρήση υπό μορφή υδατικού διαλύματος 10-15%, στο οποίο εμβαπτίζονται οι θήκες πριν την πλήρωση τους ή ολόκληρα τα αλλαντικά μετά την πλήρωση τους. Εμποδίζει την ανάπτυξη των ζυμών και των μυκήτων στην επιφάνεια του προϊόντος στα αρχικά στάδια της ζύμωσης, όταν η σχετική υγρασία στους θαλάμους είναι υψηλή, καθώς επίσης και την ανάπτυξη των αερόβιων βακτηρίων. Η ανεπιθύμητη αυτή ανάπτυξη των

μικροοργανισμών ευνοείται και από την συμπύκνωση υδρατμών στο εξωτερικό των αλλαντικών λόγω της πολύ χαμηλής θερμοκρασίας της κρεατόπαστας και έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός λευκού απανθίσματος από μικροοργανισμούς, το οποίο είναι γνωστό ως γλίτσα. Ο σχηματισμός της γλίτσας ενεργεί και ως μονωτικό στρώμα και παρεμποδίζει την αναπνοή του προϊόντος στην αρχή της ωρίμανσης και μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματικό χρωματισμό. Επειδή το σορβικό κάλιο αναστέλλει ή και καταστρέφει τα νιτροαναγωγικά βακτήρια, ο χρόνος εμφάνισης των ενθουμένων προϊόντων πρέπει να είναι περιορισμένος, ώστε να μην υπάρξουν προβλήματα ανάπτυξης του ερυθρού χρώματος στην εξωτερική επιφάνεια του προϊόντος.

Σύμφωνα με τον κώδικα τροφίμων και ποτών του 2008 επιτρέπεται η χρήση για την επιφανειακή επεξεργασία αποξηραμένων προϊόντων σορβικών (E200, E202, E203), βενζοϊκών (E210, E211, E212, E213), παραυδροξυβενζοϊκών (E214, E215, E216, E217, E218, E219).

◆ Αρτυματικές ύλες

Η προσθήκη μπαχαρικών ή εκχυλισμάτων τους στην παραγωγή των αλλαντικών αέρος θεωρείται απαραίτητη προκειμένου το προϊόν να αποκτήσει ιδιαίτερο άρωμα, το οποίο θα το διακρίνει από ομοειδή προϊόντα (Μπλούκας, 1998). Συνήθως χρησιμοποιούνται αυτούσια καρυκεύματα ή εκχυλίσματα τους σε ποσότητες που δεν ξεπερνούν το 0,5%. Εξαιρέση αποτελούν ορισμένα ξενικής προέλευσης αλλαντικά, τα οποία μπορούν να περιέχουν μέχρι και 2% κόκκινο πιπέρι.

Τα συνηθέστερα καρυκεύματα που χρησιμοποιούνται είναι το μαύρο και λευκό πιπέρι, το κοκκινοπίπερο σε ποσότητες που να μην αλλοιώνεται το χρώμα του τελικού προϊόντος, το μοσχοκάρυδο και τα άνθη του και τέλος το κάρδαμο και το σκόρδο. Τέλος εκτός από τα καρυκεύματα, στην παραγωγή των αλλαντικών αέρος μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως αρωματικές ύλες το κόκκινο κρασί και το ρούμι (Αμβροσιάδης, 2000).



Εικόνα 3 διάφορα μπαχαρικά

Το είδος των μπαχαρικών που θα χρησιμοποιηθούν είναι δυνατόν να επηρεάσει σημαντικά την πορεία της ζύμωσης των αλλαντικών αέρος. Τα μπαχαρικά που δεν έχουν υποστεί αποστείρωση, έχουν υψηλό μικροβιολογικό φορτίο το οποίο είναι δυνατόν να παρεμποδίσει την ανάπτυξη της επιθυμητής μικροχλωρίδας. Ορισμένα μπαχαρικά όπως το σκόρδο, δρουν ανασταλτικά στην ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων, όπως οι σαλμονέλες, ενώ τα εκχυλίσματα είναι πιθανόν να επηρεάσουν αρνητικά την ανάπτυξη της επιθυμητής μικροχλωρίδας στο εσωτερικό των αλλαντικών (Μπλούκας, 2008).

◆ Καλλιέργειες εκκίνησης

Η επιτυχής παραγωγή των αλλαντικών αέρος βασίζεται στη επικράτηση μιας επιθυμητής μικροχλωρίδας στην κρεατόμαζα των αλλαντικών τις πρώτες κρίσιμες ημέρες της ωρίμανσης. Η σύνθεση όμως της μικροχλωρίδας που απαντά στην κρεατόμαζα των αλλαντικών, αμέσως μετά την παρασκευή της, είναι πάρα πολύ ποικιλόμορφη και κάτω από ανεξέλεκτες συνθήκες μπορεί να οδηγήσει σε μη κανονική οξίνιση της κρεατόμαζας και γενικά στην παραγωγή ελαττωματικών προϊόντων. (Μπλούκας 1998)

Η επικράτηση της επιθυμητής μικροχλωρίδας και η καταστολή των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματικά με την προσθήκη καλλιεργείων εκκίνησης οι οποίες χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια από τις αλλαντοβιομηχανίες. Στα αλλαντικά αέρος η δραστηριότητα των καλλιεργείων εκκίνησης συνοψίζονται στα εξής : καθοδηγούν επακριβώς την πορεία της ζύμωσης – ωρίμανσης, επιτυγχάνουν παραγωγή προϊόντων με σταθερή ποιότητα, επιταχύνεται η ωρίμανση, μειώνουν τον κίνδυνο παραγωγής ελαττωματικών προϊόντων εξαιτίας ανεπιθύμητης βακτηριακής ανάπτυξης, παρεμποδίζεται η επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων που θα μπορούσαν να παράγουν τοξίνες και βελτιώνουν το χρώμα και το άρωμα του προϊόντος.

Οι καλλιέργειες εκκίνησης διακρίνονται σε φυσικές και καθαρές καλλιέργειες. Η φυσική καλλιέργεια αποτελείται από υψηλής ποιότητας αλλαντικό αέρος το οποίο λεπτοτεμαχίζεται και προστίθεται στην κρεατόμαζα. Οι καθαρές καλλιέργειες εκκίνησης αποτελούνται από στελέχη μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από εξαιρετικής ποιότητας αλλαντικά αέρος.

Οι καθαρές καλλιέργειες διακρίνονται σε απλές και σύνθετες. Οι περισσότερες καλλιέργειες είναι σύνθετες και αποτελούνται από γαλακτικά βακτήρια και μικρόκοκκους και σταφυλόκοκκους.

Οι καλλιέργειες συνήθως περιέχουν *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Micrococcus varians*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus* είδη του γένους *Debaryomyces* (*D. Hanseni*) και ορισμένα επιλεγμένα στελέχη του γένους *Penicillium* (*P. Nagliovensis*). Τα βακτήρια αυτά έχουν ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης που κυμαίνεται από 20 ° έως 35 °C.

1.2.4 Παρασκευή κρεατόπαστας

Στα διάτμητα αλλαντικά ο τεμαχισμός και η ανάμιξη των πρώτων και βοηθητικών υλών γίνεται συνήθως στο κούτερ. Για να επιτευχθεί καθαρή και ευδιάκριτη εικόνα τομής, το λίπος που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι πάντοτε κατεψυγμένο και τα αποθέματα ψύχους του άπαχου κρέατος επαρκή, ώστε στο τέλος του τεμαχισμού η θερμοκρασία της κρεατόμαζας να κυμαίνεται μεταξύ -1 και -3°C.



Αρχικά το κρέας τεμαχίζεται αδρομερώς στο κούτερ που λειτουργεί με χαμηλή ταχύτητα για ένα περίπου λεπτό.

Εικόνα 4 το κούτερ με τα μαχαίρια του.

Στο τεμαχισμένο κρέας αναμιγνύονται τα νιτρώδη και νιτρικά άλατα, τα ζάχαρα και το ασκορβικό. Ακολουθεί η προσθήκη του χοίρειου λίπους και ο λεπτοτεμαχισμός του μαζί με το κρέας με μεγάλη ταχύτητα περιστροφής των μαχαιριών του κούτερ. Σταδιακά προσθέτονται στην κρεατόμαζα τα καρυκεύματα και οι υπόλοιπες ουσίες εκτός του χλωριούχου νατρίου.

Το αλάτι προστίθεται λίγο πριν ολοκληρωθεί η επεξεργασία στο κούτερ έτσι ώστε να αναμιχθεί με την κρεατόμαζα. Η επεξεργασία της κρεατόμαζας στο κούτερ συνεχίζεται μέχρις ότου επέλθει πλήρης ανάμιξη των συστατικών και τα τεμαχίδια του κρέατος και του χοίρειου λίπους αποκτήσουν το χαρακτηριστικό για το κάθε προϊόν μέγεθος κόκκων. (Μπλούκας 1998)

Η χρήση κούτερ κενού για τον τεμαχισμό των πρώτων υλών συνοδεύεται από αρκετά πλεονεκτήματα και βρίσκει τελευταία όλο και μεγαλύτερη εφαρμογή. Η απομάκρυνση του αέρα και συνεπώς του οξυγόνου έχει ως αποτέλεσμα την ταχύτερη

και καλύτερη ανάπτυξη του ερυθρού χρώματος, την αύξηση της σταθερότητάς του και την παρεμπόδιση της τάγγισης του λίπους. Παράλληλα καθιστά τη μάζα του προϊόντος περισσότερο συμπαγή, βελτιώνοντας έτσι την σύστασή του.

1.2.5 Ενθήκευση κρεατόπαστας

Η κρεατόπαστα ενθηκεύεται με την βοήθεια πληρωτικών μηχανών (εικόνα 6), οι οποίες συνήθως λειτουργούν υπό κενό. Είναι πολύ σημαντικό να αφαιρείται ο αέρας που έχει εγκλωβιστεί στην κρεατόπαστα κατά την διάρκεια του τεμαχισμού της. Η παραμονή του μέσα σ' αυτήν επηρεάζει αρνητικά τη σταθερότητα του χρώματος, τις μικροβιολογικές διεργασίες που επιτελούνται στην αρχή της ζύμωσης και τέλος ευνοεί την τάγγιση



Εικόνα 5 πληρωτική μηχανή.

Η θερμοκρασία της κρεατόμαζας κατά την στιγμή της ενθήκευσης πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ -1 και -3 °C. Χαμηλότερες θερμοκρασίες (< -4 °C) έχουν ως αποτέλεσμα την κρυστάλλωση του νερού, οπότε αυξάνει σημαντικά το ιξώδες της κρεατόπαστας, καθιστώντας την ενθήκευση της και την απομάκρυνση του αέρα δύσκολη έως αδύνατη. Αντίθετα αν η θερμοκρασία της είναι υψηλή ($> 5 - 6$ °C), τότε λόγω τριβής της κρεατόπαστας με τα εξαρτήματα προώθησης του γεμιστικού μηχανήματος και του εσωτερικού τοιχώματος του σωλήνα πλήρωσης, μέρος του λίπους ρευστοποιείται και σχηματίζει ένα λεπτό υμένιο κάτω από την θήκη, με αποτέλεσμα το προϊόν να αφυδατώνεται δύσκολα. (Αμβροσιάδης, 2000).

Οι θήκες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των αλλαντικών αέρος μπορεί να είναι φυσικές ή τεχνικές και πρέπει να έχουν τις εξής ιδιότητες: α) να είναι διαπερατές στον αέρα, β) να είναι διαπερατές στους υδρατμούς και στον καπνισμό γ) να προσκολλώνται εύκολα στην κρεατόμαζα και να ακολουθούν την συστολή της κατά την ωρίμανση (Μπλούκας 1998), δ) να αποκολλώνται εύκολα από το έτοιμο προϊόν και ε) να είναι σε άριστη υγιεινή κατάσταση.

1.2.6 Στάδια ωρίμανσης αλλαντικών αέρος

Μετά την ενθήκευσή τους τα διατηρητά αλλαντικά αέρος, περασμένα στις μεταλλικές βέργες και αναρτημένα στο βαγονέτο, πρέπει να παραμείνουν για 2- 6 ώρες εκτός του θαλάμου ωρίμανσης (εικόνα 7) με σκοπό την σταδιακή ανύψωση της θερμοκρασίας της κρεατόμαζας στο επίπεδο των θερμοκρασιών που επικρατούν μέσα στον θάλαμο ωρίμανσης. Στο χώρο αυτό η θερμοκρασία πρέπει να υπερβαίνει τους 25 °C ενώ η σχετική υγρασία πρέπει να είναι μικρότερη από 60%. Αν τα αλλαντικά εισαχθούν απ' ευθείας μέσα στον θάλαμο ωρίμανσης με θερμοκρασία 20° - 25 °C και σχετική υγρασία υψηλότερη 90%, χωρίς να έχουν προσαρμοστεί στις συνθήκες ζύμωσης, οι υδρατμοί από το περιβάλλον θα συμπυκνωθούν στην επιφάνεια τους. Η κρεατόμαζα των αλλαντικών θα απορροφήσει την υγρασία αυτή με αποτέλεσμα να χρειαστεί να χαθεί πολύτιμος χρόνος για την αποβολή της σε μεταγενέστερο στάδιο της ωρίμανσης. Επίσης η πρόσληψη της υγρασίας αυτής αυξάνει τον συντελεστή ενεργού ύδατος σε τιμές που ευνοούν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. (Μπλούκας 1998)



Εικόνα 6 θάλαμος ωρίμανσης

Μετά το στάδιο της προσαρμογής των αλλαντικών αέρος ακολουθεί το στάδιο της ζύμωσης, το οποίο ανάλογα με τη μέθοδο ωρίμανσης διαρκεί από 4 ημέρες έως 2 εβδομάδες ή και περισσότερο. Κατά την διάρκεια του σταδίου αυτού αρχίζουν και ολοκληρώνονται σχεδόν όλες οι μικροβιολογικές και φυσικοχημικές μεταβολές, εκτός από την αφυδάτωση, την αύξηση της σκληρότητας και την ανάπτυξη του αρώματος. Στο στάδιο αυτό με κατάλληλη ρύθμιση της υγρασίας, της ταχύτητας του αέρα, αλλά κυρίως της θερμοκρασίας, επιτυγχάνεται η επιθυμητή πορεία όλων των μικροβιολογικών και φυσικοχημικών μεταβολών. (Αμβροσιάδης & Γιωργάκης, 2005)

Ακολουθεί το στάδιο της αφυδάτωσης που είναι το τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης η διάρκεια του οποίου εξαρτάται από την μέθοδο ωρίμανσης και από τη διάμετρο των αλλαντικών. Η απομάκρυνση της υγρασίας πρέπει να γίνεται ομοιόμορφα από όλη τη μάζα και είναι απαραίτητο να υπάρχει σταθερά μια διαφορά πίεσης υδρατμών μεταξύ μάζας προϊόντων και χώρου της τάξης του 2 – 4%. Κατά το τέλος της αφυδάτωσης η θερμοκρασία μέσα στο θάλαμο ωρίμανσης των χώρων κυμαίνεται μεταξύ 14° και 17 °C και η σχετική υγρασία ρυθμίζεται γύρο στο 75%. Η αφυδάτωση επιφέρει αύξηση της σκληρότητας του τελικού προϊόντος και μείωση του συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w) σε τιμές που εμποδίζουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων βακτηρίων (εκτός του *S. aureus* που αναστέλλεται σε τιμές a_w έως 0.86) και διασφαλίζουν την σταθερότητα του τελικού προϊόντος (Αμβροσιάδης & Γιωργάκης, 2005).

1.2.7 Μεταβολές κρεατόμαζα των αλλαντικών

Οι βασικότερες διεργασίες που συντελούνται κατά την ωρίμανση της κρεατόμαζας είναι η πτώση του pH και η αφυδάτωση της, με αποτέλεσμα την εξυγίανση και την ικανότητα του τελικού προϊόντος να συντηρείται ακόμη και εκτός ψυγείου. (Αμβροσιάδης & Γιωργάκης, 2005). Παράλληλα, αναπτύσσονται ο ερυθρός χρωματισμός, το χαρακτηριστικό άρωμα και η συνεκτικότητα της κρεατόμαζας. Το τελικό προϊόν αποκτά έτσι όλα εκείνα τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που το κάνουν ελκυστικό και μικροβιολογικά σταθερό. Η ταχύτητα εξέλιξης των μεταβολών αυτών εξαρτάται από τις συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας που επικρατούν στο θάλαμο ωρίμανσης και την ταχύτητα κυκλοφορίας του αέρα. (Αμβροσιάδης & Γιωργάκης, 2005)

Η ομαλή πορεία της ζύμωσης και ωρίμανσης των αλλαντικών αέρος εξαρτάται άμεσα από την επιβίωση και ανάπτυξη μιας επιθυμητής μικροχλωρίδας στην κρεατόμαζα. Ωστόσο, η μικροχλωρίδα αυτή μπορεί να έχει και αρνητικές επιδράσεις στην τελική ποιότητα του προϊόντος γιατί η ανάπτυξη της μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή και ανεπιθύμητων ουσιών όπως είναι οι βιογενείς αμίνες.

1.2.7.1 Μικροβιολογικές, φυσιολογικές και οργανοληπτικές μεταβολές.

Η σύνθεση της μικροχλωρίδας στην κρεατόπαστα των αλλαντικών αέρος εξαρτάται από το αρχικό μικροβιακό φορτίο των πρώτων υλών, το χειρισμό τους κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος και των προστιθεμένων ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της.

Το νωπό κρέας που παράγεται κάτω από υγιεινές συνθήκες κατά κανόνα περιέχει λιγότερους από 10^4 μικροοργανισμούς / cm^2 επιφανείας στους οποίους επικρατούν οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι. Ωστόσο, κατά τη συντήρηση του υπό ψύξη κάτω από αερόβιες συνθήκες επικρατούν οι ψευδομονάδες ενώ σε κάπως υψηλότερες θερμοκρασίες αναπτύσσονται και είδη εντεροβακτηρίων. Κατά τη συντήρηση του κρέατος κάτω από αερόβιες συνθήκες και υπό κενό αναπτύσσονται οι λακτοβάκιλλοι (Μπλούκας, 1998). Κατά την παρασκευή της κρεατόμαζας των αλλαντικών στο κούτερ οι μικροοργανισμοί που απαντούν σε αυτήν διασκορπίζονται

ομοιόμορφα σε όλη τη μάζα της. Η πορεία των μεταβολών προς τη σωστή κατεύθυνση συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη και επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Επειδή όμως ο αριθμός τους στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης είναι μικρός είναι απαραίτητη η ύπαρξη μικροβιακών παρεμποδιστών που θα αναστείλλουν την ανάπτυξη των ανεπιθύμητων βακτηρίων. Τα πρώτα εμπόδια είναι τα νιτρώδη άλατα που αναστέλλουν την ανάπτυξη κυρίως των σαλμονελών και των κλωστριδίων. Το χλωριούχο νάτριο μειώνει το συντελεστή ενεργού ύδατος (a_w) λόγω δέσμευσης του νερού. Ακολουθεί η χαμηλή τιμή του δυναμικού οξειδοαναγωγής. Η ενθήκευση της κρεατόμαζας με μηχανή που λειτουργεί υπό κενό, η προσθήκη ασκορβικών αλάτων και ζαχάρων και η ανάπτυξη των αεροβίων βακτηρίων έχει σαν αποτέλεσμα τη γρήγορη κατανάλωση του οξυγόνου στο εσωτερικό της κρεατομάζας. Κατ' αυτό τον τρόπο δημιουργούνται αναερόβιες συνθήκες που συνεπάγονται την πτώση της τιμής του δυναμικού οξειδοαναγωγής με αποτέλεσμα την αναστολή των εντεροβακτηρίων και των ψευδομονάδων ενώ ταυτόχρονα ευνοείται η ραγδαία ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Γεωργάκης & Αμβροσιάδη, 2005). Ταυτόχρονα παρατηρείται σημαντική ανάπτυξη των βακτηρίων της οικογένειας *Micrococaceae*, κυρίως όταν τα αλλαντικά παρασκευάζονται με την προσθήκη νιτρικών αλάτων, και επίσης ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων κυρίως στα επιφανειακά στρώματα του προϊόντος.

Η μεγάλη ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η έντονη μεταβολική τους δραστηριότητα με παραγωγή γαλακτικού οξέος τις πρώτες μέρες της ζύμωσης οδηγεί σε γρήγορη πτώση της τιμής του pH που ακολουθείται από μικρή αύξηση κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Στα αλλαντικά αέρος βορείου τύπου το pH κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 4,6-5,2. Αντίθετα, στα αλλαντικά μεσογειακού τύπου τα οποία ωριμάζουν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα το pH ανέρχεται στα 5,4-5,8. Η μείωση της τιμής του pH της κρεατόμαζας κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο των πρωτεϊνών οδηγεί σε μετουσίωση των συστατικών μυϊκών πρωτεϊνών και συνεπακόλουθα στη διαμόρφωση της χαρακτηριστικής υφής των αλλαντικών. Επίσης το όξινο περιβάλλον διευκολύνει το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση του ερυθρού χρωματισμού γιατί ευνοεί την αναγωγή των νιτρωδών αλάτων σε μονοξειδίο του αζώτου. Η υψηλή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος συμβάλλει τέλος, στην ανάπτυξη χαρακτηριστικού αρώματος και συγχρόνως στην αναστολή της δράσης παθογόνων μικροοργανισμών.

Οι μικροοργανισμοί που διαδραματίζουν τον κύριο ρόλο στην παραγωγή των αλλαντικών αέρος ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Staphylococcus* και *Micrococcus*. Από τους λακτοβακίλλους οι περισσότεροι ζυμώνουν τα διάφορα ζάχαρα σε οργανικά οξέα. Οι ομοζυμωτικοί παράγουν κυρίως γαλακτικό οξύ. Μια κατηγορία ετεροζυμωτικών εκτός από γαλακτικό οξύ παράγουν και σε μεγάλες ποσότητες οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Οι σταφυλόκοκκοι και οι μικρόκοκκοι παράγουν καταλάση και αναπτύσσονται καλύτερα κάτω από αερόβιες συνθήκες. Τα κυριότερα είδη των σταφυλοκόκκων που βρίσκονται στα αλλαντικά αέρος είναι οι *Staphylococcus xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. carnosus* και από τους μικροκόκκους ο *Micrococcus varians*. Οι σταφυλόκοκκοι και μικρόκοκκοι: α) Ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη και με αυτόν τον τρόπο συμβάλλουν στη δημιουργία ερυθρού χρωματισμού β) Παράγουν καταλάση που καταστρέφει το υπεροξειδίο του υδρογόνου με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η καταστροφή του ερυθρού χρώματος και η τάγγιση του λίπους, γ) Παράγουν λιπολυτικά ένζυμα τα οποία αποδομούν το λίπος και παράγουν ουσίες που είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία του αρώματος των αλλαντικών (αλδεύδες, κετόνες, μεθυλοκετόνες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, διακετύλιο, ακετοΐνη) δ) Παράγουν πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία μαζί με ενδογενή ένζυμα του κρέατος καταβολίζουν τις πρωτεΐνες του σαρκοπλάσματος και των μυϊκών ινιδίων. Κατά την πρωτεόλυση παράγονται μικρότερα πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα που επηρεάζουν σημαντικά το άρωμα των αλλαντικών. Τα ελεύθερα αμινοξέα με τη δράση διαφόρων μικροβιακών ομάδων καταβολίζονται περαιτέρω σε αμίνες (μεταξύ των οποίων και βιογενείς αμίνες) αμμωνία και διάφορα άλλα αρωματικά συστατικά όπως αλδεύδες, αλκοόλες, οργανικά οξέα και εστέρες (Talon & Leroy, 2006). Η δραστηριότητα των σταφυλοκόκκων και μικροκόκκων αναστέλλεται σε τιμές pH χαμηλότερες από 5,4 (Γεωργιάκης & Αμβροσιάδης, 2005)

Η αρχική κρεατόμαζα περιέχει επίσης σε μεγάλους αριθμούς εντεροβακτήρια, ψευδομονάδες, στρεπτόκοκκους, κλωστρίδια, διάφορα είδη βακίλλων, ζυμών και μυκήτων. Ο πληθυσμός τους εξαρτάται από τις συνθήκες υγιεινής των πρώτων υλών. Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (εντεροβακτηριοειδή, ψευδομονάδες, αερομονάδες) ανευρίσκονται στη μάζα των αλλαντικών αέρος στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης και καταστρέφονται σταδιακά με την πτώση του pH και από τις βακτηριοσίνες που παράγουν ορισμένα στελέχη λακτοβακίλλων (Hugas et al., 1996). Η παρουσία τους και η ανάπτυξη τους είναι ανεπιθύμητη όμως η ύπαρξη τους για ένα

μικρό χρονικό διάστημα έχει σαν αποτέλεσμα να συμβάλλουν θετικά στη δημιουργία ενός επιθυμητού αρώματος λόγω της πρωτεϊνολυτικής και λιπολυτικής δράσης τους.

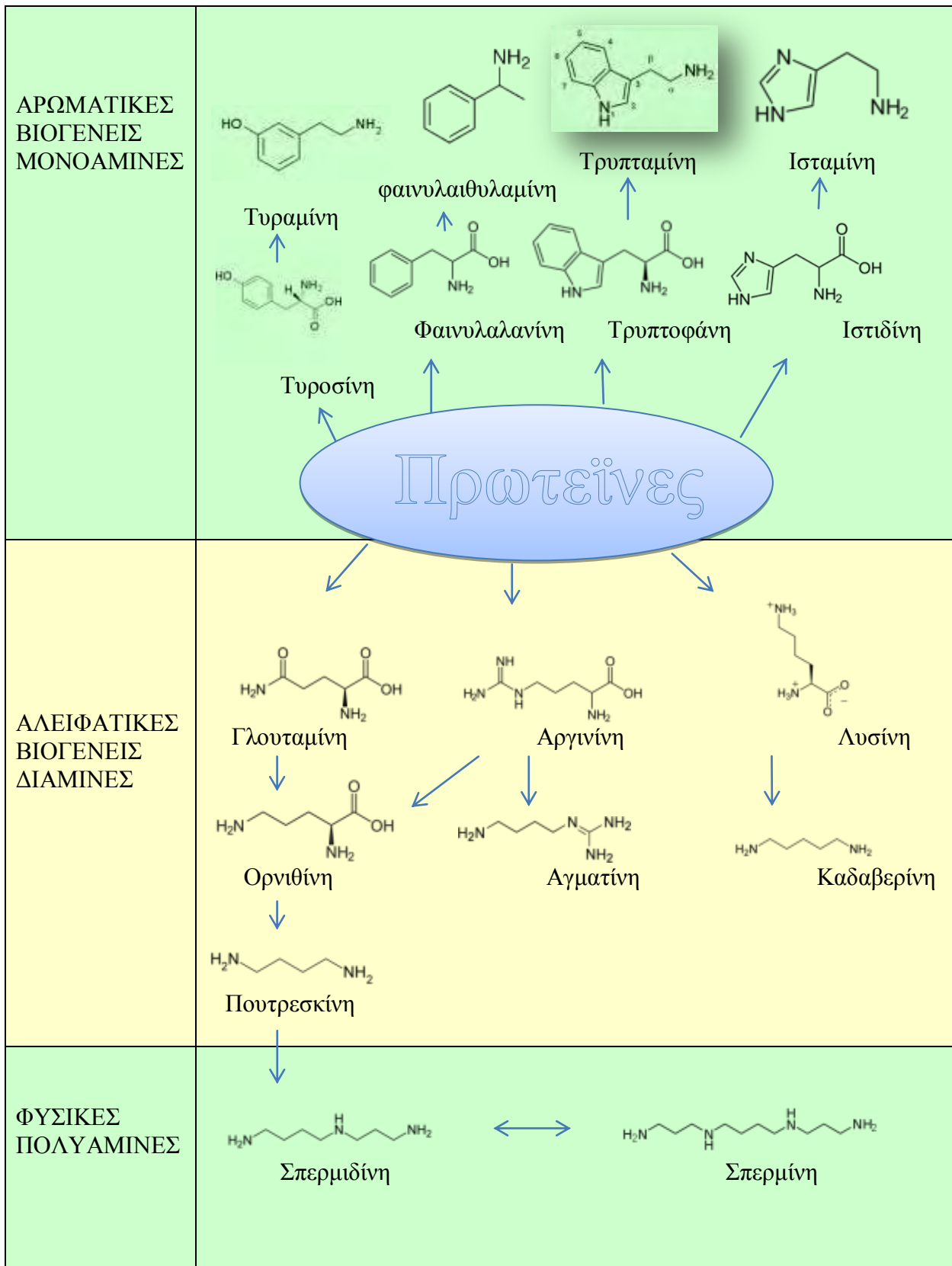
1.3 ΒΙΟΓΕΝΕΙΣ ΑΜΙΝΕΣ

1.3.1 Εισαγωγή

Οι βιογονείς αμίνες, γνωστές επίσης ως βιολογικά ενεργές αμίνες, είναι αζωτούχες ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους, βιολογικής προέλευσης, που απαντούν σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων σχεδόν σε όλους τους τύπους τροφίμων (Bardócz, 1995; Izquierdo-Pulido et al., 1999). Υψηλά επίπεδα βιογενών αμιμών ενδέχεται να περιέχουν τρόφιμα και ποτά που κατά την επεξεργασία τους υπέστησαν ζύμωση και ωρίμανση όπως αλλαντικά αέρος, τυρί, προϊόντα ψαριού, λαχανικά, τουρσί, κρασί, μύρα (ten Brink et al., 1990; G Spano et al., 2010) ή μη ζυμούμενα τρόφιμα και κυρίως κρέας (Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004) και ψάρια (Rawles et al., 1996) λόγω μικροβιολογικής αλλοίωσης, ύστερα από παρατεταμένη συντήρηση τους υπό ψύξη.

Οι βιογενείς αμίνες μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες τρεις ομάδες ανάλογα με την προέλευση και τη χημική τους δομή σε: α) Αρωματικές αμίνες (τυραμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη, τρυπταμίνη και ισταμίνη), β) Αλειφατικές διαμίνες (πουτρεσκίνη, αγματίνη και καδαβερίνη) και γ) Φυσικές πολυαμίνες (σπερμιδίνη και σπερμίνη) (σχήμα 2). Στα τρόφιμα οι βιογενείς αμίνες παράγονται κυρίως από την αποκαρβοξυλίωση πρόδρομων αμινοξέων από συγκεκριμένα ένζυμα (αποκαρβοξυλάσες) μικροβιολογικής προέλευσης (Bardócz 1995; Izquierdo-Pulido et al., 1999). Η ισταμίνη, η τυραμίνη, η πουτρεσκίνη, η καδαβερίνη η β-φαινυλαιθυλαμίνη και η τρυπταμίνη παράγονται από την αποκαρβοξυλίωση της ιστιδίνης, τυροσίνης, ορνιθίνης, λυσίνης, β – φαινυλαλανίνης και τρυπτοφάνης αντίστοιχα (Spano et al., 2010). Οι φυσικές πολυαμίνες σπερμίνη και σπερμιδίνη, δεν συνδέονται με τη μικροβιολογική δραστηριότητα και η βιοσύνθεσή τους ακολουθεί μια πιο σύνθετη διαδικασία. Χαμηλά επίπεδα πουτρεσκίνης στο τρόφιμο μπορεί επίσης να θεωρούνται σαν φυσιολογικά ή φυσικής προέλευσης και όχι παραγόμενα από μικροβιακή δραστηριότητα (Bardócz 1995; Izquierdo-Pulido et al., 1999) .

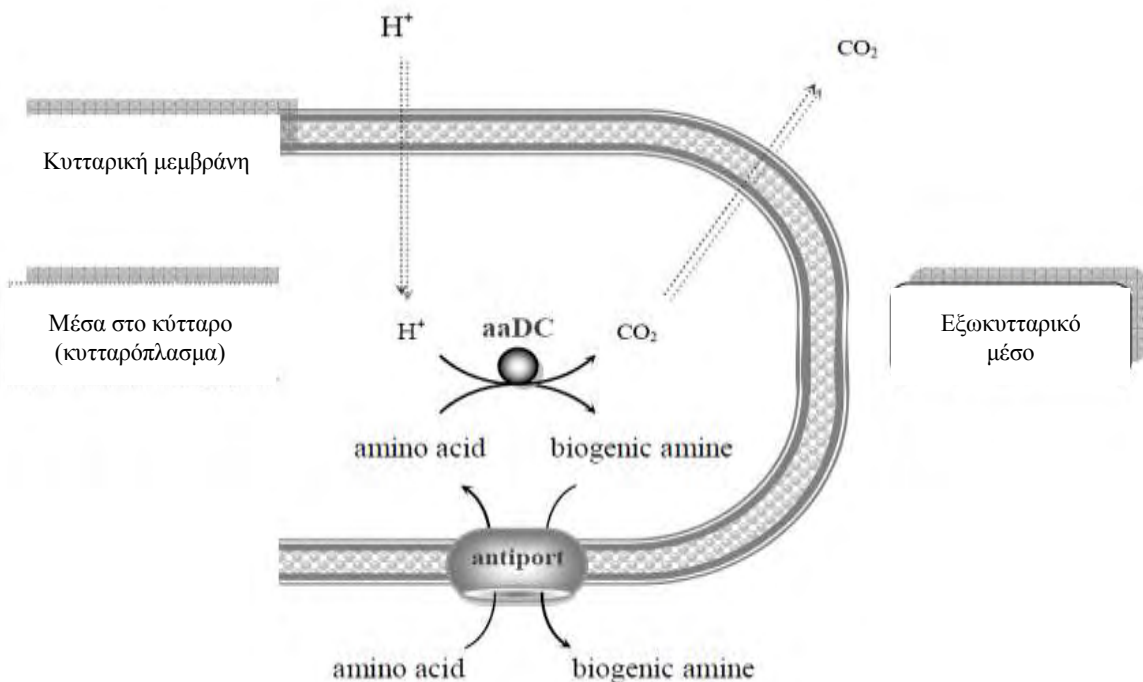
Το ενδιαφέρον για τις βιογενείς αμίνες προέκυψε στη δεκαετία του '60 μετά από τις αναφορές της αποκαλούμενης «αντίδρασης στα τυριά», μιας σοβαρής υπερτασικής κρίσης μετά από την κατανάλωση τυριών πλούσιων σε τυραμίνη (Blackwell et al., 1969).



Σχήμα 2 : Χημική δομή και τρόπος σχηματισμού των βιογενών αμινών (Vidal-Carou 2007)

1.3.2 Βιολογικός ρόλος

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, η βιοσύνθεση των βιογενών αμινών είναι απαραίτητη καθώς αυτές οι ενώσεις λειτουργούν ως πρόδρομες για την σύνθεση ορμονών, αλκαλοειδών, νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών (Premont et al., 2001). Μερικές βιογενείς αμίνες έχουν σημαντικό ρόλο ως νευροδιαβιβαστές, ενώ άλλες όπως η πουτρεσκίνη και η σπερμιδίνη, είναι χρήσιμες σε κρίσιμες βιολογικές λειτουργίες (Igarashi et al., 2001). Στα προκαρυωτικά κύτταρα, ο φυσιολογικός ρόλος της σύνθεσης των βιογενών αμινών φαίνεται κυρίως ότι σχετίζεται με τους αμυντικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται από τα βακτήρια για να είναι ανθεκτικά σε όξινο περιβάλλον (Rhee et al., 2002, Lee et al., 2007). Η αποκαρβοξυλίωση αυξάνει την επιβίωσή τους κάτω από συνθήκες όξινου στρες (Rhee et al., 2002), μέσω της κατανάλωσης πρωτονίων και της απομάκρυνση αμινών και του διοξειδίου του άνθρακα (σχήμα 3), που βοηθούν στο να αποκατασταθεί το εσωτερικό pH (van de Guchte et al., 2002).



Σχήμα 3: Βιοσύνθεση αμινών στα βακτήρια. Αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων (aaDC). Μέσω της κυτταρικής μεμβράνης το αμινοξύ εισχωρεί μέσα στο κυτταρόπλασμα του βακτηρίου όπου αποκαρβοξυλιώνεται και με τον ίδιο τρόπο η παραγόμενη αμίνη εκκρίνεται στον εξωτερικό χώρο (Bovel – Cid, 2000).

Η ισταμίνη δρα ως ορμόνη και ως νευροδιαβιβαστής. Τα μαστικά κύτταρα, τα κύτταρα του πλάσματος του αίματος (π.χ. βασεόφιλα, κοκκιοκύτταρα, θρομβοκύτταρα) και οι εγκεφαλικοί νευρώνες περιέχουν ισταμίνη. Αλληλεπιδρώντας με συγκεκριμένους υποδοχείς κυττάρων – στόχων, η ισταμίνη έχει διάφορες λειτουργίες. Ο φυσιολογικός της ρόλος περιλαμβάνει την έκκριση του γαστρικού υγρού, την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση, τον κερκαδικό ρυθμό. Επιπλέον, η ισταμίνη σχετίζεται με την έναρξη αλλεργικών αντιδράσεων, καθώς συνδέεται με συγκεκριμένους υποδοχείς, με αποτέλεσμα την συστολή των κυττάρων των λείων μυών, την διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και την εκροή πλάσματος σε περιβάλλοντες ιστούς, όπως βλεννογόνοι και υποδόριος ιστός (EFSA, 2011).

Η τυραμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη και η τρυπαμίνη θεωρούνται ότι βρίσκονται σε ίχνη σε ανθρώπους και σχετίζονται με νευρορυθμιστικές λειτουργίες γιατί είναι παρόμοιες δομικά και λειτουργικά με τις κατεχολαμίνες. Πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο σε ανθρώπινες διαταραχές όπως σχιζοφρένεια, κατάθλιψη, διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και νόσος του Πάρκινσον. Οι μηχανισμοί δράσης τους εξαρτώνται από τον εντοπισμό τους. Στον εγκέφαλο, δρουν ως έμμεσα συμπαθομιμητικά, μέσω της έκλυσης της νοραδρεναλίνης, η οποία προκαλεί αγγειοσυστολή και παροδική υπέρταση. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η τυραμίνη και οι άλλες αμίνες – ίχνη προκαλούν αγγειοδιαστολή του μεσεντέριου αγγειακού συστήματος, αυξάνοντας την ροή του αίματος στο γαστρεντερικό σωλήνα, διευκολύνοντας έτσι την απορρόφηση τους. Άμεσες επιπτώσεις που συνδέονται με συγκεκριμένους υποδοχείς έχουν επίσης αναφερθεί στο καρδιαγγειακό σύστημα, προκαλώντας αύξηση του καρδιακού ρυθμού (EFSA, 2011).

Η πουτρεσκίνη διεγείρει τις κινάσες τυροσίνης και την έκφραση συγκεκριμένων πυρηνικών πρωτοογκονιδίων και εμπλέκεται στην καρκινική παθογένεση (Wolter et al., 2004). Στους ανθρώπους, δρα ως πρόδρομος για τις φυσικές πολυαμίνες (δηλ. σπερμιδίνη και σπερμίνη) και όλες σχετίζονται με την ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης, την κυτταρική διαίρεση και την αύξηση των όγκων. Η πουτρεσκίνη είναι ένα σημαντικό συστατικό όλων των κυττάρων των θηλαστικών και συμμετέχει ουσιαστικά σε μια πληθώρα ρυθμιστικών βημάτων, κατά τη διάρκεια του κανονικού και κακοήθους κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Λόγω του υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού, ο εντερικός και κολονικός βλεννογόνο έχουν μεγάλη απαίτηση για πουτρεσκίνη (EFSA, 2011).

Ο ρόλος της καδαβερίνης είναι λιγότερο γνωστός, αλλά θα μπορούσε να ενισχύει τη δράση άλλων διαμινών και. έχει αναφερθεί ότι σε ορισμένα συστήματα, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, η καδαβερίνη μπορεί να αντικαταστήσει την πουτρεσκίνη (EFSA, 2011).

Οι πολυαμίνες είναι χρήσιμες στην ανάπτυξη των κυττάρων και αυξάνουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Wolter et al., 2004).

1.3.3 Τοξικολογική δράση των βιογενών αμινών

Παρόλο που οι βιογενείς αμίνες είναι χρήσιμες σε κρίσιμες βιολογικές λειτουργίες, η κατανάλωση τροφών που περιέχουν μεγάλες ποσότητες βιογενών αμινών μπορεί να έχει τοξικολογικές συνέπειες.

Τοξικολογικά οι πιο σημαντικές βιογενείς αμίνες είναι η τυραμίνη και η ισταμίνη.

Η ισταμίνη, σε υγιή άτομα, μεταβολίζεται γρήγορα από τις αμινοοξειδάσες (DAO). Ωστόσο μπορεί να προκαλέσει σοβαρά συμπτώματα δηλητηρίασης, ως αποτέλεσμα των υψηλών συγκεντρώσεων που προσλαμβάνονται με την τροφή, όπως ψάρια της οικογένειας των σκομβροειδών (σκομβροειδής τοξίνωση) ή σκληρά τυριά (Lehane and Olley, 2000). Μείωση της δραστηριότητας της DAO (διαμινοοξειδάση), λόγω γενετικής προδιάθεσης ή γαστροεντερικών ασθενειών, ή φαρμακευτικής αγωγής με αναστολείς DAO, προκαλεί αύξηση των επιπέδων της ισταμίνης και οδηγεί σε δυσανεξία ισταμίνης, προκαλώντας πολλά συμπτώματα, που μοιάζουν με αλλεργική αντίδραση, ακόμη και μετά την κατάποση μικρών ποσοτήτων ισταμίνης, ανεκτών από υγιή άτομα (Maintz και Novak, 2007). Η δηλητηρίαση χαρακτηρίζεται από μια περίοδο επώασης που κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως μερικές ώρες, με συμπτώματα που είναι συνήθως εμφανή για λίγες ώρες μόνο. Τα συμπτώματα αφορούν τα αιμοφόρα αγγεία και τους λείους μυς και περιλαμβάνουν πονοκεφάλους, ρινικές εκκρίσεις, βρογχοσπασμούς, ταχυκαρδίες, αρρυθμίες, υποτάσεις, οιδήματα, κνιδώσεις, κνησμούς, εξάνθειες και άσθμα (Maintz και Novak, 2007). Η ισταμίνη έχει επίσης εμπλακεί στην παθογένεση των ημικρανιών σε επιρρεπή άτομα, που πάσχουν από έλλειψη DAO (Maintz και Novak, 2007). Τρόφιμα πλούσια σε ισταμίνη έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν κεφαλαλγίες, οι οποίες ανακουφίζονται από μία διατροφή

απουσία ισταμίνης, από ασθενείς που πάσχουν από ημικρανίες. Επίσης, προκαλεί συστολή των εντερικών μυών, εμετούς, διάρροια και εντερικούς σπασμούς. Για τους παραπάνω λόγους η ισταμίνη αποτελεί την σημαντικότερη τοξικολογικά αμίνη και είναι η μόνη για την οποία έχει θεσπιστεί σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, το ανώτατο όριο των 100mg/kg για τους ιχθείς των οικογενειών Clupeidae και Scombroidea.

Η τυραμίνη, η φαινυλαιθυλαμίνη και η τρυπταμίνη είναι δραστικοί αγγειοσυστολείς και υψηλά επίπεδα στους οργανισμούς μπορούν να οδηγήσουν σε υπέρταση, ημικρανίες, εμετούς, διαστολή της κόρης του οφθαλμού (EFSA, 2011) και ακόμη εγκεφαλικές αιμορραγίες και καρδιακή ανεπάρκεια (Til et al., 1997). Τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται σε 30 λεπτά έως μερικές ώρες μετά την κατανάλωση βιογενών αμινών και συνήθως εξαφανίζονται μέσα σε λίγες ώρες και η αποκατάσταση της υγείας ολοκληρώνεται σε 24 ώρες. Επιπροσθέτως, υπερτασικές κρίσεις και σοβαροί πονοκέφαλοι μπορούν να προκληθούν με την κατανάλωση τροφίμων με μεγάλη περιεκτικότητα σε τυραμίνη από άτομα σε φαρμακευτική αγωγή με αναστολείς μονοαμινοξειδάσης (MAOI) (Stockley's Drug Interactions, 2011). Συγκεκριμένα, όσον αφορά το τυρί, τροφική δηλητηρίαση μπορεί να προκληθεί από υψηλές συγκεντρώσεις τυραμίνης σε συνδυασμό με αναστολείς MAO, ως αντικαταθληπτικά. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται αντίδραση τυριού (Spano et al., 2010). Το ανώτατο όριο συγκέντρωσης για την τυραμίνη εκτιμάται σε υψηλότερα επίπεδα (100 – 800mg/kg) σε σχέση με την ισταμίνη.

Η ισταμίνη και η τυραμίνη διασπώνται στα θηλαστικά με την οξειδωτική απαμίνωση, που καταλύεται από τις αμινοοξειδάσες. Παρόλα αυτά, οι άνθρωποι μηχανισμοί αποτοξίνωσης μπορεί να είναι ανεπαρκείς, όπως στην περίπτωση διατροφής με πρόσληψη υψηλών ποσοστών βιογενών αμινών, σε αλλεργικά άτομα ή σε ασθενείς που τους χορηγούνται φάρμακα που έχουν δράση αναστολέων διάμινο και μονοάμινο οξειδάσης (MAOI, DAOI) όπως τα φάρμακα για το Πάρκινσον και τα αντικαταθληπτικά (Komprda, et al., 2009). Στην περίπτωση αυτή οι αμίνες συσσωρεύονται στον οργανισμό με αποτέλεσμα την εκδήλωση των παραπάνω τοξικών φαινομένων.

Η τοξικολογική δράση της πουτρεσκίνης και της καδαβερίνης φαίνεται να είναι λιγότερο σημαντική από εκείνη της ισταμίνης και της τυραμίνης. Οι ανεπιθύμητες δράσεις που αναφέρονται είναι υπόταση, βραδυκαρδία και μερική παράληση των άκρων (Shalaby, 1996). Ίσως, η πιο σημαντική ανεπιθύμητη δράση

της πουτρεσκίνης και της καδαβερίνης των τροφίμων είναι η αύξηση της τοξικότητας που προκαλούν σε άλλες αμίνες, ιδιαίτερα της ισταμίνης. Τέλος, αυτές οι διαμίνες μπορούν να αντιδράσουν με νιτρώδη και να σχηματισούν καρκινογόνες νιτροζαμίνες (EFSA, 2011)

Η τοξικολογική σημασία των πολυαμινών σπερμίνη και σπερμιδίνη, που περιλαμβάνουν και την πρόδρομη πουτρεσκίνη (διαμίνη), βασίζεται στην ικανότητα τους να σχηματίζουν δομές καρκινογένεσης και να ενισχύουν την ανάπτυξη κρυφών εστιών στο έντερο (Paulsen, et al., 1997).

Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων βιογενών αμινών στα τρόφιμα είναι ανεπιθύμητη και μη αποδεκτή για δύο λόγους : 1^ο Η κατανάλωση τέτοιων τροφίμων μπορεί να αποδειχθεί επικίνδυνη για την ανθρώπινη υγεία λόγω της άμεσης τοξικής επίδρασης των ενώσεων αυτών και της αλληλεπίδρασης τους με μερικά φάρμακα (Shalaby, 1996). 2^ο Είναι ένδειξη κακής υγιεινής κατάστασης και κακής ποιότητας των πρώτων υλών που χρησιμοποιήθηκαν όπως και εφαρμογής λανθασμένων μεθόδων και πρακτικών κατά την παραγωγή και συντήρηση των αντίστοιχων τροφίμων (Bover – Cid et al., 2000; Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004)

1.3.4 Βιογενείς αμίνες στο κρέας

Οι βιογενείς αμίνες είναι παρούσες σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων στο κρέας και τα προϊόντα του. Σε νωπά, σε θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος και σε προϊόντα ωρίμανσης από ολόκληρα τεμάχια κρέατος (Alfaia et al., 2004), αυτές οι συγκεντρώσεις δεν ξεπερνούν τις μερικές δεκάδες ppm (πίνακας 2) όταν το προϊόν έχει παραχθεί από πρώτη ύλη υψηλής ποιότητας (Paulsen et al., 1997; Bover – Cid et al., 2001b) και συντηρείται σε κατάλληλες συνθήκες υγιεινής.

Η κατεργασία του κρέατος καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσής του επηρεάζουν το σχηματισμό των βιογενών αμινών. Αυτό συμβαίνει διότι επιδρούν στους παράγοντες που εμπλέκονται στην παραγωγή των βιογενών αμινών. Είναι γνωστό ότι κάθε στάδιο επεξεργασίας του κρέατος, άμεσα ή έμμεσα, επηρεάζει τη συγκέντρωση του ενζύμου και του υποστρώματος και καθορίζει την παρουσία και άλλων ενώσεων, καθώς και συνθηκών που μπορούν να ρυθμίσουν την αποκαρβοξυλιωτική δραστηριότητα (Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004). Γενικά, έχει βρεθεί ότι η διαδικασία του μαγειρέματος μειώνει τις συγκεντρώσεις των

βιογενών αμινών και απαντούν στα προϊόντα αυτά 4 έως 10 φορές λιγότερο από ότι στα αλλαντικά και τα προϊόντα ωρίμανσης, εξαιτίας, κυρίως, της απώλειας των βιογενών αμινών κατά τη διαδικασία αυτή (Lakritz et al., 1975). Δεδομένου ότι το μαγείρεμα δεν ευνοεί το σχηματισμό βιογενών αμινών, η παρουσία τους στα μαγειρεμένα προϊόντα κρέατος φαίνεται ότι είναι στενά συνδεδεμένη με την ποιότητα των πρώτων υλών κρέατος που χρησιμοποιούνται (Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004). Υψηλές συγκεντρώσεις βιογενών αμινών σε κρέας υποδηλώνουν κακή ποιότητα του προϊόντος αυτού και οφείλονται στην προέλευση του (Paulsen et al., 1997, Bover-Cid et al., 2001b). Ένας άλλος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη, είναι οι συνθήκες θερμικής επεξεργασίας (π.χ τελική θερμοκρασία, ρυθμός θέρμανσης). Αυτές επηρεάζουν τις αποκαρβοξυλάσεις, οι οποίες, σε μερικές περιπτώσεις, ανενεργοποιούνται (Maijala et al., 1995b, Kebary et al., 1999) σε θερμοκρασία πάνω από 65 °C, στην οποία φτάνουν όλα τα θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα. Η καδαβερίνη και η πουτρεσκίνη που ανιχνεύονται σε αυτά τα προϊόντα κρέατος, χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής, κατά το ότι κατά τη διάρκεια της θέρμανσης μπορούν να μετατραπούν σε πυρρολιδίνη και πιπεριδίνη αντίστοιχα. Αν αντιδράσουν με τα νιτρώδη του κρέατος, μπορούν να σχηματίσουν νιτροζαμίνες, οι οποίες είναι άκρως καρκινογόνες (Patterson and Mottram, 1974, Wathensen et al., 1975).

Επίσης ο σχηματισμός των βιογενών αμινών επηρεάζεται από τις συνθήκες, κάτω από τις οποίες γίνεται ο χειρισμός των πρώτων υλών του κρέατος. Για παράδειγμα, μετά την απολύμανση των σφαγίων βοοειδών (πλύση με χλώριο και γαλακτικό οξύ), η οποία ακολουθείται από τη συσκευασία κενού όλων των τεμαχίων, από όλες τις αμίνες που προσδιορίζονται (ισταμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη, τρυπταμίνη, τυραμίνη), μόνο η τυραμίνη ανιχνεύεται μετά από 120 ημέρες σε θερμοκρασία 1 °C (Smith et al., 1993).

Οι συνθήκες που επικρατούν κατά την αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία (ψύξη) επιδρούν σημαντικά στην παραγωγή αμινών. Ακατάλληλες θερμοκρασίες αποθήκευσης (π. χ μεγαλύτερες από 5 °C) καθώς και παρατεταμένη αποθήκευση έχουν επίδραση: στην πρωτεόλυση, εξαιτίας της αύξησης της μικροβιακής ανάπτυξης και στην αποκαρβοξυλιωτική δράση (Maijala et al., 1995b).

Εκτός από το χρόνο και τις συνθήκες επεξεργασίας και αποθήκευσης, ο σχηματισμός των βιογενών αμινών εξαρτάται από τις συνθήκες συσκευασίας (κενό ή

τροποποιημένη ατμόσφαιρα), οι οποίες επηρεάζουν καθοριστικά τη μικροβιακή χλωρίδα (Wortberg and Woller, 1982). Συσκευασία είτε σε κενό είτε σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα, που χρησιμοποιούνται συχνά για την παράταση του χρόνου παραμονής τέτοιων προϊόντων στο ράφι, έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή των επιπέδων του O₂ και, συνεπώς, την αύξηση και επιλογή ορισμένων στελεχών διαφόρων μικροοργανισμών που μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό των βιογενών αμινών. Για παράδειγμα, ο *Enterobacter cloacae* παράγει τη μισή ποσότητα πουτρεσκίνης σε αερόβιες συνθήκες, ενώ ο *Klebsiella pneumoniae* συνθέτει σημαντικά λιγότερη ποσότητα καδαβερίνης και συνθέτει μεγαλύτερη ποσότητα πουτρεσκίνης σε αναερόβιες συνθήκες (Halasz et al., 1994). Οι Nadon et al. (2001) ανέφεραν ότι, η χρήση ατμόσφαιρας CO₂, είναι πιθανό να επιφέρει την παράταση του χρόνου παραμονής χοιρινού κρέατος στο ράφι, που αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -1,5 °C, μέχρι και 13 εβδομάδες, αφού έτσι περιορίζεται ο σχηματισμός των βιογενών αμινών, κυρίως κατά τη διάρκεια των 2 πρώτων εβδομάδων.

Αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης, μπορεί να προκαλέσει χημικές και δομικές μεταβολές στο κρέας, ανάλογα με το είδος και τις συνθήκες αποθήκευσης (θερμοκρασία, διάρκεια, διακυμάνσεις θερμοκρασίας κ.α). Οι περισσότερες αποκαρβοξυλάσεις είναι ασταθείς σε συνθήκες ψύξης. Για παράδειγμα, η αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης ανενεργοποιείται σε διάστημα 8-15 ημερών σε θερμοκρασία -20 °C (Halasz et al., 1994, Silla, 1996, Chen et al., 1994). Μολονότι εξαρτάται από τις συνθήκες, η επίδραση της αποθήκευσης σε συνθήκες ψύξης και κατάψυξης στη μικροβιακή ανάπτυξη και στην ενζυμική ενεργότητα δεν ευνοεί, γενικά, το σχηματισμό των βιογενών αμινών. Οι υφιστάμενες συγκεντρώσεις θα πρέπει, ως εκ τούτου, να προέρχονται, κυρίως, από τα νωπά προϊόντα και εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την προεπεξεργασία κατάψυξης και τις συνθήκες αποθήκευσης. Έτσι, οι Hernandez-Jover et al. (1996) διαπίστωσαν ότι η αναλογία των βιογενών αμινών παραμένει σταθερή σε χοιρινό κρέας που αποθηκεύεται για 12 ημέρες σε θερμοκρασία -18 °C. Παρόλα αυτά, κάποιοι άλλοι ερευνητές έχουν καταγράψει αύξηση στις συγκεντρώσεις της καδαβερίνης και της πουτρεσκίνης και μείωση στις συγκεντρώσεις της ισταμίνης, της σπερμιδίνης και της σπερμίνης μετά τις 8 ημέρες σε θερμοκρασία -20 °C (Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004).

Οι Maijala et al. (1995a) αναφέρουν ότι ο χρόνος απόψυξης των πρώτων υλών επηρεάζει τη μικροβιακή χλωρίδα και τις ποσότητες των ελεύθερων αμινοξέων που

δρουν ως πρόδρομες ενώσεις και, συνεπώς, το σχηματισμό των βιογενών αμινών. Όμως, οι Bover-Cid et al. (2001b) έδειξαν ότι ο σχηματισμός των βιογενών αμινών, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης αλλαντικών που παρασκευάζονται από αποψυγμένο χοιρινό κρέας, εξαρτάται από τη χρήση ενός εκκινητή καλλιέργειας παρά από το χρόνο απόψυξης των πρώτων υλών.

1.3.5 Βιογενείς αμίνες στα αλλαντικά αέρος

Στα ζυμούμενα αλλαντικά από σύγκοπτο κρέας (σαλάμι αέρος) έχουν μετρηθεί αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις βιογενών αμινών οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις θα μπορούσαν κάτω από ορισμένες συνθήκες να θέσουν κάποιους ευαίσθητους καταναλωτές όπως άτομα με αλλεργίες και άτομα στα οποία χορηγούνται αντικαταθλιπτικά σε κίνδυνο για τροφική δηλητηρίαση (Komprda et al., 2009). Η συσσώρευση των βιογενών αμινών στο σαλάμι αέρος, όπως άλλωστε και σε άλλα ζυμούμενα τρόφιμα, ευνοείται από τις συνθήκες που επικρατούν σε αυτό κυρίως κατά το στάδιο της ζύμωσης και ωρίμανσης όπως: α) Ανάπτυξη μικροοργανισμών με γνωστή πρωτεολυτική, αποκαρβοξυλιωτική και αμινογενετική δράση (λακτοβάκιλοι, μικρόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι κλπ). β) Εκτεταμένη πρωτεόλυση και δημιουργία αυξημένων συγκεντρώσεων ελευθέρων αμινοξέων που μπορούν να αποκαρβοξυλιωθούν προς βιογενείς αμίνες. γ) Παραγωγή ασθενών οργανικών οξέων η οποία ενισχύει την δράση κάποιων μικροοργανισμών που παράγουν βιογενείς αμίνες για να προστατευτούν από τη μείωση του pH του περιβάλλοντος τους (Suzzi, & Gardini, 2003).

Η παρουσία των βιογενών αμινών στα αλλαντικά αέρος έχει μελετηθεί πολύ την τελευταία εικοσιπενταετία. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται κάποια αποτελέσματα μετρήσεων τους σε διάφορα αλλαντικά αέρος από λιανικές αγορές διάφορων ευρωπαϊκών χωρών. Όπως προκύπτει από τις πολυάριθμες μελέτες οι συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών παρουσιάζουν ευρύτατες διακυμάνσεις όχι μόνο σε διαφορετικούς τύπους αλλαντικών αέρος προερχόμενα από διαφορετικές χώρες και παραγωγούς αλλά ακόμη και σε διαφορετικές παρτίδες του ίδιου προϊόντος που προέρχεται από τον ίδιο παραγωγό. Στο προφίλ των βιογενών αμινών των αλλαντικών αέρος πιο συχνά εμφανίζεται η τυραμίνη η οποία υπερσχύει συνήθως (αλλά όχι πάντα) και ποσοτικά. Η πουτρεσκίνη και καδαβερίνη απαντούν επίσης αρκετά συχνά αλλά σε

πολύ πιο μεταβλητές συγκεντρώσεις. Η ισταμίνη εμφανίζεται πιο σπάνια και σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Κάποια όμως δείγματα με αυξημένη συγκέντρωση βιογενών αμινών μπορεί να την περιέχουν σε ασυνήθιστα υψηλά ποσοστά. Η 2-φαινυλαιθυλαμίνη και τρυπταμίνη βρίσκονται επίσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι οποίες μπορεί να είναι κάπως πιο αυξημένες σε δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε τυραμίνη. Τέλος τα αλλαντικά αέρος από σύγκοπτο κρέας αποτελούν σημαντική πηγή φυσιολογικών αμινών (σπερμιδίνη, σπερμίνη) οι οποίες προέρχονται από το κρέας που έχει χρησιμοποιηθεί σαν πρώτη ύλη και όχι από μικροβιακή δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό οι συγκεντρώσεις τους παρουσιάζουν μικρότερες διακυμάνσεις και τα επίπεδα της σπερμίνης είναι πάντοτε υψηλότερα της σπερμιδίνης (Vidal-Carou et al., 2007).

Η συσσώρευση των βιογενών αμινών στα αλλαντικά αέρος είναι αποτέλεσμα της σύνθετης αλληλεπίδρασης διαφόρων μικροβιακών, φυσικοχημικών και τεχνολογικών παραγόντων οι οποίοι αν και έχουν μελετηθεί πολύ τα τελευταία 25 χρόνια δεν έχουν ωστόσο, διευκρινιστεί πλήρως. Παρακάτω εξετάζονται κάποιοι από αυτούς.

Reference	product	n	Tyrosine	Histamine	Phenylethyl-amine	Tryptamine	Cadaverine	Putrescine	Spermidine	Spermine
Rover - Cid et al. (1999)	Thin fuet	15	68 Md. 92 ± 72 (1 - 218)	0.6 Md. 1 ± 2 (0 - 5)	1 Md. 4 ± 8 (0 - 29)	0 Md. 5 ± 11 (0 - 39)	11 Md. 43 ± 48 (1 - 115)	15 Md. 80 ± 152 (1 - 513)	5 Md. 7 ± 5 (1 - 21)	30 Md. 25 ± 14 (2 - 44)
	fuet	23	103 Md. 119 ± 64 (22 - 272)	2 Md. 12 ± 34 (0 - 158)	3 Md. 8 ± 13 (0 - 47)	4 Md. 8 ± 11 (0 - 36)	8 Md. 28 ± 42 (2 - 156)	34 Md. 49 ± 43 (1 - 169)	6 Md. 8 ± 9 (2 - 45)	23 Md. 24 ± 16 (2 - 84)
Ruiz Cepillés & Jimenez - Comenaro (2004)	Chorizo Jamon serrano Cooked ham Mortadella	3	129 ± 100 (19 - 214) (0.5 - 8.5) (0 - 11.9) (0 - 66)	6 ± 9 (1 - 16) (2 - 128.4) - (0 - 4.8)	- - - (0 - 1.4)	- - - (0 - 1)	103 ± 113 (9 - 229) - (0 - 0.9) (0.6 - 7)	92 ± 92 (0.8 - 185) - (0 - 3.9) (0 - 3.9)	8 ± 1 (7 - 8) - (1.7 - 3) (1.9 - 8.9)	46 ± 11 (39 - 59) - (18.1 - 25.4) (7.8 - 32.2)
Coisson et al. (2004)	Salsiccia brelloni	10	68 Md. 205 ± 105 (60 - 372)	19 Md. 46 ± 54 (8 - 165)	0 Md. 14 ± 20 (0 - 53)	9 Md. 20 ± 25 (0 - 69)	-	-	-	-
Miguel - Arredondo et al. (2006)	Dry sausage (industrial)	33	128 Md. 143 ± 120 (6 - 675)	2 Md. 28 ± 50 (0 - 186)	4 Md. 10 ± 32 (0 - 186)	5 Md. 14 ± 34 (0 - 194)	11 Md. 47 ± 90 (2 - 466)	41 Md. 91 ± 110 (0 - 410)	4 Md. 6 ± 5 (1 - 20)	22 Md. 22 ± 9 (8 - 44)
	Dry sausage traditional	67	118 Md. 139 ± 93 (1 - 433)	1 Md. 14 ± 37 (0 - 205)	3 Md. 8 ± 14 (0 - 61)	3 Md. 7 ± 12 (0 - 52)	9 Md. 26 ± 38 (0 - 156)	33 Md. 63 ± 89 (0 - 537)	5 Md. 6 ± 5 (1 - 29)	21 Md. 24 ± 15 (2 - 78)
Frohn et al. (1998b)	Finish sausage	11	88 (4 - 200)	54 (0 - 180)	13 (2 - 248)	jd (0 - 43)	50 (0 - 270)	92 ± 92 (0.8 - 185)	8 ± 1 (7 - 8)	46 ± 11 (39 - 59)
	Russian sausage	4	110 (6 - 240)	89 (0 - 200)	11 (1 - 33)	22 (0 - 43)	10 (3 - 18)	-	-	-
Papavegou et al. (2012)	Danish sausage	8	54 (5 - 110)	9 (1 - 56)	2 (0 - 4)	27 (0 - 91)	180 (0 - 790)	(0 - 3.9) (0 - 3.9)	(1.7 - 3) (1.9 - 8.9)	(18.1 - 25.4) (7.8 - 32.2)
	Meatwurst	12	72 (5 - 320)	21 (0 - 170)	3 (0 - 5)	18 (0 - 54)	6 (0 - 16)	-	-	-
Papavegou et al. (2012)	dry-cured products made of whole meat cuts	8	8.5 Md. (0 - 18.5)	1.5 Md. (0 - 6)	-	(0 - 6)	-	1.6 Md. (0 - 7)	6.3 Md. (3 - 19.5)	36.5 Md. (11.1 - 46.3)

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις Βιογενών Αμινών σε διάφορα αλλαντικά στην Ευρώπη

Παραγωγή βιογενών αμινών από μικροοργανισμούς που σχετίζονται με το κρέας

Ο πιο σημαντικός παράγοντας σχηματισμού βιογενών αμινών στα αλλαντικά αέρος είναι η παρουσία συγκεκριμένων μικροβιακών στελεχών που μπορούν να ανήκουν σε διάφορα είδη μικροβίων και τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα αποκαρβοξυλίωσης κάποιων αμινοξέων. Τα στελέχη αυτά μπορεί να έχουν προστεθεί στην αρχική κρεατόπαστα σαν καλλιέργειες εκκίνησης ή ακόμη η παρουσία τους μπορεί να οφείλεται σε τυχαία επιμόλυνση των πρώτων υλών ή των προϊόντων κατά τη διάρκεια κάποιου από τα στάδια παραγωγής.

Από τα Gram αρνητικά βακτήρια πολλά στελέχη των εντεροβακτηρίων και των ψευδομονάδων που απαντούν στο κρέας έχουν την ικανότητα να παράγουν πουτρεσκίνη, καδαβερίνη (Bover-Cid & Holzapfel, 1999; Durlu-Özkaya et al., 2001; Suzzi & Gardini, 2003) και κάποια από αυτά και ισταμίνη (Roig Sagués et al., 1996) αν και σε μικρότερες ποσότητες από τα εντεροβακτήρια των ψαριών. Υψηλοί πληθυσμοί ψευδομονάδων και εντεροβακτηρίων μπορούν να απαντούν (σαν μολύνουσα μικροχλωρίδα) μόνο κατά το αρχικό στάδιο της παραγωγής των αλλαντικών αέρος. Η ανάπτυξη τους παρεμποδίζεται στις συνθήκες που δημιουργούνται κατά την ζύμωση και ωρίμανση των σαλαμιών αέρος με αποτέλεσμα σχεδόν να εξαφανίζονται από το έτοιμο προϊόν. Επομένως, αυξημένες συγκεντρώσεις κυρίως καδαβερίνης αλλά και πουτρεσκίνης και ισταμίνης σε αλλαντικά αέρος άσχετα με το μικροβιακό φορτίο τους θα μπορούσαν να είναι ένδειξη υψηλού μικροβιακού φορτίου των πρώτων υλών λόγω μακροχρόνιας και ανεπαρκούς συντήρησης (Bover-Cid et al., 2000) ή ακόμη και μη τήρησης ορθών υγιεινών πρακτικών καθ' όλη την παραγωγική διαδικασία του προϊόντος.

Από τα θετικά κατά Gram βακτήρια πολλά στελέχη των λακτοβακίλων *L. curvatus*, *L. buchneri*, *L. Brevis*, των εντεροκόκκων (*faecalis*, *faecium*) και των θετικών στην καταλάση κόκκων (σταφυλόκοκκοι, μικρόκοκκοι και κοκούρια) είναι ικανά να παράγουν αυξημένες ποσότητες τυραμίνης και κάποια από αυτά μικρότερες συγκεντρώσεις φαινυλαιθυλαμίνης, τρυπταμίνης και ακόμη πουτρεσκίνης και καδαβερίνης (Aymerich et al., 2006; Ansonera et al., 2002; Bover-Cid et al., 2001a; Joosten, 1987; Martín et al., 2006). Η ισταμίνη μπορεί επίσης να παραχθεί από στελέχη κάποιων λακτοβακίλων που δεν είναι ωστόσο πολύ συνηθισμένα στα αλλαντικά αέρος (Roig Sagués et al., 1996; Paulsen & Bauer, 1997). Τα θετικά κατά

Gram βακτήρια αντίθετα με τα αρνητικά επιβιώνουν και αναπτύσσονται στο σαλάμι αέρος και καθ' όλη τη διάρκεια της ζύμωσης και ωρίμανσης του. Κάποια από αυτά αποτελούν μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του κρέατος που έχει χρησιμοποιηθεί σαν πρώτη ύλη. Άλλα μπορεί να προέρχονται από εξωτερική επιμόλυνση των πρώτων υλών ή να έχουν χρησιμοποιηθεί στην αρχική κρεατόπαστα σαν καλλιέργειες εκκίνησης. Επομένως, χρειάζεται προσεκτική επιλογή της σύστασης των καλλιεργειών εκκίνησης ώστε να αποφεύγονται στελέχη με μεγάλη ικανότητα παραγωγής βιογενών αμινών.

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των βιογενών αμινών σε ζυμούμενα αλλαντικά.

Ένας πολύ καθοριστικός παράγοντας για τη συσσώρευση βιογενών αμινών των σε αλλαντικά αέρος είναι το pH.τους. Μείωση της τιμής του κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ωρίμανσης δραστηριοποιεί τις αποκαρβοξυλάσες των μικροβίων και την παραγωγή βιογενών αμινών σαν ένα μέσο εξουδετέρωσης ενός δυσμενούς για αυτά όξινου περιβάλλοντος. Έτσι, έχει διαπιστωθεί ότι η παραγωγή τυραμίνης επιταχύνεται μετά την έναρξη της οξίνισης κατά τη ζύμωση και γενικά υπάρχει θετική σχέση μεταξύ της οξίνισης και της συνολικής συγκέντρωσης βιογενών αμινών στα προϊόντα αυτά (Bover-Cid et al., 2001b; Miguélez-Arrizado et al., 2006). Ωστόσο, η επίδραση της τιμής του pH στην αμινογένεση των αλλαντικών αέρος είναι αρκετά αμφιλεγόμενη γιατί έχει επίσης αποδειχθεί ότι γρήγορη και απότομη οξίνιση κατά το στάδιο της ζύμωσης παρεμποδίζει την ανάπτυξη της μολύνουσας μικροχλωρίδας της κρεατόπαστας και επομένως και την παραγωγή βιογενών αμινών από αυτήν (Maijala et al., 1993; González-Fernández et al., 2003). Η παραγωγή των βιογενών αμινών επηρεάζεται επίσης θετικά από την τιμή της υγρασίας και της ενεργότητας νερού του αλλαντικού. Έτσι, η συγκέντρωση των βιογενών αμινών είναι μεγαλύτερη στο κεντρικό τμήμα ενός αλλαντικού γιατί η υγρασία του (και επομένως και η μικροβιακή ανάπτυξη) είναι μεγαλύτερη από ότι στις περιφερειακές στοιβάδες (Bover-Cid et al., 1999). Για τον ίδιο λόγο αλλαντικά με μεγαλύτερη διάμετρο περιέχουν υψηλότερες ποσότητες βιογενών αμινών από ότι λεπτότερα τα οποία αφυδατώνονται πιο εύκολα

Η θερμοκρασία και η υγρασία του χώρου στην οποία λαμβάνει χώρα η ζύμωση (συνήθως 7-28⁰C) και η ωρίμανση, είναι επίσης σημαντικές παράμετροι για τη

συσσώρευση βιογενών αμινών στο σαλάμι αέρος (Latorre-Moratalla et al., 2010). Αυξημένη σχετική υγρασία στο θάλαμο ωρίμανσης ευνοεί το σχηματισμό βιογενών αμινών (Bozkurt & Erkmen, 2004). Επίσης, υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν την ανάπτυξη της καλλιέργειας εκκίνησης και της δίνουν τη δυνατότητα να ξεπεράσει τα αμινογενετικά οξυγαλακτικά βακτήρια που προυπήρχαν στο προϊόν. Έτσι, οι Maijala et al., (1995b) ανίχνευσαν χαμηλότερα επίπεδα αμινών στην τελική φάση επεξεργασίας αλλαντικών αέρος που παράχθηκαν με καλλιέργειες εκκίνησης, σε υψηλότερη θερμοκρασία (24°C). Αντίθετα, άλλοι ερευνητές (Kranmer et al., 1991) βρήκαν ότι ο σχηματισμός της ισταμίνης μειώνεται όταν η θερμοκρασία ωρίμανσης μειώνεται από τους 18^o στους 7^oC πιθανόν λόγω συνεπακόλουθης μείωσης της ταχύτητας της πρωτεόλυσης και επίσης της δραστηριότητας της αποκαρβοξυλάσης της ιστιδίνης .

Τα πρόσθετα τα οποία χρησιμοποιούνται στην παραγωγή των ζυμούμενων προϊόντων κρέατος επηρεάζουν επίσης το σχηματισμό των βιογενών αμινών και το αποτέλεσμα της δράσης τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως είδος, συγκέντρωση, συνθήκες επεξεργασίας του προϊόντος, χρήση καλλιέργειας εκκίνησης κ.λπ. Υψηλότερες συγκεντρώσεις αλατιού και ζάχαρης προκάλεσαν μείωση της συγκέντρωσης της τυραμίνης, καδαβερίνης και πουτρεσκίνης σε ισπανικά παραδοσιακά λουκάνικα αέρος (González-Fernández et al., 2003; Lorenzo et al., 2008). Προσθήκη μίγματος μπαχαρικών με καυτερή πιπεριά μείωσε επίσης τις παραπάνω αμίνες σε βιομηχανικά παραγόμενο σαλάμι αέρος (Komprda et al., 2004). Προσθήκη νιτροδών αλάτων είχε το ίδιο αποτέλεσμα σε sucuk (τούρκικο παραδοσιακό σαλάμι αέρος) παραγόμενο είτε με καλλιέργεια εκκίνησης ή με φυσική ωρίμανση (Genccelep et al., 2007). Τέλος, οι Bover-Cid et al. (2001, c) ανέφεραν ότι το θειώδες νάτριο στα αλλαντικά ανέστειλε την παραγωγή καδαβερίνης και ενίσχυσε την παραγωγή της τυραμίνης και πουτρεσκίνης.

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες επηρεάζουν κατά διαφορετικό τρόπο διάφορα φαινόμενα σχετιζόμενα με παραγωγή βιογενών αμινών (κινητική ανάπτυξης διαφόρων βακτηρίων, οξίνιση, πρωτεόλυση, αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων μικροβιακών πληθυσμών, ενζυμική δραστηριότητα, κλπ). Ακόμη, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους κατά πολύπλοκο τρόπο και η επίδραση τους στην τελική περιεκτικότητα του προϊόντος σε βιογενείς αμίνες είναι δύσκολο να προβλεφτεί. Συνεπώς, για την πρόληψη και τον έλεγχο του φαινομένου της αμινογένεσης στα αλλαντικά, είναι

προτιμότερο να εξετάζονται αυτοί κατά περίπτωση. Επί πλέον, πολύ σημαντικοί παράγοντες για την πρόληψη του σχηματισμού των βιογενών αμινών είναι οι ακόλουθοι:

α) Καλή υγιεινή κατάσταση και ποιότητα των πρώτων υλών, σωστή επιλογή τους, έλεγχος του χρόνου και της θερμοκρασίας αποθήκευσης τους, όπως και της διαδικασίας κατάψυξης- απόψυξης τους (Maijala et al., 1995a; Bover-Cid et al., 2000). Η βελτίωση της υγιεινής κατάστασης και ποιότητας των πρώτων υλών αποδείχθηκε ότι θα μπορούσε να είναι εφικτή είτε με την κατάψυξη του κρέατος και του λίπους (Bover-Cid et al., 2006) ή/και με την εφαρμογή υψηλής υδροστατικής πίεσης στην αρχική κρεατόμαζα πριν από τη ζύμωση (Latorre-Moratalla et al., 2006). Αυτές οι δύο στρατηγικές εμποδίζουν την ανάπτυξη εντεροβακτηρίων και σαν αποτέλεσμα συντελούν σε μία αξιοσημείωτη μείωση της συσσώρευσης της καδαβερίνης.

β) Προσθήκη στην κρεατόμαζα καλλιεργείων εκκίνησης που δεν παράγουν βιογενείς αμίνες. Η χρήση τέτοιων καλλιεργείων έχει προταθεί επανειλημμένα σαν ένα από τα πιο αξιόπιστα εργαλεία ελέγχου της ζύμωσης και επομένως και της συσσώρευσης βιογενών αμινών λόγω της δράσης κυρίως της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας (οξυγαλακτικά βακτήρια, εντερόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι, μικρόκοκκοι) η οποία επιβιώνει ως το τέλος της ωρίμανσης. Ύστερα από πολλές έρευνες και δοκιμές επιβεβαιώθηκε ότι καλλιέργειες εκκίνησης που περιλαμβάνουν στελέχη *L.sakei* με αρνητική αποκαρβοξυλιωτική δράση είναι οι πιο προστατευτικές γιατί μειώνουν την συνολική συσσώρευση βιογενών αμινών έως και κατά 95% συγκριτικά με άλλα μικροβιακά είδη τα οποία συνήθως χρησιμοποιούνται εμπορικά όπως *L. plantarum*, *Pediococcus spp* και *S. carnosus* (González-Fernandez et al., 2003; Bover-Cid et al., 2001b; Latorre-Moratalla et al., 2007).

1.3.6 Βιογενείς αμίνες ως δείκτης ποιότητας στο κρέας και στα προϊόντα του

Οι συγκεντρώσεις ορισμένων βιογενών αμινών (όπως η τυραμίνη, πουτρεσκίνη, και καδαβερίνη) συνήθως αυξάνονται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευση του κρέατος και των προϊόντων με βάση το κρέας, ενώ άλλες (όπως σπερμιδίνη και σπερμίνη) μειώνονται ή παραμένουν σταθερές. Ως εκ τούτου έχουν γίνει προσπάθειες για τη δημιουργία μιας σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης των βιογενών αμινών (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) και της ποιότητας του κρέατος ή των επεξεργασμένων προϊόντων του. Η χρησιμότητα των βιογενών αμινών ως δείκτη ποιότητας και ανεπιθύμητης μικροβιακής δραστηριότητας εξαρτάται από τη φύση του προϊόντος. Τα αποτελέσματα είναι πιο ικανοποιητικά σε φρέσκο και θερμικά κατεργασμένο κρέας από ό, τι στα προϊόντα ζύμωσης (Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004).

Ένας συνδυασμός μεταξύ της πουτρεσκίνης και της καδαβερίνης προτάθηκε ως ένας δείκτης αποδοχής του νωπού κρέατος, γιατί οι συγκεντρώσεις τους αυξάνονται πριν την αλλοίωση και εμφανίζουν υψηλή συσχέτιση με το μικροβιολογικό φορτίο (Edwards et al., 1985). Οι Wortberg και Woller (1982) βρήκαν ότι μια υψηλή συγκέντρωση καδαβερίνης ήταν σαφώς ενδεικτική της αλλοίωσης. Οι συγγραφείς πρότειναν ένα δείκτη βιογενών αμινών (BAI) που αποτελείται από το άθροισμα της πουτρεσκίνης, καδαβερίνης, ισταμίνης και τυραμίνης και καθορίστηκε στα 500 mg / kg ως το όριο για βραστά αλλαντικά, το βοδινό και το χοιρινό κιμά. Χρησιμοποιώντας τον ίδιο δείκτη, ο Hernandez-Jover et al. (1996) πρότειναν τα ακόλουθα όρια: BAI <5 mg / kg για την καλή ποιότητα νωπού κρέατος, μεταξύ 5 και 20 mg / kg για τα αποδεκτά κρέατα, αλλά με αρχικές ενδείξεις αλλοίωσης, μεταξύ 20 και 50 mg / kg για τη χαμηλή ποιότητα του κρέατος και τελικά > 50 mg / kg για χαλασμένο κρέας (Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004).

Έχει αποδειχθεί γενικά ότι είναι δύσκολο να εφαρμοστούν παρόμοια κριτήρια ποιότητας στα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση. Αυτό ισχύει γιατί οι συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών ποικίλουν πολύ περισσότερο στα ζυμούμενα προϊόντα από ό, τι στο νωπό κρέας και τα θερμικά επεξεργασμένα προϊόντα κρέατος, λόγω του αριθμού των διαφόρων παραγόντων που εμπλέκονται στο σχηματισμό τους.

Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν τον τύπο και το βαθμό της μόλυνσης των πρώτων υλών, πρακτικές παρασκευής, ορισμένα στάδια επεξεργασίας, και τη χρήση των εκκινητών. Όλοι οι παράγοντες αυτοί διαφέρουν ανάλογα με τη φύση του προϊόντος και σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορούν να επηρεάσουν πολύ τις αλλαγές, τη συγκέντρωση και το είδος των βιογενών αμινών διαμέσου των διαφόρων φάσεων της επεξεργασίας και αποθήκευσης, ούτως ώστε αυτές να μην συμβαδίζουν με ορατά σημάδια αλλοίωσης όπως π.χ η ανάπτυξη δυσάρεστης οσμής. Σαν παράδειγμα αναφέρεται ότι όλοι οι μικροοργανισμοί τις αρχικής κρεατόμαζας των αλλαντικών αέρος και κυρίως οι προερχόμενοι από επιμόλυνση ή καλλιέργειες εκκίνησης δεν μπορούν να αποκαρβοξυλιώσουν τα ελεύθερα αμινοξέα. Ακόμη και μέσα στο ίδιο μικροβιακό είδος όλα τα στελέχη δεν έχουν την ίδια ικανότητα αποκαρβοξυλίωσης. Έτσι, μια χαμηλή συγκέντρωση βιογενών αμινών δεν συνεπάγεται πάντοτε και καλή μικροβιολογική ποιότητα του αντίστοιχου προϊόντος. (Ruiz – Capillas & Jimenez – Colmenero, 2004).

1.4 Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΡΓΑΣΙΑ

Από όσα έχουν περιγραφεί στα προηγούμενα κεφάλαια γίνεται σαφές ότι η παραγωγή των βιογενών αμινών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και ωρίμανσης των σαλαμιών αέρος έχει ως τώρα μελετηθεί πάρα πολύ όπως και οι παράγοντες που την επηρεάζουν. Σχετικά λίγες έρευνες ωστόσο, έχουν ασχοληθεί με το σχηματισμό των βιογενών αμινών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και συντήρησης του έτοιμου προϊόντος (Bover-Cid et al., 2001d; Komprda et al., 2001; Komprda et al., 2004; Komprda et al., 2009). Αυτός όμως ο σχηματισμός είναι πολύ πιθανός γιατί μετά το τέλος της ωρίμανσης επιβιώνουν στο σαλάμι αέρος μικροβιακές ομάδες με γνωστή ικανότητα να αποκαρβοξυλιώνουν τα αμινοξέα. Η παρακάτω εργασία πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη του σχηματισμού των βιογενών αμινών στο σαλάμι αέρος, κατά τη διάρκεια της συντήρησης του υπό ψύξη και της επίδρασης της θερμοκρασίας συντήρησης σε αυτόν τον σχηματισμό.

Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν προς μελέτη δύο διαφορετικά είδη αλλαντικών ευρείας κατανάλωσης στην Ελλάδα με διαφορετική τεχνολογία παραγωγής. Το ένα είναι βιομηχανικό και παράγεται με χρήση μικροβιακών καλλιιεργειών εκκίνησης ενώ το άλλο είναι παραδοσιακό προϊόν παραγόμενο με φυσική ωρίμανση. Η μελέτη έγινε για τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες αποθήκευσης και συνεχίστηκε μέχρι το πέρας της διάρκειας ζωής κάθε προϊόντος σύμφωνα με τις προδιαγραφές του, κατά δήλωση των παραγωγών τους. Οι θερμοκρασίες αποθήκευσης που επιλέχθηκαν ήταν 5°, 10° και 18°C. Οι ≤ 5°C είναι η συνήθης θερμοκρασία κατά την συντήρηση των τροφίμων υπό ψύξη, οι 10°C είναι η θερμοκρασία στην οποία λειτουργούν μερικές φορές τα οικιακά ψυγεία στην Ελλάδα (Sergelidis et al., 1997) και τέλος οι 18°C είναι η συνιστώμενη θερμοκρασία συντήρησης για το παραδοσιακό σαλάμι Λευκάδας από τον παραγωγό του.

Εκτός από τις βιογενείς αμίνες προσδιοριζόταν επίσης α) οι μεταβολές των πληθυσμών ορισμένων μικροβιακών ομάδων με γνωστή αποκαρβοξυλιωτική και αμινογενετική δράση, β) του pH και γ) του συντελεστή ενεργότητας νερού γιατί αυτές οι μεταβολές παρέχουν συμπληρωματική πληροφόρηση και διευκολύνουν την κατανόηση των παραγόντων που επηρεάζουν την αμινογένεση κατά τη διάρκεια της

αποθήκευσης. Παράλληλα, στην αρχή και ύστερα από τέσσερις μήνες αποθήκευσης στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες μετρήθηκαν οι πληθυσμοί της *Listeria monocytogenes* και του *Staphylococcus aureus* ως δείκτες της καλής υγιεινής κατάστασης τω προϊόντων αυτών.

2. Πειραματικό Μέρος

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Τεχνολογίας Προϊόντων Ζωικής προελεύσεως της Κτηνιατρικής σχολής του Α.Π.Θ. Η έρευνα ολοκληρώθηκε σε τρεις επαναλήψεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους.

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο κατηγορίες αλλαντικών αέρος α) παραδοσιακά αλλαντικά αέρος Λευκάδας παραγόμενα από σύγχρονη μονάδα στο νησί της Λευκάδας και β) βιομηχανοποιημένα αλλαντικά αέρος τύπου Ουγγαρίας παραγόμενα από μονάδα στη Β. Ελλάδα.

Σύμφωνα με τους παραγωγούς η διαδικασία παραγωγής των προϊόντων ήταν η εξής:

✓ **Λευκάδας**

Η διαδικασία ξεκινά με την αποστέωση του φρέσκου χοιρινού κρέατος και με την παραδοσιακή απονεύρωση και απολίπωση «με το χέρι». Ύστερα από αυτό, το κρέας γίνεται κιμάς αναμιγνύεται με κυβάκια λίπους, αλάτι, πιπέρι, σκόρδο, ζάχαρη και νιτρικά άλατα και στη συνέχεια με το μείγμα που δημιουργείται γεμίζονται τα έντερα (διαμέτρου 47mm). Το σαλάμι είναι φυσικής ωρίμανσης οπότε στη συνέχεια τα έντερα κρεμιούνται για να ωριμάσουν για διάστημα 8 έως 18 ημερών, ανάλογα τη διάμετρο και τις καιρικές συνθήκες.

Συστατικά : Νωπό χοιρινό κρέας 80 %, λίπος χοιρινό, αλάτι, πιπέρι, σκόρδο, ζάχαρη.

Αντιοξειδωτικό : ερυθροβικό νάτριο.



Εικόνα 7 : θάλαμος ωρίμανσης

Ενισχυτικό γεύσης: γλουταμινικό μονονάτριο. Συντηρητικά: νιτρώδες νάτριο, νιτρικό κάλιο

Το σαλάμι διατηρείται στους 4 – 15°C για 4 μήνες όταν είναι συσκευασμένο αεροστεγώς και για 3 μήνες σε μορφή χύμα (όχι σε αεροστεγή συσκευασία) τυλιγμένο με χαρτί κουζίνας και αλουμινόχαρτο. Και στις δύο περιπτώσεις μπορεί να συντηρηθεί στην κατάψυξη για 1 έτος.

✓ **Τύπου Ουγγαρίας**

Η κρεατόμαζα αποτελείται από κρέας χοιρινό τυποποιημένο, χοιρινό λίπος, μίγμα ζαχάρων, μίγμα μπαχαρικών (κόλιανδρο, μοσχοκάρυδο, πιμέντο), αλάτι, πιπέρι, νιτρώδη άλατα και εμπορική, λυοφιλωμένη καλλιέργεια εκκίνησης αποτελούμενη από *S. carnosus*, *L. pentosus*. Τα παραπάνω συστατικά αναμιγνύονται στο κούτερ και με το μείγμα που δημιουργείται γεμίζονται θήκες διαμέτρου 60mm στην συνέχεια τα σαλάμια τοποθετούνται στον θάλαμο ζύμωσης όπου παραμένουν για μία εβδομάδα σε ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Ύστερα από την πρώτη εβδομάδα τοποθετούνται σε θάλαμο ωρίμανσης όπου και παραμένουν σε ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας για 3 – 4 εβδομάδες. Στο πρώτο στάδιο της ωρίμανσης τα αλλαντικά υφίστανται και κάπνιση με φυσικό καπνό.

Το σαλάμι μπορεί να συντηρηθεί για δώδεκα μήνες σε θερμοκρασία 5 °C και συσκευασία κενού.

Τα αλλαντικά παραλήφθηκαν από τα εργοστάσια παραγωγής τους, αμέσως μετά το στάδιο της συσκευασίας τους υπό κενό, όταν ήταν έτοιμα προς κατανάλωση. Αμέσως μετά την άφιξή τους στο εργαστήριο κάθε κατηγορία χωρίστηκε σε τρεις ομάδες (συνολικά έξι ομάδες) που συντηρήθηκαν υπό κενό σε διαφορετικές θερμοκρασίες μέχρι την ημερομηνία λήξης τους που ήταν τέσσερις μήνες για τα αλλαντικά Λευκάδας και δώδεκα μήνες για τα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας (5°C). Η πρώτη ομάδα κάθε κατηγορίας συντηρήθηκε στους 5 °C, η δεύτερη ομάδα στους 10 °C και η τρίτη ομάδα σε θερμοκρασία 18 °C.

Κατά το διάστημα της συντήρησης παίρνονταν δείγματα από κάθε ομάδα και υποβάλλονταν σε μικροβιολογικές και φυσικοχημικές αναλύσεις. Η δειγματοληψίες πραγματοποιούνταν ως εξής α) για τα αλλαντικά Λευκάδας στις 0, 30, 60, 90, 120 ημέρες μετά το πέρας της παραγωγής τους β) για τα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας που

συντηρήθηκαν στους 10 και 18 °C στις 0, 30, 60, 90, 120 ημέρες (γιατί μετά παρουσίασαν σημάδια αλλοίωσης) και για αυτά που συντηρήθηκαν στους 5 °C στις 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 360 ημέρες μετά το πέρας της παραγωγής τους.

2.2 ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές εξετάσεις και φυσικοχημικές αναλύσεις των δειγμάτων βάσει επισήμων μεθόδων ανάλυσης.

2.2.1 Μικροβιολογικές εξετάσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις που έγιναν στα δείγματα ήταν οι εξής:

- ✍ Αρίθμηση οξυγαλακτικών βακτηρίων
- ✍ Αρίθμηση Εντεροβακτηριοειδών
- ✍ Αρίθμηση Μικροκόκκων
- ✍ Αρίθμηση Σταφυλόκοκκων θετικού στην πηκταση
- ✍ Αρίθμηση Σταφυλόκοκκων
- ✍ Αρίθμηση Εντεροκόκκων
- ✍ Αρίθμηση Ζυμών – Μυκήτων
- ✍ Αρίθμηση – Ανίχνευση *L.monocytogenes*

Η πρώτη εξέταση γινόταν αμέσως μετά την παρασκευή του προϊόντος (ημέρα 0) και οι επόμενες εξετάσεις την 30η, 60η, 90η, 120^η, 150^η, 180^η και 360^η ημέρα της συντήρησης.

Προετοιμασία των διαδοχικών αραιώσεων

Για τις μικροβιολογικές εξετάσεις των δειγμάτων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: 25 g δείγματος τοποθετούνταν υπό άσηπτες συνθήκες μέσα σε σακούλα Stomacher και ομογενοποιούνταν με 225 ml πεπτονόχου υγρού, Bacteriological Peptone (MC24), στον ομογενοποιητή Stomacher (Stomacher 400-laboratory blender, Seward Medical, London, UK) για δύο λεπτά. Στη συνέχεια από την αραιώση που προέκυπτε παρασκευάζονταν οι υπόλοιπες διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε 9 ml του ίδιου αραιωτικού υγρού.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως δεκαδικοί λογάριθμοι (colony forming units) ανά γραμμάριο (cfu/g).

Πίνακας 3. Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για τις μικροβιολογικές εξετάσεις του παραδοσιακού Ποντιακού καβουρμά από κρέας αγριόχοιρου.

Μικροοργανισμοί	Υπόστρωμα	Επώαση	Μέθοδος
<i>Micrococci</i>	Baird Parker	37 °C / 3	ISO 6888 – 2 :1999
<i>S. aureous</i>	Baird Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen	37 °C / 3	ISO 6888 – 2 :1999
Οξυγαλακτικά βακτήρια	MRS agar	37°C/3ημ. αναερόβια	Swanson και συν., 2001
Εντεροβακτηριοειδή	VRBG agar	37°C/1 ημέρα	ISO21528-2: 2004 (E)
Ζύμες-Μύκητες	Yeast Extract Dextrose Chloramphenicol agar	25°C/5 ημέρες	ISO7954:1987E
Λιστέρια	ALOA	30°C /24 ώρες	ΕΛΟΤ EN ISO 11290-2/1998/AM 1:2004

➤ **Αναλυτικότερα:**

2.2.1.1 Αρίθμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα deMan Rogosa Sharpe (MRS) agar (LAB M). Ο ενοφθαλμισμός γινόταν με ενσωμάτωση και μετά τη στερεοποίηση ακολουθούσε η επιστιβάδευση ενός δεύτερου λεπτού στρώματος από το ίδιο υπόστρωμα. Μετά από επώαση 3 ημερών σε αναερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασία 37°C, ακολουθούσε η αρίθμηση σύμφωνα με τους κανόνες της ΑΡΗΑ (Swanson και συν., 2001).

2.2.1.2 Αρίθμηση των Ζυμών - Μυκήτων

Για την αρίθμηση των ζυμών και των μυκήτων χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Yeast Extract Dextrose Chloramphenicol agar (LAB 119) που περιείχε το supplement X009 . Ο ενοφθαλμισμός γινόταν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης. Η επώαση γινόταν στους 25 °C για 5 ημέρες και μετά ακολουθούσε η καταμέτρηση των αποικιών (ISO7954:1987E).

2.2.1.3 Αρίθμηση των Μικρόκοκκων - Σταφυλόκοκκων που παράγουν πηκτάση

Για την αρίθμηση των *Μικρόκοκκων και των σταφυλόκοκκων που παράγουν πηκτάση (S. aureus)* χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Baird Parker (BP). Για τους σταφυλόκοκκους που παράγουν πηκτάση προστέθηκε επί πλέον το supplement Rabbit Plasma Fibrinogen (LABX086). Ο ενοφθαλμισμός γινόταν με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης. Η επώαση γινόταν στους 37 °C για 3 ημέρες και ακολουθούσε η καταμέτρηση των αποικιών (ISO 6888 – 1 :1999).

2.2.1.4 Αρίθμηση των εντεροβακτηριοειδών

Χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose agar (LAB M). Ο ενοφθαλμισμός γινόταν με ενσωμάτωση και μετά τη στερεοποίησή του, το υπόστρωμα καλυπτόταν με δεύτερη στιβάδα από το ίδιο υλικό. Μετά από επώαση 24 ωρών σε θερμοκρασία στους 37°C, αριθμούνταν μόνο οι χαρακτηριστικές αποικίες (πορφυρές περιβαλλόμενες από ερυθρωπή ζώνη). Η αρίθμηση γινόταν σύμφωνα με τους κανόνες της ΑΡΗΑ (ISO21528-2: 2004E).

2.2.1.4 Αρίθμηση των εντεροκόκκων

Χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα Kanamycin Aesculin Azide agar (KAA, LAB M, Lancashire, UK). Ο ενοφθαλμισμός γινόταν με την μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης. Μετά από επώαση 24 ωρών σε θερμοκρασία στους 37°C, αριθμούνταν μόνο οι χαρακτηριστικές αποικίες (μαύρες με γκριζωπή ζώνη) (Sirgelidis, 2010)

2.2.1.6 Αναζήτηση – αρίθμηση της *Listeria monocytogenes*

Για την αρίθμηση των Λιστεριών, χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία σύμφωνα με το Ελληνικό Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 11290-2/1998/AM 1:2004.

Η αναζήτηση – απομόνωση γινόταν σύμφωνα με τη μέθοδο που καθορίζει το διεθνές πρότυπο ISO 11290-1: 1996/FDAM 1: 2004 (E).

Συγκεκριμένα, 25g δείγματος αναμιγνύονταν με 225 ml του προεμπλουτιστικού ζωμού Half Fraser (LAB M), ομογενοποιούνταν μέσα πλαστικούς σάκους σε συσκευή Stomacher (Stomacher 400-laboratory blender, Seward Medical, London, UK) για 2 λεπτά και επωάζονταν στους 30°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια ενοφθαλμιζόνταν 100 ml από την κάθε καλλιέργεια Half Fraser στα εκλεκτικά υποστρώματα Agar *Listeria* Ottavani and Agosti (ALOA, Biolife, Milano, Italy) και Oxford agar και οι αποικίες εξετάζονταν μετά από επώαση στους 37°C για 24 και 48 ώρες.

Παράλληλα, μια ποσότητα (0,1 ml) από την κάθε καλλιέργεια με Half Fraser ενοφθαλμιζόταν σε 10 ml εκλεκτικού εμπλουτιστικού ζωμού Fraser και επωάζονταν στους 37°C για 48 ώρες.

Ακολούθως, ενοφθαλμιζόταν 100 ml από την κάθε καλλιέργεια Fraser στα εκλεκτικά υποστρώματα ALOA και Oxford agar και οι αποικίες εξετάζονταν μετά από επώαση στους 37°C για 24 και 48 ώρες.

Τρεις χαρακτηριστικές αποικίες *Listeria* spp. λαμβάνονταν από κάθε στερεό εκλεκτικό υπόστρωμα και καθαροποιούνταν σε Tryptone Soya Yeast Extract agar μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

2.2.1.6 Ταυτοποίηση της *Listeria monocytogenes*

Οι καθαροποιημένες αποικίες των *Listeria* spp. ταυτοποιούνταν με τη χρήση εξειδικευμένων για το γένος εκκινητών (primers) με τη μέθοδο της πολλαπλής αλυσιδωτής αντίδρασης της Πολυμεράσης (multiplex PCR) (Lawrence and Gilmour, 1994).

Χρησιμοποιήθηκαν 3 ζεύγη εκκινητών (primers U1-U2, LI1-U1, LM1-LM2), από τα οποία το πρώτο αναγνωρίζει την ύπαρξη βακτηριακού DNA, το δεύτερο των *Listeria* spp. και το τρίτο της *L. monocytogenes* (Liu, 2008).

Τα αποτελέσματα εκφράζονταν σε λογαρίθμους (\log_{10} cfu/g) (Swanson και συν., 2001).

2.2.2 Φυσικοχημικές αναλύσεις

Οι φυσικοχημικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν ήταν

- Βασική χημική ανάλυση (των αρχικών δειγμάτων)
- Προσδιορισμός του συντελεστή ενεργού ύδατος
- Προσδιορισμός ενεργού οξύτητας (pH)
- Προσδιορισμός των βιογενών αμινών (τυραμίνη, πουτρεσκίνη, καδαβερίνη, ισταμίνη, β-φαινυλο-αιθυλαμίνη, τρυπταμίνη, σπερμιδίνη, σπερμίνη)
- Προσδιορισμός του αριθμού θειοβαρβιτουρικού οξέος

2.2.2.1 Βασική χημική ανάλυση

✓ Προσδιορισμός υγρασίας

Εφαρμόστηκε η έμμεση μέθοδος σύμφωνα με την οποία περίπου 5 g ομογενοποιημένου δείγματος θερμαίνονταν στους 105⁰C με άμμο έως ότου το δείγμα αποκτήσει σταθερό βάρος (AOAC, 2000).

✓ Προσδιορισμός λιπαρών ουσιών

Για τον προσδιορισμό των ολικών λιπαρών ουσιών χρησιμοποιήθηκε ειδική συσκευή εκχυλίσεως (SOXTHERM S-106 Automatic Extraction Unit 810600/811200, Gerhardt) (AOAC, 2000).

Διαδικασία

Ζυγίστηκαν περίπου 3g ομογενοποιημένου δείγματος, αναμίχτηκαν με άμμο και μεταφέρθηκαν σε ειδική φύσιγγα η οποία ήταν τοποθετημένη μέσα σε ένα γυάλινο υποδοχέα. Η εκχύλιση των λιπαρών ουσιών έγινε με ποσότητα πετρελαϊκού αιθέρα (150 ml) σε δύο φάσεις. Κατά την πρώτη φάση η εκχύλιση γινόταν για 40 min ακολουθούσε η συλλογή του αιθέρα για 10 min και στη δεύτερη φάση η εκχύλιση επαναλαμβανόταν για 90 min. Η συλλογή των λιπαρών ουσιών γινόταν στον υποδοχέα, ο οποίος ζυγιζόταν πριν και μετά την εκχύλιση.

✓ Προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών

Για τον προσδιορισμό των ολικών πρωτεϊνών, χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές Kjeldahltherm Digestion Block KB84-KBL85 και Vapodest (Gerhardt).

Διαδικασία

Ο προσδιορισμός έγινε σε δύο φάσεις: Στην πρώτη φάση ζυγιζόταν περίπου 2 g ομογενοποιημένου δείγματος και τοποθετούνταν σε φιάλη Kjeldahl (ειδικός σωλήνας καύσης) μαζί με ταμπλέτα καταλύτη και 25 ml πυκνόθειικό οξύ. Όταν η συσκευή θέρμανσης (Vapodest) έφθανε σε θερμοκρασία 220°C τότε το δείγμα παρέμεινε για 9 min σε αυτήν τη θερμοκρασία και στη συνέχεια αυξάνονταν η θερμοκρασία και όταν έπιανε τους 420°C παρέμεινε για 45 min. Μετά την ολοκλήρωση της καύσης η φιάλη Kjeldahl μεταφερόταν στη συσκευή απόσταξης όπου γινόταν προσθήκη περίπου 175 ml πυκνού διαλύματος καυστικού νατρίου (NaOH) ώστε το διάλυμα στη φιάλη να καταστεί έντονα αλκαλικό. Το απόσταγμα συλλεγόταν σε κωνική φιάλη που περιείχε 100 ml διαλύματος βορικού οξέος 2% και 3-4 σταγόνες δείκτη Tashiro. Μετά το τέλος της απόσταξης ο προσδιορισμός της δεσμευμένης αμμωνίας γινόταν μέσω τιτλοδότησης με πρότυπο διάλυμα θειϊκού οξέος (H₂SO₄) 0.1 N. Η περιεκτικότητα του διαλύματος σε πρωτεΐνες υπολογιζόταν με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Πρωτεΐνες \%} = \frac{\text{καταναλωθέντα ml 0,1 N H}_2\text{SO}_4 \times 0,0014 \times 100 \times 6,25}{\text{Ποσότητα δείγματος σε gr}}$$

✓ Προσδιορισμός της τέφρας

Ο προσδιορισμός της τέφρας γινόταν ύστερα από πλήρη καύση και αποτέφρωση του δείγματος (500 °C) σε αποτεφρωτικό κλίβανο (AOAC, 2000).

2.2.2.2 Προσδιορισμός συντελεστή ενεργού ύδατος

Μικρή ποσότητα δείγματος ομογενοποιούνταν και ακολουθούσε μέτρηση του συντελεστή ενεργού ύδατος σε αυτό (a_w) με την χρήση συσκευής AQUA LAB, Mod. CX-2 (Decagon Devices Inv. Pullman Washington 99163).

2.2.2.3 Προσδιορισμός της ενεργού οξύτητας (pH)

Για τον προσδιορισμό του pH χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό πεχάμετρο (Knid mod, Portames 654). Ποσότητα δείγματος 10 g ομογενοποιούνταν σε ειδική συσκευή (stomacher) για δύο λεπτά με 90ml απεσταγμένο νερό στην συνέχεια παρέμενε για 15min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθούσε μέτρηση του pH με το ηλεκτρόδιο του οργάνου (Ambrosiadis et al., 2004)

2.2.2.4 Προσδιορισμός της μηλονικής διαλδεύδης (MDA) ή αριθμού θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA)

Ο βαθμός οξείδωσης του λίπους των αλλαντικών αέρος εκτιμήθηκε με βάση τη μηλονική διαλδεύδη (MDA) η οποία σχηματίστηκε κατά την διατήρησή τους. Η MDA είναι ένα από τα δευτερογενή προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων που παράγονται κατά την διάσπαση των υδροϋπεροξειδίων. Αυτή, μπορεί να αντιδράσει με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) προς παραγωγή εγχρώμων προϊόντων

τα οποία απορροφούν σε μήκος κύματος 532 nm. Η συγκέντρωση της μπορεί επομένως να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης του βαθμού οξείδωσης ενός δείγματος. Ο προσδιορισμός της MDA έγινε με χρήση μιας εκλεκτικής φασματοφωτομετρικής μεθόδου (Botsoglou et al., 1994).

Αντιδραστήρια

- 1) Τριχλωροξικό οξύ (TCA) (Merck, Germany)
- 2) Βουτυλο-υδροξυ-τολουόλιο (BHT) (Sigma Chemical Co., Germany)
- 3) Εξάνιο
- 4) 2-θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA)(Sigma Chemical Co., Germany)
- 5) 1,1',3,3'-τετρααιθόξυπροπάνιο (Sigma Chemical Co., Germany)

Διαλύματα

1. Υδατικό διάλυμα TCA 5 %
2. Διάλυμα BHT 0,8 % σε εξάνιο
3. Υδατικό διάλυμα TBA 0,8 %
4. Υδατικό διάλυμα MDA 2,39 µg/ml

Διαδικασία

Ένα γραμμάριο ομογενοποιημένου δείγματος αναμίχθηκε με 10 ml υδατικού διαλύματος TCA 5 % και 5 ml διαλύματος BHT 0,8 % σε εξάνιο.

Το μίγμα ομογενοποιήθηκε (Ultraturrax, IKA) για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε για 3 λεπτά στα 3000 g.

Η επάνω στοιβάδα του εξανίου απορρίφθηκε ενώ ποσότητα 2,5 ml από την υδατική (κάτω) στοιβάδα μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα και αναμίχθηκε με 1.5 ml

υδατικού διαλύματος TBA 0,8 %. Το μίγμα επώαστηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 70°C για 30 min.

Μετά την επώαση το μίγμα ψύχθηκε με τρεχούμενο νερό βρύσης και υποβλήθηκε σε τυπική φασματοφωτομετρία χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους διπλής δέσμης (Shimadzu, Model UV-160A, Japan) με κυψελίδα απορρόφησης 1cm στο εύρος των 400-650 nm. Λήφθηκαν φάσματα παραγώγου τρίτης τάξης ($d^3A/d\lambda^3$, όπου A = απορρόφηση και λ = μήκος κύματος) με ψηφιακή παραγοντοποίηση των κανονικών φασμάτων που προέκυψαν με ταχύτητα σάρωσης 480 nm/min ρυθμίζοντας τη διαφορά μήκους κύματος ($\Delta\lambda$) στα 21 nm.

Η συγκέντρωση της MDA (ng/g δείγματος prb) στα εξεταζόμενα δείγματα υπολογίστηκε με βάση το ύψος της κορυφής της παραγώγου τρίτης τάξης στα 521,5 nm χρησιμοποιώντας τα στοιχεία (κλήση καμπύλης και σταθερός παράγοντας) της εξίσωσης που προέκυπτε από την προσαρμογή, με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, της εκάστοτε παρασκευαζόμενης (με χρήση 1, 1', 2, 2'- τετρααιθοξυπροπανίου) καμπύλης αναφοράς.

2.2.2.5 Προσδιορισμός βιογενών αμινών

Ο προσδιορισμός των βιογενών αμινών έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με μετά τη στήλη παραγωγοποίηση με OPA (ορθοφθαλική διαλδεΰδη) και φθορισμομετρικό προσδιορισμό. Η μέθοδος διαχωρισμού η οποία χρησιμοποιήθηκε (Hernández-Jover et al., 1996) στηρίζεται στο σχηματισμό ζευγών ιόντων μεταξύ των βιογενών αμινών που υπάρχουν στο υπό εξέταση δείγμα και του οκτανοσουλφονικού οξέος που υπάρχει στην κινητή φάση του υγρού χρωματογράφου.

Αντιδραστήρια

1. Υπερχλωρικό οξύ (Chemlab, Belgium)
2. Ακετονιτρίλιο (HPLC grade, Merck, Germany)
3. Νερό δισαπεσταγμένο
4. Οξικό νάτριο (Panreac, Spain)
5. Οκτανοσουλφονικό νάτριο (Alltech Associates Inc., USA)
6. Οξικό οξύ (Merck)
6. OPA (specially purified grade, Sigma Chemical Co., Germany)
7. Βορικό οξύ (Merck)
8. Καυστικό κάλιο (Riedel-de Haën, Czech Republic)
9. Βιογενείς αμίνες (Υδροχλωρική τυραμίνη, υδροχλωρική τρυπταμίνη, υδροχλωρική β-φαινυλαιθυλαμίνη, διυδροχλωρική πουτρεσκίνη, διυδροχλωρική καδαβερίνη, διυδροχλωρική ισταμίνη, τριυδροχλωρική σπερμιδίνη, τετραϋδροχλωρική σπερμίνη (Sigma Chemical Co. Germany).

Διαλύματα

1. Διάλυμα HClO_4 , 0.6 M
2. Διάλυμα έκλουσης Α. Διάλυμα 0,1 M άνυδρου οξικού νατρίου και 10 mM οκτανοσουλφονικού νατρίου ρυθμισμένο σε pH 5,2 με την προσθήκη οξικού οξέος.
3. Διαλύτης Β. Διάλυμα 0,2 M άνυδρου οξικού νατρίου και 10 mM οκτανοσουλφονικού νατρίου ρυθμισμένο σε pH 4,5 με την προσθήκη οξικού οξέος
4. Διάλυμα έκλουσης Β. Αποτελείται από διαλύτη Β και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 66: 34 V/V.
5. Διάλυμα παραγωγοποίησης μετά τη στήλη. 31,5g βορικού οξέος και 26,2g υδροξειδίου του καλίου διαλύονται σε 1000 ml δισαπεσταγμένου νερού και στη συνέχεια προστίθενται 3ml 2-μερκαπτοαιθανόλης και 0,2g OPA διαλυμένα σε 5ml μεθανόλης. Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στα 10.5-11 με τη βοήθεια διαλύματος 30% KOH. Η παρασκευή του διαλύματος παραγωγοποίησης γίνεται την ίδια μέρα που θα χρησιμοποιηθεί και αυτό προστατεύεται από το φως.

Προετοιμασία των δειγμάτων

Ποσότητα ομογενοποιημένου δείγματος (5g) εκχυλίζεται για 10 λεπτά με διάλυμα 0,6 M HClO₄ με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του μίγματος (12.000 rpm για 10 λεπτά), διήθηση και συλλογή του υπερκείμενου υγρού σε ογκομετρική φιάλη 50 ml. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για άλλες δύο φορές και η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται με νερό ως τη χαραγή. (Hernández-Jover et al., 1996). Ποσότητα του εκχυλίσματος περνιέται μέσα από μία σύριγγα με φίλτρο 0,20 μm (Grace, Deerfield, IL) και στη συνέχεια υποβάλλεται σε ανάλυση με τον υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης (HPLC).

Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης

Χρησιμοποιήθηκε υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (HPLC) της εταιρείας Shimadzu (Shimadzu Corporation, Japan) εξοπλισμένος με αντλία υψηλής πίεσης, μονάδα βαθμωτής έκλουσης, απαερωτή, κλίβανο στήλης ρυθμισμένο στους 35 °C, βαλβίδα έγχυσης δείγματος Reodyne 7125 όγκου 20μl και φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Shimadzu) ρυθμισμένος στα 340_{ex}/445_{em}. Μεταξύ της εξόδου της στήλης και του ανιχνευτή ήταν τοποθετημένη η μονάδα παραγωγοποίησης μετά τη στήλη. Αυτή αποτελούνταν από μια δεύτερη αντλία υψηλής πίεσης (Shimadzu) και έναν μετά τη στήλη αντιδραστήρα (Pickering Laboratories, USA) εξοπλισμένο με σπείρα αντίδρασης 0.15 ml και ρυθμισμένο στους 35 °C ο οποίος συνδέονταν με τον ανιχνευτή. Ο διαχωρισμός των βιογενών αμινών πραγματοποιούνταν σε στήλη Discovery C₁₈ (Supelco, USA) διαστάσεων.250 x 4.6 mm I.D.(5 μm particle size).

Η κινητή φάση αποτελούνταν από το διάλυμα έκλουσης A και το διάλυμα έκλουσης B. Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ως εξής: Χρόνος = 0 min: 80% διάλυμα έκλουσης A, 20% διάλυμα έκλουσης B. Χρόνος = 50min: 20% διάλυμα έκλουσης A, 80% διάλυμα έκλουσης B. Χρόνος = 55 min: 20% διάλυμα έκλουσης A, 80% διάλυμα έκλουσης B. Χρόνος = 57 min 80% διάλυμα έκλουσης A, 20% διάλυμα έκλουσης B. Χρόνος = 67 min 80% διάλυμα έκλουσης A, 20% διάλυμα έκλουσης B. Η αύξηση του ποσοστού του διαλύματος έκλουσης B ήταν

σύμφωνα με εκθετική συνάρτηση δεύτερης τάξης. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 1 mL/min ενώ η ταχύτητα ροής του μετά τη στήλη αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης ήταν 0.5 mL / min (Hernández-Jover et al., 1996).

Οι βιογενείς αμίνες ταυτοποιούνταν βάσει των χρόνων κατακράτησης σε σύγκριση με πρότυπες ουσίες. Η ποσοτικοποίηση της τυραμίνης, πουτρεσκίνης, καδαβερίνης, ισταμίνης, β-φαινυλ-αιθυλαμίνης, τρυπταμίνης, σπερμιδίνης και σπερμίνης στα διάφορα δείγματα πραγματοποιούνταν με αναφορά σε καμπύλες βαθμονόμησης οι οποίες χαράσσονταν χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης των αντίστοιχων ενώσεων.

Η λήψη και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με λογισμικό της εταιρίας Shimadzu (LCsolution Release 1.22 SP1) .

2.2.3 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε χρησιμοποιώντας τις αναλυτικές μεθόδους του Statistica 8.0 και MINITAB 16.0 Windows 7

2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

3.1 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΞΕΤΑΣΕΙΣ

Στον **Πίνακα 5** δίνονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών εξετάσεων τα οποία προέκυψαν από την εξέταση των αλλαντικών Λευκάδας και του Τύπου Ουγγαρίας


Πίνακας 5. Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των μικροβιακών πληθυσμών στα δείγματα αλλαντικών Λευκάδας και Τύπου Ουγγαρίας κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

(log cfu/g).

Οξύγαλακτικά

 Λευκάδας

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	8,118	0,392	8,118	0,392	8,118	0,392
30	8,214	0,633	8,333	0,272	8,25	0,334
60	8,522	0,235	8,502	0,113	8,56	0,355
90	8,325	0,410	8,354	0,362	8,471	0,459
120	7,731	0,584	7,830	0,546	7,712	0,938

 Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	7,677	0,104	7,677	0,0853	7,677	0,104
30	8,039	0,343	8,056	0,6137	8,468	1,004
60	8,277	0,854	8,418	4,849	8,522	0,657
90	8,224	0,310	8,134	0,226	8,737	0,180
120	7,742	0,831	7,464	0,398	7,630	1,219

Μικρόκοκκοι – Σταφυλόκοκκοι

✚ Λευκάδα

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	5,911	0,319	5,911	0,319	5,911	0,319
30	5,659	0,404	5,600	0,131	5,576	0,057
60	5,451	0,227	5,148	0,697	5,514	0,491
90	5,074	0,245	5,315	0,352	5,813	0,131
120	5,383	0,323	5,596	0,351	5,782	0,070

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	6,154	0,204	6,154	0,204	6,154	0,204
30	6,103	0,203	6,129	0,175	6,286	0,304
60	6,234	0,206	6,389	0,137	6,897	0,676
90	6,052	0,156	6,762	0,114	6,956	0,176
120	5,828	0,176	5,714	0,223	5,710	0,918

Σταφυλόκοκκοι θετική στην πηκτάση (S. aureus)

✚ Λευκάδα

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	5,221	0,247	5,221	0,247	5,221	0,247
120	5,264	0,338	5,12	0,155	5,178	0,938

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	5,56	0,394	5,56	0,394	5,56	0,394
120	5,82	0,197	5,65	0,174	5,70	0,912

Εντεροβακτηριοειδή

✚ Λευκάδας

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	2,322	0,352	2,322	0,352	2,322	0,352
30	1,014	0,433	0,958	0,355	1	0
60	0,897	0,227	0,899	0,104	0,694	0
90	0,868	0,227	0,9	0,272	<1	0
120	<1	0	<1	0	<1	0

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	<1	0	<1	0	<1	0
30	<1	0	<1	0	<1	0
60	<1	0	<1	0	<1	0
90	<1	0	<1	0	<1	0
120	<1	0	<1	0	<1	0

Ζύμες – Μύκητες

✚ Λευκάδας

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	5,364	0,653	5,364	0,653	5,364	0,653
30	3,757	0,464	3,370	0,351	3,665	0,166
60	3,807	0,356	3,336	0,356	3,964	0,342
90	2,376	0,260	2,767	0,084	2,388	0,099
120	2,062	0,535	2,280	0,787	2,962	0,298

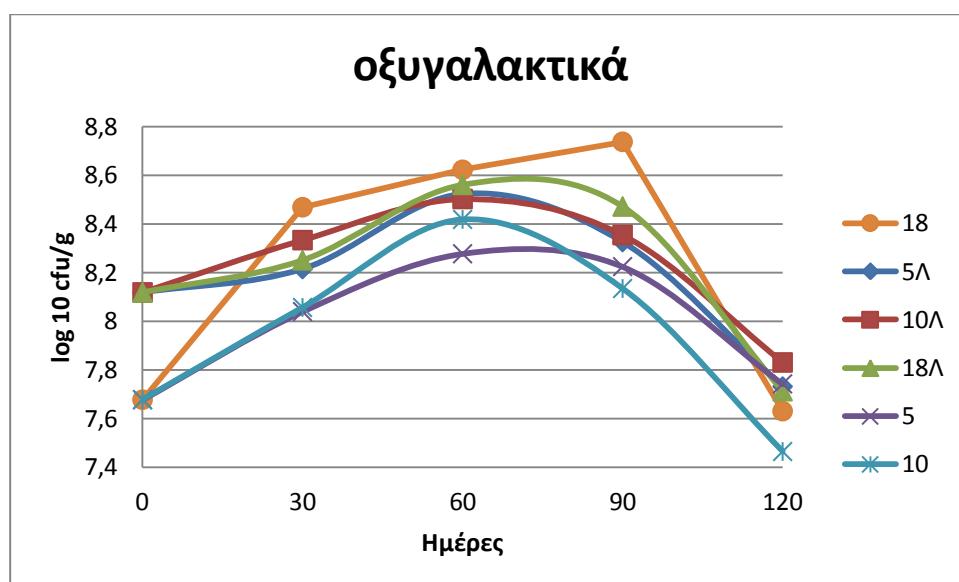
✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	3,667	0,599	3,667	0,599	3,667	0,694
30	3,736	0,770	3,966	0,807	3,431	0,607
60	3,337	0,252	3,791	0,713	3,991	0,458
90	2,937	0,103	2,415	0,001	2,661	0,081
120	2,194	0,247	2,764	0,494	2,866	0,030

3.1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τη σημαντικότερη μικροχλωρίδα, των αλλαντικών αέρος, στο τέλος του σταδίου της ωρίμανσης οι πλυθοισμοί τους βρέθηκαν να είναι υψηλοί τόσο στα παραδοσιακά όσο και στα βιομηχανοποιημένα αλλαντικά (Lebert et al., 2007).

Στο γράφημα 1 φαίνεται η μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε συνάρτηση με τον χρόνο (μετά το τέλος της ωρίμανσης και μέχρι την ημερομηνία λήξης) και τις θερμοκρασίες (συντήρησης) στα παραδοσιακά και στα βιομηχανοποιημένα αλλαντικά.

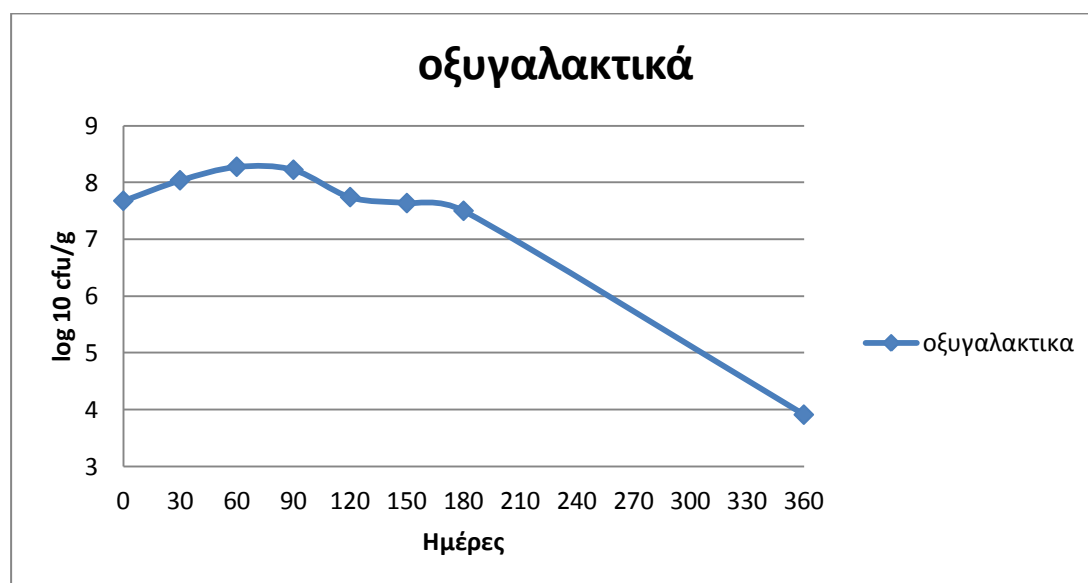


Γράφημα 1: Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά σε διάστημα 120 ημερών
5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια τόσο στο βιομηχανοποιημένο όσο και στο παραδοσιακό αλλαντικό, είχαν περίπου τον ίδιο πληθυσμό μετά το τέλος της ωρίμανσης (όταν το προϊόν ήταν έτοιμο προς κατανάλωση) και παρουσίασαν την ίδια συμπεριφορά κατά την συντήρηση, δηλαδή αυξήθηκαν με πολύ αργό ρυθμό ως μια μέγιστη τιμή και ύστερα μειώθηκαν. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 2, οι πληθυσμοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την ημέρα μηδέν στα αλλαντικά της

Λευκάδας ήταν $8,118 \pm 0,392 \log \text{ cfu/g}$, ενώ για τύπου Ουγγαρίας ήταν $7,677 \pm 0,104 \log \text{ cfu/g}$. Κατά την διάρκεια της συντήρησης και μέχρι την 60^η ημέρα, τα αλλαντικά της Λευκάδας, παρουσίασαν αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης (στην θερμοκρασία συντήρησης 5 °C αυξήθηκαν κατά 0,404 log cfu/g, στους 10 °C κατά 0,384 log cfu/g και στους 18 °C 0,442 log cfu/g). Στα τύπου Ουγγαρίας, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών παρουσίασε αύξηση ως την 60^η ημέρα για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 5 °C και 10°C (κατά 0,6 log cfu/g και 0,741 log cfu/g αντίστοιχα) και ως την 90^η ημέρα για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 18°C (κατά 1,06 log cfu/g). Στην συνέχεια, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών άρχισε να μειώνεται σταδιακά σε όλα τα δείγματα και των δύο τύπων ως τις 120 ημέρες (ημερομηνία λήξης για τα αλλαντικά της Λευκάδας και αλλοίωσης των αλλαντικών τύπου Ουγγαρίας που συντηρήθηκαν στους 10° και 18°C), οπότε έφθασε λίγο χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα της μηδενικής ημέρας.

Στο γράφημα 2, παρουσιάζεται η μεταβολή των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά την συντήρηση του σαλαμιού τύπου Ουγγαρίας για 1 χρόνο στους 5 °C. Ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών ύστερα από τις 120 ημέρες συντήρησης παρουσιάζει συνεχή μείωση η οποία φτάνει περίπου της τάξης των 4 log cfu/g. Η μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού παρατηρήθηκε στο διάστημα από τις 120 ημέρες στις 150 (περίπου 1,5 log).

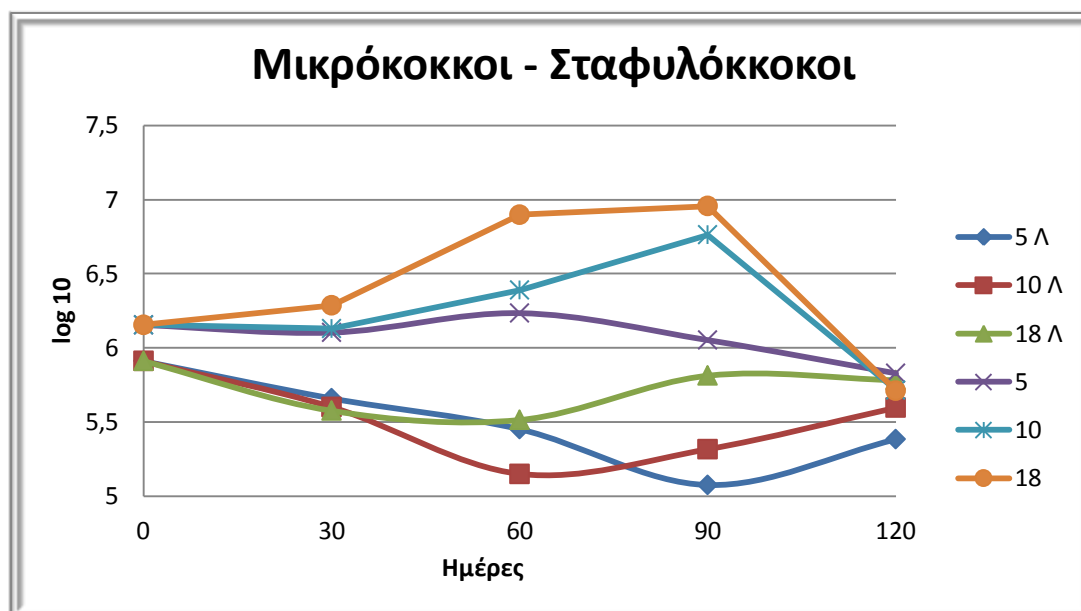


Γράφημα 2 : Μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας στους 5° C για 365 ημέρες

Τα αποτελέσματά μας, που αφορούν στην μεταβολή του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε συνάρτηση με τον χρόνο συντήρησής τους, συμπίπτουν και με τα αποτελέσματα των πειραμάτων των T. Komprda et al. (2009), που δείχνουν μικρή αύξηση του πληθυσμού και στην συνέχεια μείωση του, όταν το αλλαντικό συντηρήθηκε για περίπου τρεις μήνες μετά το τέλος της ωρίμανσης του.

3.1.2 Μικρόκοκκοι - Σταφυλόκοκκοι

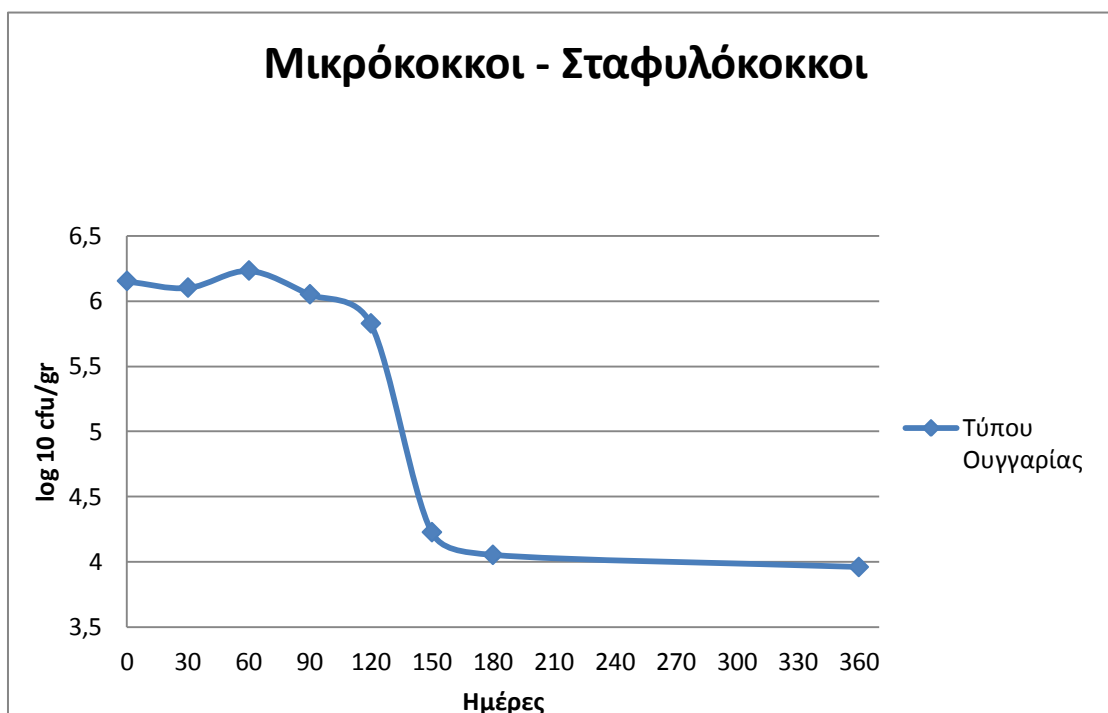
Στα παραδοσιακά αλλαντικά οι σταφυλόκοκκοι και οι μικρόκοκκοι (GCC+) αποτελούν την δεύτερη κύρια μικροχλωρίδα των αλλαντικών στο τέλος της ωρίμανσης. Στην πλειοψηφία των αλλαντικών τα GCC+ έχουν έναν πληθυσμό περίπου 6-8 log cfu/g, ο πληθυσμός τους είναι γενικά χαμηλότερα από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ο πληθυσμός των μικρόκοκκων και σταφυλόκοκκων και στα παραδοσιακά αλλά και στα βιομηχανοποιημένα αλλαντικά βρέθηκαν να είναι περίπου στα ίδια επίπεδα. (Lebert et al 2007).



Γράφημα 3: Μεταβολή του πληθυσμού των Μικρόκοκκων – Σταφυλόκοκκων στα αλλαντικά σε διάστημα 120 ημερών

5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18° αντίστοιχα
5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18° C αντίστοιχα

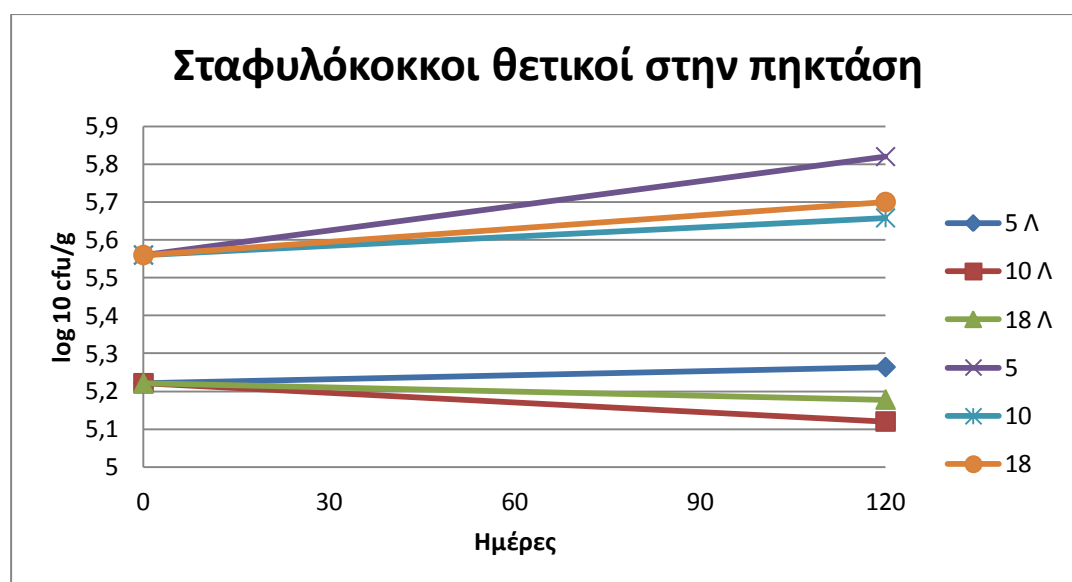
Όπως φαίνεται στο γράφημα 3 οι πληθυσμοί των μικρόκοκκων και σταφυλόκοκκων τόσο στο βιομηχανοποιημένο όσο και στο παραδοσιακό αλλαντικό ήταν περίπου ίδιοι (6 log cfu/g). Οι διαφορές των πληθυσμών των μικροοργανισμών μεταξύ των τριών θερμοκρασιών συντήρησης δεν ήταν πολύ μεγάλες και για τα δύο αλλαντικά. Γενικά στους 18 °C είχαμε λίγο μεγαλύτερους πληθυσμούς μικρόκοκκων – σταφυλόκοκκων και αυτό είναι αναμενόμενο καθώς οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι μεσόφιλοι. Έτσι εξηγείται και γιατί στους 5 °C ο πληθυσμός τους παρέμεινε σχεδόν σταθερός. Στα αλλαντικά του τύπου Ουγγαρίας παρατηρήθηκε μια ελαφριά μείωση από τις 90 στις 120 ημέρες (στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10° και 18°C). Η μεγαλύτερη μείωση στον πληθυσμό των μικρόκοκκων – σταφυλόκοκκων στα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας, παρατηρήθηκε στα δείγματα που διατηρήθηκαν στους 5 °C για ένα χρόνο από τις 120 ημέρες στις 150 (γράφημα 4). Μέσα σε 30 ημέρες ο πληθυσμός μειώθηκε κατά 2 log cfu/g όπως φαίνεται στο παρακάτω γράφημα και ύστερα σταθεροποιείται.



Γράφημα 4: Μεταβολή του πληθυσμού των Σταφυλόκοκκων – Μικρόκοκκων στα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας στους 5° C για 365 ημέρες

Οι μετρήσεις για τους θετικούς στην πηκτάση σταφυλόκοκκούς (*S. aureus*) έγιναν την ημέρα που το προϊόν ήταν έτοιμο προς κατανάλωση, δηλ μετά το τέλος της ωρίμανσης (ημέρα 0) και την 120 ημέρα ημερομηνία λήξης για τα αλλαντικά της Λευκάδας και αλλοίωσης των αλλαντικών τύπου Ουγγαρίας που συντηρήθηκαν στους 10° και 18 °C.

Οι θετικοί στην πηκτάση σταφυλόκοκκοι (*S. aureus*) δεν παρουσίαζε σημαντικές μεταβολές στον πληθυσμό του, όπως φαίνεται και από το παρακάτω γράφημα. Σε διάστημα 120 ημερών ο πληθυσμός τους ήταν σχεδόν σταθερός και για τα δύο είδη αλλαντικών. Η θερμοκρασία και ο χρόνος δεν φαίνεται να επηρέασε τον πληθυσμό τους.

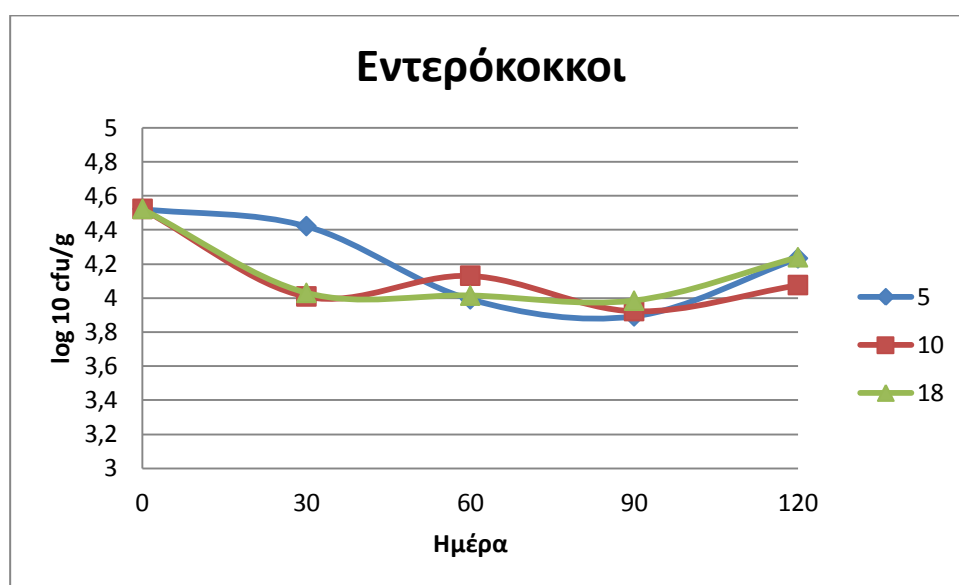


Γράφημα 5: Μεταβολή των Σταφυλόκοκκων – Μικρόκοκκων στα αλλαντικά σε διάστημα 120 ημερών 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

3.1.3 Εντερόκοκκοι

Στα αλλαντικά αέρος οι εντερόκοκκοι έχουν ένα αρχικό πληθυσμό μεταξύ 2 και 4 log cfu/g. Συνήθως αυξάνονται κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και παραμένουν σταθεροί σε επίπεδα λογαρίθμου 4-6 μέχρι το τέλος της διαδικασίας (Comi et al., 2005; Drosinos et al. 2005; Rebecchi et al. 1998).

Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο στα αλλαντικά της Λευκάδας καταμετρήθηκαν εντεροκόκκοι ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στα αλλαντικά του τύπου Ουγγαρίας. Στο παρακάτω γράφημα 6 φαίνεται ότι όταν το προϊόν ήταν έτοιμο προς κατανάλωση (ημέρα 0) ο πληθυσμός των εντεροκόκκων ήταν περίπου 4,5 log cfu/g. Στα δείγματα που διατηρήθηκαν και στις τρεις θερμοκρασίες, ο πληθυσμός τους ήταν σχεδόν σταθερός μέχρι την ημερομηνία λήξης.

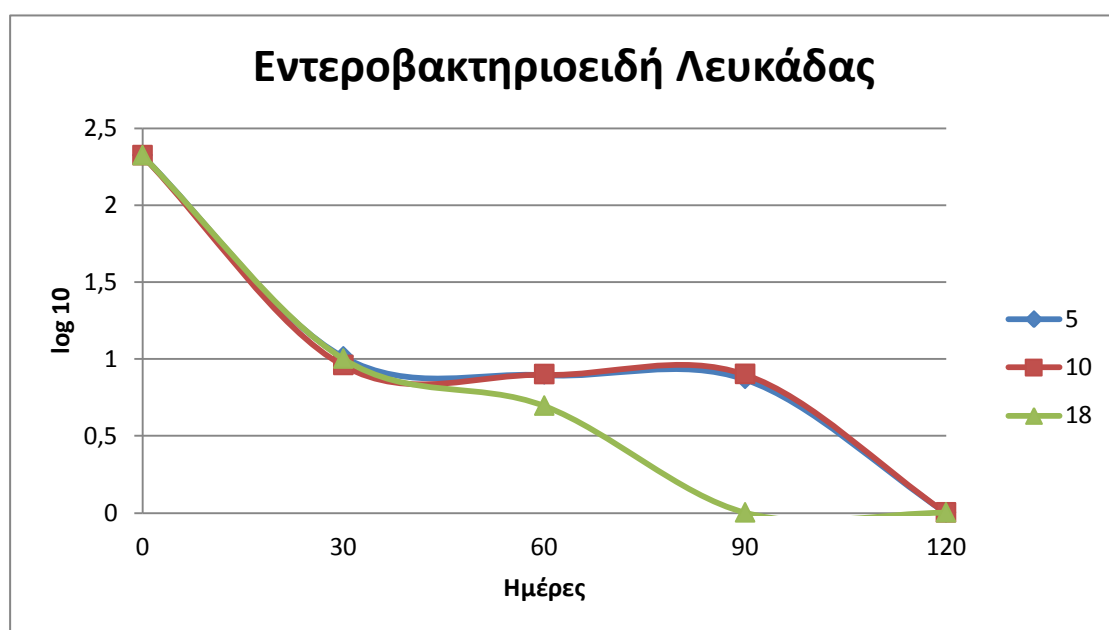


Γράφημα 6: Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροκόκκων στα αλλαντικά σε διάστημα 120 ημερών
5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Τα αποτελέσματά μας, συμπίπτουν και με τα αποτελέσματα των πειραμάτων από τους Komprda et al. (2009), που δείχνουν επίσης σχεδόν σταθερό τον πληθυσμό των εντεροκόκκων, όταν το αλλαντικό συντηρήθηκε για περίπου τρεις μήνες μετά την ωρίμανση.

3.1.4 Εντεροβακτηριοειδή

Εντεροβακτηριοειδή καταμετρήθηκαν μόνο στα παραδοσιακά αλλαντικά της Λευκάδας, τα οποία αποθηκεύονται σε φυσικές θήκες ενώ δεν ανιχνεύθηκαν στα αλλαντικά του Τύπου Ουγγαρίας. Από το γράφημα 7 φαίνεται ότι είχαν φθίνουσα πορεία κατά την διάρκεια της συντήρησης και στο τέλος δεν ανιχνεύθηκαν. Ακόμα παρατηρείται ότι οι καμπύλες των προϊόντων που διατηρήθηκαν στους 5° και 10 °C σχεδόν ταυτίζονται και μηδενίζονται στις 120 ημέρες (αρχικός πληθυσμός 2,322 log cfu/g και τελικός στις 120 ημέρες 0). Στα αλλαντικά που διατηρήθηκαν στους 18°C τα εντεροβακτηριοειδή δεν ανιχνεύθηκαν ύστερα από 90 ημέρες (αρχικός πληθυσμός 2,322 log cfu/g και τελικός στις 90 ημέρες 0). Η μείωση των εντεροβακτηριοειδών θα πρέπει να αποδοθεί στην δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

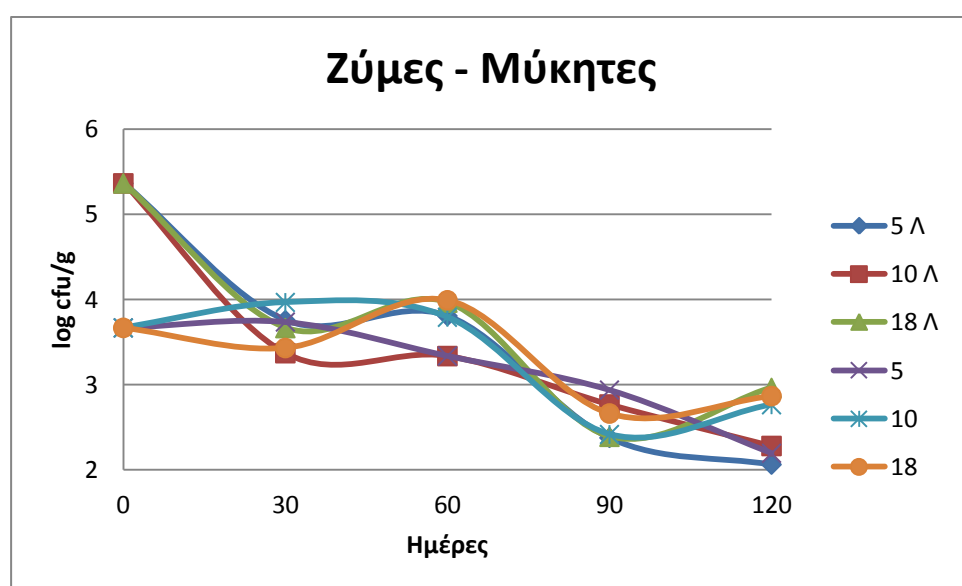


Γράφημα 7: Μεταβολή του πληθυσμού των Εντεροβακτηριοειδών στα αλλαντικά Λευκάδας σε διάστημα 120 ημερών
5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Η εντονότερη μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών σε υψηλότερη θερμοκρασία (18°C), επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα των Bover-Cid et al., (2001d), οι οποίοι επίσης βρήκαν μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού των εντεροβακτηριοειδών στην υψηλότερη θερμοκρασία, όταν το αλλαντικό συντηρήθηκε για περίπου είκοσι ημέρες μετά το στάδιο της ωρίμανσης του σε θερμοκρασίες 4 °C και 19°C.

3.1.5 Ζύμες - Μύκητες

Στα αλλαντικά της Λευκάδας του Τύπου Ουγγαρίας ο αρχικός πληθυσμός των ζυμών και μυκήτων ήταν 5,354 log cfu/g και 3,667 log cfu/g αντίστοιχα. Φαίνεται μια διαφορά της τάξεως των δύο λογαρίθμων ανάμεσα στα παραδοσιακά και βιομηχανοποιημένα αλλαντικά. Γενικά οι ζύμες και οι μύκητες έχουν μια φθίνουσα πορεία και αυτό φαίνεται ακόμα καλύτερα στα αλλαντικά του Τύπου Ουγγαρίας που διατηρήθηκαν για ένα χρόνο στους 5°C.



Γράφημα 8: Μεταβολή των Ζυμών και Μυκήτων στα αλλαντικά σε διάστημα 120 ημερών
5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Για τα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας που διατηρήθηκαν στους 5 °C για ένα χρόνο (γράφημα 9) βλέπουμε ότι οι ζύμες και οι μύκητες δεν ανιχνεύονται σε 150 ημέρες μετά την ωρίμανση τους (μείωση κατά 3,6 log). Ο χρόνος συντήρησης ήταν ένας σημαντικός παράγοντας για τα δείγματα που διατηρήθηκαν στους 5°C για έναν χρόνο.



Γράφημα 9: Μεταβολή των Ζυμών και Μυκήτων στα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας σε διάστημα 360 ημερών

3.1.6 Λιστέρια

Η *L.monocytogenes* είναι δυνατόν να ανιχνεύονται στα αρχικά στάδια της ωρίμανσης των αλλαντικών, αλλά στην συνέχεια ο πληθυσμός τους μειώνεται ή δεν είναι ανιχνεύσιμη μετά το τέλος της ωρίμανσης στα ελληνικά αλλαντικά (Drosinos et al. 2005 Samelis et al. 1998). Η τιμή που ορίζεται είναι 100cfu/g σύμφωνα με την νομοθεσία, ως κριτήριο ασφαλείας για τα τρόφιμα (Ε.Κ. 2073/2005 και Ε.Κ. 1441/2007).

Η αναζήτηση των *Listeria spp* και *L. monocytogenes* γινόταν στα δείγματα των αλλαντικών την 0^η ημέρα και την 120^η ημέρα. Με την διαδικασία της αριθμησης (σύμφωνα με το Ελληνικό Πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 11290-2/1998/AM 1:2004) δεν ανιχνεύθηκε *Listeria spp* και *L. monocytogenes* σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν. Μετά όμως την διαδικασία του εμπλουτισμού σύμφωνα με την ISO 11290-1: 1996/FDAM 1: 2004 ανιχνεύθηκε *Listeria spp* και *L. monocytogenes* στα αλλαντικά της Λευκάδας ενώ δεν ανιχνεύθηκε στα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας. Η ταυτοποίηση των λιστεριών έγινε με multiplex – PCR. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε δύο διαφορετικά δείγματα 0^{ης} ημέρας και σε ένα δείγμα που συντηρήθηκε στους

10°C για 120 ημέρες ανιχνεύθηκε *L. monocytogenes* και σε ένα άλλο δείγμα 0^{ης} ημέρας ανιχνεύθηκε *Listeria* spp. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα η multiplex – PCR έδειξε βακτηριακό DNA.



Εικόνα 8. Απεικόνιση της ταυτοποίησης χαρακτηριστικών αποικιών της *L. monocytogenes* σε δείγματα καβουρμά, με τη μέθοδο multiplex PCR.

3.2 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

3.2.1 Βασική χημική ανάλυση

Η βασική χημική ανάλυση των δειγμάτων έγινε όταν τα προϊόντα ήταν έτοιμα προς κατανάλωση. Δηλαδή την ημέρα μηδέν για το πείραμα. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 6 Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των φυσικοχημικών παραμέτρων των αλλαντικών αέρος

Υγρασία	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
Λευκάδας	45,99	±2,12
Τύπου Ουγγαρίας	30,82	±2,04

Πρωτεΐνες	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
Λευκάδας	28,04	±0,79
Τύπου Ουγγαρίας	22,60	±1,57

Λίπος	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
Λευκάδας	18,99	±3,30
Τύπου Ουγγαρίας	36,30	±3,74

Τέφρα	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
Λευκάδας	3,70	±0,16
Τύπου Ουγγαρίας	3,37	±0,26

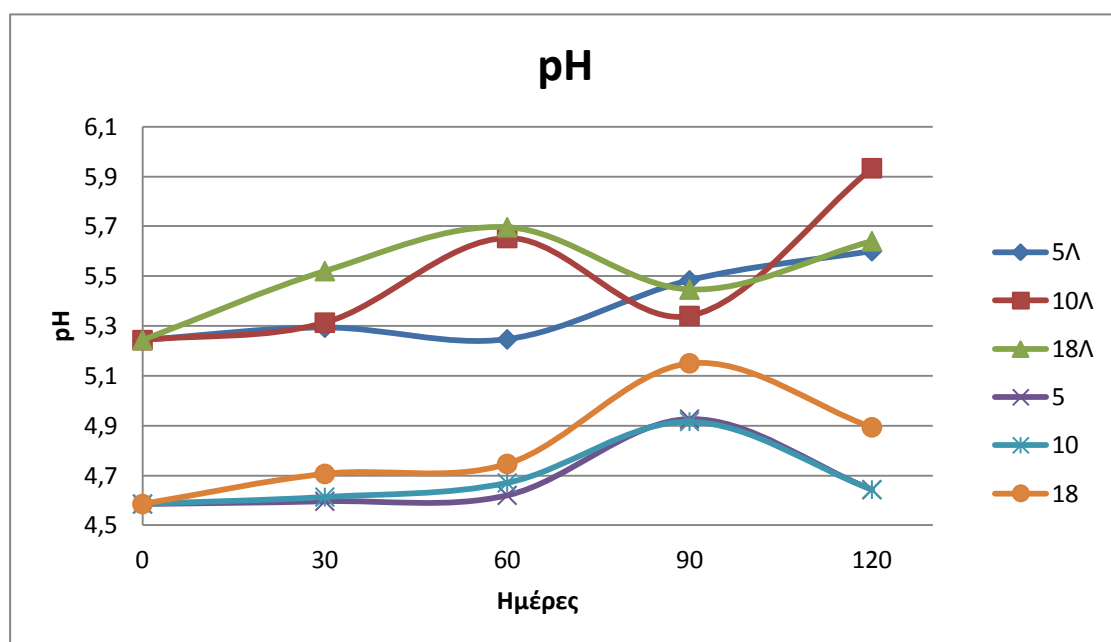
Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα, υπάρχουν κάποιες διαφορές μεταξύ των δύο προϊόντων. Τα παραδοσιακά αλλαντικά της Λευκάδας έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (28,029%) και λιγότερη λιποπεριεκτικότητα (18,989%). Αντίθετα τα αλλαντικά του τύπου Ουγγαρίας έχουν λιγότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (22,599%) και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος (36,302%). Αυτό οφείλεται στην διαφορετική σύνθεση της κρεατόμαζας. Δηλαδή για τη σύνθεση των δύο αλλαντικών μπορεί να χρησιμοποιείται κρέας από διαφορετικά μέρη του ζώου αλλά και η αναλογία λίπος/κρέας φαίνεται να είναι διαφορετική

3.2.2 pH

Καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης παράλληλα με τις μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις γινόταν και μετρήσεις του pH. Οι Miguélez-Arrizado et al. (2006), βρήκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιογενών αμινών σε σαλάμια με χαμηλότερη τιμή pH από ότι σε άλλα με υψηλότερη γιατί στα πρώτα η ζύμωση είναι πιο έντονη και παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες βιογενών αμινών. Επίσης, οι Komprda et al., (2009) παρατήρησαν σε κάποια σαλάμια ότι υψηλότεροι πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων αντιστοιχούσαν κατά παράδοξο τρόπο σε υψηλότερες τιμές pH κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και στη δική μας εργασία για το σαλάμι Λευκάδας (Πίνακας 5 κεφαλαίου 3.1)

Οι τιμές του pH και των δύο σαλαμιών παρουσίασαν αυξητική τάση λόγω συσσώρευσης σε αυτά διαφόρων αμινικών ενώσεων κατά τη διάρκεια της συντήρησης τους (Bover-Cid et al., 2001d). Όπως φαίνεται από το παρακάτω γράφημα 10 το είδος του αλλαντικού έπαιξε σημαντικό ρόλο στην τιμή του pH. ($p < 0,0001$). Τα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας είχαν χαμηλότερες τιμές pH καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις τρεις θερμοκρασίες σε σχέση με τα αλλαντικά της Λευκάδας. Η αρχική τιμή του pH για τα αλλαντικά Λευκάδας ήταν 5,243 ενώ για τα τύπου Ουγγαρίας 4,585. Στα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας οι τιμές του pH κατά τη συντήρηση στους 5 °C και 10°C σχεδόν ταυτίζονταν ενώ στους 18°C παρουσίαζαν μεγαλύτερη αύξηση σε σχέση με τις δύο άλλες θερμοκρασίες συντήρησης. Η αύξηση του pH μέσα σε 120 ημέρες ήταν κατά 0,058 στους 5 °C και στους 10 °C ενώ στους 18 °C κατά 0,308. Στα αλλαντικά Λευκάδας την μεγαλύτερη αύξηση παρουσίασε το δείγμα που συντηρήθηκε στους 10 °C. Η μεταβολή του pH μέσα σε 120 ημέρες για

τους 5 °C, 10 °C και 18 °C ήταν κατά 0,357, 0,69 και 0,397 αντίστοιχα. Πιθανόν, οι διαφορετικές τιμές του pH που δημιούργησαν τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αλλαντικών ($p < 0,05$) να οφείλονται στη διαφορετική σύνθεση της μικροχλωρίδας των αλλαντικών με αποτέλεσμα να παράγονται ίδια ή διαφορετικά οξέα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.



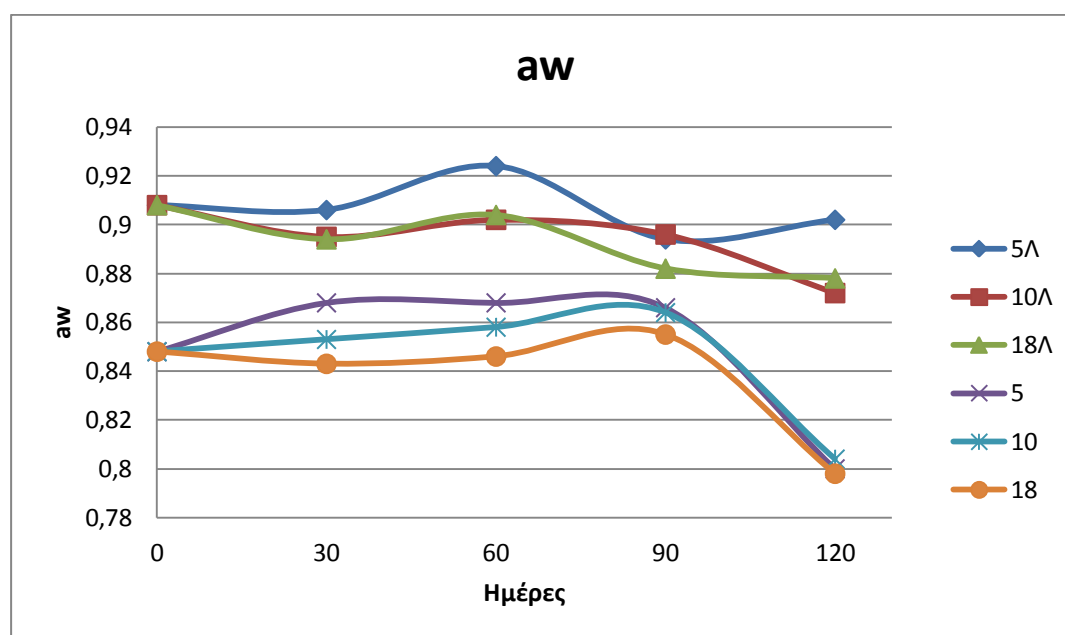
Γράφημα 10 : Μεταβολή του pH στα αλλαντικά σε διάστημα 120 ημερών
5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

3.2.3 Συντελεστής ενεργού νερού (a_w)

Καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης και ταυτόχρονα με τις μικροβιολογικές και χημικές αναλύσεις γινόταν και μετρήσεις της a_w . Οι τιμές της οποίας παρουσίασαν σταδιακή μείωση.

Όπως φαίνεται από το γράφημα 11 το είδος του αλλαντικού έπαιξε σημαντικό ρόλο ($p < 0,0001$) στην τιμή του συντελεστή ενεργού ύδατος. Τα αλλαντικά Λευκάδας είχαν υψηλότερες τιμές a_w καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης και στις τρεις θερμοκρασίες σε σχέση με τα τύπου Ουγγαρίας τα οποία περιείχαν περισσότερο λίπος και επομένως λιγότερη υγρασία. Η αρχική τιμή της a_w στα αλλαντικά της

Λευκάδας ήταν 0,908 ενώ στα τύπου Ουγγαρίας 0,848. Από το Γράφημα παρατηρούμε ότι η πτώση της a_w στα αλλαντικά Λευκάδας ήταν μικρότερη από ότι στα τύπου Ουγγαρίας. Η μεγαλύτερη μείωση στα τύπου Ουγγαρίας συνέβη από τις 90 μέχρι τις 120 ημέρες (η διαφορά από την αρχική τιμή ήταν κατά 0,066, 0,060 και 0,057 για τους για τους 5 °C, 10 °C και 18 °C αντίστοιχα).



Γράφημα 11 : Μεταβολή της a_w στα αλλαντικά σε διάστημα 120 ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

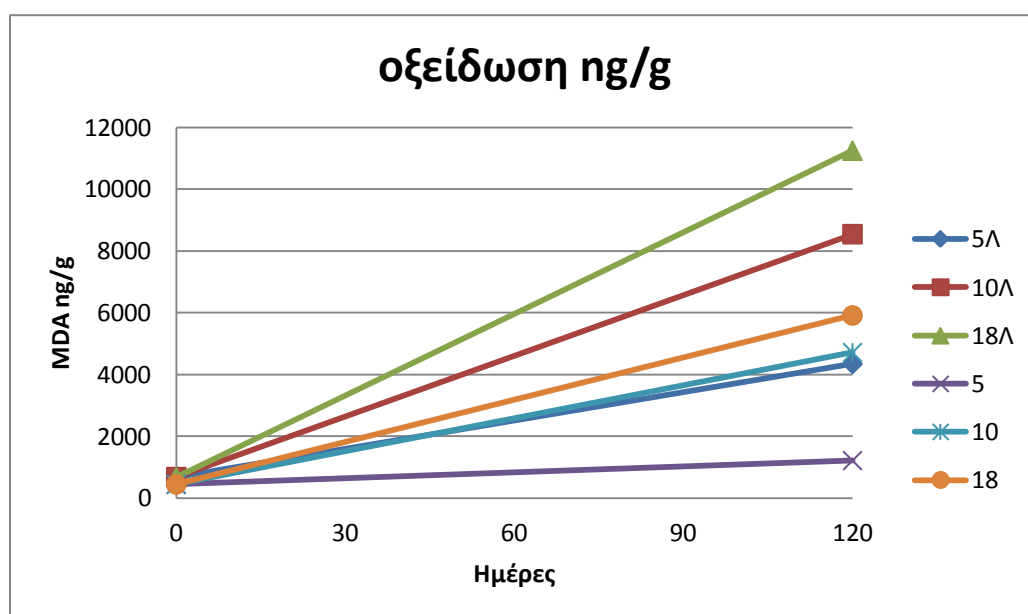
3.2.4 Οξείδωση

Οι μετρήσεις για την οξείδωση έγιναν την ημέρα που το προϊόν ήταν έτοιμο προς κατανάλωση, δηλ μετά το τέλος της ωρίμανσης (ημέρα 0) και την 120^η ημέρα ημερομηνία λήξης για τα αλλαντικά της Λευκάδας και αλλοίωσης των αλλαντικών τύπου Ουγγαρίας που συντηρήθηκαν στους 10° και 18 °C. Οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις της MDA (μηλονική διαλδεύδη) δη φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7 Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις της MDA σε ng / g των αλλαντικών αέρος

ΗΜΕΡΕΣ	ΛΕΥΚΑΔΑΣ			ΤΥΠΟΥ ΟΥΓΓΑΡΙΑΣ		
	5°	10°	18°	5°	10°	18°
0	678 ±27,84	678±27,84	678±27,84	441±25,76	441±25,76	441±25,76
120	4342 ± 48,92	8544± 59,98	11246±78,76	1213±40,56	4713±56,5	5913±73,3

Στο γράφημα 12 φαίνεται η αύξηση της συγκέντρωσης της MDA με το πέρασμα του χρόνου. Τόσο στα βιομηχανοποιημένα όσο και στο παραδοσιακά αλλαντικά παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης της MDA και επομένως και της οξείδωσης όταν τα προϊόντα συντηρούνται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες.



Γράφημα 12: Μεταβολή της συγκέντρωσης της μηλονικής διαλδεϋδης ng/g μέσα σε χρονικό διάστημα 120

ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

3.2.5. Βιογενείς αμίνες

Οι μεταβολές της συγκέντρωσης των βιογενών αμινών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του σαλαμιού αέρος εξαρτήθηκαν από το χρόνο και την θερμοκρασία συντήρησης, το είδος του σαλαμιού (παραδοσιακό ή βιομηχανικό) και το είδος της αμίνης.

Στον **Πίνακα 8** δίνονται τα αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των βιογενών αμινών τα οποία προέκυψαν από την εξέταση των αλλαντικών Λευκάδας και Τύπου Ουγγαρίας

Πίνακας 8. Μέσοι όροι και τυπικές αποκλίσεις των συγκεντρώσεων των βιογενών αμινών αλλαντικών Λευκάδας και Τύπου Ουγγαρίας

Τυραμίνη

🇬🇷 Λευκάδας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	150,32	10,83	150,32	10,83	150,32	10,83
30	180,05	22,66	213,98	50,61	261,13	11,81
60	196,80	15,95	220,77	30,11	314,21	34,57
90	190,04	22,98	230,34	7,75	353,52	43,57
120	221,81	37,29	256,51	0,22	421,63	133,02

🇬🇷 Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	169,19	9,57	169,19	9,57	169,19	9,57
30	180,86	23,26	192,35	20,53	274,39	41,33
60	193,30	27,08	215,16	22,34	313,94	40,83
90	188,93	19,33	208,80	20,16	362,64	73,80
120	187,06	32,24	236,06	42,47	415,06	113,50

Πουτρεσκίνη

✚ Λευκάδας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	79,03	56,64	79,03	56,64	79,03	56,64
30	52,47	17,75	44,73	15,36	143,27	104,94
60	55,52	33,55	88,60	41,43	265,93	162,68
90	128,72	80,82	152,12	51,33	175,99	81,45
120	122,84	35,05	200,25	85,52	420,76	204,25

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	141,14	25,67	141,14	25,67	141,14	25,67
30	165,10	24,43	167,31	19,32	170,18	24,70
60	177,72	33,27	188,34	20,42	167,06	26,02
90	165,85	20,34	163,12	15,16	146,68	28,19
120	174,73	6,01	183,04	33,74	155,34	22,69

Καδαβερίνη

✚ Λευκάδας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	52,29	20,78	52,29	20,78	52,29	20,78
30	36,00	4,93	46,78	12,35	70,75	47,33
60	33,72	11,03	33,48	12,23	79,19	47,56
90	58,00	35,73	59,44	26,42	49,41	12,26
120	55,30	28,24	60,40	26,48	101,15	40,51

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	11,34	7,12	11,34	7,12	11,34	7,12
30	13,32	7,69	12,71	6,36	12,40	6,84
60	12,93	9,22	13,84	7,46	11,70	8,58
90	18,33	9,57	16,54	8,17	12,15	8,17
120	13,63	7,46	13,60	7,24	10,19	8,10

Ισταμίνη

✚ Λευκάδα

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	0,21	0	0,21	0	0,21	0
30	0	0	0	0	0	0
60	0,14	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0	0

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	95,57	31,80	95,57	31,80	95,57	31,80
30	118,60	17,59	136,52	13,55	215,98	5,87
60	129,66	23,61	155,18	24,60	261,26	16,52
90	137,92	19,53	165,09	31,80	281,09	73,40
120	141,81	22,33	195,32	38,80	347,12	69,77

Φαινυλαιθυλαμίνη

✚ Λευκάδα

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	0,47	0,60	0,47	0,60	0,47	0,60
30	0	-	0	-	0,19	-
60	0	-	0	-	4,95	3,44
90	0	-	0	-	3	-
120	0	-	0,836	-	17,77	6,00

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C M.O	5° C τυπική απόκλιση	10° C M.O	10°C τυπική απόκλιση	18 °C M.O	18°C τυπική απόκλιση
0	31,30	19,00	31,30	19,00	31,30	19,00
30	32,80	16,52	47,02	19,88	131,32	9,67
60	34,19	17,75	59,17	15,19	191,26	17,45
90	36,65	17,54	56,17	27,02	227,03	16,83
120	36,47	18,86	56,12	32,31	251,97	74,68

Τρυοταμίνη

✚ Λευκάδα

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	15,16	4,76	15,16	4,76	15,16	4,76
30	13,77	4,13	15,88	1,60	41,15	27,55
60	13,22	5,07	23,01	10,08	52,74	10,69
90	28,98	22,56	47,00	19,405	27,36	1,17
120	22,17	4,805	57,30	24,58	99,01	15,91

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	24,24	17,21	24,24	17,21	24,24	17,21
30	27,32	22,09	30,12	22,09	25,07	19,76
60	29,27	21,28	29,17	15,71	20,93	15,89
90	23,10	13,62	23,39	14,61	15,34	11,32
120	23,43	10,14	24,89	13,31	16,94	12,14

Σπερμιδίνη

✚ Λευκάδας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	4,62	0,23	4,62	0,23	4,62	0,23
30	5,75	1,28	3,89	1,53	4,81	0,76
60	3,67	1,85	3,84	2,07	3,33	1,33
90	5,15	0,50	5,06	0,41	2,58	1,75
120	5,25	1,59	4,83	0,60	1,77	0,51

✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	6,53	0,62	6,53	0,62	6,53	0,62
30	5,50	1,40	5,24	1,40	3,58	1,19
60	4,75	0,78	4,96	1,03	2,38	0,90
90	4,53	1,40	4,10	0,29	2,23	1,23
120	5,67	1,35	4,34	1,03	1,27	0,30

Σπερμίνη

✚ Λευκάδας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	57,05	1,25	15,16	1,25	15,15	1,25
30	51,09	5,76	15,88	5,76	41,15	5,76
60	49,66	5,17	23,01	4,58	52,74	2,31
90	48,01	1,89	47,00	4,20	27,35	6,91
120	47,85	2,69	57,30	4,13	99,01	3,44

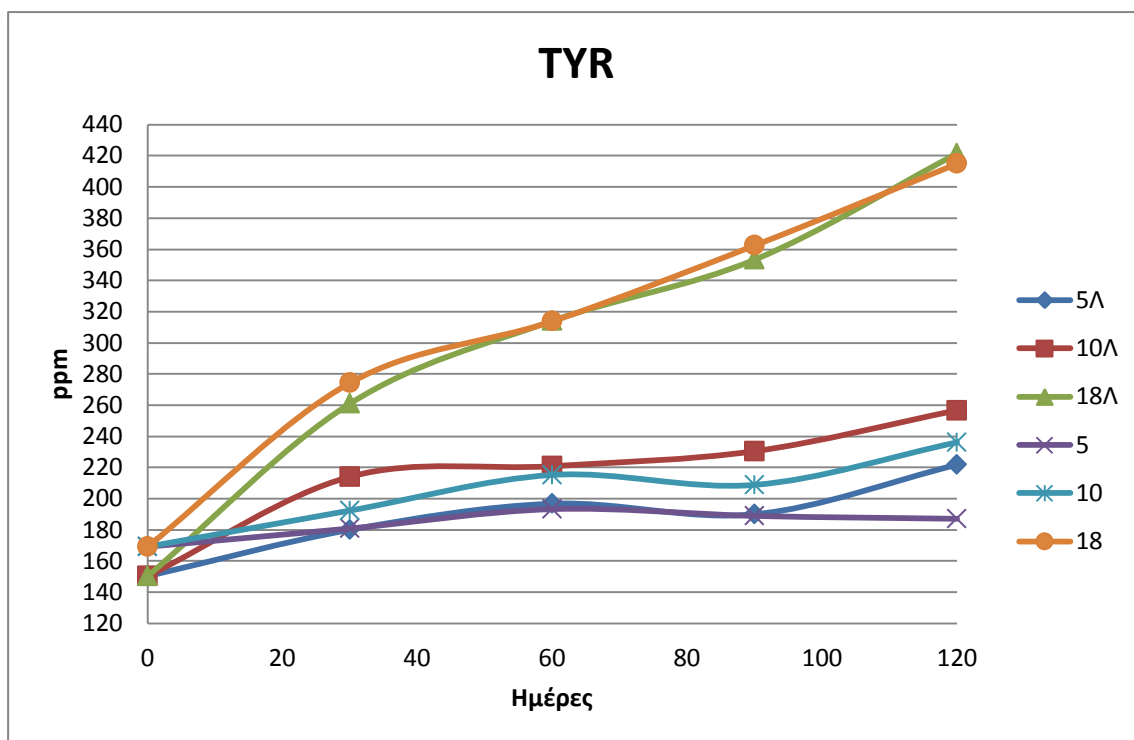
✚ Τύπου Ουγγαρίας

Ημέρες	5°C Μ.Ο	5° C τυπική απόκλιση	10° C Μ.Ο	10°C τυπική απόκλιση	18 °C Μ.Ο	18°C τυπική απόκλιση
0	24,24	2,51	24,24	2,51	24,24	2,51
30	27,32	17,33	30,12	7,00	25,07	3,66
60	29,27	1,45	29,17	2,47	20,93	2,70
90	23,10	5,77	23,39	1,24	15,34	2,95
120	23,43	1,75	24,89	1,70	16,94	1,70

3.2.5.1 Τυραμίνη

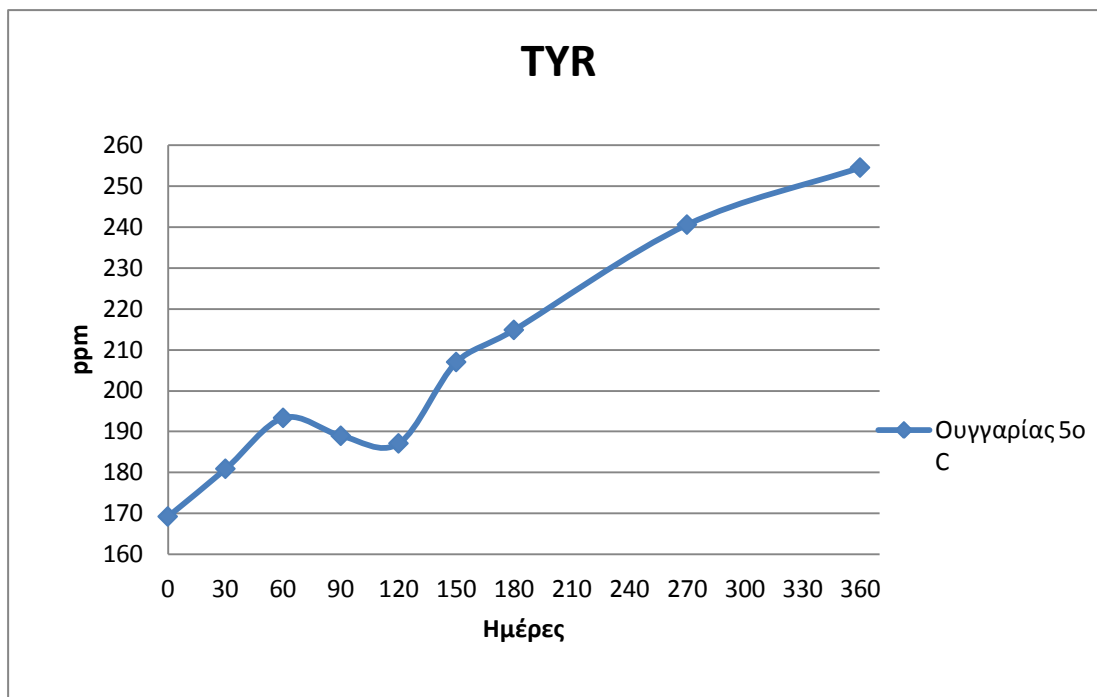
Η τυραμίνη είναι συνήθως η πιο συχνή και άφθονη βιογενής αμίνη των σαλαμιών αέρος (Vidal-Carou et al., 2007). Η συσσώρευση της ξεκινάει σε αυτά πολύ νωρίς, ήδη από την τρίτη ημέρα της ζύμωσης. Τυραμίνη παράγεται κυρίως από Gram-θετικά βακτήρια των γενών *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*), *Lactobacillus* (π.χ. *L. curvatus*, *L. brevis*) *Leuconostoc*, *Lactococcus* και *Carnobacterium* (Aymerich et al., 2006; Bover-Cid et al., 2001a; Fernández et al., 2004; Masson et al., 1996; Roig-Sagués et al., 1997; Straub et al., 1995). Οι σταφυλόκοκκοι μπορούν επίσης να παίζουν κάποιο ρόλο στην παραγωγή της τυραμίνης (Ansonera et al., 2002; Martín, et al., 2006; Latorre-Moratalla et al., 2010a).

Είναι φανερό από το Γράφημα 13 ότι οι αρχικές συγκεντρώσεις της τυραμίνης (TYR) και στους δύο τύπους αλλαντικών ήταν περίπου παρόμοιες (150,32 ppm για τα Λευκάδας και 169,13 ppm για τα τύπου Ουγγαρίας). Στις θερμοκρασίες 5 και 10°C παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση της συγκέντρωσης της τυραμίνης και στους δύο τύπους αλλαντικών. Μέσα στο χρονικό διάστημα των 120 ημερών για τα Λευκάδας, η συγκέντρωση αυξήθηκε κατά 71,49 ppm στους 5°C και κατά 106,19 ppm στους 10°C ενώ για τα τύπου Ουγγαρίας, η συγκέντρωση της τυραμίνης αυξήθηκε κατά 17,19 ppm στους 5°C και κατά 66,87 ppm στους 10°C. Αντίθετα, στους 18°C παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) της συγκέντρωσης της τυραμίνης καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης (120 ημέρες) και για τους δύο τύπους αλλαντικών. Για την ακρίβεια, η συγκέντρωση της τυραμίνης στους 18°C μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών αυξήθηκε για μεν τα αλλαντικά Λευκάδας κατά 271,31 ppm για δε τα τύπου Ουγγαρίας κατά 245,87 ppm. Οι μεγαλύτερες αυξήσεις της τυραμίνης στα αλλαντικά Λευκάδας πιθανόν να οφείλονται και στην παρουσία σε αυτά εντεροκόκκων κάποια στελέχη των οποίων έχουν αυξημένη ικανότητα αποκαρβοξυλίωσης της τυροσίνης.



Γράφημα 13: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της τυραμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Σε αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας τα οποία διατηρήθηκαν στους 5°C (συνιστώμενη θερμοκρασία διατήρησης προϊόντος από τον παραγωγό) ως την ημερομηνία λήξης τους δηλ. για διάστημα ενός χρόνου (Γράφημα 14), η τυραμίνη παρουσίασε μια σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της (συνολικά κατά 85,28 ppm από την αρχική τιμή της). Πιθανόν αυτή η αύξηση να οφείλεται σε επιβίωση των λακτοβακίλων και σταφυλοκόκκων-μικροκόκκων ως την τελευταία ημέρα της συντήρησης (3,90 και 3,95 log₁₀ cfu/g αντίστοιχα).



Γράφημα 14: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της τυραμίνης του τύπου Ουγγαρίας μέσα σε χρονικό διάστημα 360 ημερών

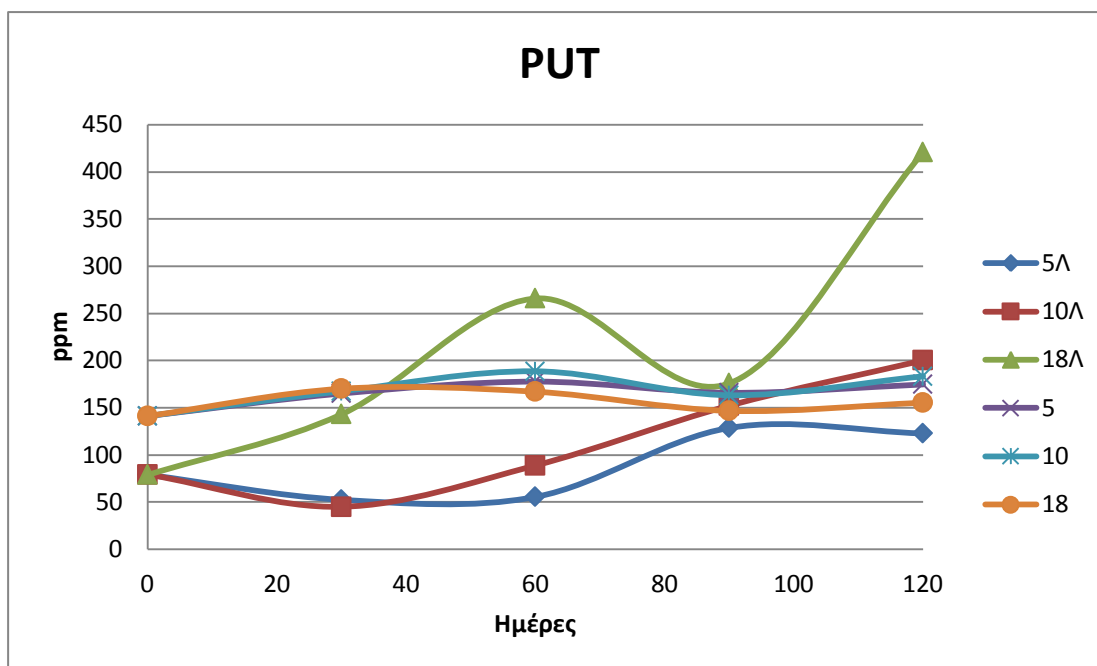
Τα αποτελέσματα μας που αφορούν στην αύξηση της συγκέντρωσης της τυραμίνης σε συνάρτηση με το χρόνο συντήρησης συμπίπτουν με τα αποτελέσματα των πειραμάτων των Komprda et al., (2009) που δείχνουν αύξηση της συγκέντρωσης της τυραμίνης σε σαλάμι αέρος που συντηρήθηκε για περίπου 3 μήνες μετά την παρασκευή του.

Η ποσότητα της τυραμίνης σε μια μερίδα 100g των σαλαμιών και των δύο τύπων ύστερα από συντήρηση τους για 4 μήνες στους 18°C δεν θα προκαλούσε προβλήματα υγείας σε υγιείς καταναλωτές (προτεινόμενο από την EFSA, 2011 όριο τοξικότητας για την τυραμίνη : 600mg τυραμίνης / γεύμα). Θα μπορούσε όμως να προκαλέσει υπερτασικά συμπτώματα σε άτομα βρισκόμενα σε θεραπεία με κλασσικά MAOI φάρμακα ή τρίτης γενιάς φάρμακα MAOI (όρια τοξικότητας 6mg και 50mg / γεύμα αντίστοιχα).

3.2.5.2 Πουτρεσκίνη

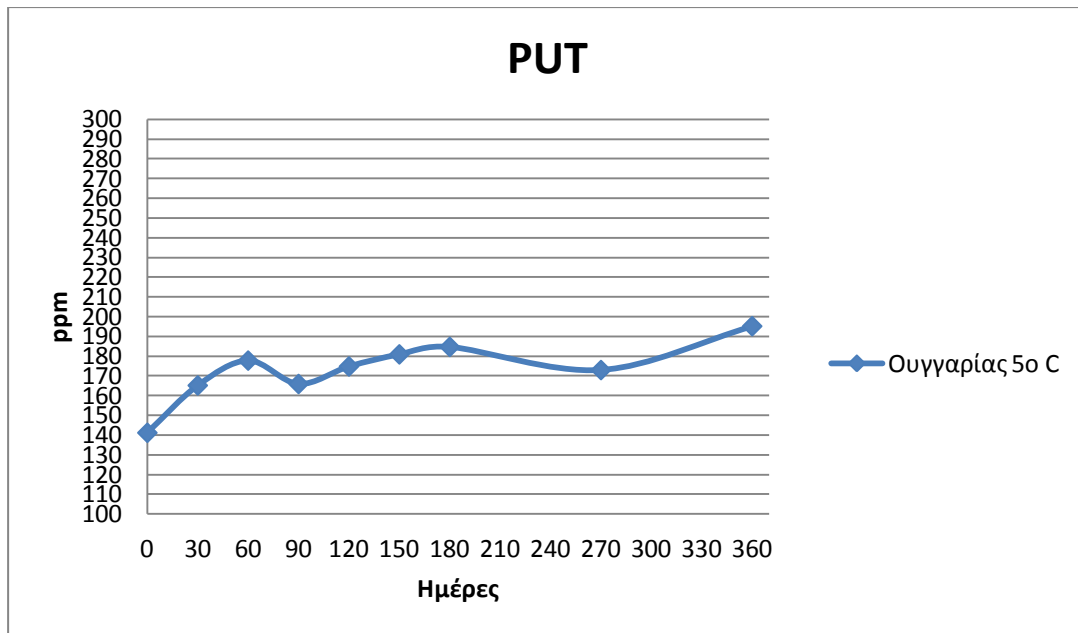
Η παραγωγή της πουτρεσκίνης (PUT) γίνεται συνήθως από Gram-αρνητικά βακτήρια, και κυρίως των οικογενειών Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae και Shewanellaceae, που συνδέονται γενικά με την αλλοίωση των προϊόντων (Lopez-Caballero et al., 2001). Από τα εντεροβακτήρια που συνδέονται με την παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων της πουτρεσκίνης στα τρόφιμα, είναι κυρίως τα γένη *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* και *Shigella* (Paleologos et al., 2004; Kim et al., 2009; Rezaei et al., 2007; Chytiri et al., 2004). Η πουτρεσκίνη είναι μια από τις πιο κοινές αμίνες που βρίσκονται στα προϊόντα ζύμωσης. Οι λακτοβάκιλοι, οι σταφυλόκοκκοι και οι εντερόκοκκοι έχουν επίσης αναφερθεί ότι είναι σε θέση να παράγουν πουτρεσκίνη (Arena et al., 2001; Ansonera et al., 2002; Beneduce et al., 2010; Coton et al., 2010). Η συσσώρευση της πουτρεσκίνης στο σαλάμι αέρος κατά την διάρκεια της ωρίμανσης ξεκινάει λίγο αργότερα από την τυραμίνη.

Στο παραδοσιακό σαλάμι Λευκάδας, η αρχική συγκέντρωση της πουτρεσκίνης (γράφημα 15) βρισκόταν σε χαμηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με την τυραμίνη. Ύστερα από 120 ημέρες στους 5°C, 10°C και 18°C αυτή αυξήθηκε κατά 43,81 ppm, 121,22 ppm και 341,73 ppm αντίστοιχα. Η θερμοκρασία συντήρησης ήταν σημαντική ($p < 0,05$) για την αύξηση της συγκέντρωσης της πουτρεσκίνης στα αλλαντικά Λευκάδος.



Γράφημα 15: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της πουτρεσκίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Στο σαλάμι τύπου Ουγγαρίας, η αρχική συγκέντρωση της πουτρεσκίνης αν και υψηλότερη από αυτήν του σαλαμιού Λευκάδας ίσως λόγω μεγαλύτερης διαμέτρου (Bover-Cid et al., 1999) και πιο όξινου pH (Miguélez-Arrizado et al., 2006), δεν παρουσίασε σημαντική αλλαγή κατά τη συντήρηση. Για την ακρίβεια, η αύξηση της συγκέντρωσης μέσα σε 120 ημέρες ήταν 33,59 ppm, 41,90 ppm και 14,20 ppm στους 5°C, 10°C, και 18°C αντίστοιχα. Οι χαμηλοί αυτοί ρυθμοί αύξησης ήταν σε συμφωνία με την απουσία εντεροβακτηριοειδών από τα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησής τους. Μικρή σχετικά αύξηση της πουτρεσκίνης παρατηρήθηκε και ύστερα από συντήρηση των παραπάνω σαλαμιών στους 5°C για 12 μήνες (οπότε η συγκέντρωση της έφθασε τα 195,13 ppm δηλ. αυξήθηκε κατά 54 ppm). και πιθανόν να οφείλεται στην επιβίωση σε αυτά κάποιων στελεχών λακτοβακίλων και μικροκόκκων-σταφυλοκόκκων (Γραφήματα 2, 4) με ικανότητα παραγωγής πουτρεσκίνης (Ansonera et al., 2002; Bover-Cid et al., 2001a; Martín et al., 2006).



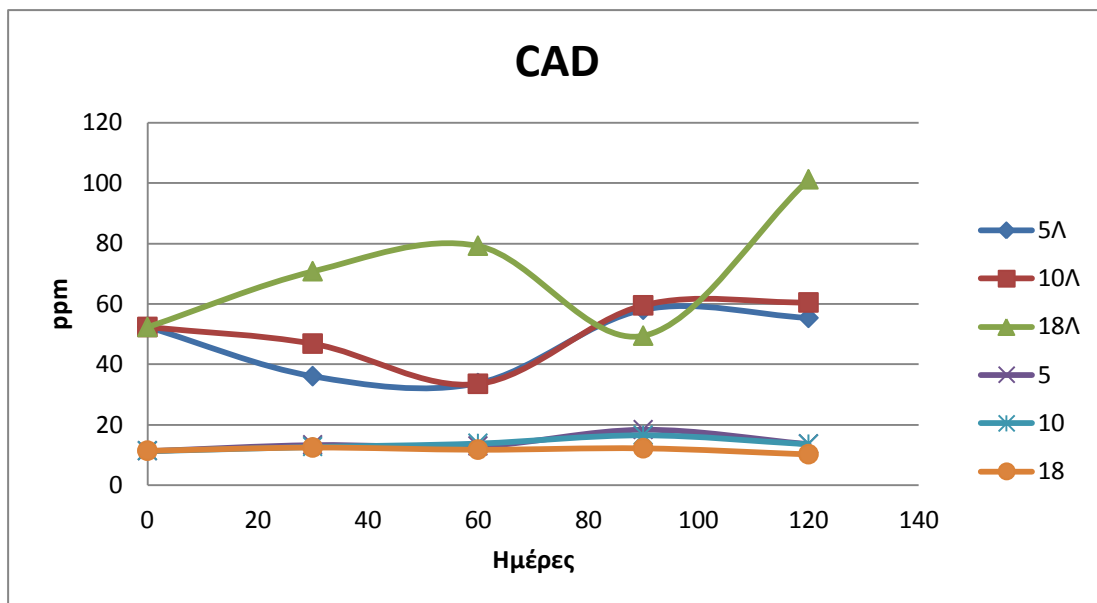
Γράφημα 16: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της πουτρεσκίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 360 ημερών

Τα αποτελέσματα μας είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων των Komprda et al.(2009) που έδειξαν πολύ μικρή αύξηση της συγκέντρωσης της πουτρεσκίνης, όταν το σαλάμι αέρος συντηρήθηκε για περίπου τρεις μήνες μετά το πέρας της παραγωγής του.

3.2.5.3 Καδαβερίνη

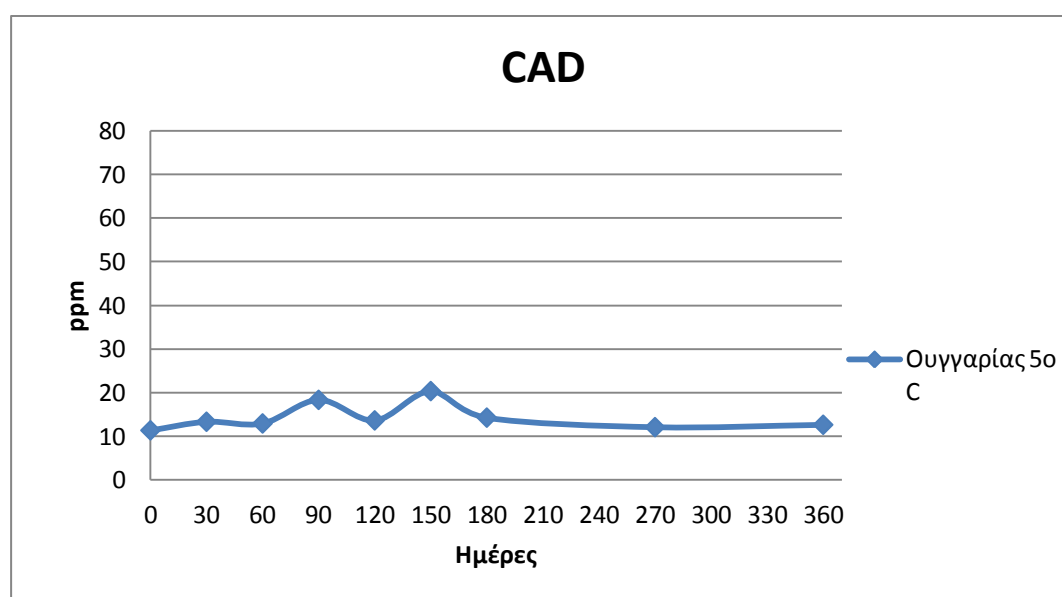
Η παραγωγή της καδαβερίνης (CAD) γίνεται συνήθως από Gram-αρνητικά βακτήρια, και κυρίως των οικογενειών Enterobacteriaceae, Pseudomonaceae και Shewanellaceae, που συνδέονται γενικά με την αλλοίωση των προϊόντων (Lopez-Caballero et al., 2001). Από τα εντεροβακτήρια που συνδέονται με την παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων της καδαβερίνης στα τρόφιμα, είναι κυρίως τα γένη *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* και *Shigella* (Paleologos et al., 2004; Kim et al., 2009; Rezaei et al., 2007; Chytiri et al., 2004). Η συσσώρευση της καδαβερίνης στο σαλάμι αέρος κατά την διάρκεια της ωρίμανσης ξεκινάει λίγο αργότερα από την τυραμίνη. Υψηλές συγκεντρώσεις καδαβερίνης σε σαλάμι αέρος αποδίδονται είτε σε κακή υγιεινή κατάσταση και φρεσκότητα των πρώτων υλών, ή σε υιοθέτηση λανθασμένων μεθόδων παραγωγής όπως η αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της ζύμωσης και ωρίμανσης (Bover-Cid et al., 2000).

Όπως φαίνεται από το γράφημα 17, ούτε η θερμοκρασία ($p=0,2157$) αλλά ούτε και η διάρκεια συντήρησης ($p=0,6252$) επηρέασαν τη συγκέντρωση της καδαβερίνης και στους δύο τύπους των αλλαντικών. Αντίθετα, το είδος του αλλαντικού έπαιξε σημαντικό ρόλο για την παραγωγή της. Τα αλλαντικά της Λευκάδας που είχαν παραχθεί με φυσική καλλιέργεια, περιείχαν περισσότερη καδαβερίνη από τα τύπου Ουγγαρίας και στις τρεις θερμοκρασίες συντήρησης. Παρόμοια διαφορά ως προς την καδαβερίνη παρατήρησαν και οι Bover-Cid et al., (2001d) μεταξύ σαλαμιών που είχαν παραχθεί με φυσική καλλιέργεια και με καλλιέργεια εκκίνησης αποτελούμενη από *Lactobacillus curvatus* και *Staphylococcus xylosus*. Σύμφωνα με τους Bover-Cid & Holzapfel, (1999) και Durlu-Özkaya et al., (2001) η παραγωγή της καδαβερίνης στα προϊόντα κρέατος οφείλεται κυρίως στην αποκαρβοξυλίωση της λυσίνης από διάφορα είδη εντεροβακτηρίων. Συνεπώς, η μεγαλύτερη αρχική συγκέντρωση της καδαβερίνης στο σαλάμι Λευκάδας πιθανώς να οφείλονταν στην επιβίωση σε αυτά μικρών πληθυσμών εντεροβακτηρίων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και κατά τον πρώτο μήνα της συντήρησης τους (Γράφημα 7) κάτι που δεν παρατηρήθηκε στο τύπου Ουγγαρίας.



Γράφημα 17: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της καδαβερίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Κάποιες αμελητέες αυξομειώσεις της συγκέντρωσης της καδαβερίνης βρέθηκαν και κατά την συντήρηση των σαλαμιών τύπου Ουγγαρίας στους 5°C για ένα χρόνο με τελική τιμή μόλις κατά 1,28 ppm ανώτερη από την αρχική συγκέντρωση (γράφημα 18).

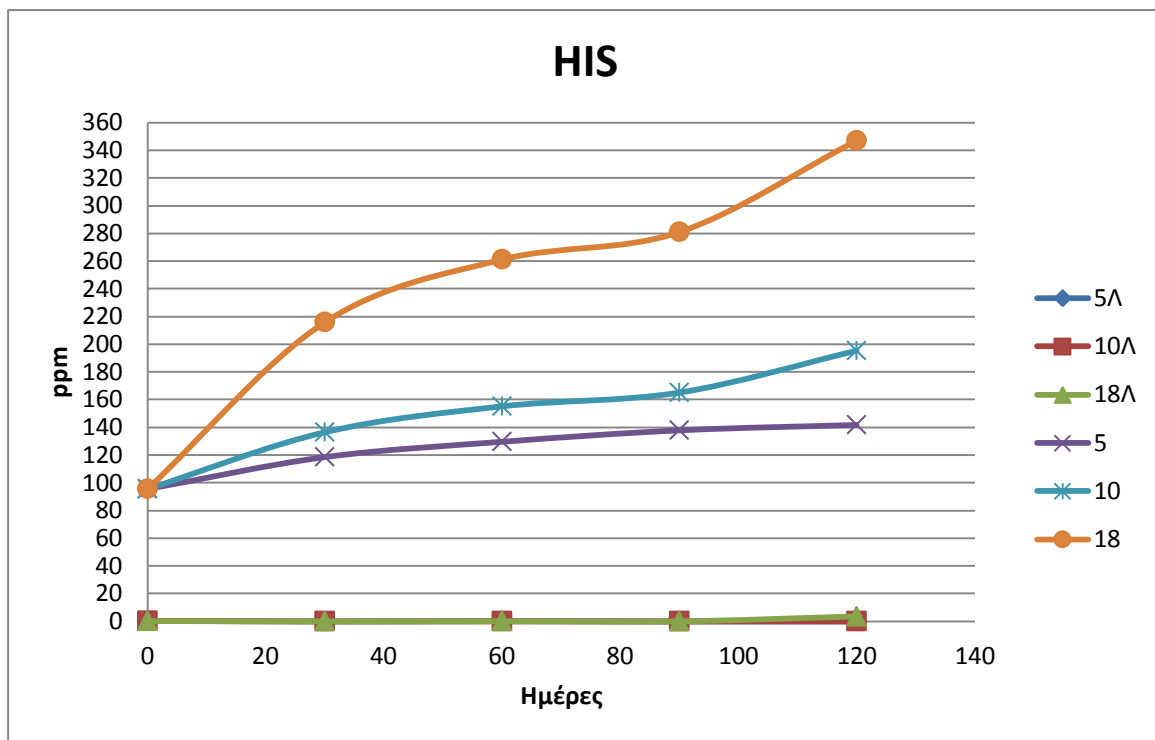


Γράφημα 18: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της καδαβερίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 360 ημερών

3.2.5.4 Ισταμίνη

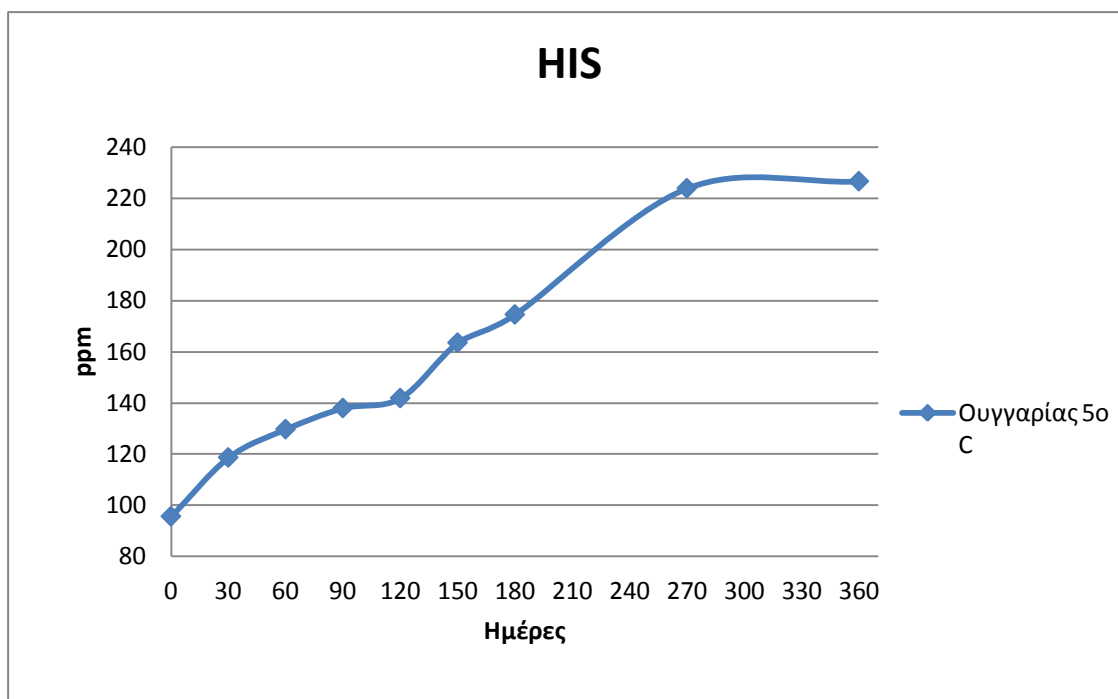
Η παραγωγή ισταμίνης μπορεί να γίνει τόσο από Gram-θετικά όσο και από Gram – αρνητικά βακτήρια. Η αποκαρβοξυλάσες της ιστιδίνης απελευθερώνονται στα αρχικά στάδια της παραγωγής των σαλαμιών αέρος από διάφορα γένη της οικογένειας Enterobacteriaceae που είναι κυρίως υπεύθυνα για την παραγωγή της ισταμίνης στα ζυμούμενα αλλαντικά (Roig – Sagués et al., 1996). Στα ζυμούμενα προϊόντα στελέχη των *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvalus*, *Pediococcus damnosus*, *Tetragenococcus* species, *Leuconostoc* species, *Lactobacillus saerimneri* 30a, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchnerii* and *Lactobacillus curvatus*, είναι γνωστό ότι παράγουν ισταμίνη (Beutling, 1996; Kimura et al., 2001 Lucas et al., 2005; Spano et al., 2010; Straub et al., 1995). Η συσσώρευση της ισταμίνης στο σαλάμι αέρος συνήθως συμβαίνει μεταξύ της δεύτερης και της τέταρτης εβδομάδας ωρίμανσης (Bover – Cid et al., 1999). Το υψηλό αρχικό μικροβιολογικό φορτίο των πρώτων υλών λόγω μη σωστής αποθήκευσης, η ανεπαρκής μείωση του pH κατά την έναρξη της ωρίμανσης και ο παρατεταμένος χρόνος ωρίμανσης είναι σημαντικοί παράγοντες για την συσσώρευση της ισταμίνης στα ζυμούμενα αλλαντικά (Suzzi & Gardini, 2003).

Όπως για την καδαβερίνη έτσι και για την παραγωγή ισταμίνης το είδος του αλλαντικού έπαιξε σημαντικό ρόλο ($p < 0,0001$). Τα αλλαντικά της Λευκάδας είχαν σχεδόν μηδενική αρχική συγκέντρωση ισταμίνης ενώ τα τύπου Ουγγαρίας είχαν υψηλή αρχική συγκέντρωση όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 19 (και από τους πίνακες του παραρτήματος). Αυτή η διαφορά πιθανόν να οφείλεται εν μέρει στον πιο παρατεταμένο χρόνο ωρίμανσης των σαλαμιών τύπου Ουγγαρίας (Suzzi & Gardini, 2003) στο πιο όξινο pH και στη μεγαλύτερη διάμετρο τους (Bover-Cid et al., 1999). Η θερμοκρασία συντήρησης έπαιξε επίσης, σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της ισταμίνης για τα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας ($p < 0,05$) όχι όμως και για τα Λευκάδας. Έτσι, στα τύπου Ουγγαρίας και ύστερα από 120 ημέρες συντήρησης, στους 5°C, 10°C και 18°C η συγκέντρωση της ισταμίνης αυξήθηκε κατά 46,24 ppm 99,75 ppm και 251,55 ppm αντίστοιχα. Τέλος, ο χρόνος συντήρησης επηρέασε επίσης σημαντικά ($p < 0,05$) την παραγωγή της ισταμίνης μόνο στα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας ιδίως για συντήρηση στους 18°C (διάγραμμα 18 και πίνακες του παραρτήματος).



Γράφημα 19: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της ισταμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Στα δείγματα τύπου Ουγγαρίας που διατηρήθηκαν στους 5°C για έναν χρόνο παρατηρήθηκε (διάγραμμα 20) μια διαρκής αύξηση της συγκέντρωσης της ισταμίνης τουλάχιστον ως τον 9^ο μήνα της συντήρησης οπότε αυτή υπερδιπλασιάστηκε σε σχέση με την αρχική.



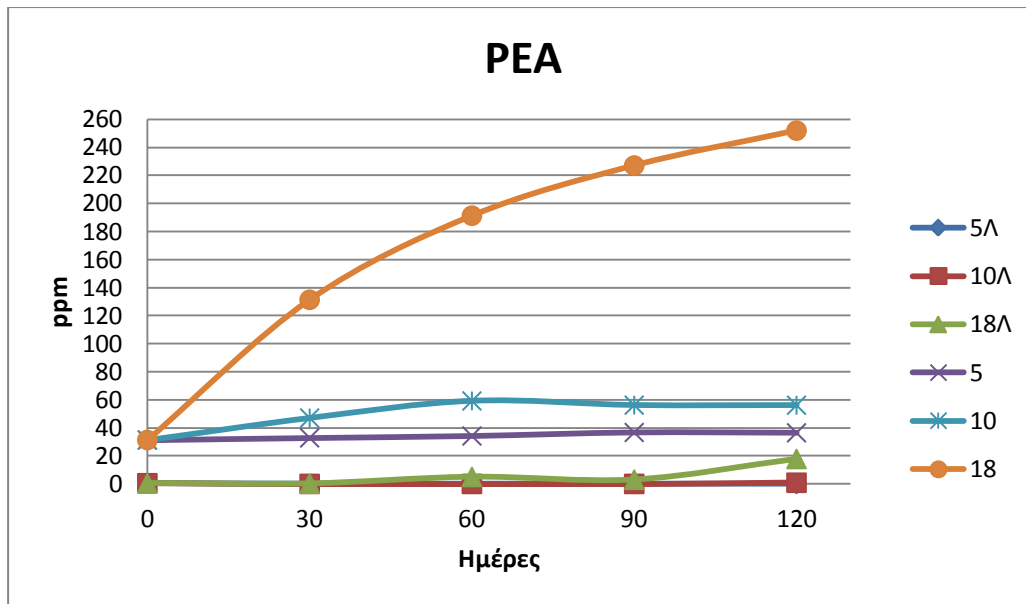
Γράφημα 20: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της ισταμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 360 ημερών

Η έλλειψη εντεροβακτηριοειδών από τα αλλαντικά τύπου Ουγγαρίας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της ισταμίνης κατά την αποθήκευση τους μάλλον οφείλεται στην επιβίωση και ανάπτυξη σε αυτά κάποιων στελεχών μεσόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων (Maijala & Eerola, 1993) τα οποία είτε προϋπήρχαν στην αρχική πρώτη ύλη (κρέας) σαν μολύνουσα μικροχλωρίδα ή προστέθηκαν κατά την παρασκευή της κρεατόπαστας μαζί με κάποιο συστατικό ή από τον περιβάλλοντα χώρο. Για το παραπάνω συμπέρασμα συνηγορούν οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της ισταμίνης για συντήρηση σε υψηλότερες θερμοκρασίες όπως και η συνεχής παράλληλη παρουσία υψηλού πληθυσμού οξυγαλακτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της συντήρησης.

3.2.5.5 β - Φαινυλαιθυλαμίνη

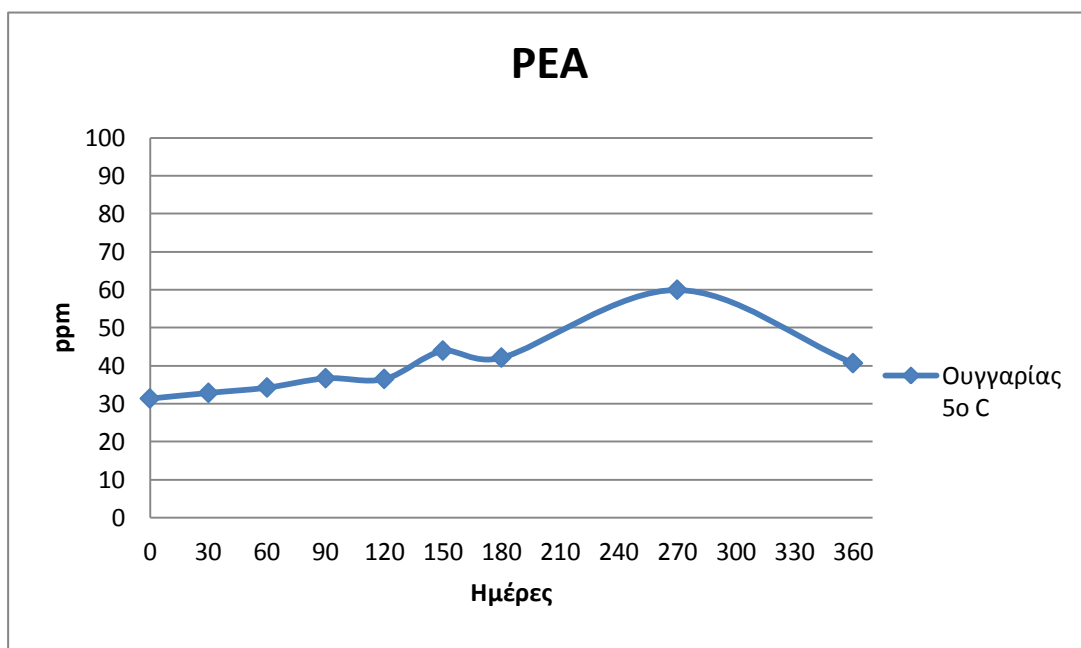
Στο σαλάμι αέρος η β – φαινυλαιθυλαμίνη μπορεί να σχηματιστεί από την αποκαρβοξυλίωση της φαινυλαλανίνης από διάφορα είδη εντεροκόκκων (*E. faecalis*, *E. faecium*) θετικών κατά Gram κόκκων (*S. carnosus*, *S. epidermidis*, *Kocuria varians*) και λακτοβακίλων όπως *L. curvatus*, *L. plantarum* (Ansonera et al., 2002; Bover-Cid et al., 2001a; Martín et al., 2006). Συνήθως συνυπάρχει σε αλλαντικά με σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις τυραμίνης. Ο σχηματισμός της φαινυλαιθυλαμίνης στο σαλάμι αέρος διαπιστώθηκε ότι συμβαίνει μετά το τέλος της δεύτερης εβδομάδας ωρίμανσης (Bover-Cid et al., 2001e).

Όπως προαναφέρθηκε για την ισταμίνη και καδαβερίνη, το είδος του αλλαντικού βρέθηκε να παίζει σημαντικό ρόλο ($p < 0,05$) στην παραγωγή της φαινυλαιθυλαμίνης (γράφημα 21). Τα αλλαντικά Λευκάδας περιείχαν μηδενικές αρχικές συγκεντρώσεις οι οποίες διατηρήθηκαν σχεδόν σταθερές και για τις τρεις θερμοκρασίες συντήρησης. Αντίθετα, τα τύπου Ουγγαρίας παρουσίασαν υψηλότερη αρχική συγκέντρωση (πιθανώς λόγω πιο όξινου αρχικού pH), η οποία αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της συντήρησης και στις τρεις θερμοκρασίες και ιδιαίτερα στα δείγματα τα οποία συντηρήθηκαν στους 18°C ($p < 0.0001$). Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 20, ο χρόνος συντήρησης έπαιξε σημαντικό ρόλο για την αύξηση της β – φαινυλαιθυλαμίνης στην περίπτωση αυτή.



Γράφημα 21: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της β- φαινυλαιθυλαμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

Στα δείγματα τύπου Ουγγαρίας που διατηρήθηκαν στους 5°C για έναν χρόνο παρατηρήθηκε (γράφημα 22) μια μικρή διαρκής αύξηση της συγκέντρωσης της φαινυλαιθυλαμίνης τουλάχιστον ως τον 9^ο μήνα της συντήρησης οπότε η συγκέντρωση διπλασιάστηκε σε σχέση με την αρχική (από τα 31,30 ppm αυξήθηκε στα 59,95 ppm)

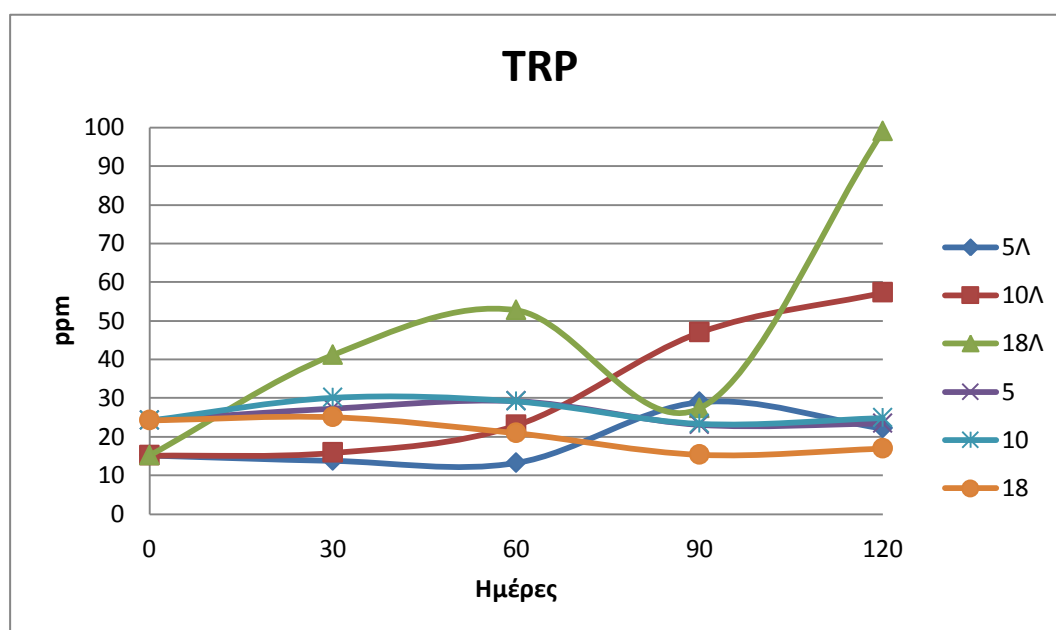


Γράφημα 22: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της β – φαινυλαιθυλαμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 360 ημερών

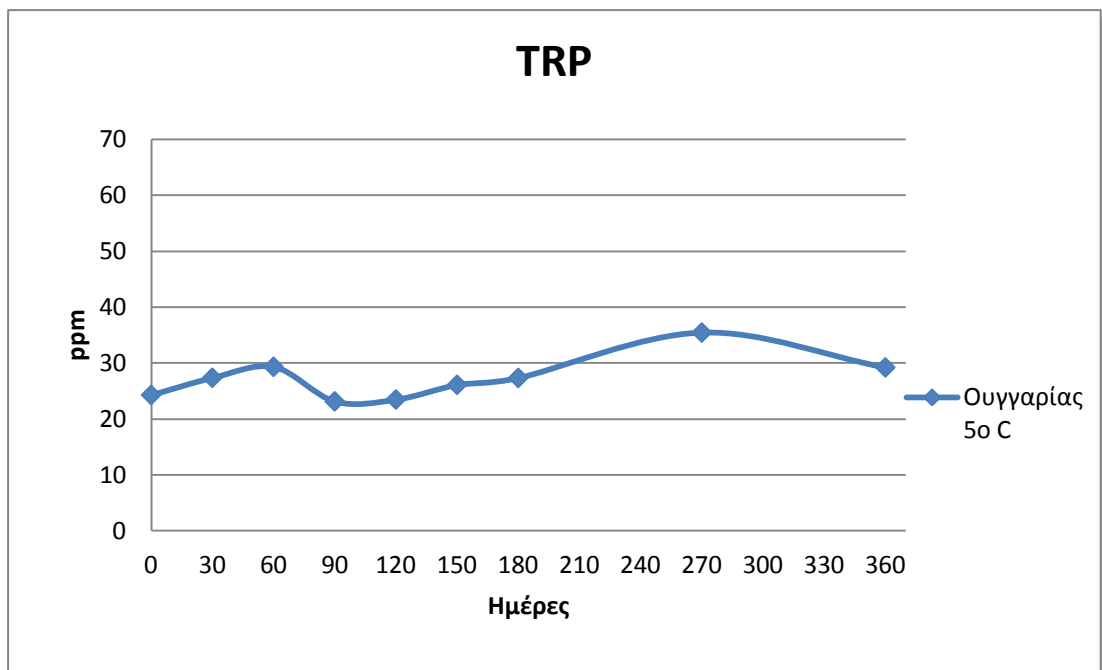
3.2.5.6 Τρυπταμίνη

Η τρυπταμίνη παράγεται στο σαλάμι αέρος σε μικρές ποσότητες από την αποκαρβοξυλίωση της τρυπτοφάνης από κάποια στελέχη των ειδών *E. faecium*, *S. carnosus*, *L. brevis* και *L. curvatus*. (Bover-Cid et al., 2001a; Latorre-Moratalla et al., 2010a). Όπως και για την φαινυλαιθυλαμίνη η παραγωγή της αρχίζει μετά το τέλος της δεύτερης εβδομάδας ωρίμανσης (Bover–Cid et al., 2001e).

Για την παραγωγή της τρυπταμίνης κατά τη διάρκεια της συντήρησης το είδος του αλλαντικού βρέθηκε να παίζει σημαντικό ρόλο ($p < 0,05$), όπως ήδη προαναφέρθηκε για την καδαβερίνη, ισταμίνη και φαινυλαιθυλαμίνη. Τα αλλαντικά της Λευκάδας είχαν μικρότερη αρχική συγκέντρωση (15,16 ppm) η οποία ως το τέλος του χρόνου συντήρησης αυξήθηκε κατά 7,02 ppm, 42,15 ppm και 83,16 ppm, για τα αλλαντικά που συντηρήθηκαν στους 5°C, 10°C και 18°C, αντίστοιχα. Αντίθετα, τα τύπου Ουγγαρίας αν και είχαν λίγο υψηλότερη αρχική συγκέντρωση (24,24 ppm), αυτή παρέμεινε σχεδόν σταθερή μέχρι το τέλος του 4^{ου} μήνα και για τις τρεις θερμοκρασίες συντήρησης (Γράφημα 23). Επίσης, και κατά τη συντήρησή τους για ένα χρόνο η συγκέντρωση της τρυπταμίνης ήταν περίπου σταθερή με κάποιες διακυμάνσεις (Γράφημα 24).



Γράφημα 23: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της τρυπταμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

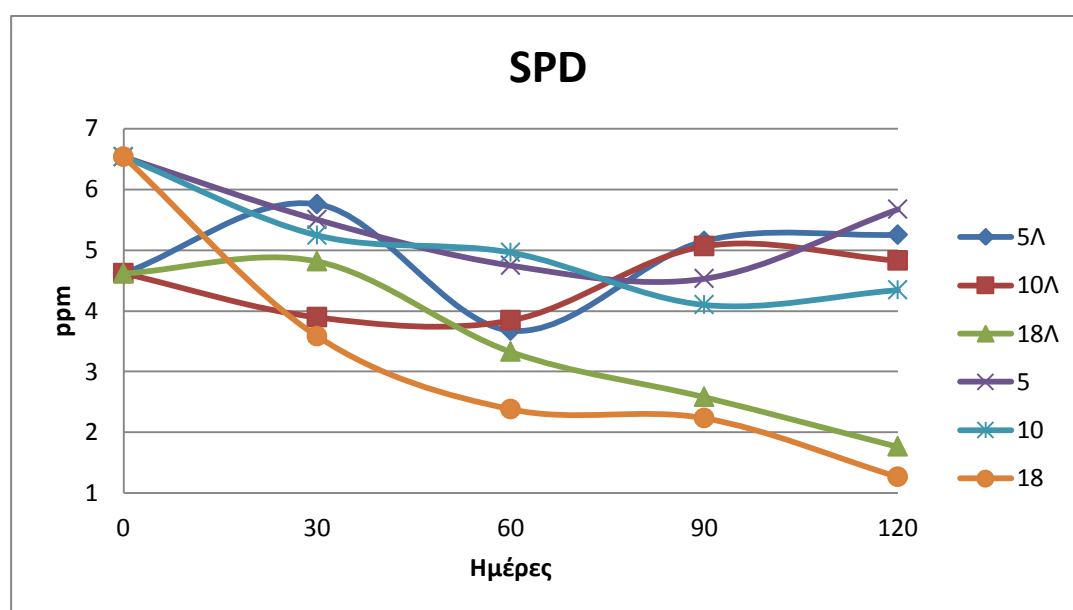


Γράφημα 24: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της τρυπταμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 360 ημερών

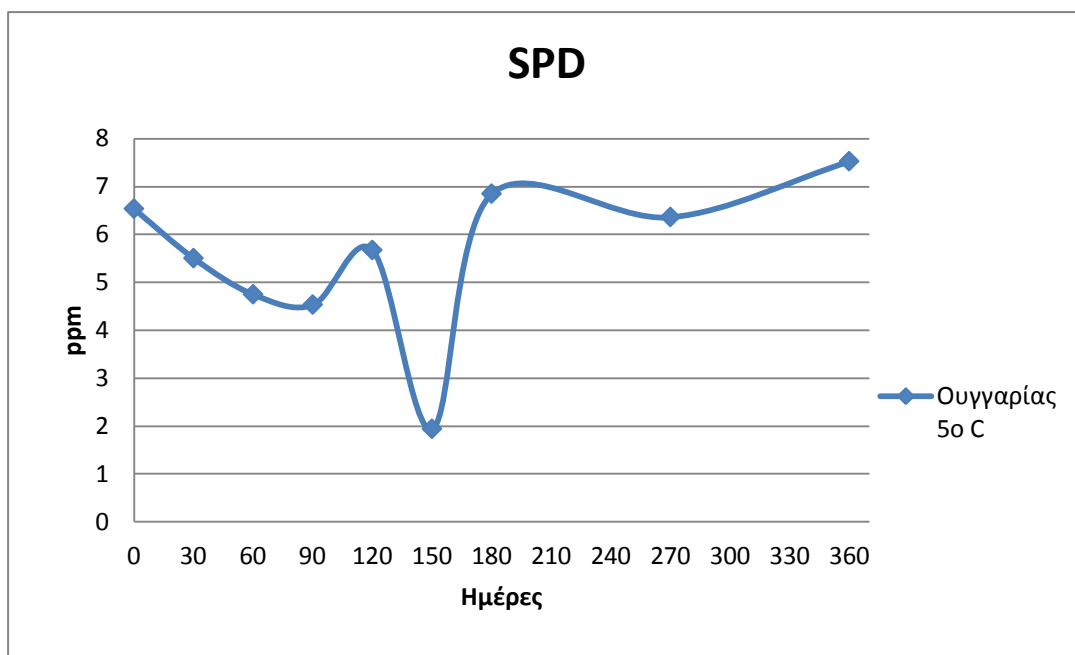
3.2.5.7 Σπερμιδίνη-Σπερμίνη

Οι δύο αυτές αμίνες αποτελούν φυσικά συστατικά του κρέατος που χρησιμοποιήθηκε σαν πρώτη ύλη και δεν σχηματίζονται από την μικροβιακή αποκαρβοξυλίωση αμινοξέων κατά το στάδιο της ωρίμανση. Επομένως, κατά την διάρκεια της ωρίμανσης και της συντήρησης του σαλαμιού αέρος οι συγκεντρώσεις τους ήταν αναμενόμενο είτε να παραμένουν σταθερές ή να παρουσιάζουν μείωση λόγω κατανάλωσης τους από κάποιους μικροοργανισμούς οι οποίοι τις χρησιμοποιούν σαν πηγή αζώτου (Bardócz, 1995).

Στην παρούσα εργασία, η σπερμιδίνη παρουσίασε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της και για τα δύο είδη αλλαντικών μόνο στα δείγματα που διατηρήθηκαν στους 18°C (ύστερα από 4 μήνες κατά 2,85 ppm στα Λευκάδας και κατά 5,27 ppm στα τύπου Ουγγαρίας). Για συντήρηση στους 5 και 10 °C οι αυξομειώσεις στις τιμές της σπερμιδίνης ήταν μάλλον αμελητέες (γράφημα 25). Το ίδιο αμελητέες ήταν και κατά την συντήρηση στους 5°C για ένα χρόνο των σαλαμιών τύπου Ουγγαρίας (γράφημα 26). Συνεπώς, μόνο η θερμοκρασία αποθήκευσης είναι σημαντικός παράγοντας ($p < 0,0001$) για την μεταβολή της συγκέντρωσης της σπερμιδίνης όχι όμως και το είδος του σαλαμιού ($p > 0,05$).

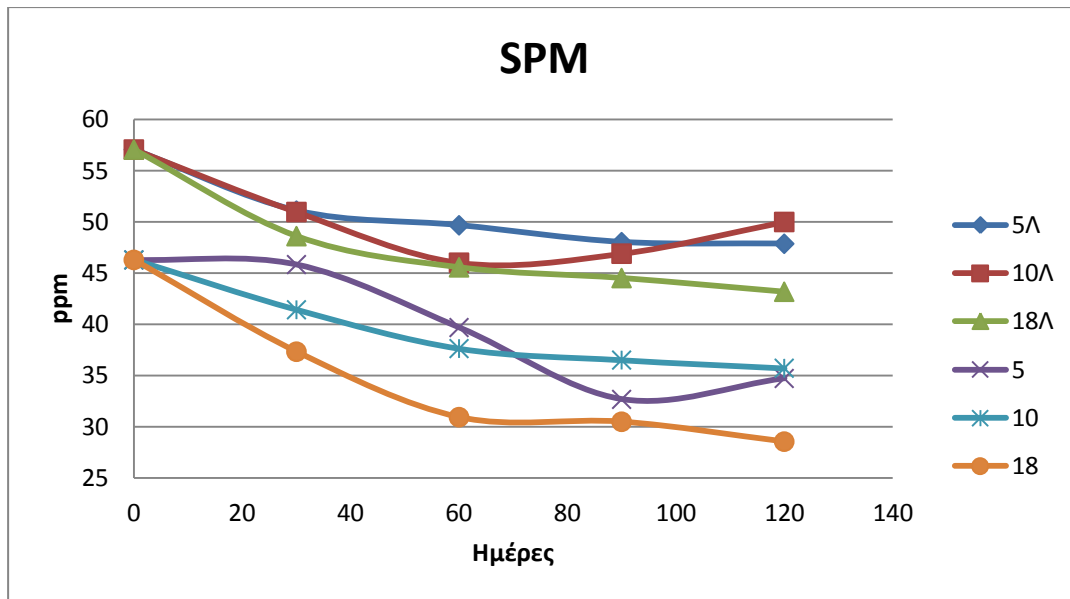


Γράφημα 25: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της σπερμιδίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα

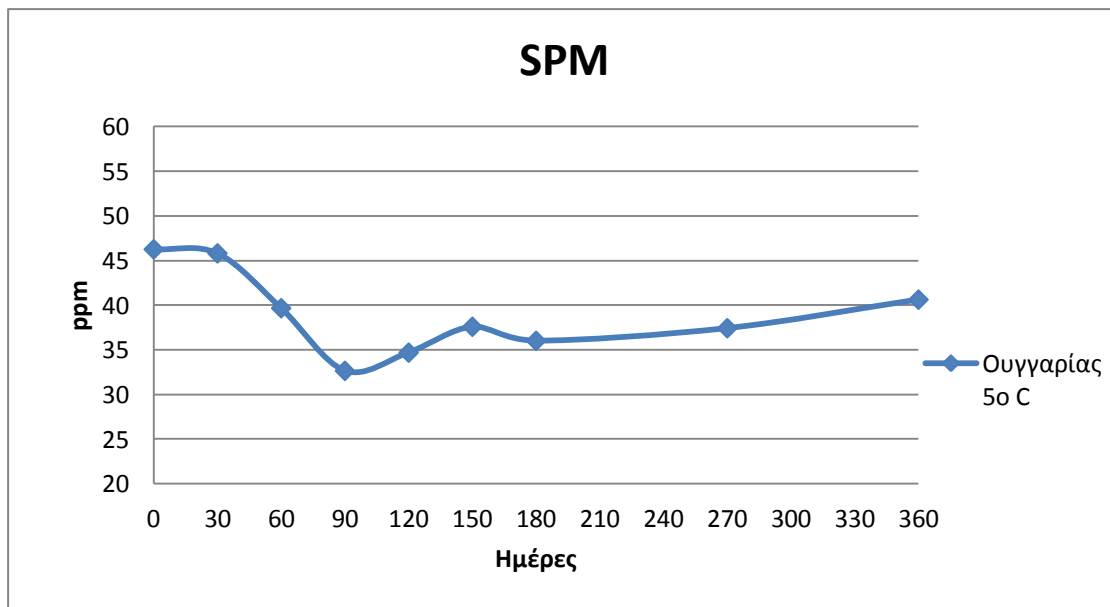


Γράφημα 26: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της σπερμιδίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 360 ημερών

Όσον αφορά τη σπερμίνη (SP) το είδος του αλλαντικού έπαιξε σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση της ($p < 0,0001$). Όπως βλέπουμε στο γράφημα 27, καθ' όλη τη διάρκεια της συντήρησης τα τύπου Ουγγαρίας είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τα Λευκάδας και στις τρεις θερμοκρασίες ίσως λόγω μικρότερης περιεκτικότητας του σαλαμιού τύπου Ουγγαρίας σε κρέας όπως συμπεραίνεται έμμεσα από τον Πίνακα 6 (3.2.1 βασική χημική ανάλυση). Επίσης, η θερμοκρασία συντήρησης επηρέασε τη μείωση της συγκέντρωσης της σπερμίνης. Ωστόσο, σημαντική μείωση ($p < 0,0001$) και για τους δύο τύπους σαλαμιών παρατηρήθηκε μόνο σε δείγματα που διατηρήθηκαν στους 18°C για 4 μήνες. Δείγματα που διατηρήθηκαν στους 5°C και 10°C δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση της σπερμίνης ύστερα, από 4 μήνες συντήρησης. Το ίδιο και δείγματα τύπου Ουγγαρίας ύστερα από 12 μήνες συντήρησης στους 5°C (Γράφημα 28).



Γράφημα 27: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της σπερμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 120 ημερών
 5Λ, 10Λ και 18Λ = δείγματα Λευκάδας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα
 5, 10, 18 = δείγματα τύπου Ουγγαρίας σε θερμοκρασίες 5°, 10° και 18 °C αντίστοιχα



Γράφημα 28: Μεταβολή της συγκέντρωσης (ppm) της σπερμίνης μέσα σε χρονικό διάστημα 360 Ημερών

4. Συμπεράσματα

Ο χρόνος, η θερμοκρασία και ορισμένες φορές και ο τύπος του αλλαντικού παίζουν σημαντικό ρόλο στις μικροβιολογικές και χημικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της συντήρησης των αλλαντικών αέρος και πιο συγκεκριμένα:

- ✎ Στα αλλαντικά αέρος που συντηρήθηκαν στους 18°C οι αλλαγές που παρουσίασαν στο pH, στους μικροβιακούς πληθυσμούς και στις συγκεντρώσεις των βιογενών αμινών ήταν μεγαλύτερες σε σύγκριση με αυτά που διατηρήθηκαν στους 5°C και 10°C.
- ✎ Το βιομηχανικό αλλαντικό αέρος παρουσίασε χαμηλότερη τιμή pH και a_w σε σύγκριση με το παραδοσιακό και ταυτόχρονα το βιομηχανικό αλλαντικό παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση σε τυραμίνη, πουτρεσκίνη, ισταμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη και τρυπταμίνη.
- ✎ Μετά τον θάλαμο ωρίμανσης τα αλλαντικά αέρος συνιστάται να συντηρούνται στους 5°C για την αποφυγή μεγαλύτερης συσσώρευσης των βιογενών αμινών.
- ✎ Όσο αυξάνεται ο χρόνος συντήρησης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή υπό ψύξη, είναι δυνατόν να αυξάνεται η συγκέντρωση των τριών πιο τοξικών βιογενών αμινών (τυραμίνη, φαινυλαιθυλαμίνη και ισταμίνη) με πιθανότητα να θέσουν σε κίνδυνο την ασφάλεια της υγείας (τροφική δηλητηρίαση) κάποιων ευαίσθητων καταναλωτών, όπως άτομα που χρησιμοποιούν φαρμακευτική αγωγή MAOI (π.χ αντικαταθληπτικά), άτομα με δυσανεξία στην ισταμίνη κλπ.
- ✎ Αν και τα αλλαντικά αέρος καταναλίσκονται σε μικρές ποσότητες (<50g), θα ήταν σωστό να θεσμοθετηθούν κάποια όρια ανώτερης επιτρεπόμενης συγκέντρωσης ισταμίνης σε αυτά προκειμένου να προστατευτεί η δημόσια υγεία γιατί υπάρχει μεγάλη πιθανότητα σε κάποιο αλλαντικό αέρος του εμπορίου η συγκέντρωση ισταμίνης να ξεπερνάει το προτεινόμενο για τα ζυμούμενα τρόφιμα όριο τοξικότητας (100ppm). Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται όσο το προϊόν πλησιάζει την ημερομηνία λήξης.

Βιβλιογραφία

- Acton JC, Dick RL. 1977. Cured color development during fermented sausage processing. *J Food Sci* 42:895–897.
- Alfaia, C.M., Castro, M.F., Reis, V.A., Prates, J.M., de Almeida, I.T., Correia, A.D. & Dias, M.A. (2004). Changes in the Profile of Free Amino Acids and Biogenic Amines during the Extended Short Ripening of Portuguese Dry-Cured Ham. *Food Science and Technology International*, 10(5), 297-304.
- Ambrosiadis, I., Soultos, N., Abraham, A. and Bloukas, J.G. (2004). Physicochemical, Microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Science*, 66: 279-287.
- Ansonera, D., Montel, M.C., Rokka, M., Talon, R., Eerola, S., Rizzo, A., Raemaekers M. & Demeyer, D. (2002). Analysis of biogenic amines in northern and southern European sausages and role of flora in amine production. *Meat Science*, 61(2), 141-147.
- Arena ME and Manca de Nadra MC, (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 158-162.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S. Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 100: 40-49
- Aymerich M.T, Garriga M, Monfort JM, Nes I, Hugas M. (2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: Characterization of bacteriocins. *Food Microbiol* 17(1):33–45.
- Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. *Trends in Food Science and Technology*, 6:341-346.
- Baum F., Lieckefett H., Rödel & Zunft H. (1968) Erfahrungen bei der Herstellung von Zervelatwurst mit Glucono – delta – Lactone. *Europ Meet. Meat Res. Workers. Brno, 1968. B 14, pp 315*

- Beneduce L, Romano A, Capozzi V, Lucas P, Barnavon L, Bach B, Vuchot P, Grieco F and G. Spano G, (2010). Biogenic amines in regional wines. *Ann. Microbiol.* 60 :573-578
- Beutling DM, (1996). Biogene Amine in der Ernährung. Wien - Berlin - New York, Springer.
- Blackwell B, Mabbitt LA and Marley E, (1969). Histamine and tyramine content of yeast products. *J. Food Sci.* 34 (1): 47-51.
- Botsoglou N.A., Fletouris D.J., Papageorgiou G.E., et al. (1994). Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 42: 1931 – 1937.
- Bover-Cid, S. & Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53(1), 33-41.
- Bover-Cid, S., Schoppen, S., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M.C. (1999). Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science*, 51: 305-311.
- Bover-Cid, S., (2000). Identificación de variables y medidas de control de la acumulación de aminas biógenas en productos cárnicos fermentados. Ph.D. Thesis. University of Barcelona, Spain.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M.C. (2000). Influence of Hygienic Quality of Raw Materials on Biogenic Amine Production during Ripening and Storage of Dry Fermented Sausages. *Journal of Food Protection* 63(11), 1544-1550.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. & Vidal-Carou, M.C. (2001a). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 66(3), 185-189.
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M and Vidal-Carou MC, (2001b). Effectiveness of *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *Journal of Food Protection*, 64:367–373

- Bover-Cid S, Miguélez-Arrizado, M.J, Vidal-Carou, MC.(2001c). Biogenic amine accumulation in ripened sausages influenced by the addition of sodium sulphite. *Meat Science*, 59(4): 391-396.
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Vidal-Carou MC. (2001d). Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *Int J Food Microbiol* 65(1–2):113–123.
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M and Vidal-Carou MC, (2001e). Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science*, 57:215-221.
- Bover-Cid S, Miguélez-Arrizado MJ, Latorre-Moratalla ML, Vidal-Carou MC. (2006). Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Science* 72:62–68.
- ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M. and Huis in't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 11(1), 73-84.
- Bozkurt, H. and Erkmen, O. (2004). Effects of Temperature, Humidity and Additives on the formation of Biogenic Amines in Sucuk during Ripening and Storage Periods. *Food Science and Technology International*, 10(1): 21-28.
- Chen, C.M., Lin, L.C., and Yen, G.G. (1994). Relationship between changes in biogenic amine contents and freshness of pork during storage at different temperatures. *J. Chin. Agri. Chem. Soc.*, 32:47–60.
- Chytiri S., Paleologos E., Savvaidis I and Kontominas MG, (2004). Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwaterrainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored on ice. *J. Food Prot.* 67 (5):960–965.
- Coisson JD, Cerutti C, Travaglia F, Arlorio M. (2004). Production of biogenic amines in “Salamini italiani alla cacciatora PDO.” *Meat Sci* 67:343–349.
- Coton E, Mulder N, Coton M, Pochet S, Trip H and Lolkema JS, (2010). Origin of the putrescineproducing ability of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus epidermidis* 2015B. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 5570-5576.

- Durlu-Özkaya F., Ayhan K. & Vural N. (2001). Biogenic amines produced by *Enterobacteriaceae* isolated from meat products. *Meat Science*, 58(2), 163-166.
- Edwards, R.A., Dainty, R.H., and Hibard, C.M. (1985). Putrescine and cadaverine formation in vacuum packed beef. *J. Appl. Bacteriol.*, 58:13–19.
- Eerola, S., Roig Sagues, A-X., Lilleberg, L., Aalto, H. (1997). Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage *Z Lebensm Unters Forsch A*, 205: 351-355
- EFSA (2011). Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. EFSA Panel on Biological Hazards(BIOHAZ). *EFSA Journal*, 9(10): 2393
- Fernández M, Linares DM and Alvarez MA, (2004). Sequencing of the tyrosine decarboxylase cluster of *Lactococcus lactis* IPLA 655 and the development of a PCR method for detecting tyrosinedecarboxylating lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 67: 2521–2529.
- Girard, C Bucharles, JL Berdague, M Ramihone. (1989). The influence of unsaturated fats on drying and fermentation processes in dry sausages. *Fleischwirtsch* 69:255–260.
- Gencelep, H., Kaban, G. and Kaya, M. (2007). Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Science*, 77(4), 424-430.
- González-Fernández, C., Santos, E.M., Jaime, I. & Rovira J. (2003). Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in *chorizo* dry sausage. *Food Microbiology*, 20(3), 275-284.
- Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., and Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends Food Sci. Tech.*, 5:42–49.
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, M.T., and Vidal- Carou, M.C. (1996). Biogenic amine sources in cooked cured shoulder pork. *J. Agr. Food Chem.*, 44:3097–3101.
- Houghton (1982). The Encyclopedia Americana International edition Vol 24. Danbury, Connecticut: Grolier Inc, p. 309.

- Hugas M., Neumeier B., Pagcs F., Garriga M., & Hammes WP., (1996). Die antimikrobielle Wirkung von Bakteriozin bildenden Kulturen in Fleischwaren. *Fleischwirtschaft* 76, pp 649
- Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogues, MT., Mariné Font, A. & Vidal-Carou, MC. (1999). Polyamine and biogenic amine evolution during food processing. In Bardócz, S., White A., eds. *Polyamines in health and nutrition*. London, UK: Kluwer Academic Publishers, pp. 139-159.
- Igarashi K, Ito K, Kashiwagi K., (2001). Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 152: 271 – 278.
- ISO 7954:1987 (E)., *Microbiology General guidance for enumeration of yeasts and moulds – colony count temperature at 25°C*
- ISO 6888 – 2:1999 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)
- ISO 21528-2:2004 (E), *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -Part 2- Colony-count Method*, Switzerland, 2004, International Organisation for Standardisation.
- Joosten, H.M.L.J. (1987). Conditions allowing the formation of biogenic amines in cheese: 3. Factors influencing the amounts formed. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 41, 329-357.
- Kebary, K.M.K., El-Sonbaty, A.H., and Badawi, R.M. (1999). Effects of heating milk and accelerating ripening of low fat ras cheese on biogenic amines and free amino acids development. *Food Chem.*, 64:67–75.
- Kim MK, Mah JH and Hwang HJ, (2009). Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem.* 116: 87–95.
- Kimura B, Konagaya Y and Fujii T, (2001). Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sausae. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 71-77.

- Komprda, T., Neznalova, J., Standara, S., & Bover-Cid, S. (2001). Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. *Meat Science*, 59, 267–276.
- Komprda, T.*, Smela, D., Pechova, P., Kalhotka, L., Stencl, J., Klejdus, B. (2004). Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science*, 67, 607-616.
- Komprda, T., Sládková, P. & Dohnal, V. (2009). Biogenic amine content in dry fermented sausages as influenced by a producer, spice mix, starter culture, sausage diameter and time of ripening. *Meat Science*, 83(3), 534-542.
- Kranner, P., Bauer, F. & Hellwig, E. (1991). 37th International Congress of Meat Science and Technology Kulmbach, Division 6, 12, 889.
- Lakritz, L., Spinelli, A.M., and Wasserman, A.E. (1975). Determination of amines in fresh and processed pork. *J. Agr. Food Chem.*, 23:344–346.
- Latorre-Moratalla ML, Bover-Cid S, Aymerich T, MarcosB, Vidal-Carou MC, Garriga M. (2007). Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. *Meat Science*, 75: 460–469.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S. and Vidal-Carou, M.C. (2010). Technological conditions influencing aminogenesis during spontaneous sausage fermentation. *Meat Science*, 85: 537-541.
- Latorre-Moratalla, M.L., Bover-Cid, S. Talon, R., et al., (2010a). Distribution of aminogenic activity among potential autochthonous starter cultures for dry fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 73(3): 524-528.
- Lebert I, Leroy S, Talon R, (2007). Microorganisms in Traditional Fermented Meats In F. Toldra, (Ed) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA, Blackwell Publishing Professional p 113 – 124.
- Lee YH, Kim BH, Kim JH, Yoon WS, Bang SH, Park YK (2007). CadC has a global translational effect during acid adaptation in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal Bacteriol* 189, 2417 – 2425.
- Lehane L and Olley J. (2000). Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 1-2: 1-37.

- Lücke, F-K. (1998). Fermented sausages. In B.J.B. Wood, *Microbiology of fermented foods*, (2nd ed. pp 441-483), London: Blackie Academic and Professional.
- Lorenzo, J.M., Martinez, S., Franco, I. & Carballo, J. (2008) Biogenic amine content in relation to physicochemical parameters and microbial counts in two kinds of spanish traditional sausages. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 59, 70-75.
- Maijala, R. and Eerola, S. (1993). Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*, 35 (387-395).
- Maijala, R., Eerola, S., Aho, M. Him, J. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, 56: 125-129.
- Maijala R, Eerola S, Lievonen S, Hill P, Hirvi T. (1995a). Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *Journal of Food Science*, 60(6):1187–1190.
- Maijala, R., Nurmi, E., Fischer, A. (1995b). Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Meat Science*, 39:9-22.
- Maintz L and Novak N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *American J. Clin. Nutrit.* 85, 5: 1185-1196.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 107: 148-158.
- Miguélez-Arrizado, M.J., Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L. & Vidal- Carou, M.C. (2006). Biogenic amines in Spanish fermented sausages as a function of diameter and artisanal or industrial origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(4), 549-557.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansonera, D. & Astiasarán I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 15(9), 452-457.
- Nadon, C.A. Ismond, M.A.H., and Holley, R. (2001). Biogenic amines in vacuum packaged and carbon dioxide-controlled atmosphere-packaged fresh pork stored at -1.5°C . *J. Food Protec.*, 64:220–227.

- NSSG (2007). National Statistical Service of Greece. Manufacturing products (PRODCOM). Production and sales. www.statistics.gr.
- Ordoñez, JA Hierro, EM Bruna, JM de la Hoz L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 39:329–367.
- Paleologos EK, Savvaidis IN and Kontominas MG, (2004). Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Food Microbiol.* 21, 5: 549-557.
- Papavergou E, Savvaidis I, Ambrosiadis I. (2012). Levels of biogenic amines in retail market fermented meat products. *Food Chemistry* 135 : 2750–2755
- Patterson, R.L. and Mottram, D.S. (1974). The occurrence of volatile amines in uncured and cured pork their possible role in nitrosamine formation in bacon. *J Sci Food Agric.*, 25:1419–1425.
- Paulsen, P. & Bauer, F. (1997). Biogenic amines in fermented sausages.2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft Int* 4: 32-34.
- Paulsen, J. E., Reistad, R., Eliassen, K. A., Sjaastad, O. V., & Alexander, J. (1997). Dietary polyamines promote the growth of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Carcinogenesis*, 18: 1871–1875.
- Pederson. (1979). *Microbiology of Food Fermentation*. 2nd ed. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company Inc, p. 212.
- Premont RT, Gainetdinov RR and Caron MG, (2001). Following the trace of elusive amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98: 9474–9475.
- Rawles, D.D., Flick, G.J. & Martin, R.E. (1996). Biogenic amines in fish and shellfish. *Advances in Food and Nutrition Research*, 39, 329-365.
- Rezaei M, Montazeri N, Langrudi H E, Mokhayer B, Parviz M and Nazarinia A, (2007). The biogenic amines and bacterial changes of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored in ice. *Food Chem.* 103: 150–154.

- Rhee JE, Rhee JH, Ryu PY, Choi SH (2002). Identification of the cadBA operon from *Vibrio vulnificus* and its influence on survival to acid stress. *FEMS Microbiol Lett* 208: 245 – 251.
- Roig Sagués, A.X., Hernández-Herrero, M., López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J & Mora-Ventura, M.T. (1996). Histidine Decarboxylase Activity of Bacteria Isolated from Raw and Ripened *Salchichón* a Spanish Cured Sausage. *Journal of Food Protection*, 59(5): 516-520.
- Ruiz-Capillas, C. and Jiménez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in Meat and Meat Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(7-8): 489-499.
- Schillinger U., Lücke F.K., (1990). Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischwirtschaft* 70, 1296 – 1299.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, Pr., Genigeorgis, C. (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 171-177.
- Sergelidis D., Abraham A., Anagnostou V., Papa A., Papadopoulos Th., (2010) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* spp. in ready-to-eat salads (dips), the environment and the personnel of a salad processing plant in Northern Greece. *Journal of Hellenic veterinary medical society*, 61(4): 308-315
- Shalaby AR, (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29, 7: 675-690.
- Silla, M.H. (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 29:213–231.
- Smith, J.S., Kenney, P.B., Kastner, C.L., and Moore, M.M. 1993. Biogenic amines formation in fresh vacuum-packaged beef during storage at 1°C for 120 days. *J. Food Protect.*, 56:497–500, 532.
- Spano,G., Russo, P., Lonvaut-Funel, A. et al. (2010). Risk assessment of biogenic amines in fermented food. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 95-100.

- Stockley's Drug Interactions. (2011). The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. (Downloaded on 27 April 2011: www.medicinescomplete.com/mc/stockley/current/x18-1097.htm).
- Straub, BW, Tichaczek, PS et al., (1994). Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* LTH-972. *Z Lebensm Unters Forsh A*, 199: 9-12.
- Suzzi, G. & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88(1), 41-54.
- Swanson, K. M. J., Petran, R. L. and Hanlin, J.H., (2001). Culture Methods for enumeration of microorganisms. In F. P. Downes & K. Ito, *Compendium of Methods for the microbiological examination of foods* (4th ed), Washington, USA: American Public Health Association (APHA), p. 53-62.
- Talon, R. & Leroy, S. (2006). Latest developments in meat bacterial starters. In : L.M.L. Nollet and F.Toldra, (Eds). *Advanced technologies for meat processing*, CRC Press/Taylor and Francis Group, New York, pp 401-818.
- Til HP, Falke HE, Prinsen MK and Willems MI, (1997). Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. *Food Chem. Toxicol.* 35, 3-4: 337-348.
- Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, 187 - 216
- Vidal-Carou, MC., Veciana-Nogues, MT., Latorre-Moratala, ML. and Bover-Cid, S.(2007). Biogenic Amines:Risks and Control. In F. Toldra, (Ed) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA, Blackwell Publishing Professional pp. 455-468.
- Warthensen, J.J., Scanlan, R.A., Bills, D.D., and Libbely, L.M. (1975). Formation of heterocyclic N-nitrosamines from the reaction of nitrite and selected primary diamines and amino acids. *J. Agr. Food Chem.*, 23:898-902.
- Wolter, F., Ulrich, S., & Stein, J. (2004). Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in colorectal cancer: key role of polyamines. *Journal of Nutrition*, 134: 3219-3222.
- Wortberg, B. and Woller, R. (1982). Quality and freshness of meat and meat products

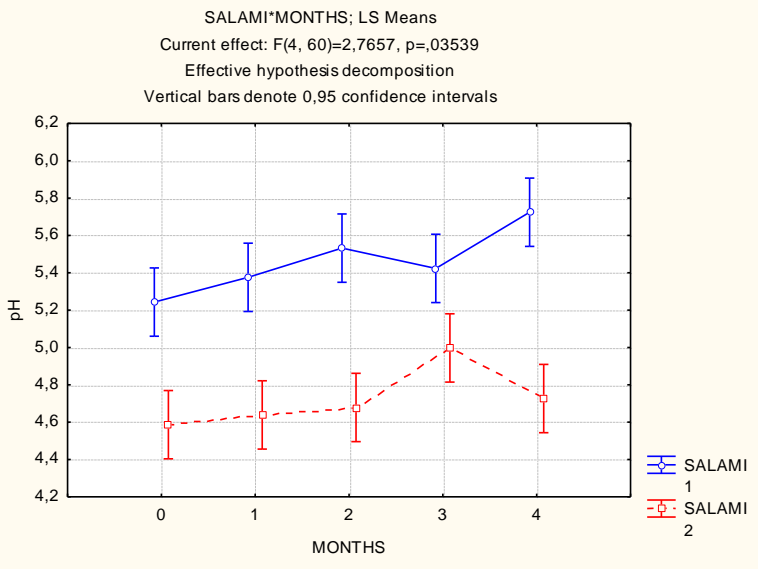
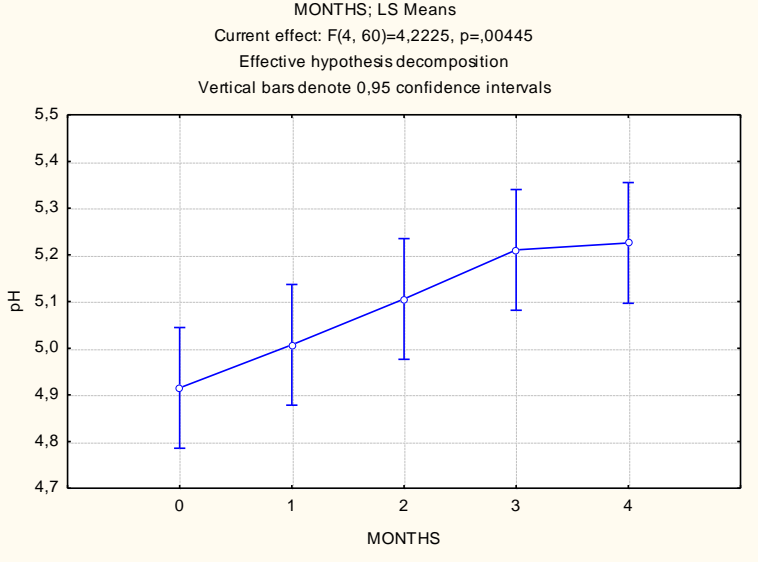
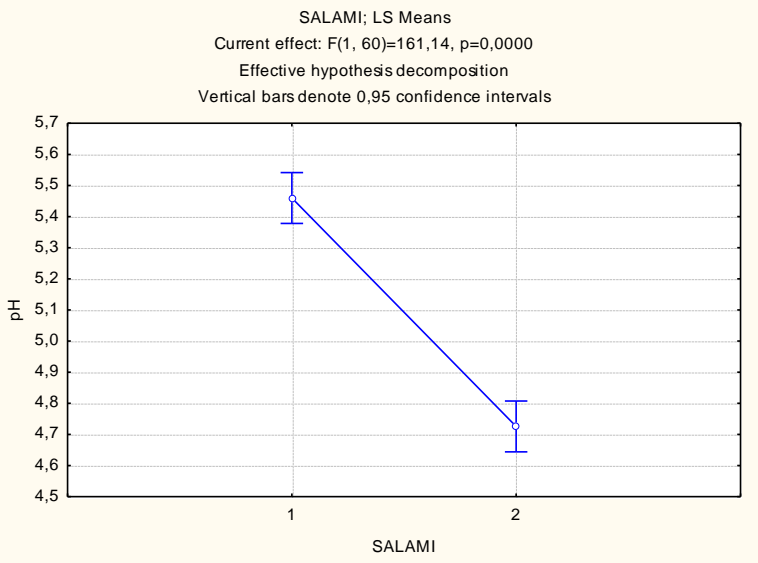
- as related to their content of biogenic amines. *Fleischwirtsch*, 62:1457–1463.
- Zeuthen P (2007). A Historical Perspective of Meat Fermentation. In F. Toldra, (Ed) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA, Blackwell Publishing Professional pp. 3 - 8.
- Αμβροσιάδης, Ι. (2000) Τεχνολογία παραγωγής προϊόντων κρέατος στο Σ.Α. Γεωργάκη, Κ.Π. Βαρελτζή, Ι.Α. Αμβροσιάδη, Τεχνολογία τροφίμων ζωικής προέλευσης, Θεσσαλονίκη : Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, σελ. 418 – 461
- Αμβροσιάδης, Ι. & Γεωργάκης, Σ.Α. (2005). Τεχνολογία παραγωγής προϊόντων κρέατος. Στο Σπ. Α. Γεωργάκη, Το κρέας και τα προϊόντα του (παραγωγή εμπορία, τεχνολογία, υγιεινή), Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, σελ. 746-756
- Μπλούκας Ι (1998). Τεχνολογία. Κρέατος, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Α.Π.Θ Υπηρεσία Δημοσιευμάτων σελ. 129-133 & 267 – 317
- Κανονισμός Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Κ) 2073/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, *περί Μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα*, Βρυξέλλες 2005.
- Κανονισμός Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Κ) 1441/2007 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, *τροποποίηση του κανονισμού 2073/2005 περί Μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα*, Βρυξέλλες 2007.

Παράρτημα

Πίνακες και γραφήματα από την στατιστική ανάλυση

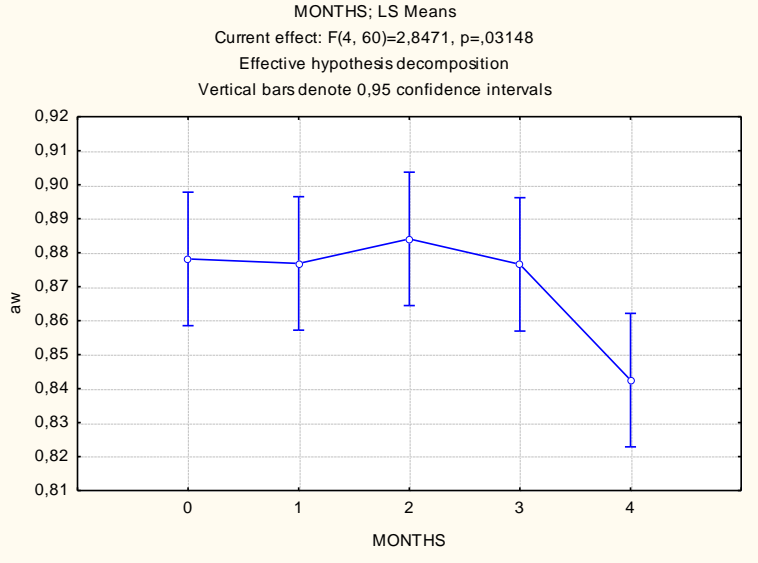
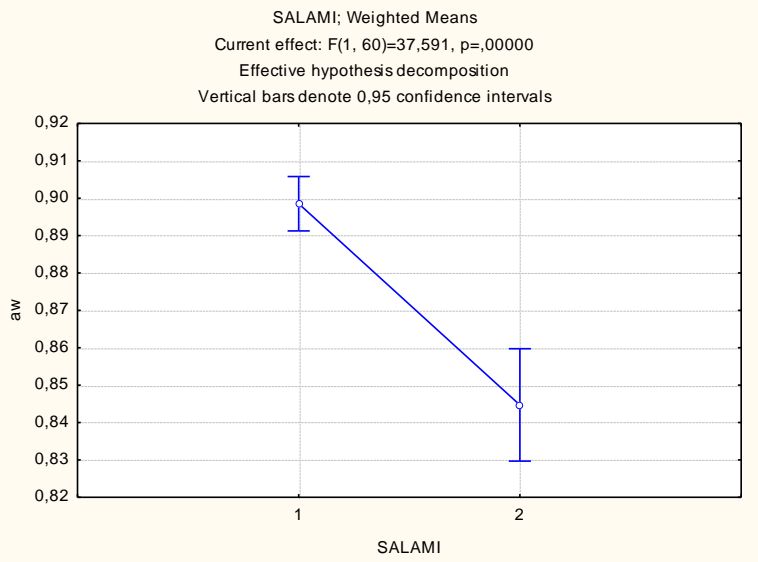
Univariate Tests of Significance for pH (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2334,275	1	2334,275	31028,97	0,000000
SALAMI	12,122	1	12,122	161,14	0,000000
TEMP	0,290	2	0,145	1,93	0,154510
MONTHS	1,271	4	0,318	4,22	0,004453
SALAMI*TEMP	0,066	2	0,033	0,44	0,645850
SALAMI*MONTHS	0,832	4	0,208	2,77	0,035388
TEMP*MONTHS	0,276	8	0,034	0,46	0,880465
SALAMI*TEMP*MONTHS	0,339	8	0,042	0,56	0,803160
Error	4,514	60	0,075		



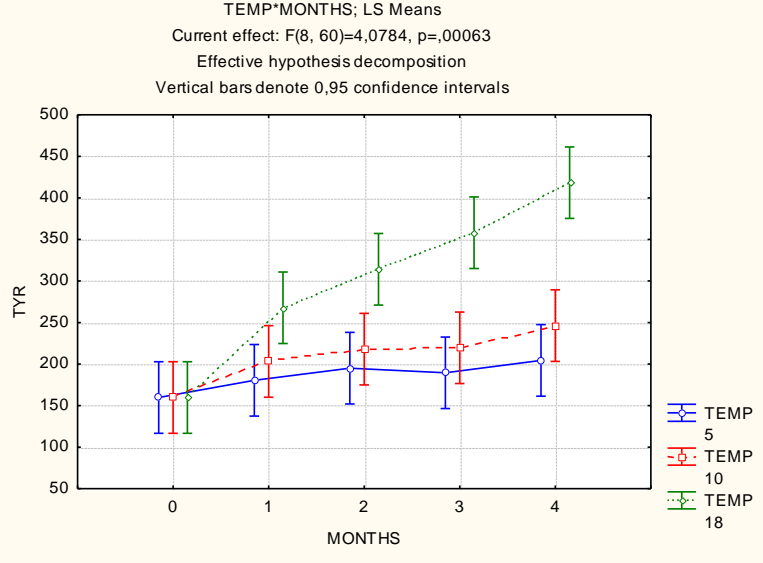
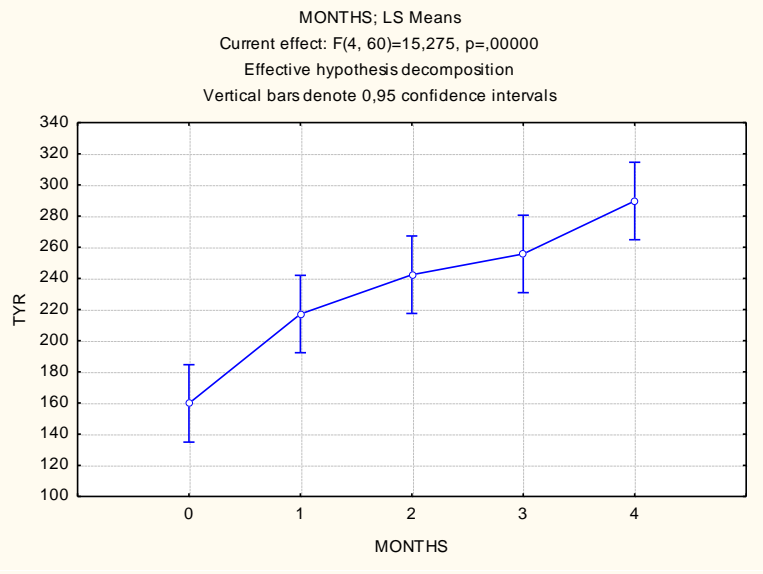
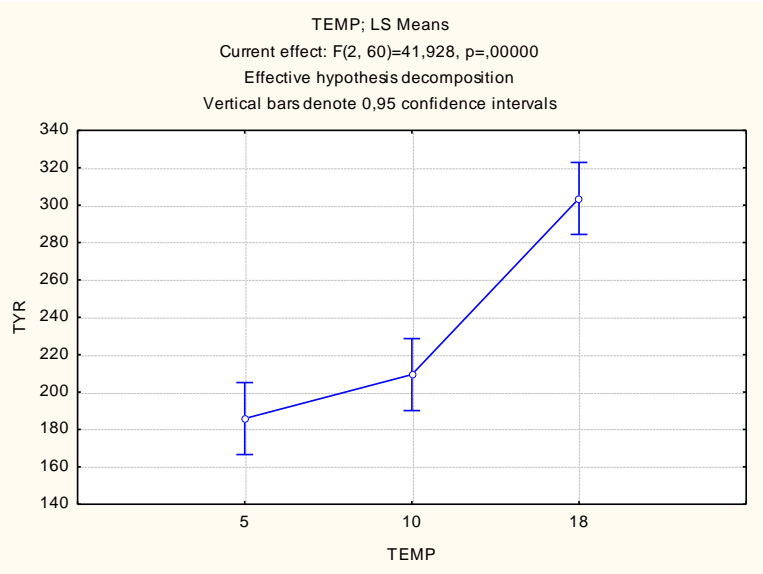
Univariate Tests of Significance for aw (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	68,37528	1	68,37528	39434,89	0,000000
SALAMI	0,06518	1	0,06518	37,59	0,000000
TEMP	0,00257	2	0,00129	0,74	0,480242
MONTHS	0,01975	4	0,00494	2,85	0,031482
SALAMI*TEMP	0,00024	2	0,00012	0,07	0,932162
SALAMI*MONTHS	0,00719	4	0,00180	1,04	0,395898
TEMP*MONTHS	0,00120	8	0,00015	0,09	0,999474
SALAMI*TEMP*MONTHS	0,00095	8	0,00012	0,07	0,999776
Error	0,10403	60	0,00173		



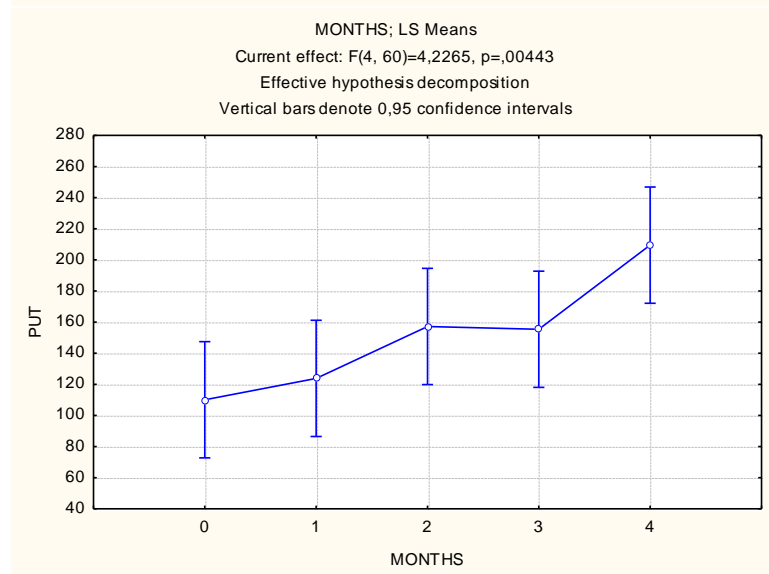
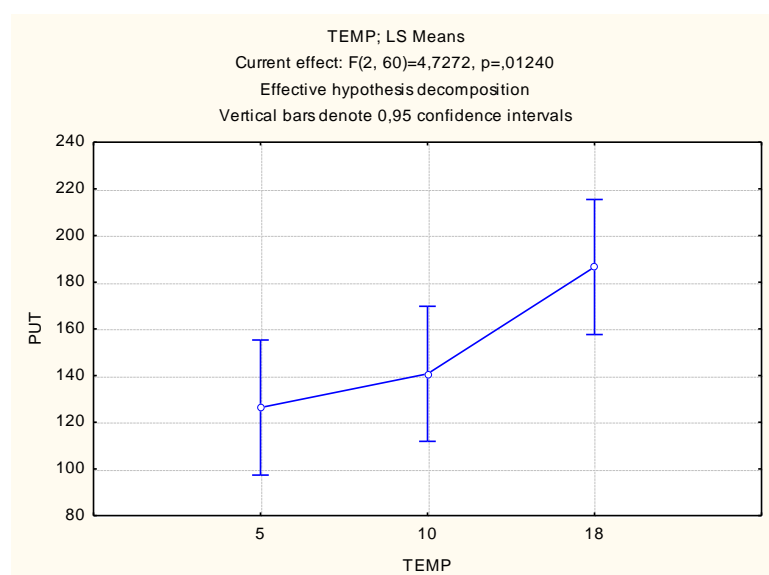
Univariate Tests of Significance for TYR (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

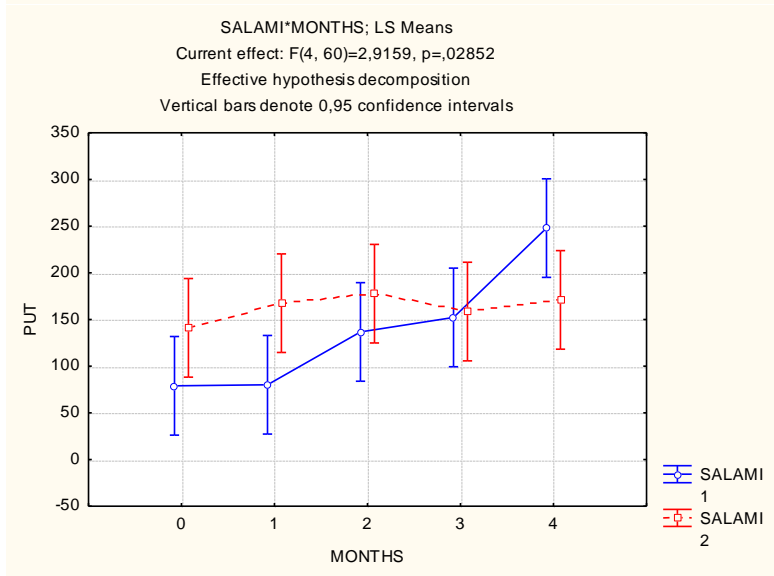
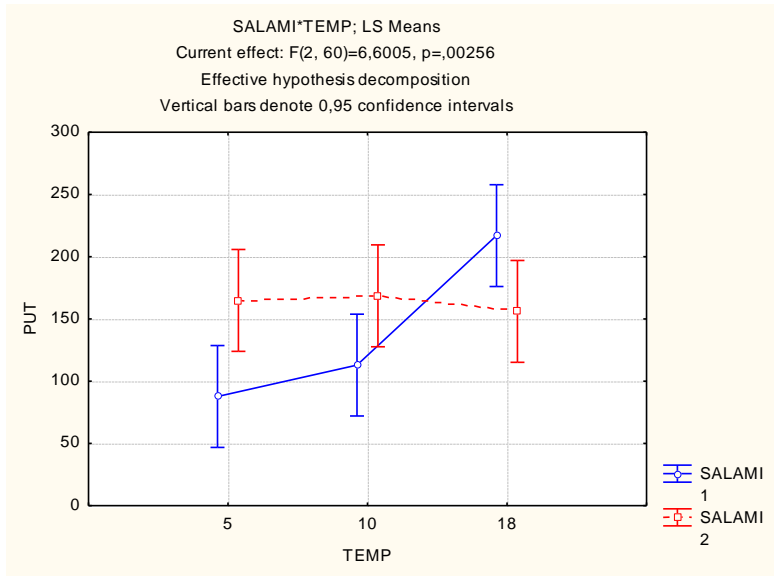
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	4883033	1	4883033	1757,004	0,000000
SALAMI	127	1	127	0,046	0,831454
TEMP	233051	2	116525	41,928	0,000000
MONTHS	169806	4	42451	15,275	0,000000
SALAMI*TEMP	1105	2	553	0,199	0,820220
SALAMI*MONTHS	3547	4	887	0,319	0,864153
TEMP*MONTHS	90677	8	11335	4,078	0,000629
SALAMI*TEMP*MONTHS	1181	8	148	0,053	0,999915
Error	166751	60	2779		



Univariate Tests of Significance for PUT (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

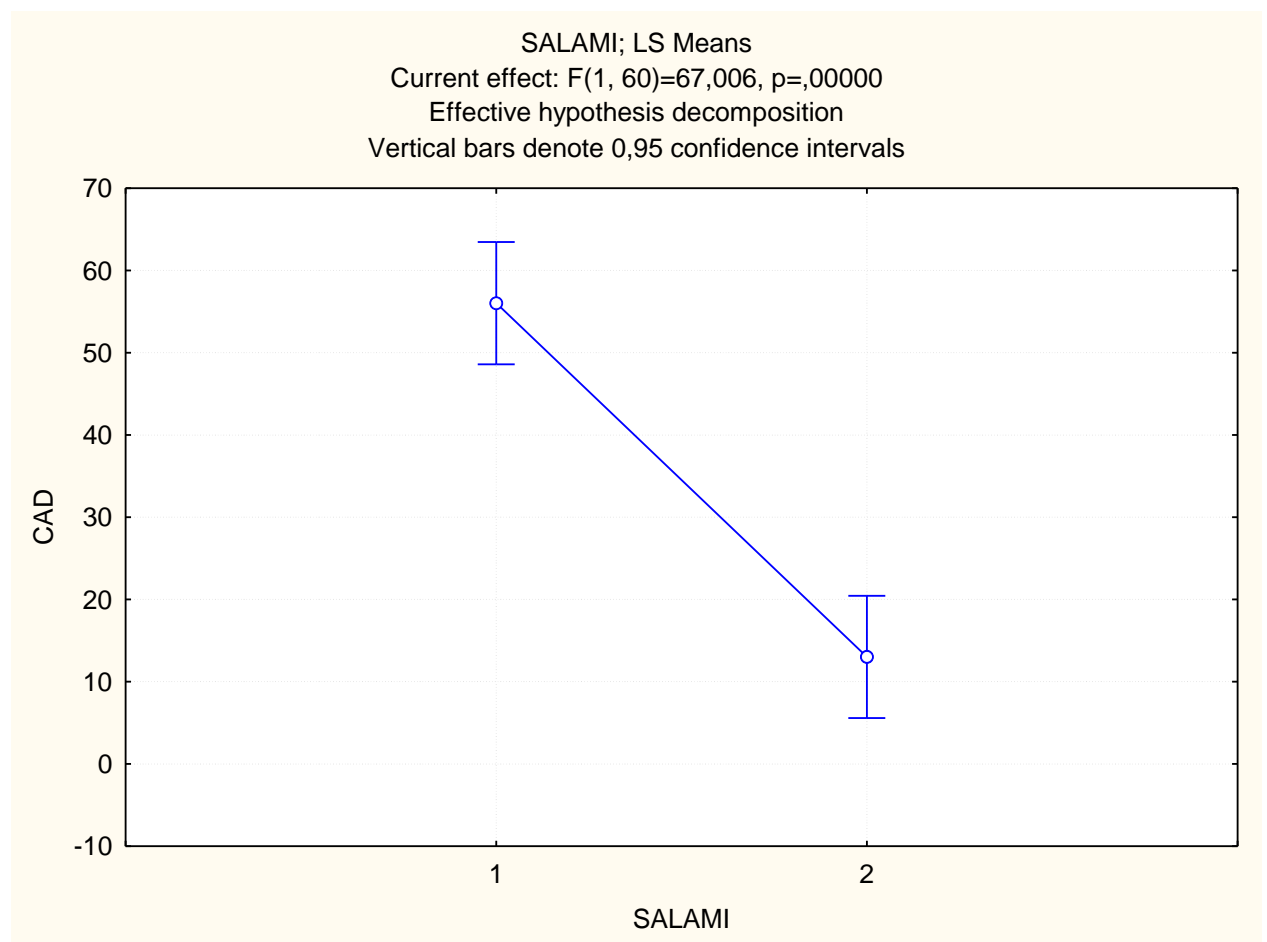
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	2057645	1	2057645	328,0536	0,000000
SALAMI	12935	1	12935	2,0622	0,156188
TEMP	59300	2	29650	4,7272	0,012404
MONTHS	106040	4	26510	4,2265	0,004428
SALAMI*TEMP	82800	2	41400	6,6005	0,002565
SALAMI*MONTHS	73158	4	18289	2,9159	0,028519
TEMP*MONTHS	45213	8	5652	0,9011	0,521617
SALAMI*TEMP*MONTHS	56799	8	7100	1,1320	0,355520
Error	376337	60	6272		





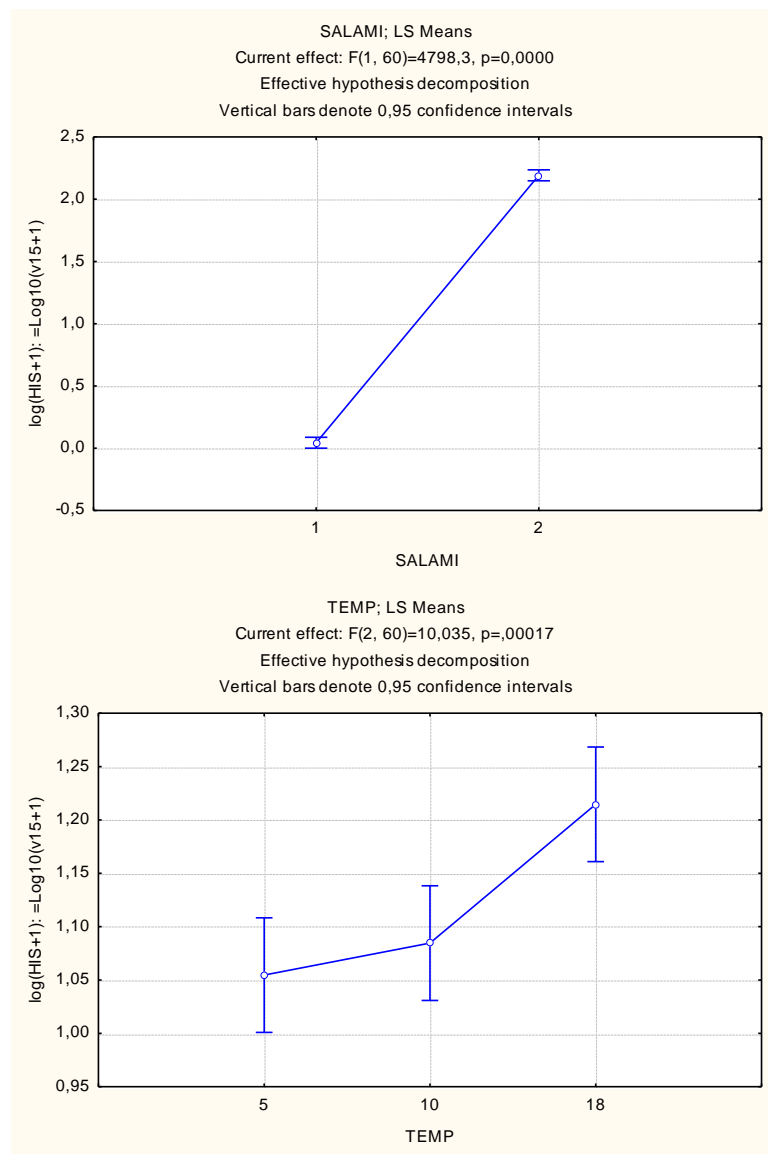
Univariate Tests of Significance for CAD (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

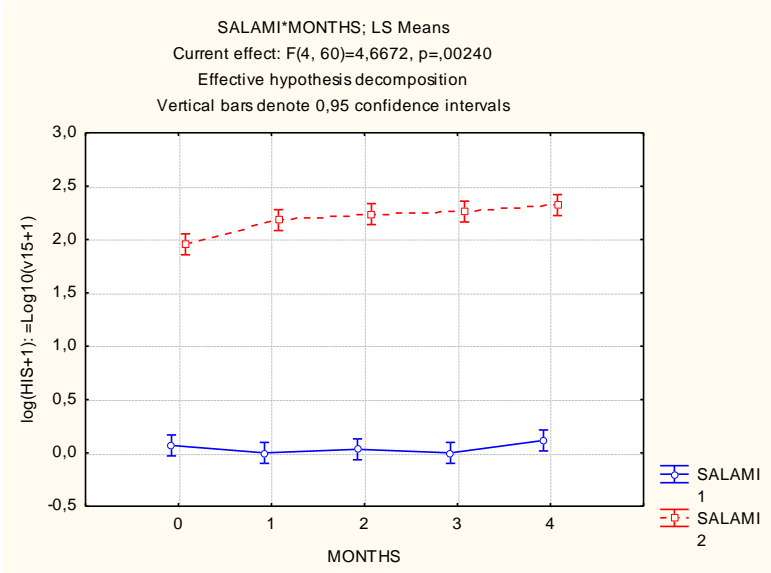
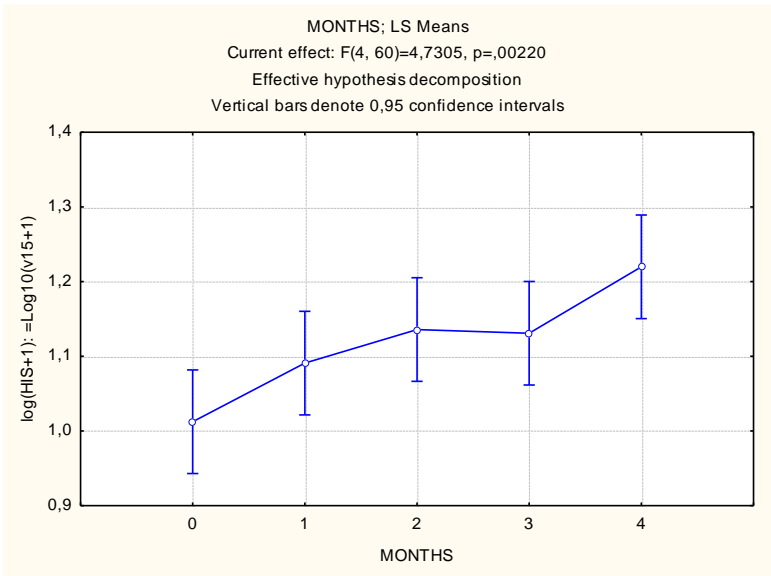
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	107295,8	1	107295,8	172,7366	0,000000
SALAMI	41621,0	1	41621,0	67,0061	0,000000
TEMP	1954,6	2	977,3	1,5734	0,215779
MONTHS	1628,8	4	407,2	0,6556	0,625253
SALAMI*TEMP	2929,2	2	1464,6	2,3579	0,103332
SALAMI*MONTHS	1651,8	4	413,0	0,6648	0,618891
TEMP*MONTHS	2700,1	8	337,5	0,5434	0,819110
SALAMI*TEMP*MONTHS	2529,4	8	316,2	0,5090	0,844917
Error	37269,1	60	621,2		



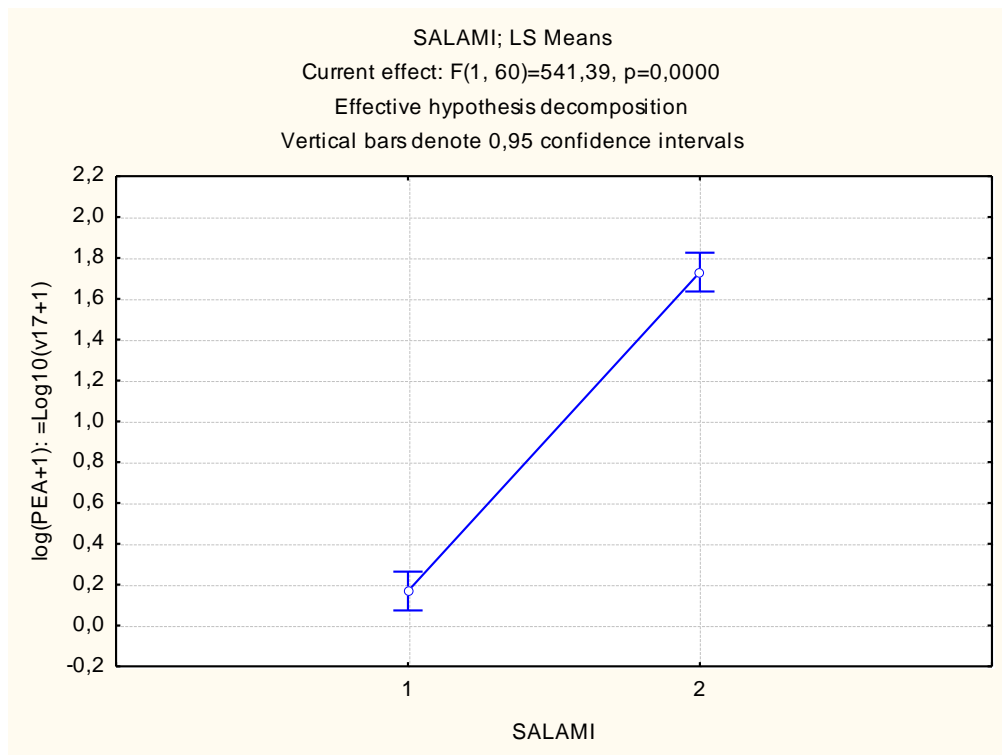
Univariate Tests of Significance for log(HIS+1) (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition

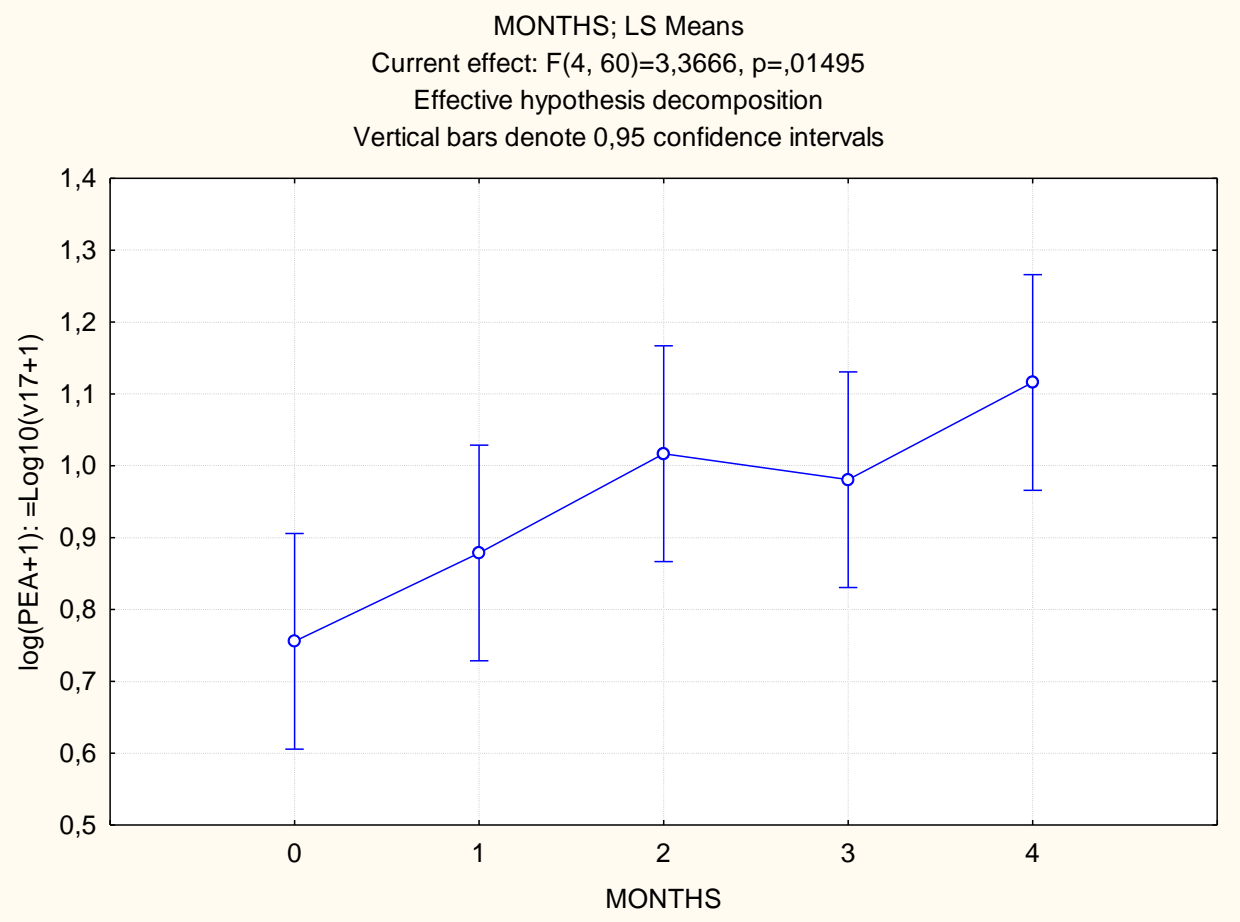
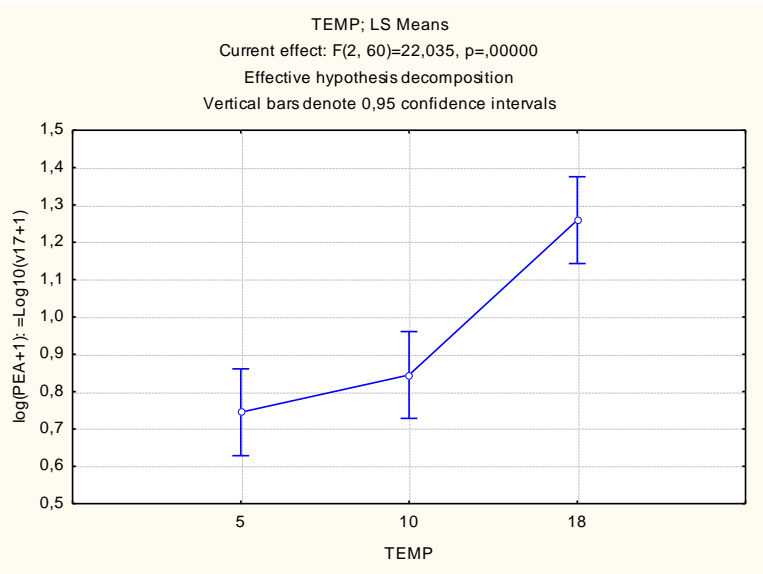
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	112,4856	1	112,4856	5200,099	0,000000
SALAMI	103,7944	1	103,7944	4798,311	0,000000
TEMP	0,4341	2	0,2171	10,035	0,000174
MONTHS	0,4093	4	0,1023	4,731	0,002198
SALAMI*TEMP	0,1232	2	0,0616	2,848	0,065815
SALAMI*MONTHS	0,4038	4	0,1010	4,667	0,002399
TEMP*MONTHS	0,2382	8	0,0298	1,377	0,225205
SALAMI*TEMP*MONTHS	0,0934	8	0,0117	0,540	0,822028
Error	1,2979	60	0,0216		





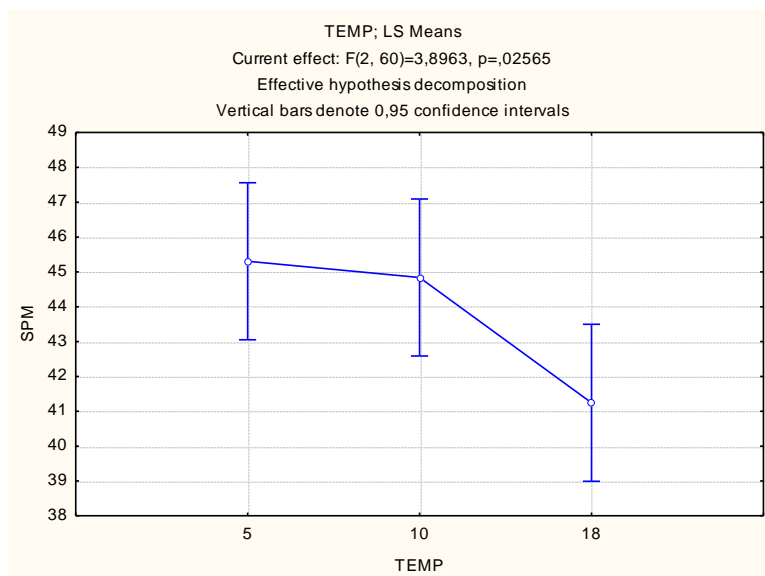
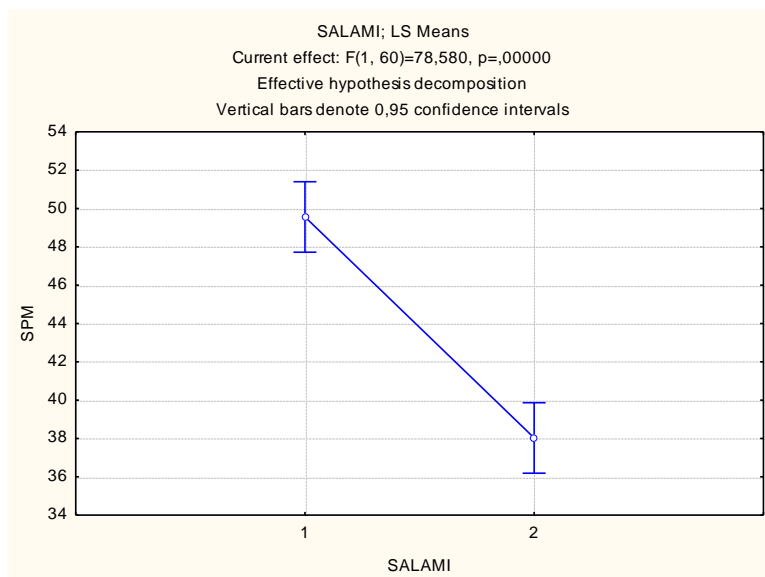
Univariate Tests of Significance for log(PEA+1) (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	81,15226	1	81,15226	800,7053	0,000000
SALAMI	54,87071	1	54,87071	541,3931	0,000000
TEMP	4,46659	2	2,23330	22,0353	0,000000
MONTHS	1,36485	4	0,34121	3,3666	0,014952
SALAMI*TEMP	0,23813	2	0,11907	1,1748	0,315886
SALAMI*MONTHS	0,77388	4	0,19347	1,9089	0,120617
TEMP*MONTHS	1,66192	8	0,20774	2,0497	0,055425
SALAMI*TEMP*MONTHS	0,32896	8	0,04112	0,4057	0,912971
Error	6,08106	60	0,10135		

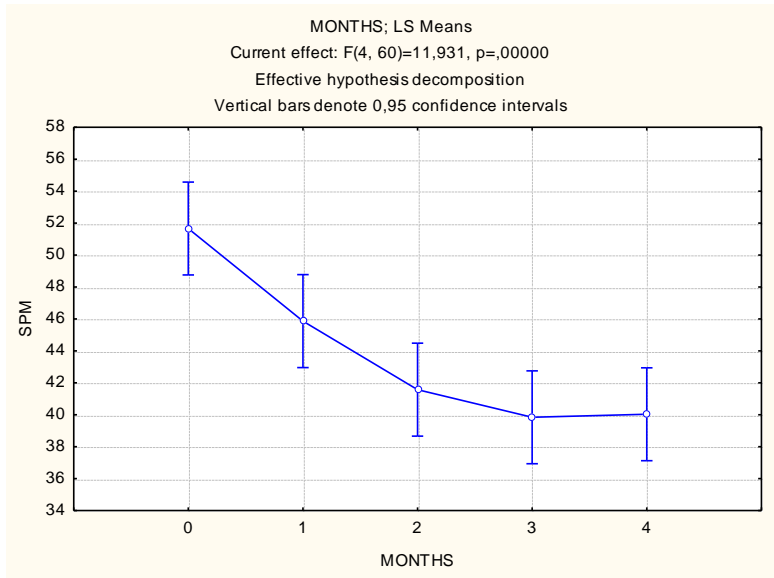




Univariate Tests of Significance for SPM (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	172629,8	1	172629,8	4535,288	0,000000
SALAMI	2991,1	1	2991,1	78,580	0,000000
TEMP	296,6	2	148,3	3,896	0,025649
MONTHS	1816,6	4	454,1	11,931	0,000000
SALAMI*TEMP	26,8	2	13,4	0,352	0,704986
SALAMI*MONTHS	79,4	4	19,9	0,522	0,720131
TEMP*MONTHS	137,9	8	17,2	0,453	0,883903
SALAMI*TEMP*MONTHS	55,9	8	7,0	0,184	0,992311
Error	2283,8	60	38,1		





Univariate Tests of Significance for SPD (Spreadsheet11) Sigma-restricted parameterization
Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of - Freedom	MS	F	p
Intercept	1740,552	1	1740,552	689,7256	0,000000
SALAMI	1,898	1	1,898	0,7521	0,389255
TEMP	55,726	2	27,863	11,0412	0,000083
MONTHS	42,882	4	10,720	4,2482	0,004296
SALAMI*TEMP	3,008	2	1,504	0,5960	0,554217
SALAMI*MONTHS	17,460	4	4,365	1,7297	0,155256
TEMP*MONTHS	32,363	8	4,045	1,6030	0,143080
SALAMI*TEMP*MONTHS	7,377	8	0,922	0,3654	0,934703
Error	151,413	60	2,524		

