



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ

**ΚΙΝΗΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΚΡΕΑΤΟΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΧΡΟΝΟΥ
ΖΩΗΣ ΤΟΥΣ**

**STUDY OF KINETICS OF SPOILAGE AND SHELF LIFE DETERMINATION FOR MEAT
PRODUCTS**



**ΟΝΟΜΑΤΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΩΝ/NAME OF THE STUDENTS:
ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΜΠΑΡΔΑΚΟΥ - EVANGELIA BARDAΚΟΥ
ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΧΟΤΖΑ - CHRISTINA HOTZA**

**ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR
ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΚΟΝΤΕΛΕΣ - SPYRIDON KONTELES**

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2023

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο **‘Κινητικές αλλοιώσεις κρεατοσκευασμάτων και προσδιορισμός του χρόνου ζωής τους’** που παρουσιάστηκε από τις Μπαρδάκου Ευαγγελία και Χότζα Χριστίνα και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

Όνομα επιβλέποντος

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Ημερομηνία

Όνομα μέλους επιτροπής

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Όνομα φοιτητή
ΜΠΑΡΔΑΚΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ



Όνομα φοιτητή
ΧΟΤΖΑ ΧΡΙΣΤΙΝΑ



Ευχαριστίες

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μας εργασία, θα θέλαμε να εκφράσουμε τις θερμές μας ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της. Αρχικά, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τον επιβλέποντα καθηγητή μας τον κύριο Σπύρο Κοντελέ για την εμπιστοσύνη που μας έδειξε εξ' αρχής, την επιστημονική του καθοδήγηση, την επίβλεψη και την αξιότιμη συμβολή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα θέλαμε να δώσουμε στην υποψήφια Δρ. Ναταλία Σταυροπούλου για την πολύτιμη υποστήριξη, βοήθεια και παροχή γνώσεων καθόλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε όλα τα παιδιά του εργαστηρίου Μικροβιολογίας, Κατερίνα, Γιώργο, Μαρία, Γιάννη, Συμεών και Μαριλένα, για την συνεχή βοήθειά τους όταν και όπου μας χρειαζόταν και μας ήταν απαραίτητη, καθώς και την καθηγήτρια κυρία Μαρία Γιαννακούρου για την πολύτιμη συμβολή της στην έναρξη αυτής της εργασίας. Τέλος, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τις οικογένειές μας για την συμπαράσταση και την στήριξή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μας.

Περίληψη

Γενικά, η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων, η σύνθεση του τροφίμου και οι συνθήκες αποθήκευσης παίζουν καθοριστικό ρόλο στην κινητική αλλοίωσης του. Η κινητική της μικροβιακής αλλοίωσης εστιάζεται στον ρυθμό με τον οποίο ομάδες ή μεμονωμένοι μικροοργανισμοί αλλοίωσης αναπτύσσονται και υποβαθμίζουν τα τρόφιμα. Αυτές οι κινητικές συχνά ακολουθούν μια σιγμοειδή καμπύλη, που χαρακτηρίζεται από την φάση προσαρμογής, την φάση λογαριθμικής ανάπτυξης και την στατική φάση. Παράμετροι όπως ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (μ) και ο χρόνος προσαρμογής (λ) ποσοτικοποιούνται χρησιμοποιώντας μαθηματικά μοντέλα όπως το μοντέλο Baranyi.

Σε αυτή τη μελέτη, εμπορικά παρασκευασμένο μπέικον σε φέτες και συσκευασμένο σε κενό διατηρήθηκε σε τρεις ισοθερμικές θερμοκρασίες 5, 10 και 15°C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, λήφθηκαν δείγματα και αναλύθηκαν μικροβιολογικά για τις ακόλουθες ομάδες μικροοργανισμών, Aerobic Plate Count, Lactic Acid Bacteria, *Carnobacterium* spp. και *Clostridium* spp. Σε όλα τα δείγματα και τις ομάδες μικροοργανισμών που παρακολουθήθηκαν το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν υψηλό, της τάξης των 10^4 - 10^6 cfu/g. Ως ομάδα μικροοργανισμών δείκτη αλλοίωσης, επιλέχθηκαν βακτήρια Γαλακτικού Οξέος και χρησιμοποιώντας την διαδικτυακή βάση δεδομένων Combase και την κατάλληλη εξίσωση προσέγγισης - με βάση το μοντέλο Baranyi - υπολογίστηκε η διάρκεια ζωής του μπέικον, υπό ισοθερμικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, λήφθηκε διάρκεια ζωής 9 ημερών για τα δείγματα μπέικον που αποθηκεύτηκαν στους 5°C και 4 ημέρες για τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 10°C.

Λέξεις-κλειδιά: κρεατοσκευάσματα, μπέικον, συσκευασία υπό κενό, αλλοίωση, Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, οξυγαλακτικά βακτήρια, *Carnobacterium* spp., *Clostridium* spp., ComeBase

Abstract

In general, the effect of environmental factors, product composition and storage conditions play a decisive role in the spoilage kinetics of a product. Microbial spoilage kinetics focus on the rate at which groups or individual spoilage microorganisms grow and degrade food products. These kinetics often follow a sigmoidal curve, characterized by lag, log, and stationary phases. Parameters such as specific growth rate (μ) and lag time (λ) are quantified using mathematical models like the Baranyi model Spoilage.

In this study commercially prepared sliced and vacuum-packed bacon was preserved at three isothermal temperatures of 5, 10 and 15°C. At regular intervals, samples were taken and microbiologically analyzed for the following groups of microorganisms, Aerobic Plate Count, Lactic Acid Bacteria, *Carnobacterium* spp. and *Clostridium* spp. In all samples and groups of microorganisms monitored the initial microbial load was high, in the order of 10^4 - 10^6 cfu/g. As a group of spoilage indicator microorganisms, Lactic Acid Bacteria were selected and using the Combase online database and the appropriate approximation equation, - based on the Baranyi model - the shelf life of bacon was calculated, under isothermal conditions. In particular, a shelf life of 9 days was obtained for the bacon samples stored at 5°C and 4 days for the samples stored at 10°C.

key-words: meat products, bacon, vacuum packaging, spoilage, Aerobic Plate Count, lactic acid bacteria, *Carnobacterium* spp., *Clostridium* spp., ComeBase.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Κατάλογος Πινάκων	9
Κατάλογος Εικόνων	9
Κατάλογος Διαγραμμάτων	10
Κεφάλαιο 1	12
1.1 Εισαγωγή	12
1.2 Κρεατοσκευάσματα	13
1.2.1 Ταξινόμηση προϊόντων κρέατος	13
1.3 Μπέικον	15
1.4 Μικροβιακές αλλοιώσεις μπέικον	16
1.5 Κυριότερες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην αλλοίωση του μπέικον	16
1.5.1 Ολική Μεσόφιλη Μικροχλωρίδα	16
1.5.2 Lactic Acid Bacteria	17
1.5.3 Carnobacterium spp.	18
1.5.4 Clostridium spp.	18
1.6 Υποστρώματα	19
1.6.1 Plate Count Agar - PCA	19
1.6.2 MRS Agar	20
1.6.3 Carnobacterium Selective Agar Base (CTAS Agar Base)	21
1.6.4 Reinforced Clostridial Agar (RCA)	22
1.7 Συσκευασία υπό κενό	23
1.8 Σκοπός Εργασίας	25
Κεφάλαιο 2	26
Υλικά και Μέθοδοι	26
2.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών	26
2.1.1 Παρασκευή Plate Count Agar	27
2.1.2 Παρασκευή MRS	28
2.1.3 Παρασκευή CTA	30
2.1.4 Παρασκευή CLO	32
2.2 Μικροβιολογικές τεχνικές	33
2.2.1 Παρασκευή Ringer	33
2.2.2 Δειγματοληψία	34
2.2.3 Εμβολιασμός Θρεπτικών Υποστρωμάτων	36
2.2.3.1 Τεχνική επίστρωσης (spread plating)	36
2.2.3.2 Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plating)	37
2.2.4 Μέτρηση pH	37
2.3 Αποστείρωση θρεπτικών μέσων και άλλων υλικών	40
2.4 Καταμέτρηση αποικιών	41
2.5 Μεθοδολογία υπολογισμού διάρκειας ζωής υπό σταθερές θερμοκρασίες	44
Κεφάλαιο 3	47
Αποτελέσματα και συζήτηση	47

3.1 Ατιολόγηση επιλογής πειραματικών συνθηκών	47
3.2 Επεξήγηση πειραματικών αποτελεσμάτων	48
3.2.1 Εξέλιξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας	48
3.2.2 Εξέλιξη της της οξυγαλακτικής χλωρίδας	51
3.2.3 Εξέλιξη του πληθυσμού <i>Carnobacterium</i> spp.	54
3.2.4 Εξέλιξη του πληθυσμού <i>Clostridium</i> spp.	57
3.3 Εκτίμηση διάρκειας ζωής υπό σταθερές θερμοκρασίες – ισόθερμο	61
3.4 Αποτελέσματα pH	63
3.4.1 Μεταβολές των τιμών pH στα δείγματα μπέικον.	63
Συμπεράσματα	66
Βιβλιογραφία	67
Πηγές Εικόνων	69

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 3.1: Πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Προϊόντα κρέατος συσκευασμένα υπό κενό (πάνω: καπρικό, κάτω: μπέικον)

Εικόνα 2.1: Εμβολιασμένα Θρεπτικά Υπόστρώματα

Εικόνα 2.2: Αποικίες βακτηρίων της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε θρεπτικό υπόστρωμα PCA στο τρυβλίο petri

Εικόνα 2.3: Αποικίες Οξυγαλακτικών βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS στο τρυβλίο petri

Εικόνα 2.4: Αποικίες βακτηρίων *Carnobacterium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα CTA στο τρυβλίο petri

Εικόνα 2.5: Αποικίες βακτηρίων *Clostridium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα Reinforced *Clostridium* Agar στο τρυβλίο petri

Εικόνα 2.6: Το pH-μετρο

Εικόνα 2.7: Αποστειρωτήρας

Εικόνα 2.8: Μηχάνημα καταμέτρησης αποικιών

Εικόνα 2.9: Εικόνα από την ComeBase – εισαγωγή των δεδομένων.

Εικόνα 2.10: Εικόνα από την ComeBase – εμφάνιση της καμπύλης του μοντέλου και των δεδομένων της καμπύλης.

Κατάλογος Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 3.1: Μεταβολή του πληθυσμού της ΟΜΧ (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.2: Μεταβολή του πληθυσμού της ΟΜΧ (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.3: Μεταβολή του πληθυσμού της ΟΜΧ (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.4: Μεταβολή του πληθυσμού της Οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.5: Μεταβολή του πληθυσμού της Οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.6: Μεταβολή του πληθυσμού της Οξυγαλακτικής χλωρίδας (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.7: Μεταβολή του πληθυσμού των *Carnobacterium* spp. μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.8: Μεταβολή του πληθυσμού των *Carnobacterium* spp. μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.9: Μεταβολή του πληθυσμού των *Carnobacterium* spp. μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.10: Μεταβολή του πληθυσμού των *Clostridium* spp. μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.11: Μεταβολή του πληθυσμού των *Clostridium* spp. μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.12: Μεταβολή του πληθυσμού των *Clostridium* spp. μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Διάγραμμα 3.13 Το μοντέλο Baranyi & Roberts – complete model από την διαδικτυακή πηγή μικροβιολογικών δεδομένων Combase που χρησιμοποιήθηκε για την θεωρητική εκτίμηση διάρκειας ζωής των δειγμάτων μπέικον που συντηρήθηκαν στους 5°C.

Διάγραμμα 3.14 Το μοντέλο Baranyi & Roberts – complete model από την διαδικτυακή πηγή μικροβιολογικών δεδομένων Combase που χρησιμοποιήθηκε για την θεωρητική εκτίμηση διάρκειας ζωής των δειγμάτων μπέικον που συντηρήθηκαν στους 10°C.

Διάγραμμα 3.15 Μεταβολές του pH για τα δείγματα μπέικον που διατηρήθηκαν στους θερμοκρασία 5°C.

Διάγραμμα 3.16 Μεταβολές του pH για τα δείγματα μπέικον που διατηρήθηκαν στους θερμοκρασία 10°C.

Διάγραμμα 3.17 Μεταβολές του pH για τα δείγματα μπέικον που διατηρήθηκαν στους θερμοκρασία 15°C.

Κεφάλαιο 1

1.1 Εισαγωγή

Η ραγδαία αύξηση του πληθυσμού στον πλανήτη μας και η βελτίωση του βιοτικού επιπέδου του ανθρώπου δημιούργησε την ανάγκη να παράγονται όλο και μεγαλύτερες ποσότητες τροφίμων. Τα τρόφιμα πολλές φορές χρειάζεται να ταξιδέψουν σε μακρινές αποστάσεις για να καλύψουν τις ανάγκες της παγκοσμιοποιημένης αγοράς. Αποτέλεσμα αυτού αποτελεί, η ανάγκη του προσδιορισμού του χρόνου ζωής έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι το προϊόν θα είναι ποιοτικά άρτιο κατά την παραλαβή του από τον καταναλωτή.

Ειδικότερα, η ποιότητα των επεξεργασμένων τροφίμων δεν είναι απλή ιδιότητα. Δεν εξαρτάται μόνο από την αρχική ακεραιότητα των πρώτων υλών αλλά και από τις αλλαγές που συμβαίνουν κατά την επεξεργασία και την επακόλουθη αποθήκευση που μπορεί να οδηγήσουν σε πιθανές απώλειες και μειωμένη ποιότητα. Ως εκ τούτου, η ποιότητα είναι ένα χαρακτηριστικό των τροφίμων στο οποίο είναι κατανοητό ότι εστιάζεται μεγάλη προσοχή. Η ποιότητα των τροφίμων μπορεί να οριστεί ως το σύνολο των ιδιοτήτων που διαφοροποιούν τις μεμονωμένες μονάδες και επηρεάζουν τον βαθμό αποδοχής του τροφίμου από τον καταναλωτή ή τον χρήστη. Επομένως, για κάθε συγκεκριμένο τρόφιμο, υπάρχει ένα πεπερασμένο χρονικό διάστημα μετά την παραγωγή, εντός του οποίου θα διατηρήσει ένα απαιτούμενο επίπεδο ποιότητας οργανοληπτικά και με ασφάλεια, υπό καθορισμένες συνθήκες αποθήκευσης. Αυτή η χρονική περίοδος μπορεί γενικά να οριστεί ως η διάρκεια ζωής του τροφίμου. Δεν υπάρχει καθιερωμένος, ομοιόμορφα εφαρμόσιμος ορισμός της διάρκειας ζωής. Ο ορισμός της διάρκειας ζωής και τα κριτήρια για τον προσδιορισμό του τέλους της διάρκειας ζωής εξαρτώνται από συγκεκριμένα εμπορεύματα και από την προβλεπόμενη χρήση του ορισμού (δηλαδή, για ρυθμιστικούς σκοπούς έναντι μάρκετινγκ).

Η σχετική συμβολή κάθε παράγοντα στη συνολική ποιότητα μπορεί να ποικίλλει σε διαφορετικά επίπεδα ποιότητας ή σε διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης. Η κινητική της αλλοίωσης των τροφίμων βασίζεται στην ενδεδειγμένη μελέτη των ρυθμών με τους οποίους προχωρούν οι φυσικοχημικές αντιδράσεις ή/ και μικροβιολογικές. Ο τομέας της κινητικής στα συστήματα τροφίμων έχει λάβει μεγάλη προσοχή τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω

των προσπαθειών για βελτιστοποίηση ή τουλάχιστον μεγιστοποίηση της ποιότητας των τροφίμων κατά την επεξεργασία και αποθήκευση (Villota and Hawkes 2007). Επιπλέον, η καλή κατανόηση της κινητικής της αντίδρασης μπορεί να προσφέρει μια συστηματική προσέγγιση για τον επανασχεδιασμό της σύνθεσης των προϊόντων διατροφής για την καλύτερη διατήρηση του επιθυμητού συστήματος αισθητηριακών, θρεπτικών και λειτουργικών συστατικών και ελαχιστοποίηση της εξέλιξης ανεπιθύμητων προϊόντων.

Η χρήση της χημικής κινητικής, η μελέτη των ρυθμών και των μηχανισμών που εμπλέκονται στις αντιδράσεις ενδιαφέροντος και οι μαθηματικές σχέσεις που περιγράφουν καλύτερα την επίδραση της θερμοκρασίας στις σταθερές του ρυθμού αντίδρασης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση αλλαγών στην ποιότητα των τροφίμων. Παράλληλα, σημαντική δημοσιευμένη εργασία σχετικά με τη μαθηματική μοντελοποίηση έχει επικεντρωθεί στη μικροβιολογική ασφάλεια και την αλλοίωση σε μια ποικιλία μητρών τροφίμων.

Ο σκοπός της παρούσας εργασία είναι η εκτίμηση της κινητικής αλλοίωσης κρεατοσκευασμάτων, συγκεκριμένα του μπέικον, συσκευασμένων υπό κενό σε τρεις διαφορετικές σταθερές θερμοκρασίες συντήρησης (ισόθερμες) και συγκεκριμένα 5°C, 10°C και 15°C. Οι μικροβιολογικές ομάδες που μελετήθηκαν είναι η ολική μεσόφιλη χλωρίδα, η οξυγαλακτική χλωρίδα, τα καρνοβακτήρια και τα κλωστρίδια.

1.2 Κρεατοσκευάσματα

1.2.1 Ταξινόμηση προϊόντων κρέατος

Ομάδα Α: Προϊόντα με βάση το κρέας

Ορισμός: μεταποιημένα προϊόντα που προέρχονται από την μεταποίηση κρέατος ή από την περαιτέρω μεταποίηση των μεταποιημένων αυτών προϊόντων ώστε η επιφάνεια της εγκάρσιας τομής να επιτρέπει να διαπιστωθεί η απουσία των χαρακτηριστικών του νωπού κρέατος {ορισμός: κρέας το οποίο δεν έχει υποστεί καμία άλλη επεξεργασία συντήρησης εκτός από την ψύξη, την κατάψυξη ή την ταχεία κατάψυξη, συμπεριλαμβανομένου και του κρέατος που είναι συσκευασμένο σε κενό αέρος ή σε ελεγχόμενη ατμόσφαιρα (νοείται η 1η συσκευασία)}.

- **Ομάδα Α1: Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας**

Ορισμός: Θερμική επεξεργασία είναι η επεξεργασία σε συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου τέτοιων που να επιφέρουν την μετουσίωση των πρωτεϊνών του κρέατος και μείωση σε αποδεκτά επίπεδα ή καταστροφή του μικροβιακού φορτίου ανάλογα με το είδος του προϊόντος και τον πιθανό συνδυασμό άλλων μεθόδων επεξεργασίας (π.χ. κάπνιση, αλάτιση, μάλαξη, ανάμιξη).

- **Ομάδα Α1α:** Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας από αυτοτελή τεμάχια κρέατος : Μπέικον, Καπρικό

- **Ομάδα Α1β:** Προϊόντα θερμικής επεξεργασίας από συγκοπτό κρέας με ή χωρίς κομμάτια κρέατος : πάριζα, μορταδέλα

- **Ομάδα Α2:** Προϊόντα ζύμωσης και ωρίμανσης

- **Ομάδα Α3:** Προϊόντα μερικής ζύμωσης

- **Ομάδα Α4:** Προϊόντα διπλής θερμικής επεξεργασίας

Ομάδα Β : Παρασκευάσματα κρέατος

Ορισμός: το νωπό κρέας, συμπεριλαμβανομένου του κρέατος που έχει μετατραπεί σε τεμάχια, στο οποίο έχουν προστεθεί τρόφιμα, καρυκεύματα ή πρόσθετα ή το οποίο έχει υποβληθεί σε διεργασία που δεν μεταβάλλει την εσωτερική δομή των μυϊκών ινών του κρέατος και κατά συνέπεια δεν εξαφανίζει τα χαρακτηριστικά του νωπού κρέατος.

- Ομάδα Β1: Παρασκευάσματα από τεμάχια κρέατος
- Ομάδα Β2: Παρασκευάσματα από σύγκοπτο κρέας
- Ομάδα Β3: Μορφοποιημένα παρασκευάσματα κρέατος
- Ομάδα Β4: Μη θερμικά επεξεργασμένα νωπά προϊόντα
- Παραδοσιακά χωριάτικα λουκάνικα

Ομάδα Γ: Άλλα προϊόντα με βάση το κρέας

Ομάδα Δ: Παράγωγα κρέατος

1.3 Μπέικον

Το μπέικον είναι ένα είδος αλλαντικού που παρασκευάζεται από την κοιλιά ενός χοίρου. Είναι ένα δημοφιλές φαγητό που απολαμβάνουν σε όλο τον κόσμο και τρώγεται συνήθως για πρωινό, καθώς και σε σάντουιτς, σαλάτες και άλλα πιάτα.

Για την παρασκευή μπέικον, η χοιρινή κοιλιά ωριμάζει πρώτα σε μείγμα αλατιού, ζάχαρης και άλλων καρυκευμάτων για αρκετές ημέρες. Αυτή η διαδικασία βοηθά στη διατήρηση του κρέατος και του δίνει τη χαρακτηριστική του γεύση. Μετά την ωρίμανση, το μπέικον συνήθως καπνίζεται, το οποίο προσδίδει μια πλούσια, καπνιστή γεύση στο κρέας.

Το μπέικον μπορεί να αγοραστεί σε διάφορες μορφές, όπως σε φέτες, σε κύβους και σε ολόκληρες πλάκες. Το μπέικον σε φέτες είναι η πιο διαδεδομένη μορφή και πωλείται συνήθως σε συσκευασίες στα παντοπωλεία. Το μπέικον σε κύβους χρησιμοποιείται συχνά στη μαγειρική, ενώ ολόκληρες πλάκες μπέικον χρησιμοποιούνται συχνά σε κουζίνες εστιατορίων και μπορούν να τεμαχιστούν κατά παραγγελία.

Το μπέικον είναι μια πλούσια πηγή πρωτεϊνών, καθώς και βιταμινών και μετάλλων όπως η νιασίνη, η θειαμίνη και το σελήνιο. Ωστόσο, είναι επίσης πλούσιο σε λιπαρά και νάτριο, επομένως θα πρέπει να καταναλώνεται με μέτρο ως μέρος μιας ισορροπημένης διατροφής.

Ένας σημαντικός τομέας μελέτης του μπέικον που αφορά τους επιστήμονες είναι η διασφάλιση της ασφάλειας του μπέικον. Επιστήμονες μελετούν τους μικροβιολογικούς κινδύνους που συνδέονται με την παραγωγή μπέικον και αναπτύσσουν μεθόδους ελέγχου αυτών των κινδύνων. Επίσης, μελετούν τις επιπτώσεις διαφορετικών μεθόδων συντήρησης στην ασφάλεια και τη διάρκεια ζωής του μπέικον.

1.4 Μικροβιακές αλλοιώσεις μπέικον

Οι μικροβιακές αλλοιώσεις του μπέικον προέρχονται από τη δράση των μικροοργανισμών (βακτηρίων, μυκήτων) πάνω στο μπέικον με την πάροδο του χρόνου και των συνθηκών αποθήκευσης. Οι κύριες μικροβιακές αλλοιώσεις περιλαμβάνουν τη σάπρωση, οξειδώσεις λιπαρών οξέων, μυκητίαση και βακτηριακή ανάπτυξη.

Η σάπρωση είναι η διάσπαση των πρωτεϊνών και άλλων οργανικών υλικών από μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες. Αυτή η διαδικασία μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην υφή και τη γεύση του μπέικον.

Ο αέρας μπορεί να προκαλέσει οξειδώσεις στα λιπαρά οξέα που περιέχονται στο μπέικον. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην γεύση και την ποιότητα του μπέικον.

Οι μύκητες μπορούν να αναπτυχθούν στο μπέικον αν δεν αποθηκεύονται σωστά. Αυτό μπορεί να προκαλέσει αλλοιώσεις στην όψη και την ποιότητα του μπέικον.

Κατά την αποθήκευση, μπορούν να αναπτυχθούν βακτήρια όπως το *Clostridium botulinum*, το οποίο παράγει την τοξίνη του βοτουλισμού, μια επικίνδυνη τοξίνη. Γι' αυτό τον λόγο, είναι σημαντικό να αποθηκεύεται το μπέικον στις σωστές συνθήκες και να μαγειρεύεται καλά πριν καταναλωθεί.

Για την διατήρηση της ποιότητας του μπέικον και την αποφυγή των παραπάνω αλλοιώσεων συνίσταται η σωστή αποθήκευση στο ψυγείο και η επαρκής μαγειρική πριν την κατανάλωση.

1.5 Κυριότερες ομάδες μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην αλλοίωση του μπέικον

Οι κυριότερες ομάδες που συμμετέχουν στην αλλοίωση του μπέικον είναι η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ), τα Οξυγαλακτικά βακτήρια, τα γένη των *Carnobacterium* spp. και τα γένη των *Clostridium* spp.

1.5.1 Ολική Μεσόφιλη Μικροχλωρίδα

Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα αναφέρεται σε μια γενική κατηγορία μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε μέτριες θερμοκρασίες, κυρίως στο εύρος των 20 έως 45. Αυτοί οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν διάφορα είδη βακτηρίων, μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στην κανονική θερμοκρασία του περιβάλλοντος.

Κύρια είδη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας είναι *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* και *Escherichia coli*.

Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι ευρέως διαδεδομένοι στο περιβάλλον, και συνήθως συμπεριλαμβάνουν τη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα που βρίσκεται στο

έδαφος, το νερό, τα τρόφιμα και ακόμη και στο δέρμα και το γαστρεντερικό σύστημα των ανθρώπων και των ζώων.

Οι μικροοργανισμοί της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας μπορούν να έχουν διάφορους ρόλους στο περιβάλλον και στα τρόφιμα. Ορισμένοι είναι χρήσιμοι, όπως αυτοί που βοηθούν στην διαδικασία της ανάπτυξης των γαλακτικών οξέων στην παραγωγή γιαούρτι και τυριού, ενώ άλλοι μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και να είναι προβληματικοί από υγειονομικής απόψεως, αναπτύσσοντας ανεπιθύμητα μικρόβια ή παράγοντες αφομοιώσεις.

Η παρακολούθηση και ο έλεγχος της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας είναι σημαντικά στην τροφική βιομηχανία και την υγιεινή των τροφίμων, για να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η ποιότητα των τροφίμων που καταναλώνονται από το κοινό.

1.5.2 Lactic Acid Bacteria

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μια κατηγορία βακτηρίων που παράγουν γαλακτικά οξέα κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι γνωστά για τον ρόλο τους στην παραγωγή ποικίλων γαλακτικών προϊόντων, όπως γιαούρτι, τυρί, κεφίρ, και άλλα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι αναερόβια, δηλαδή μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε περιβάλλοντα με περιορισμένη ποσότητα οξυγόνου. Κατά την διάρκεια της ζύμωσης μετατρέπουν τους υδατάνθρακες που περιέχονται στο γάλα σε οξυγαλακτικό οξύ, το οποίο έχει φαρμακευτικές και υγειονομικές ιδιότητες. Διάφορα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, και *Streptococcus*.

1.5.3 *Carnobacterium* spp.

Τα *Carnobacterium* spp. είναι ένα γένος βακτηρίων που ανήκει στην οικογένεια Carnobacteriaceae. Αυτά τα βακτήρια είναι γραμμοθετικά, αερόβια ή αναερόβια και καταναλώνουν γλυκόζη. Είναι γνωστά για την παρουσία τους σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των υδάτων και του εδάφους, καθώς και των τροφίμων.

Ορισμένα είδη του γένους *Carnobacterium* έχουν επίσης βρεθεί σε τρόφιμα, που συχνά σχετίζονται με την ψύξη και την συντήρηση τροφίμων. Αντέχουν σε χαμηλές θερμοκρασίες και μπορούν να επιβιώσουν στο ψυγείο ή την κατάψυξη, με αποτέλεσμα ο κίνδυνος ανάπτυξής τους σε τρόφιμα που δεν αποθηκεύονται σωστά να αυξάνεται. Αυτά

τα βακτήρια μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα των τροφίμων, καθώς μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις στην υφή και την γεύση.

Παράλληλα, κάποια είδη *Carnobacterium* έχουν τη δυνατότητα να παράγουν αντιμικροβιακά πεπτίδια και έχουν εξεταστεί ως πιθανοί προβιοτικοί παράγοντες σε ορισμένες εφαρμογές στην παραγωγή τροφίμων.

Συνολικά, τα *Carnobacterium* spp. είναι ένας γένος βακτηρίων που είναι αναγνωρισμένο για την παρουσία του σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, και μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην ποιότητα των τροφίμων και την τεχνολογία τροφίμων.

1.5.4 *Clostridium* spp.

Τα βακτηρία του γένους *Clostridium* spp. είναι ένα ευρύ γένος βακτηρίων που ανήκουν στην τάξη *Clostridiales* και αναπτύσσονται σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι περισσότεροι τύποι κλοστριδίων είναι αναερόβιοι, δηλαδή αναπτύσσονται σε απουσία οξυγόνου, και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία σε ό,τι αφορά τις αναπτυξιακές απαιτήσεις και τις ιδιότητες.

Ορισμένα από τα *Clostridium* spp. είναι γνωστά για την παραγωγή τοξινών που μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση τροφίμων. Για παράδειγμα, το *Clostridium botulinum* παράγει τοξίνη – μη θερμοάντοχη - που μπορεί να προκαλέσει το βακτηριακό τοξικό εντερικό σύνδρομο, που είναι μια σοβαρή μορφή δηλητηρίασης τροφίμων. Γι' αυτό, η ασφαλής επεξεργασία και αποθήκευση τροφίμων είναι σημαντική για την πρόληψη της δηλητηρίασης από *Clostridium botulinum*.

Ορισμένα *Clostridium* spp. μπορούν να προκαλέσουν τον σχηματισμό αζώτου σε τρόφιμα, κυρίως σε κρέας και κοτόπουλο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση τοξινών που μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση.

Ωστόσο, όχι όλα τα *Clostridium* spp. είναι επιβλαβή για τον άνθρωπο ή τα τρόφιμα. Ορισμένα είδη χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία, όπως το *Clostridium acetobutyricum*, το οποίο παράγει βιοκαύσιμα και χημικά, ενώ άλλα μπορούν να βοηθήσουν στην παραγωγή τυριών και γιαουρτιού.

Συνολικά, τα *Clostridium* spp. είναι ένα ευρύ γένος βακτηρίων με ποικίλες ιδιότητες και επιδράσεις στον άνθρωπο και τα τρόφιμα. Η ανίχνευση, η πρόληψη και η

διαχείριση των *Clostridium* spp. σε σχέση με την ασφάλεια τροφίμων είναι σημαντικές διαδικασίες στην τροφική βιομηχανία και την υγιεινή των τροφίμων.

1.6 Υποστρώματα

1.6.1 Plate Count Agar - PCA

Το Plate Count Agar (PCA) είναι ένα μικροβιολογικό μέσο, γενικής χρήσης, μη-εκλεκτικό, που χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση του αριθμού βιώσιμων βακτηριακών κυττάρων σε ένα δεδομένο δείγμα. Είναι ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά μέσο που παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος βακτηρίων. Το PCA χρησιμοποιείται συνήθως στη μικροβιολογία των τροφίμων και του περιβάλλοντος για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου ενός δείγματος και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών απολύμανσης. Το PCA αποτελείται από έναν συνδυασμό πεπτονών, εκχυλίσματος ζύμης και γλυκόζης, τα οποία χρησιμεύουν ως πρωταρχικές πηγές αζώτου, άνθρακα και ενέργειας για την ανάπτυξη βακτηρίων. Το PCA είναι ένα σημαντικό εργαλείο στη μικροβιολογία των τροφίμων και του περιβάλλοντος, καθώς επιτρέπει τον γρήγορο και ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηριακών πληθυσμών σε ένα δείγμα. Αυτές οι πληροφορίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της ποιότητας και της ασφάλειας των προϊόντων διατροφής, καθώς και για την παρακολούθηση του μικροβιακού φορτίου των περιβαλλοντικών δειγμάτων. Επιπλέον, το άγαρ PCA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών απολύμανσης, όπως ο καθαρισμός και η απολύμανση, συγκρίνοντας τον αριθμό των βακτηριακών κυττάρων πριν και μετά την εφαρμογή. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το PCA δεν είναι επιλεκτικό για συγκεκριμένους τύπους βακτηρίων και θα υποστηρίξει την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν άλλα μέσα και μέθοδοι για την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων ειδών ή ομάδων βακτηρίων.

1.6.2 MRS Agar

Το MRS, ή το μέσο de Man, Rogosa, Sharpe, είναι ένα εξειδικευμένο μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία για την απομόνωση και την καλλιέργεια βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB). Το MRS αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1960 από τρεις μικροβιολόγους, τους de Man, Rogosa and Sharpe, για την απομόνωση και την απαρίθμηση των γαλακτοβακίλλων από τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Σήμερα, χρησιμοποιείται ευρέως για την καλλιέργεια διαφόρων LAB, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Pediococcus*. Το MRS έχει ειδική σύνθεση που το καθιστά κατάλληλο για την ανάπτυξη του LAB. Το μέσο περιέχει υψηλή συγκέντρωση πεπτόνης, η οποία παρέχει μια πηγή αμινοξέων για τα βακτήρια. Επιπλέον, το μέσο περιέχει ένα μείγμα υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόζης και της φρουκτόζης, που χρησιμεύουν ως πηγή ενέργειας για τα βακτήρια. Η παρουσία αυτών των υδατανθράκων προάγει επίσης την παραγωγή γαλακτικού οξέος, που είναι ένας χαρακτηριστικός μεταβολίτης του LAB. Το μέσο MRS περιέχει επίσης πολλά άλλα συστατικά που το καθιστούν κατάλληλο για την ανάπτυξη του LAB. Αυτά περιλαμβάνουν:

- Εκχύλισμα μαγιάς: Παρέχει βιταμίνες και μέταλλα που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη βακτηρίων.
- Tween 80: Δρα ως επιφανειοδραστικό για την προώθηση της διασποράς των λιπιδίων στο μέσο.
- Κιτρικό αμμώνιο: Δρα ως ρυθμιστικό για τη διατήρηση του pH του μέσου.
- Θεικό μαγνήσιο: Παρέχει απαραίτητα μέταλλα για την ανάπτυξη βακτηρίων.

Το pH του μέσου MRS ρυθμίζεται τυπικά σε 6,2-6,8, που είναι το βέλτιστο εύρος για την ανάπτυξη του LAB. Το μέσο τυπικά αποστειρώνεται με αποστείρωση σε αυτόκλειστο πριν από τη χρήση.

Το MRS χρησιμοποιείται για μια ποικιλία εφαρμογών στη μικροβιολογία, συμπεριλαμβανομένης της απομόνωσης και απαρίθμησης των LAB από προϊόντα διατροφής, του χαρακτηρισμού των στελεχών LAB και της μελέτης της φυσιολογίας και του μεταβολισμού του LAB. Το μέσο χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή προβιοτικών, τα οποία είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που προσφέρουν οφέλη για την υγεία στον ξενιστή.

Συμπερασματικά, το μέσο MRS είναι ένα εξειδικευμένο μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία για την καλλιέργεια του LAB. Το μέσο έχει μια μοναδική σύνθεση που το καθιστά κατάλληλο για την ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων και χρησιμοποιείται ευρέως για διάφορες εφαρμογές, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής προβιοτικών και της μελέτης της φυσιολογίας και του μεταβολισμού LAB. Ενώ το μέσο MRS δεν είναι επιλεκτικό για το LAB, παραμένει ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη και εφαρμογή αυτών των σημαντικών μικροοργανισμών.

1.6.3 Carnobacterium Selective Agar Base (CTAS Agar Base)

Το Carnobacterium Selective Agar Base (CTAS) είναι ένα εκλεκτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία για την απομόνωση βακτηρίων του γένους *Carnobacterium* spp.

Τα βακτήρια του γένους *Carnobacterium* spp. είναι θετικά κατά Gram, που δεν σχηματίζουν σπόρια και προαιρετικά αναερόβια βακτήρια που βρίσκονται συνήθως σε ψυχρά περιβάλλοντα, όπως κρέας, γαλακτοκομικά και προϊόντα ψαριών.

Το CTAS περιέχει μια ποικιλία συστατικών που το καθιστούν επιλεκτικό για το *Carnobacterium* spp. Περιέχει πεπτόνες και εκχυλίσματα ζύμης που περιέχουν αμινοξέα και άλλα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά στα βακτήρια. Επιπλέον, το μέσο CTAS περιέχει γλυκόζη ως πηγή ενέργειας και χλωριούχο νάτριο και φωσφορικό κάλιο ως εκλεκτικούς παράγοντες για την αναστολή της ανάπτυξης άλλων βακτηρίων. Το CTAS είναι επίσης εμπλουτισμένο με εκχύλισμα βόειου κρέατος, τρυπτόνη και εκχύλισμα μαγιάς για να παρέχει πρόσθετα θρεπτικά συστατικά στα βακτήρια. Το CTAS χρησιμοποιείται συνήθως στη βιομηχανία τροφίμων για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση του *Carnobacterium* spp. βακτήρια στο κρέας, τα γαλακτοκομικά και τα ψάρια. *Carnobacterium* spp. Τα βακτήρια είναι σημαντικά στη βιομηχανία τροφίμων καθώς παίζουν ρόλο στην αλλοίωση των προϊόντων διατροφής με ψύξη και κατεψυγμένα.

Ένας περιορισμός του μέσου CTAS είναι ότι είναι εκλεκτικό για το *Carnobacterium* spp. βακτήρια και ενδέχεται να μην ανιχνεύουν άλλους τύπους βακτηρίων που μπορεί να υπάρχουν σε ένα δείγμα. Επιπλέον, μερικά *Carnobacterium* spp. ενδέχεται να μην αναπτύσσονται στο μέσο CTAS ή μπορεί να παράγουν άτυπες αποικίες που μπορεί να είναι δύσκολο να ερμηνευθούν.

1.6.4 Reinforced Clostridial Agar (RCA)

Το Reinforced Clostridial Agar (RCA) είναι ένα μικροβιολογικό μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια και την απομόνωση ειδών *Clostridium* από διάφορους τύπους κλινικών και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Το *Clostridium* είναι ένα γένος αναερόβιων βακτηρίων που βρίσκονται συνήθως στο έδαφος, το νερό και τις εντερικές οδούς των ζώων και των ανθρώπων. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν μια ποικιλία λοιμώξεων, συμπεριλαμβανομένης της αέριας γάγγραινας, της αλλαντίασης και του τετάνου. Το RCA είναι ένα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά μέσο που περιέχει μια ποικιλία συστατικών για την υποστήριξη της ανάπτυξης των ειδών *Clostridium*. Η βάση του άγαρ αποτελείται από πεπτόνες, εκχύλισμα βόειου κρέατος και εκχύλισμα ζύμης, τα οποία είναι πηγές αμινοξέων και άλλων θρεπτικών συστατικών που απαιτούνται για την ανάπτυξη βακτηρίων. Το άγαρ προστίθεται επίσης στο μέσο για να παρέχει μια στερεή επιφάνεια για να αναπτυχθούν τα βακτήρια. Εκτός από αυτά τα βασικά συστατικά, το άγαρ RCA περιέχει επίσης μια σειρά από άλλα συστατικά που ενισχύουν την ανάπτυξη των ειδών *Clostridium*. Η L-κυστεΐνη προστίθεται στο μέσο για να διεγείρει τη βλάστηση των σπορίων, ενώ το χλωριούχο νάτριο και το θειώδες νάτριο περιλαμβάνονται για την προώθηση της αναερόβιας ανάπτυξης. Ο κρόκος αυγού προστίθεται επίσης στο μέσο για να παρέχει έναν δείκτη δραστηριότητας λεκιθινάσης, που είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα των ειδών *Clostridium*.

1.7 Συσκευασία υπό κενό

Η συσκευασία υπό κενό είναι μια μέθοδος συσκευασίας τροφίμων κατά την οποία ο αέρας αφαιρείται από τη συσκευασία πριν από τη σφράγιση. Η διαδικασία της συσκευασίας σε κενό αέρος βοηθά στη διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων και στην παράταση της διάρκειας ζωής αφαιρώντας το οξυγόνο, που είναι ένας από τους κύριους παράγοντες που προκαλούν αλλοίωση. Η συσκευασία κενού μειώνει επίσης την ποσότητα υγρασίας που μπορεί να εισέλθει στη συσκευασία, αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη βακτηρίων, μούχλας και άλλων μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση των τροφίμων.

Υπάρχουν δύο τύποι συσκευασίας κενού: εξωτερική και εσωτερική. Η εξωτερική συσκευασία κενού περιλαμβάνει την τοποθέτηση του φαγητού σε μια σακούλα κενού, την αφαίρεση του αέρα με ένα σφραγιστικό κενού και στη συνέχεια τη σφράγιση της σακούλας. Η εσωτερική συσκευασία κενού, από την άλλη πλευρά, περιλαμβάνει την τοποθέτηση των τροφίμων σε ένα δοχείο που στη συνέχεια τοποθετείται σε θάλαμο κενού. Ο αέρας αφαιρείται από τον θάλαμο και το δοχείο σφραγίζεται με ένα καπάκι ή άλλο πώμα.

Η συσκευασία κενού χρησιμοποιείται συνήθως για μια ποικιλία προϊόντων διατροφής, όπως κρέατα, πουλερικά, ψάρια, τυριά και λαχανικά. Η συσκευασία σε κενό αέρος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για προϊόντα που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά ή προϊόντα που είναι επιρρεπή σε αλλοίωση, όπως το φρέσκο κρέας και το ψάρι.

Ένα από τα κύρια οφέλη της συσκευασίας σε κενό αέρος είναι ότι μπορεί να παρατείνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής των προϊόντων διατροφής. Αφαιρώντας το οξυγόνο και μειώνοντας την ποσότητα υγρασίας που μπορεί να εισέλθει στη συσκευασία, η συσκευασία κενού βοηθά στην επιβράδυνση της ανάπτυξης βακτηρίων, μούχλας και άλλων μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων. Ως αποτέλεσμα, τα συσκευασμένα τρόφιμα σε κενό αέρος μπορούν συχνά να παραμείνουν φρέσκα για πολύ περισσότερο από τα αντίστοιχα μη συσκευασμένα σε κενό αέρος.

Ένα άλλο πλεονέκτημα της συσκευασίας σε κενό αέρος είναι ότι μπορεί να βοηθήσει στη διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων. Το οξυγόνο μπορεί να προκαλέσει αποχρωματισμό ορισμένων τροφίμων, όπως τα κρέατα και να χάσουν την υφή και τη γεύση τους. Η συσκευασία κενού αέρος βοηθά στη διατήρηση του χρώματος, της υφής και της γεύσης των προϊόντων διατροφής αποτρέποντας την οξείδωση.

Η συσκευασία σε κενό αέρος μπορεί επίσης να βοηθήσει στη μείωση της σπατάλης τροφίμων παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής των προϊόντων διατροφής. Με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, τα τρόφιμα είναι λιγότερο πιθανό να αλλοιωθούν πριν καταναλωθούν. Αυτό μπορεί να είναι ιδιαίτερα ωφέλιμο για καταναλωτές που ζουν μόνοι ή έχουν μικρότερα νοικοκυριά και μπορεί να μην μπορούν να καταναλώσουν μεγάλες ποσότητες τροφίμων πριν χαλάσουν. Ωστόσο, η συσκευασία σε κενό αέρος έχει ορισμένους περιορισμούς και πιθανούς κινδύνους. Ένας πιθανός κίνδυνος της συσκευασίας υπό κενό είναι η ανάπτυξη αναερόβιων βακτηρίων, τα οποία μπορούν να ευδοκιμήσουν σε

περιβάλλοντα με χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να παράγουν τοξίνες που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες αν καταναλωθούν. Για να ελαχιστοποιηθεί αυτός ο κίνδυνος, είναι σημαντικό να ακολουθείτε τις κατάλληλες οδηγίες για την ασφάλεια των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της αποθήκευσης των συσκευασμένων τροφίμων υπό κενό στη σωστή θερμοκρασία και της κατανάλωσής τους πριν από την ημερομηνία λήξης τους.

Ένα άλλο πιθανό πρόβλημα με τη συσκευασία κενού είναι ότι μπορεί να αλλάξει την υφή ορισμένων τροφίμων, ιδιαίτερα εκείνων με υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η συσκευασία σε κενό αέρος μπορεί να κάνει ορισμένα τρόφιμα, όπως τα λαχανικά, να χαλαρώσουν ή να μαλακώσουν. Επιπλέον, η συσκευασία σε κενό αέρος μπορεί να προκαλέσει απώλεια του φυσικού τους αρώματος σε ορισμένα τρόφιμα, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τη γεύση τους.

Συμπερασματικά, η συσκευασία κενού είναι μια δημοφιλής μέθοδος συσκευασίας τροφίμων που προσφέρει πολλά οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της παρατεταμένης διάρκειας ζωής και της βελτιωμένης ποιότητας των τροφίμων. Αν και έχει ορισμένους περιορισμούς και πιθανούς κινδύνους, η συσκευασία σε κενό μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη διατήρηση των τροφίμων και τη μείωση της σπατάλης τροφίμων. Ο σωστός χειρισμός και η αποθήκευση των συσκευασμένων τροφίμων σε κενό αέρος είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και τη μεγιστοποίηση της ποιότητας των προϊόντων.



Εικόνα 1.1 Μπέικον συσκευασμένα υπό κενό

1.8 Σκοπός Εργασίας

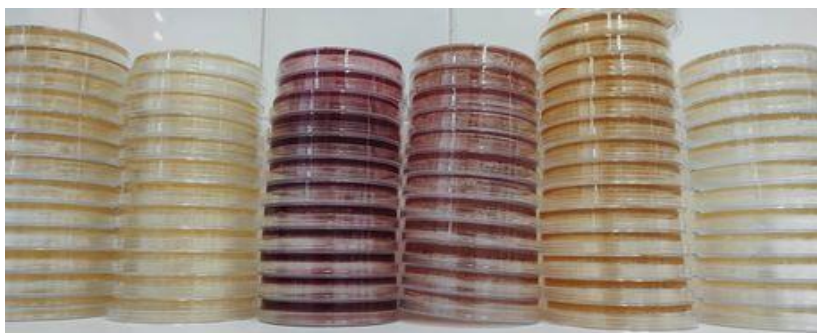
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της αλλοίωσης των κρεατοσκευασμάτων χοιρινού, τα οποία είναι συσκευασμένα υπό κενό, κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους 5, 10, 15°C. Πρόκειται για μια σειρά προκαταρκτικών μικροβιολογικών πειραματικών δοκιμών δειγμάτων που προέρχονταν από μονάδα παραγωγής και υπό τις συνθήκες που παράγονται και είχαν ως στόχο την καταγραφή της κινητικής ανάπτυξης. Κατόπιν χρησιμοποιώντας την διαθέσιμη στο διαδίκτυο βάση δεδομένων ComeBase και απλοποιημένη μορφή της εξίσωσης Baranyi and Roberts έγινε υπολογισμός της διάρκειας ζωής τους, υπό ισόθερμες πάντα συνθήκες.

Κεφάλαιο 2

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας είναι τα θρεπτικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο εργαστήριο. Υπάρχουν δύο κατηγορίες τέτοιων μέσων: τα χημικώς καθορισμένα και τα χημικώς μη καθορισμένα ή σύνθετα. Τα χημικώς καθορισμένα μέσα αποτελούνται από δεδομένες ποσότητες ανόργανων ή οργανικών χημικών ουσιών υψηλής καθαρότητας σε συγκεκριμένη ποσότητα αποσταγμένου νερού. Από την άλλη πλευρά, τα σύνθετα θρεπτικά μέσα περιλαμβάνουν προϊόντα ζύμωσης καζεΐνης (πρωτεΐνη του γάλακτος), βοδινού, καρπών σόγιας, κυττάρων ζυμομύκητα, ή οποιασδήποτε άλλης ουσίας με υψηλή θρεπτική αξία, η οποία δεν έχει όμως προσδιοριστεί χημικά. Το μειονέκτημα στα συγκεκριμένα διαλύματα είναι η απώλεια ελέγχου της ακριβούς συγκέντρωσης των συστατικών του υποστρώματος (Madigan et al., 2005).



Εικόνα 2.1 Εμβολιασμένα Θρεπτικά Υποστρώματα

Υλικά

- Ζυγός ακριβείας (Chyo Balance Corp. 69255) και μεταλλική σπάτουλα
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Θάλαμος νηματικής ροής (MSC-Advantage τθσ Thermo Scientific)
- Γυάλινη φιάλη των 500ml (Iso lab Germany)
- Τρυβλία Petri 90x14mm (delta lab)
- Αυτόκαυστο

2.1.1 Παρασκευή Plate Count Agar

Το Standard Methods Agar (PCA) συνιστάται από την ΑΡΗΑ για την καταμέτρηση βακτηρίων υγειονομικού ενδιαφέροντος, τα οποία είναι δείκτες μόλυνσης ή μικροβιακό φορτίο στα τρόφιμα.

Το Enzymatic Digest of Casein παρέχει άζωτο, βιταμίνες, μέταλλα και αμινοξέα απαραίτητα για την ανάπτυξη. Το εκχύλισμα μαγιάς είναι πηγή βιταμινών, ιδιαίτερα η ομάδα Β. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμώσιμος υδατάνθρακας που παρέχει άνθρακα και ενέργεια. Το βακτηριολογικό άγαρ είναι ο παράγοντας στερεοποίησης. Αυτό το μέσο συνιστάται από το ISO 4833 για την τεχνική μέτρησης αποικιών μικροοργανισμών στους 30°C στην τροφική αλυσίδα. Ειδικότερα, στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα οι αποικίες που θα παρατηρηθούν θα είναι τα εξής μικροβιακά στελέχη: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739.

Για την ανάπτυξη τους, τα εμβολιασμένα τρυβλία petri θα πρέπει να τοποθετηθούν σε κλιβάνους των 25-30 °C για 24-48 h σε αερόβιες συνθήκες.



Εικόνα 2.2 Αποικίες βακτηρίων Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε θρεπτικό υπόστρωμα PCA

Υλικά

- ζυγός ακριβείας (Chyo Balance Corp. 69255)
- δοκιμαστικός σωλήνας 1L
- γυάλινα μπουκάλια 500ml
- απιονισμένο νερό

- Standard Methods Agar PCA (Condalab)
- γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- τρυβλία petri
- υδατόλουτρο
- αποστειρωτήρας

Μέθοδος: Προσθήκη 23,5 γραμμάρια του μέσου σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού. Γίνεται καλό ανακάτεμα και διάλυση ζεσταίνοντας με συχνή ανάδευση. Για επιπλέον διάλυση γίνεται βρασμός για ένα λεπτό σε φούρνο μικροκυμάτων. Αποστειρώνεται σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 15 λεπτά και στην συνέχεια ψύξη στους 44-47 °C σε υδατόλουτρο. Διανείμετε στα κατάλληλα αποστειρωμένα τρυβλία petri. Αφού το υπόστρωμα σταθεροποιηθεί, θα πρέπει να έχει ανοιχτό κίτρινο χρώμα, και διατηρείται σε ψυγείο στους 5 °C.

2.1.2 Παρασκευή MRS

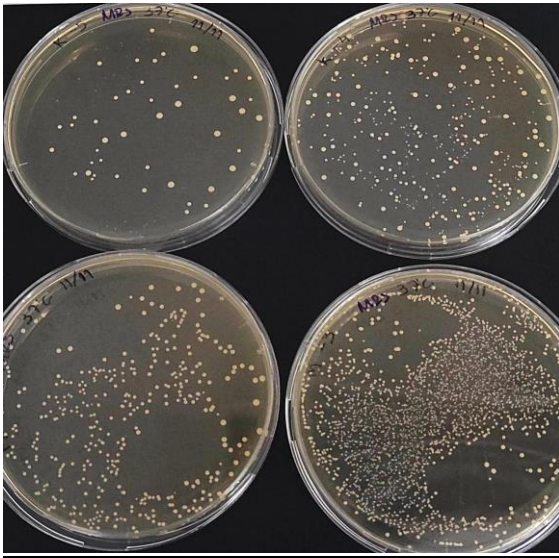
Το μέσο είναι κατάλληλο για την ανάπτυξη βακτηρίων γαλακτικού οξέος, συμπεριλαμβανομένων των *Lactobacillus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc*.

Το κιτρικό αμμώνιο, σε χαμηλό pH, αναστέλλει τους περισσότερους μικροοργανισμούς, αλλά επιτρέπει την ανάπτυξη των *Lactobacilli*. Το δικάλιο φωσφορικό και το οξικό νάτριο είναι ρυθμιστικούς παράγοντες για τη διατήρηση χαμηλού pH. Το Tween 80 είναι ένας γαλακτωματοποιητής. Το μαγγάνιο και το θεικό μαγνήσιο είναι πηγές ιόντων και θεικών. Η βακτηριολογική πεπτόνη και το εκχύλισμα βοείου κρέατος παρέχουν άζωτο, βιταμίνες, μέταλλα και αμινοξέα απαραίτητα για την ανάπτυξη. Το εκχύλισμα μαγιάς είναι πηγή βιταμινών, ιδιαίτερα των Β-ομάδα. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμώσιμος υδατάνθρακας. Το βακτηριολογικό άγαρ είναι ο παράγοντας στερεοποίησης.

Ειδικότερα, στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα οι αποικίες που θα παρατηρηθούν θα είναι τα εξής μικροβιακά στελέχη: *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Οι λακτοβάκιλλοι είναι μικροαερόφιλοι και γενικά απαιτούν στρωματοποιημένες πλάκες για αναερόβια καλλιέργεια σε στερεά μέσα. Μπορεί να είναι βυθισμένες ή επιφανειακές αποικίες συμπαγές ή φτερωτό και είναι μικρά, αδιαφανή και λευκά. Για την ανάπτυξη

τους, τα εμβολιασμένα τρυβλία petri θα πρέπει να τοποθετηθούν σε κλιβάνους των 20-37 °C για 24-48 h.



Εικόνα 2.3 Αποικίες Οξυγαλακτικών βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS

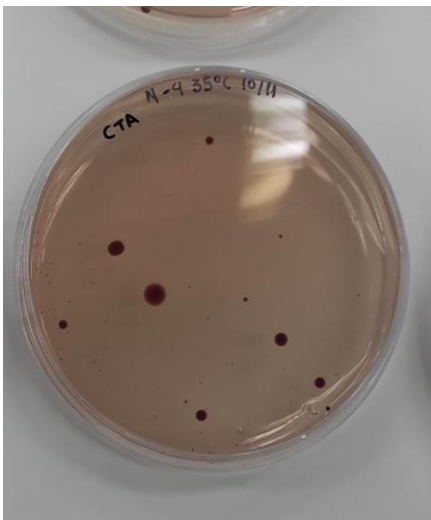
Υλικά και Σκεύη

- ζυγός ακριβείας (Chyo Balance Corp. 69255)
- δοκιμαστικός σωλήνας 1L
- γυάλινα μπουκάλια 500ml
- απιονισμένο νερό
- MRS Agar (Condalab)
- γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- τρυβλία petri
- υδατόλουτρο
- αποστειρωτήρας

Μέθοδος: Προσθήκη 62 γραμμάρια του μέσου σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού. Γίνεται καλό ανακάτεμα και διάλυση ζεσταίνοντας με συχνή ανάδευση. Για επιπλέον διάλυση γίνεται βρασμός για ένα λεπτό σε φούρνο μικροκυμάτων. Αποστειρώνεται σε αυτόκλειστο στους 121 °C για 12 λεπτά και στην συνέχεια ψύξη στους 45-50 °C σε υδατόλουτρο. Διανείμετε στα κατάλληλα αποστειρωμένα τρυβλία petri. Αφού το υπόστρωμα σταθεροποιηθεί, θα πρέπει να έχει ανοιχτό κίτρινο χρώμα, και διατηρείται σε ψυγείο στους 5 °C.

2.1.3 Παρασκευή CTA

Τα είδη *Carnobacterium* είναι θετικά κατά Gram ράβδοι που ανήκουν στην οικογένεια *Lactobacillaceae* και δεν θεωρούνται ανθρώπινα παθογόνα. Αποτελείται από 11 είδη, εκ των οποίων μόνο δύο από αυτά, το *Carnobacterium divergens* και το *Carnobacterium maltaromaticum*, απομονώνονται συχνά από το περιβάλλον και τα τρόφιμα. Τα είδη *Carnobacterium*, συνήθως, απομονώνονται από μια ποικιλία τροφίμων όπως κρέατα που αποθηκεύονται σε αναερόβιες ατμόσφαιρες σε θερμοκρασίες ψύξης, αλλά ο ρόλος αυτών των οργανισμών στην αλλοίωση του κρέατος και των προϊόντων κρέατος δεν έχουν ακόμη προσδιοριστεί. Το εκχύλισμα μαγιάς είναι η πηγή βιταμινών. Η σακχαρόζη και το κιτρικό είναι το πηγή άνθρακα. Το Polysorbate 80 δρα ως γαλακτωματοποιητής. Διβασικό φωσφορικό κάλιο ρυθμίζει το μέσο. Το θειικό μαγγάνιο βοηθά για την τόνωση της ανάπτυξης καρνοβακτηρίων, ενώ το οξικό θάλλιο και το ναλιδιξικό οξύ χρησιμοποιούνται ως ανασταλτική ουσία για επιλεκτική απομόνωση του *Carnobacterium* spp. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο συγκεκριμένο υπόστρωμα επιτυγχάνεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες σε κλιβάνους στους 30 °C για 24-48 h.



Εικόνα 2.4 Αποικίες βακτηρίων *Carnobacterium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα CTA στο τρυβλίο petri

Υλικά και Σκεύη

- ζυγός ακριβείας (Chyo Balance Corp. 69255)
- δοκιμαστικός σωλήνας 1L

- γυάλινα μπουκάλια 500ml
- απιονισμένο νερό
- CTA Medium (Condalab)
- Αντιβιοτικό TTC
- γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- τρυβλία petri
- υδατόλουτρο
- αποστειρωτήρας

Μέθοδος: Προσθήκη 74,91 γραμμάρια (το ισοδύναμο βάρος αφυδατωμένου μέσου ανά λίτρο) σε 990 ml καθαρισμένου/απεσταγμένου νερού. Ζεσταίνουμε μέχρι να βράσει για να διαλυθεί τελείως το μέσο. Αποστειρώστε σε αυτόκαυστο σε πίεση 15 lbs (121°C) για 15 λεπτά. Ψύξτε στους 45-50°C σε υδατόλουτρο και προσθέστε 10 ml 10% χλωριούχου 2, 3, 5-τριφαινυλο τετραζόλιο (TTC) (FD057). Ανακατεύουμε καλά και αδειάζουμε σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri. Αφού το υπόστρωμα σταθεροποιηθεί, θα πρέπει να έχει ανοιχτό κίτρινο χρώμα, και διατηρείται σε ψυγείο στους 5 °C.

2.1.4 Παρασκευή CLO

Το ενισχυμένο κλωστριδιακό άγαρ συνιστάται για την καλλιέργεια και την απαρίθμηση αναερόβιων, ιδιαίτερα του κλωστριδίου και άλλων μικροοργανισμών σε τρόφιμα και κλινικά δείγματα.

Οι Hirsch και Grinstead δημιούργησαν το Ενισχυμένο Κλωστριδιακό Μέσο και διαπίστωσαν ότι αυτό το μέσο είναι ανώτερο από άλλα όσον αφορά την υποστήριξη της ανάπτυξης και παράγοντας υψηλούς αριθμούς κυττάρων Clostridia. Όταν επωάζεται αναερόβια, αυτό το μέσο αναπτύσσει διάφορα αναερόβια και άλλα βακτήρια. Οι Barnes και Ingram απέδειξαν επίσης ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη φυτικών κυττάρων σε προσδιορισμούς του *Clostridium perfringens*.

Η πεπτόνη και το εκχύλισμα βοείου κρέατος παρέχουν άζωτο, βιταμίνες, μέταλλα και αμινοξέα απαραίτητα για την ανάπτυξη. Το εκχύλισμα μαγιάς είναι πηγή βιταμινών, ιδιαίτερα η ομάδα Β. Η δεξτρόζη είναι ο ζυμώσιμος υδατάνθρακας που παρέχει άνθρακα και ενέργεια. Το χλωριούχο νάτριο παρέχει βασικούς ηλεκτρολύτες για τη μεταφορά και ωσμωτική ισορροπία. Το άμυλο στο μέσο δρα ως αυξητικός παράγοντας, πιθανότατα

λειτουργεί σαν κολλοειδές προστατευτικό και εξουδετερώνει τα τοξικά προϊόντα που σχηματίζονται κατά την ανάπτυξη των οργανισμών. Η υδροχλωρική L-κυστεΐνη είναι ο αναγωγικός παράγοντας και το οξικό νάτριο είναι το ρυθμιστικό. Το βακτηριολογικό άγαρ είναι ο στερεοποιητικός παράγοντας.

Δεδομένου ότι είναι ένα μη εκλεκτικό μέσο εμπλουτισμού, επιτρέπει την ανάπτυξη διαφόρων αναερόβιων μικροοργανισμών και προαιρετικών βακτηρίων όταν επωάζονται αναερόβια. Η ανάπτυξή τους επιτυγχάνεται σε κλιβάνους 25-30 °C για 24-48h.



Εικόνα 2.5 Αποικίες βακτηρίων *Clostridium* spp. σε θρεπτικό υπόστρωμα Reinforced Clostridium Agar στο τρυβλίο petri

Υλικά και Σκεύη

- ζυγός ακριβείας (Chyo Balance Corp. 69255)
- δοκιμαστικός σωλήνας 1L
- γυάλινα μπουκάλια 500ml
- απιονισμένο νερό
- Reinforced Clostridium Agar (Condalab)
- αντιβιοτικό meropenem 1g/vial (Vocate S.A.)
- γυάλινη ράβδος ανάδευσης
- τρυβλία petri
- υδατόλουτρο
- αποστειρωτήρας

Μέθοδος: Προσθήκη 50 γραμμάρια του μέσου σε ένα λίτρο απεσταγμένου νερού. Γίνεται καλό ανακάτεμα και διάλυση ζεσταίνοντας με συχνή ανάδευση. Για επιπλέον διάλυση γίνεται βρασμός για ένα λεπτό σε φούρνο μικροκυμάτων. Αποστειρώνεται σε αυτόκλειστο

στους 121 °C για 12 λεπτά και στην συνέχεια ψύξη στους 45-50 °C σε υδατόλουτρο. Έπειτα, προστίθεται 0,02g/L αντιβιοτικό μεροπενέμη. Διανείμτε στα κατάλληλα αποστειρωμένα τρυβλία petri. Αφού το υπόστρωμα σταθεροποιηθεί, θα πρέπει να έχει ανοιχτό κίτρινο χρώμα, και διατηρείται σε ψυγείο στους 5 °C.

2.2 Μικροβιολογικές τεχνικές

2.2.1 Παρασκευή Ringer

Το διάλυμα Ringer είναι ένα στείρο ισοτονικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στην ιατρική και τη βιολογία για διάφορους σκοπούς, συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη για ενδοφλέβια φάρμακα, ως θεραπεία αντικατάστασης υγρών και ως μέσο κυτταροκαλλιέργειας. Η λύση αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Sydney Ringer, Βρετανό φυσιολόγο, το 1882.

Η σύνθεση του διαλύματος Ringer τυπικά περιλαμβάνει χλωριούχο νάτριο, χλωριούχο κάλιο και χλωριούχο ασβέστιο, μαζί με ποικίλες ποσότητες διττανθρακικού νατρίου ή άλλους ρυθμιστικούς παράγοντες για τη διατήρηση ενός σταθερού pH. Οι συγκεντρώσεις αυτών των συστατικών μπορεί να ποικίλλουν ανάλογα με την προβλεπόμενη χρήση του διαλύματος.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιείται ως μέσο μικροβιακής καλλιέργειας όπου γίνονται οι μικροβιακές αραιώσεις.

Υλικά

- ογκομετρική φιάλη 1L
- πιπέτα 1000 μL
- τιπς
- απιονισμένο νερό
- μητρικό αραιωτικό Ringer
- μικρά γυάλινα μπουκαλάκια
- γυάλινα μπουκάλια 250 ml
- αποστειρωτήρας αυτόκλειστο
- ζυγός ακριβείας (Chyo Balance Corp. 69255)

Μέθοδος: Σε μία ογκομετρική φιάλη προστίθενται 1,25 ml μητρικό διάλυμα Ringer και συμπληρώνεται απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Ανακινείται. Στα μικρά γυάλινα μπουκαλάκια, τα οποία προορίζονται για τις αραιώσεις των μικροβίων, προστίθενται 9 ml του διαλύματος Ringer, ενώ στα μεγάλα γυάλινα μπουκάλια των 250 ml, που προορίζονται για την πρώτη αραιώση, προστίθενται 225 ml διάλυμα Ringer. Στην συνέχεια, όλα τα μπουκάλια με το διάλυμα Ringer τοποθετούνται στο αυτόκλειστο και αποστειρώνονται στους 121 °C για 45 min. Προσοχή τα καπάκια πρέπει να είναι χαλαρά σφιγμένα όταν τοποθετούνται τα μπουκάλια στο αυτόκλειστο.

2.2.2 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία αποτελεί τη σπουδαιότερη φάση του ποιοτικού ελέγχου τροφίμων. Η αξιοπιστία και τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης τροφίμων εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο λαμβάνετε το προς ανάλυση δείγμα. Σκοπός είναι να ληφθούν δείγματα, τα οποία να αντιπροσωπεύουν όσο το δυνατό καλύτερα το προϊόν που πρόκειται να εξετασθεί. Αυτό σημαίνει ότι, το δείγμα που λαμβάνεται πρέπει να είναι ομοιογενές και μεγάλο σε μέγεθος. Αφού μεταφερθεί στο εργαστήριο, το δείγμα τεμαχίζεται σε μικρότερα μεγέθη ώστε να διευκολύνει τη διενέργεια χημικών και μικροβιολογικών ελέγχων.

Η μέθοδος της δειγματοληψίας στην παρούσα εργασία βασίστηκε στην βέλτιστη αξιοποίηση του αριθμού των δειγμάτων που ήταν διαθέσιμα από τον παραγωγό. Αναλυτικότερα, κατά την παραλαβή των κρεατοσκευασμάτων πραγματοποιείται καταμέτρηση και διαμοιρασμός τους σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες, (5°C, 10°C, 15°C) που μελετούνται στην εργασία.

Στην συνέχεια λαμβάνονται δύο με τρεις συσκευασίες του κάθε προϊόντος, που επιλέγονται τυχαία σε συγκεκριμένη ωστόσο θερμοκρασία και προχωράει η διαδικασία της δειγματοληψίας που θα αναλυθεί σχολαστικά παρακάτω. Σημειώνεται, πως κατά την παραλαβή των κρεατοσκευασμάτων πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε τρία τυχαία δείγματα από κάθε προϊόν, που αντιστοιχεί στην έναρξη του χρόνου του πειράματος [t0], προτού διαμοιραστούν στις διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης.

Τελος, επειδή το μπέικον αποτελεί ένα τεχνολογικά ευαίσθητο προϊόν, καθώς δεν έχει υποστεί θερμική επεξεργασία τόσο ισχυρή όσο να θεωρείται ένα προϊόν έτοιμο προς κατανάλωση, με αποτέλεσμα η διάρκεια ζωής του είναι περιορισμένη. Συνεπώς, η

συχνότητα που πραγματοποιούνται η δειγματοληψίες είναι συχνότερες με προτεραιότητα των συσκευασιών που διατηρούνται στους 15 °C, καθώς η θερμοκρασία αυτή ευνοεί την ανάπτυξη διαφόρων αλλοιογόνων μικροοργανισμών.

Υλικά και Σκεύη

Τα υλικά είναι κοινά και για τα δύο κρεατοσκευάσματα.

- Ζυγός ακριβείας (Chyo Balance Corp. 69255)
- Laboratory Blender Stomacher 400
- Εργαστηριακό μπλέντερ
- Δοχεία τεμαχισμού
- Σακούλες Stomacher με φίλτρο
- Σπάτουλα, κουτάλι, ψαλίδι
- Λίχνος
- Απορροφητικό χαρτί
- Διάλυμα Ringer σε φιάλες 250 mL και μικρά γυάλινα μπουκαλάκια
- Διάλυμα αλκοόλης 70%
- πιπέτα Pasteur 1000 μL
- τιπς
- Vortex-Genie 2, model G-560E, Scientific Industries INC, USA

Μέθοδος: Σε στείρο εργαστηριακό περιβάλλον με την χρήση λίχνων περιμετρικά, ανοίγεται η συσκευασία του κρεατοσκευάσματος με χρήση ψαλιδιού το οποίο έχει πρώτα καυτηριαστεί. Αδειάζεται όλο το περιεχόμενο της συσκευασίας στο δοχείο τεμαχισμού και στην συνέχεια αλέθεται για μερικά δευτερόλεπτα έως ότου επιτευχθεί ένας πολύ καλός τεμαχισμός και να μην υπάρχουν μεγάλα κομμάτια δείγματος. Με ένα μεταλλικό κουτάλι, το οποίο είναι επιμελώς καυτηριασμένο λαμβάνονται 25 γρ. αλεσμένου μπέικον/καπρικού και τοποθετούνται στη σακούλα Stomacher. Προστίθενται 225 mL διαλύματος Ringer, και από την σακούλα αφαιρείται ο αέρας και τοποθετείται στο Laboratory Blender Stomacher 400 για 30'' για καλή ομογενοποίηση του μίγματος. Έπειτα, σειρά έχουν οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις όπου λαμβάνονται, αρχικά, 1000 μL από την σακούλα Stomacher και προστίθενται σε γυάλινο φιαλίδιο το οποίο περιέχει 9 mL

διαλύματος Ringer. Αφού προστεθεί η ποσότητα υγρού το φιαλίδιο σφραγίζεται και αναδεύεται πολύ καλά στο μηχάνημα Vortex. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται λαμβάνοντας 1000 µL από το προηγούμενο φιαλίδιο και αναδεύοντας σχολαστικά πριν και μετά από κάθε λήψη. Ανάλογα, με το αριθμό των δεκαδικών αραιώσεων που απαιτεί κάθε φορά το πείραμα επαναλαμβάνεται η διαδικασία σε αντίστοιχο αριθμό γυάλινων φιαλιδίων αφαιρώντας ένα που αντιστοιχεί στην σακούλα Stomacher.

2.2.3 Εμβολιασμός Θρεπτικών Υποστρωμάτων

2.2.3.1 Τεχνική επίστρωσης (spread plating)

Αφορά στην εξάπλωση γνωστού όγκου (0,1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε στερεό θρεπτικό υλικό.

Υλικά

- Διάλυμα αλκοόλης 70%
- πιπέτα Pasteur 1000 µL
- τιπς
- Vortex-Genie 2, model G-560E, Scientific Industries INC, USA
- γυάλινη κεκαμμένη ράβδος

Μέθοδος: Σε ένα ποτήρι ζέσεως με αιθανόλη 70% υπάρχει κεκαμμένη ράβδος, η οποία καυτηριάζεται προσεκτικά πάνω από τη φλόγα, προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη και ψύχεται στην άκρη του τρυβλίου. Στην συνέχεια, με την πιπέτα Παστέρ λαμβάνονται 0,1 ml βακτηριακού εναιωρήματος και με κυκλικές κινήσεις απλώνονται στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Το τρυβλίο φυλάσσεται ανεστραμμένο στον επωαστήρα στους 30°C, έως ότου αναπτυχθεί η βακτηριακή καλλιέργεια. Υπογραμμίζεται ότι ο κάθε μικροοργανισμός αναπτύσσεται με διαφορετικό ρυθμό, επομένως κάποιες καλλιέργειες χρειάζεται να μείνουν στον επωαστήρα για 2 μέρες, ενώ άλλες για 5 μέρες.

2.2.3.2 Τεχνική ενσωμάτωσης (pour plating)

Υλικά

- πιπέτα Pasteur 1000 µL

- τιπς
- Vortex-Genie 2, model G-560E, Scientific Industries INC, USA

Μέθοδος: Αφορά στην εξάπλωση γνωστού όγκου (1 ml) βακτηριακού εναιωρήματος σε τρυβλίο χωρίς θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολουθεί προσθήκη του υποστρώματος που περιέχει άγαρ σε υγρή μορφή σε θερμοκρασία 42-45°C και στερεοποίηση του υποστρώματος. Εφαρμόζεται σε μικροαερόφιλους και προαιρετικά αναερόβιους μικροοργανισμούς.

2.2.4 Μέτρηση pH

Η μέτρηση του pH είναι ένας βασικός τρόπος για την παρακολούθηση της οξύτητας ή αλκαλικότητας ενός διαλύματος. Ο αριθμός του pH αντιπροσωπεύει το επίπεδο οξύτητας ή αλκαλικότητας του διαλύματος, με το 7 να αντιπροσωπεύει την ουδετερότητα, τα χαμηλότερα τιμές υποδεικνύουν οξύτητα, ενώ οι υψηλότερες τιμές υποδεικνύουν αλκαλικότητα.

Αναλυτικότερα, το pH είναι ουσιαστικός παράγοντας για τον προσδιορισμό της ποιότητας και της ασφάλειας των προϊόντων κρέατος. Το pH του κρέατος επηρεάζει διάφορους παράγοντες, όπως το χρώμα, την υφή, τη γεύση και την ανάπτυξη μικροβίων. Το pH του νωπού κρέατος είναι συνήθως περίπου 5,5 έως 6,0 και καθώς το κρέας γερνάει, το pH μεταβάλλεται λόγω του σχηματισμού γαλακτικού οξέος. Η διατήρηση ενός κατάλληλου επιπέδου pH στα προϊόντα κρέατος είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη της ανάπτυξης επιβλαβών μικροοργανισμών και τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων. Επιπλέον, το pH επηρεάζει την τρυφερότητα και το ζουμερό του κρέατος, καθιστώντας το βασικό παράγοντα για τον καθορισμό της συνολικής ποιότητας των προϊόντων κρέατος. Όσο χαμηλότερο είναι το pH του κρέατος, τόσο πιο τρυφερό είναι. Επομένως, η μέτρηση του pH είναι απαραίτητη για να διασφαλιστεί ότι τα προϊόντα κρέατος πληρούν τα επιθυμητά πρότυπα τρυφερότητας και ευχυμίας. Το pH επηρεάζει επίσης το χρώμα του κρέατος, καθώς επηρεάζει τη χρωστική ουσία που είναι υπεύθυνη για το χρώμα του κρέατος, η μυοσφαιρίνη. Το κρέας με pH κάτω από 5,6 έχει συνήθως πιο σκούρο χρώμα, ενώ το κρέας με pH πάνω από 6, είναι πιο ανοιχτόχρωμο. Τέλος, η μέτρηση του pH είναι απαραίτητη για τη συντήρηση και αποθήκευση του κρέατος. Οι αλλαγές στο pH μπορούν

να επηρεάσουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών και χημικές αντιδράσεις, οδηγώντας σε αλλοίωση. Η παρακολούθηση του pH των προϊόντων κρέατος κατά την αποθήκευση και την επεξεργασία μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της αλλοίωσης και στη διατήρηση της ποιότητας και της ασφάλειας του προϊόντος.



Εικόνα 2.6 Το pH-μετρο που χρησιμοποιήθηκε κατά τη μελέτη

Υλικά

- Συσκευή μέτρησης pH Crison pH Meter GLP 21.
- Buffer βαθμονόμησης με pH 4 και pH 7
- Ποτήρι ζέσεως
- Υδροβολέας
- Απιονισμένο νερό
- Απορροφητικό χαρτί

Μέθοδος: Η μέτρηση pH με τη χρήση της κατάλληλης συσκευής προϋποθέτει τη βαθμονόμηση σε ένα αρχικό στάδιο. Γι' αυτό το λόγο, η συσκευή μέτρησης pH που χρησιμοποιείται στην παρούσα πειραματική διαδικασία, συνοδεύεται από δύο ρυθμιστικά διαλύματα (buffer), τα οποία έχουν pH 7 και pH 4. Η μέτρηση του pH διεξάγεται από τη συσκευή μέτρησης pH, Crison pH Meter GLP 21. Πριν από τη διαδικασία της μέτρησης pH διεξάγεται η βαθμονόμηση (calibration), εφόσον εμφανίσει την ανάλογη ένδειξη η συσκευή.

I. Βαθμονόμηση (Calibration): Η διαδικασία της βαθμονόμησης δεν είναι απαραίτητη πριν από κάθε χρήση της συσκευής αυτής, παρά μόνο αν εμφανιστεί η ανάλογη ένδειξη. Η

βαθμονόμηση διεξάγεται ως εξής: Αρχικά, πριν ξεκινήσει η βαθμονόμηση είναι απαραίτητος ο σχολαστικός καθαρισμός του ηλεκτροδίου. Έπειτα, τοποθετείται το ηλεκτρόδιο στο buffer με pH 7 μέχρι να σταθεροποιηθεί η τιμή και να επιβεβαιώσει, με ανάλογη ένδειξη η συσκευή, ότι η βαθμονόμηση ήταν επιτυχής. Στη συνέχεια, απαιτείται βαθμονόμηση στο buffer με pH 4 και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με αυτή του pH 7. Δεν ξεχνάμε να ξεπλύνουμε το ηλεκτρόδιο πριν και μετά από την κάθε μέτρηση.

II. Μέτρηση: Εφόσον ολοκληρωθεί η διαδικασία της βαθμονόμησης, μπορεί πλέον να χρησιμοποιηθεί η συσκευή μέτρησης του pH στο προϊόν. Ειδικότερα, στο δείγμα, το οποίο προηγουμένως έχει υποστεί άλεση και ομογενοποίηση στο Stomacher, τοποθετείται το ηλεκτρόδιο μέτρησης pH, πατιέται το κουμπί ENT και μετά από λίγα δευτερόλεπτα λαμβάνεται η τιμή pH του δείγματος. Το ηλεκτρόδιο πρέπει να καθαρίζεται σχολαστικά πριν και μετά από κάθε μέτρηση. Τέλος, η διαδικασία προσδιορισμού του pH για κάθε δείγμα επαναλαμβάνεται τρεις φορές και λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

2.3 Αποστείρωση θρεπτικών μέσων και άλλων υλικών

Η υγρή αποστείρωση είναι μια κρίσιμη πτυχή της μικροβιολογίας που περιλαμβάνει την εξάλειψη μικροοργανισμών από τα υγρά για να αποτραπεί ο πολλαπλασιασμός ή η ανάπτυξή τους. Ο πρωταρχικός στόχος της υγρής αποστείρωσης είναι να διασφαλίσει ότι ένα υγρό είναι απαλλαγμένο από όλους τους ζωντανούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών, των μυκήτων και των σπορίων.

Διάφορες τεχνικές χρησιμοποιούνται για την επίτευξη υγρής αποστείρωσης, συμπεριλαμβανομένων φυσικών, χημικών και βιολογικών μεθόδων. Οι φυσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν το αυτόκλειστο, τη διήθηση και την ακτινοβολία, ενώ οι χημικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τη χρήση διαφόρων χημικών παραγόντων όπως αλκοόλες, αλδεΐδες και οξειδωτικά μέσα. Οι βιολογικές μέθοδοι, από την άλλη πλευρά, χρησιμοποιούν ζωντανούς οργανισμούς όπως βακτηριοφάγους για την εξάλειψη άλλων μικροοργανισμών.

Το αυτόκλειστο είναι μια κοινή μέθοδος αποστείρωσης που χρησιμοποιείται στη μικροβιολογία, τις ιατρικές εγκαταστάσεις και άλλες βιομηχανίες. Περιλαμβάνει την έκθεση του αντικειμένου ή της ουσίας σε ατμό υψηλής πίεσης σε θερμοκρασία 121°C (250°F) για καθορισμένο χρόνο, συνήθως περίπου 15-20 λεπτά. Η υψηλή θερμοκρασία και

η πίεση σκοτώνουν όλους τους μικροοργανισμούς που υπάρχουν, συμπεριλαμβανομένων των σπόρων, των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων. Το αυτόκλειστο είναι μια αξιόπιστη και αποτελεσματική μέθοδος αποστείρωσης και χρησιμοποιείται συνήθως για χειρουργικά εργαλεία, εργαστηριακό εξοπλισμό και άλλα αντικείμενα που πρέπει να είναι εντελώς απαλλαγμένα από μικροοργανισμούς. Ωστόσο, ορισμένα υλικά μπορεί να καταστραφούν από την υψηλή θερμοκρασία και την πίεση και ορισμένοι τύποι μικροοργανισμών μπορεί να είναι ανθεκτικοί στο αυτόκαυστο.



Εικόνα 2.7 Αποστειρωτήρας

Υλικά

- αυτόκλειστος αποστειρωτήρας
- πλυντήριο πιάτων

Μέθοδος: Τα θρεπτικά υποστρώματα αφού παρασκευαστούν τοποθετούνται με το πόμα όχι ερμητικά κλειμένο στο θάλαμο αποστείρωσης για έκθεση τους σε ατμό υψηλής πίεσης σε θερμοκρασία 121°C (250°F) για καθορισμένο χρόνο, 15 λεπτά. Τα σκεύη από την άλλη, πριν από κάθε αποστείρωση σε αυτόκλειστο προηγείται καλό πλύσιμο στο χέρι ή και στο πλυντήριο πιάτων για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων κρεάτων. Έπειτα, τα σκεύη τοποθετούνται στο αυτόκλειστο, που η αποστείρωση επιτυγχάνεται στους 121 °C για 30 min.

2.4 Καταμέτρηση αποικιών

Οι μέθοδοι εκτίμησης του μικροβιακού φορτίου των τροφίμων διακρίνονται σε έμμεσες και άμεσες.

- Έμμεσες: οι μέθοδοι της αναγωγής χρωστικών, της μέτρησης της ATP, της μέτρησης βακτηριακών μεταβολιτών γρήγοροι και αποτελεσματικοί αλλά με υψηλό κόστος εγκατάστασης του εξοπλισμού
- Άμεσες: οι μικροσκοπικές μέθοδοι και οι μέθοδοι που βασίζονται στη μέτρηση /εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης μετά από επώαση του δείγματος σε στερεά ή υγρά υποστρώματα.

Η εκτίμηση του ζωντανού μικροβιακού πληθυσμού των τροφίμων σε κατάλληλο θρεπτικό στερεό υπόστρωμα (agar) βασίζεται στην παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται ακινητοποιημένο σε θρεπτικό υπόστρωμα και σχηματίζει μια ορατή αποικία. Άρα 1 κύτταρο στο δείγμα (τρόφιμο)=1 αποικία στο agar.

Η παραδοχή δεν είναι απόλυτα σωστή καθώς:

- τα μικροβιακά κύτταρα του δείγματος μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικά είδη με διαφορετικές φυσιολογικές απαιτήσεις και άριστες συνθήκες ανάπτυξης και άρα κάποια μπορεί να μην αναπτυχθούν στο συγκεκριμένο χρόνο ή στις συνθήκες επώασης
- δεν αναπτύσσονται όλα τα κύτταρα (ακόμα και του ίδιου είδους) το ίδιο εύκολα ή γρήγορα υπό τις ίδιες συνθήκες
- μερικά μικρόβια λόγω θρεπτικών ελλείψεων του υποστρώματος δεν σχηματίζουν ορατές αποικίες
- μια αποικία δεν προέρχεται πάντα από ένα μικροβιακό κύτταρο (μπορεί ένα συσσωμάτωμα κυττάρων να δώσει 1 αποικία ή κάποια κύτταρα να μην δώσουν καμία αποικία)
- Κάποιες φορές οι μικροοργανισμοί έχουν κινητικότητα μέσα στο άγαρ ή οι αποικίες είναι συνενωμένες δυσκολεύοντας τη μέτρηση μεμονωμένων αποικιών.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων σε ένα τρόφιμο:

- a. το δείγμα ομογενοποιείται όσο γίνεται καλύτερα για το διασκορπισμό των μικροβιακών κυττάρων.

b. χρησιμοποιούνται διαφορετικά υποστρώματα, άλλα πιο εκλεκτικά κι άλλα που επιτρέπουν την καταμέτρηση πολλών μικροοργανισμών ταυτόχρονα.

c. Εφαρμόζονται διαφορετικές συνθήκες επώασης, ώστε να καταστεί δυνατή η καταμέτρηση των διαφόρων μικροβιακών ομάδων (αερόβια, μεσόφιλα, ψυχρότροφα, κ.λ.π.)

Το αποτέλεσμα της εκτίμησης των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζεται σε Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units - CFU) / g ή ml δείγματος. [αποικίες]



Εικόνα 2.8 Καταμετρητής αποικιών

Υλικά

- μηχανή καταμέτρησης αποικιών (Colony Counter, SC6, BioCote)
- υαλογραφικός μαρκαδόρος
- τρυβλία petri

Μέθοδος: Οι κανόνες καταμέτρησης αποικιών σε τρυβλία, που ακολουθήθηκαν ήταν οι εξής:

Επιλέγονται τα τρυβλία που έχουν 30-300 αποικίες για την ενσωμάτωση και 15 -150 για την επίστρωση. Αν δεν υπάρχει κανένα τρυβλίο ανάμεσα στα παραπάνω όρια, τότε επιλέγεται το τρυβλίο της μικρότερης αραιώσης που έχει αποτέλεσμα κοντά σε αυτά τα όρια. Ενώ, αν υπάρχουν δύο διαδοχικές αραιώσεις εντός των παραπάνω ορίων του 1ου κανόνα τότε λαμβάνεται ο μέσος όρος του τελικού αποτελέσματος των δυο αραιώσεων, μόνο όταν το τελικό αποτέλεσμα της μεγαλύτερης αραιώσης (cfu/g) δεν ξεπερνά το διπλάσιο της προηγούμενης.

Μετά από την επιλογή των τρυβλίων που η ανάπτυξη στο θρεπτικό μέσο συμφωνεί με τους παραπάνω κανόνες, χρησιμοποιείται ένας μετρητής αποικιών που διαθέτει ένα

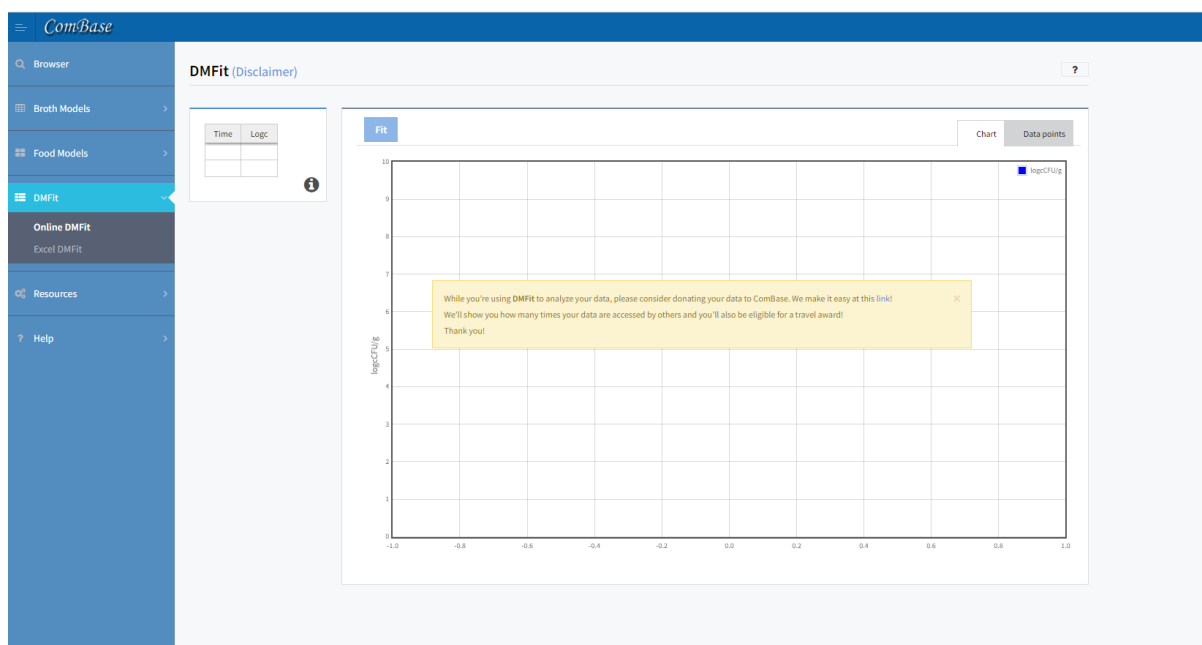
σύστημα το οποίο μετρά κάθε άγγιγμα του μαρκαδόρου στο τρυβλίο που είναι τοποθετημένο στην βάση του. Το κάθε άγγιγμα αντιστοιχεί σε μια αποικία και βοηθά τον αναλυτή στο μέτρημα καθώς κάθε αποικία που χρωματίζει, ο μετρητής την μετράει.

2.5 Μεθοδολογία υπολογισμού διάρκειας ζωής υπό σταθερές θερμοκρασίες

Βήμα 1^ο: Καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία

Βήμα 2^ο: Σε φύλλο εργασίας Excel εισάγουμε τα στοιχεία: «Χρόνος δειγματοληψίας»/ πληθυσμός βακτηρίων

Βήμα 3^ο: Εισαγωγή των δεδομένων στο ελεύθερα διαθέσιμο στο διαδίκτυο λογισμικό ComeBase (<https://browser.combase>)



Εικόνα 2.9: Εικόνα από την ComeBase – εισαγωγή των δεδομένων.

Βήμα 4^ο: Εισαγωγή των δεδομένων και επιλογή του «Fit» για να γίνει η δημιουργία της καμπύλης μέσω της καλύτερης προσαρμογής (fit).

Βήμα 5°: Διαβάζουμε στο κάτω τμήμα της σελίδας τον μοντέλο υπό το οποία δημιουργήθηκε η καμπύλη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα X τα στοιχεία τα οποία προκύπτουν από την ComeBase είναι:

R-square: 0.986

Initial value: 4.811 ± 0.175 – αντιστοιχεί στο **No**

Lag/shoulder: 8.304 ± 2.781 – αντιστοιχεί στο **λ**

Maximum Rate: 0.287 ± 0.371 – αντιστοιχεί στο **μ**

Final Value: 7.85 ± 0.0955 – αντιστοιχεί στο **N**

Επίσης αναφέρεται και το είδος του μοντέλου από το οποίο προήλθαν αυτές οι τιμές.

Βήμα 6°: Χρησιμοποίηση της απλοποιημένης μορφής της λογιστικής εξίσωσης ανάπτυξης $\log N = \mu \cdot (t - \lambda) + \log N_0$ (εξίσωση 1) η οποία είναι μια λογαριθμική γραμμική εξίσωση που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Ουσιαστικά η εξίσωση προέχεται από την εκθετική εξίσωση ανάπτυξης $N(t) = N_0 \cdot e^{\mu(t-\lambda)}$

Αν λύσουμε ως προς t την εξίσωση 1 τότε έχουμε: $t = \frac{1}{\mu} \cdot \log \log \left(\frac{Nt}{N_0} \right) + \lambda$

Όπου:

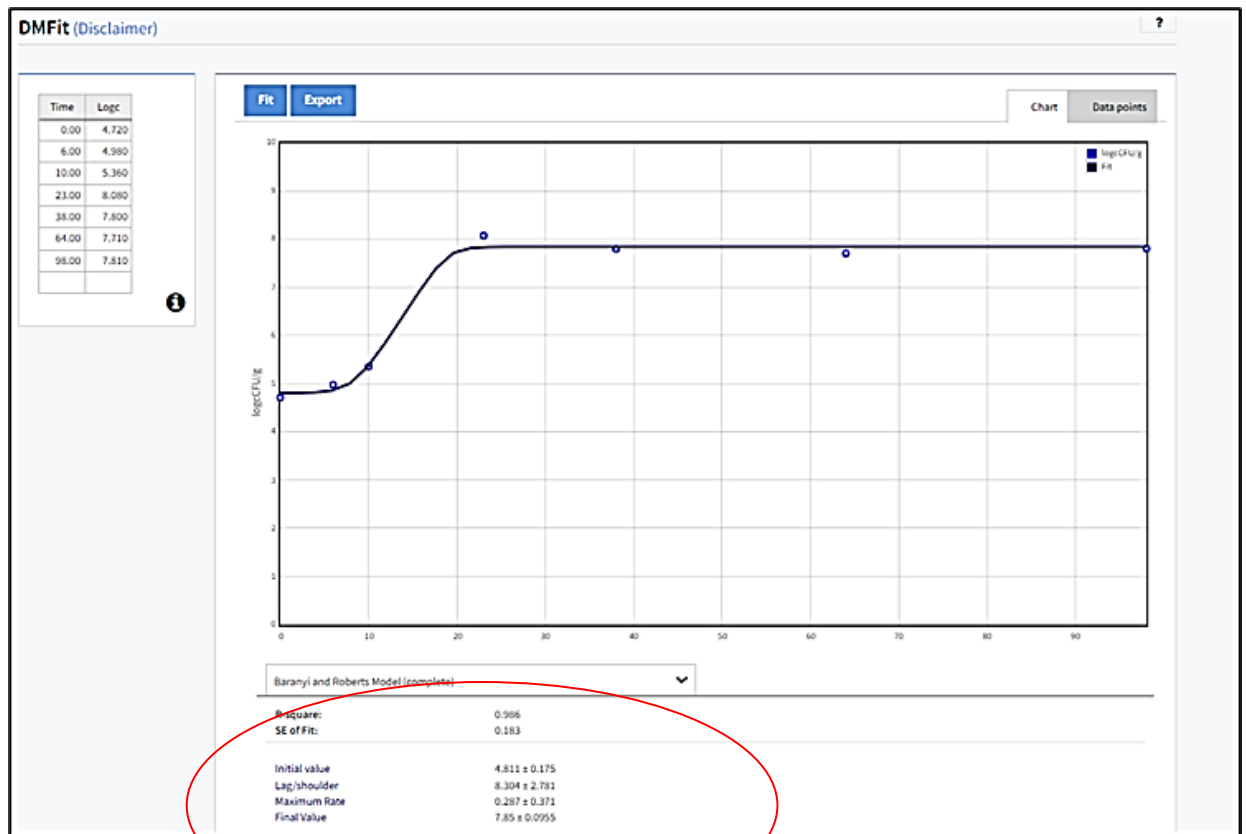
μ= μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης

Nc = ο πληθυσμός των βακτηρίων στο τέλος της διάρκειας ζωής – τον ορίζουμε εμείς

No = το αρχικό μικροβιακό φορτίο

λ = φάση προσαρμογής

Από τα παραπάνω μας είναι γνωστό μόνο ο αρχικός πληθυσμός No. Τα υπόλοιπα πρέπει να υπολογιστούν όπως και γίνεται μέσω της εφαρμογής ComeBase.



Baranyi and Roberts Model (complete)

R-square:	0.986
SE of Fit:	0.183
Initial value	4.811 ± 0.175
Lag/shoulder	8.304 ± 2.781
Maximum Rate	0.287 ± 0.371
Final Value	7.85 ± 0.0955

Εικόνα 2.10: Εικόνα από την ComeBase – εμφάνιση της καμπύλης του μοντέλου και των δεδομένων της καμπύλης.

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Αιτιολόγηση επιλογής πειραματικών συνθηκών

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι, κατά την παραλαβή των κρεατοσκευασμάτων έγινε καταμέτρηση και αποθήκευση σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες 5-10-15°C. Ύστερα, αφού προηγήθηκε παρασκευή του διαλύματος Ringer, έγιναν οι κατάλληλες αραιώσεις και γνωστού όγκου βακτηριακού εναιωρήματος εμβολιάστηκε σε θρεπτικό υλικό. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: PCA, MRS, CTA και CLO. Η θερμοκρασία των 5°C επιλέχθηκε διότι είναι η θερμοκρασία που συναντάται πιο συχνά στα ψυγεία στην αγορά, ενώ οι θερμοκρασίες 10 και 15°C επιλέχθηκαν για καθαρά πειραματικούς σκοπούς ώστε να εξεταστεί η μικροβιακή χλωρίδα του προϊόντος. Οι αραιώσεις που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων ήταν από 10^{-1} έως 10^{-8} . Διέφεραν από υπόστρωμα σε υπόστρωμα και από τα αποτελέσματα της προηγούμενης πειραματικής διαδικασίας επιλέγονται οι, κατά προσέγγιση, κατάλληλες αραιώσεις για την επόμενη. Ο όγκος του βακτηριακού εναιωρήματος είναι 0,1ml αν επιλέγεται η τεχνική επίστρωσης και 1ml αν επιλέγεται η τεχνική ενσωμάτωσης. Η επιλογή των επιστρωμάτων έγινε έπειτα από τα αποτελέσματα προκαταρκτικών δοκιμών και διότι από επιστημονικές μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η μικροβιακή χλωρίδα του χοιρινού κρέατος περιλαμβάνει κυρίως OMX βακτήρια, οξυγαλακτικά βακτήρια, εντεροβακτήρια, καρνοβακτήρια, Brochothrix και κλοστρίδια.

Μικροοργανισμοί	Υπόστρωμα	Εμβολιασμός	Συνθήκες επώασης
OMX	Plate Count Agar (PCA)	Επίστρωση	30°C/ 48 h Αερόβια
Οξυγαλακτική Χλωρίδα	Man, Rogosa, Sharpe (MRS)	Επίστρωση	37°C/ 96 h αναερόβια
Carnobacterium	Carnobacterium Selective Agar (CTA)	επιφανειακή	30°C/ 48 h αναερόβια
Clostridium	Reinforced Clostridial Agar (CLO)	επιφανειακή	30°C/ 48 h αναερόβια

Πίνακας 3.1 Πειραματικές συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμών

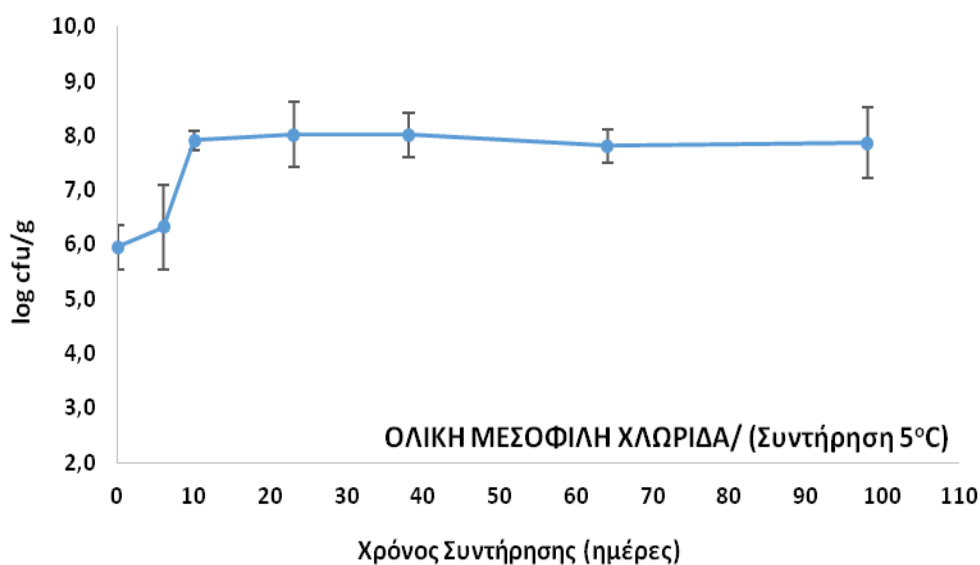
3.2 Επεξήγηση πειραματικών αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα δίδονται σε διαγράμματα (Διαγράμματα 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12) και είναι ένα για κάθε υπόστρωμα σε κάθε θερμοκρασία και εκφράζουν την καμπύλη ανάπτυξης κάθε ομάδας βακτηρίων. Ο άξονας x εκφράζει τον χρόνο συντήρησης των δειγμάτων σε μέρες και ο άξονας y τον βακτηριακό πληθυσμό σε log CFU/g.

3.2.1 Εξέλιξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας

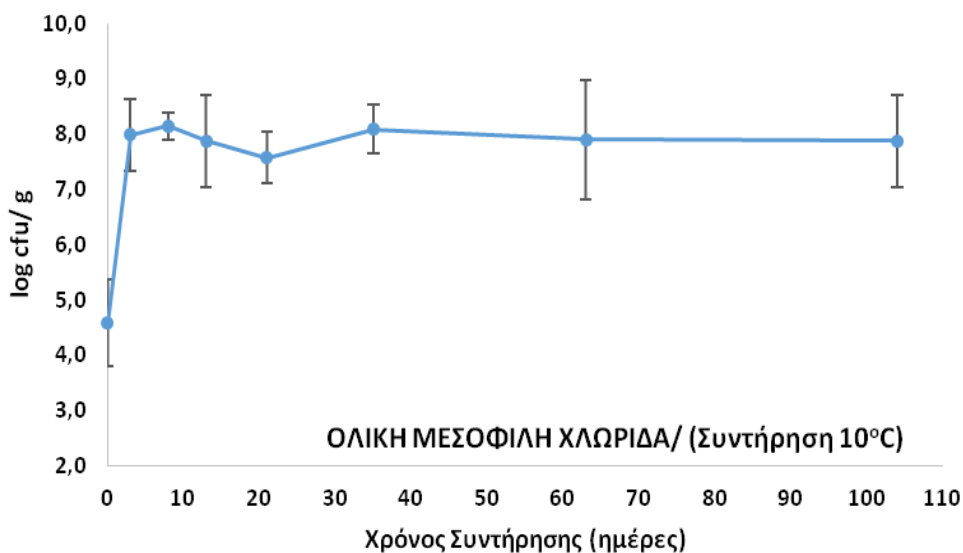
Ακολουθούν τρία διαγράμματα στα οποία παρουσιάζεται η εξέλιξη των πληθυσμών της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ) τα οποία συντηρούνταν υπό συσκευασία κενού στους 5, 10 και 15°C.

Στο **Διάγραμμα 3.1** είναι σαφές ότι η Ολική Αερόβια Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ) στα δείγματα ξεκινά από ένα υψηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο, περίπου 10^6 cfu/g και περίπου σε 5 ημέρες έχει μπει στην φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης, η οποία ολοκληρώνεται περίπου την 10^η ημέρα, οπότε και η ΟΜΧ έχει αυξηθεί κατά 2 log cycles. Από το σημείο αυτό και μετά ο πληθυσμός παρέμεινε σε αυτό το επίπεδο σε όλη την διάρκεια της συντήρησης.



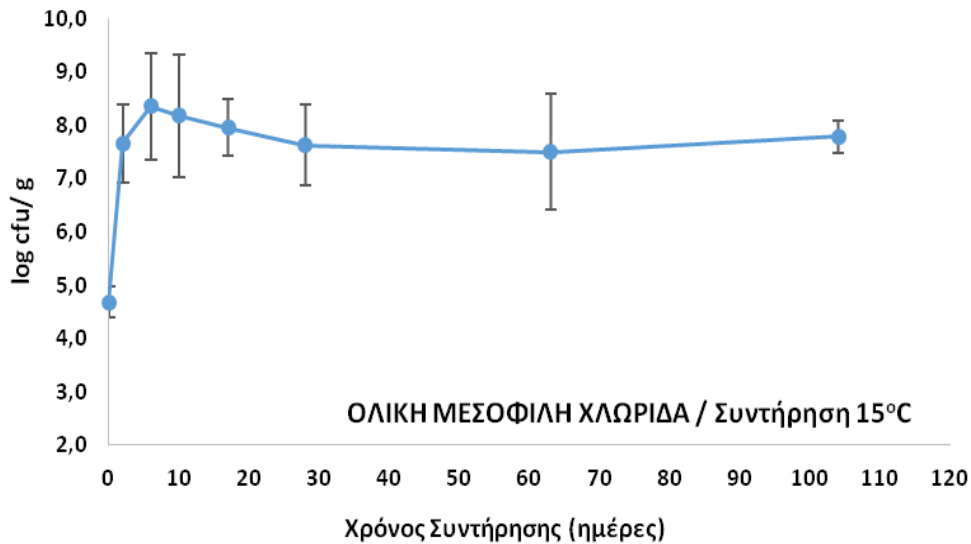
Διάγραμμα 3.1 Μεταβολή του πληθυσμού της ΟΜΧ (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Στο **Διάγραμμα 3.2** παρουσιάζεται η εξέλιξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στα δείγματα μπέικον σε θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν της τάξης του 10⁴-10⁵ cfu/g και δεν παρουσιάστηκε φάση προσαρμογής. Αντίθετα ο πληθυσμός τους ανέβηκε πολύ σύντομα -μέσα σε 3 μέρες- κατά 3,5 log cycles. Μεταξύ της 8^{ης} και 35^{ης} μέρας επώασης υπήρξε μία μικρή μείωση και έπειτα αύξηση του πληθυσμού κατά 0,5 log cycle, όπου έφτασε 10⁸ cfu/g και έπειτα παρέμεινε σταθερός για όλη την διάρκεια συντήρησης στους 10°C.



Διάγραμμα 3.2 Μεταβολή του πληθυσμού της ΟΜΧ (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Στο **Διάγραμμα 3.3** είναι σαφές ότι η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα στα δείγματα ξεκινά από ένα σχετικά υψηλό μικροβιακό φορτίο, σχεδόν 10⁶ cfu/g και δεν παρατηρήθηκε φάση προσαρμογής. Την 8^η μέρα παρατηρήθηκε μέγιστο φορτίο περίπου 10⁸ cfu/g. Μέχρι την 28^η μέρα ο πληθυσμός μειώθηκε περίπου 0,5 log cycle και έπειτα ο πληθυσμός της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας παρέμεινε σταθερός στα δείγματα που στηρίχθηκαν σε θερμοκρασία 15°C.



Διάγραμμα 3.3 Μεταβολή του πληθυσμού της ΟΜΧ (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

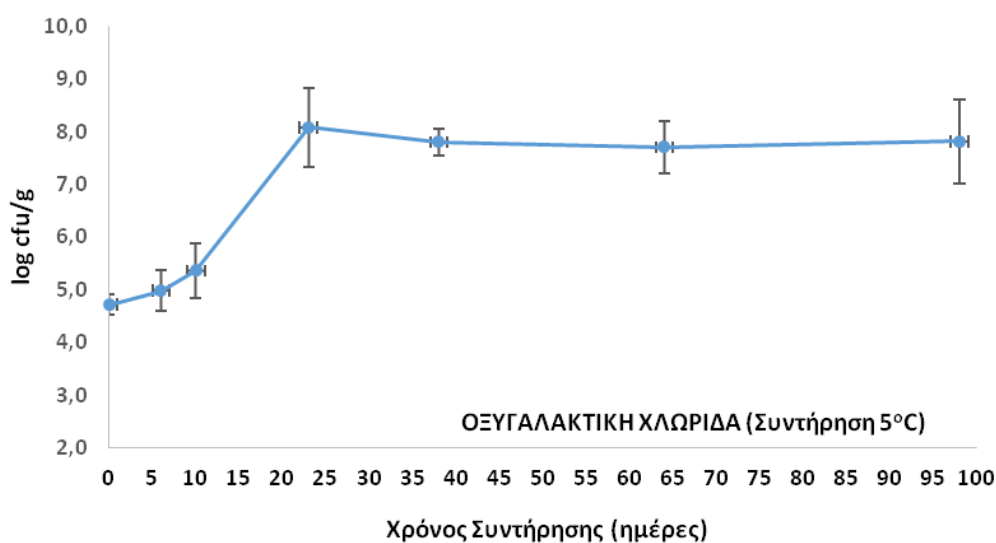
Όπως παρατηρείται στα **Διαγράμματα 3.1, 3.2 και 3.3**, η μέγιστη συγκέντρωση των ΟΜΧ βακτηρίων παρουσιάζεται την σε ποσότητα περίπου 8 logCFU/g την 23η μέρα, την 8η μέρα και την 6η ημέρα στις θερμοκρασίες αποθήκευσης 5, 10 και 15°C αντίστοιχα.

Οι Katsaros και Ταουκίς (2021) σε μία αντίστοιχη έρευνα μελέτησαν την ανάπτυξη της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας σε συσκευασμένα Λουκάνικα Bratwurst. Σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5, 10 και 15°C η μέγιστη συγκέντρωση ΟΜΧ βακτηρίων σημειώθηκε την 13^η μέρα περίπου σε ποσότητα 10⁸ cfu/g, την 10^η μέρα περίπου σε ποσότητα 10⁹ cfu/g και την 6^η μέρα σε ποσότητα 10⁹ cfu/g, αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα των δύο ερευνών είναι πολύ κοντά με μικρές μόνο αποκλίσεις. Πιο συγκεκριμένα, η μέγιστη ποσότητα ΟΜΧ βακτηρίων, της παρούσας εργασίας, είναι 23 ημέρες σε θερμοκρασία 5°C, δηλαδή σχεδόν 10 μέρες περισσότερες από την εργασία των Katsaros και Ταουκίς (2021), ενώ στην θερμοκρασίες αποθήκευσης 10°C η απόκλιση είναι 2 ημέρες και στην θερμοκρασία 15°C η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρείται την 6^η μέρα και στις δύο έρευνες. Όσον αφορά τις ποσότητες των βακτηρίων οι αποκλίσεις μεταξύ των μελετών είναι πολύ μικρές.

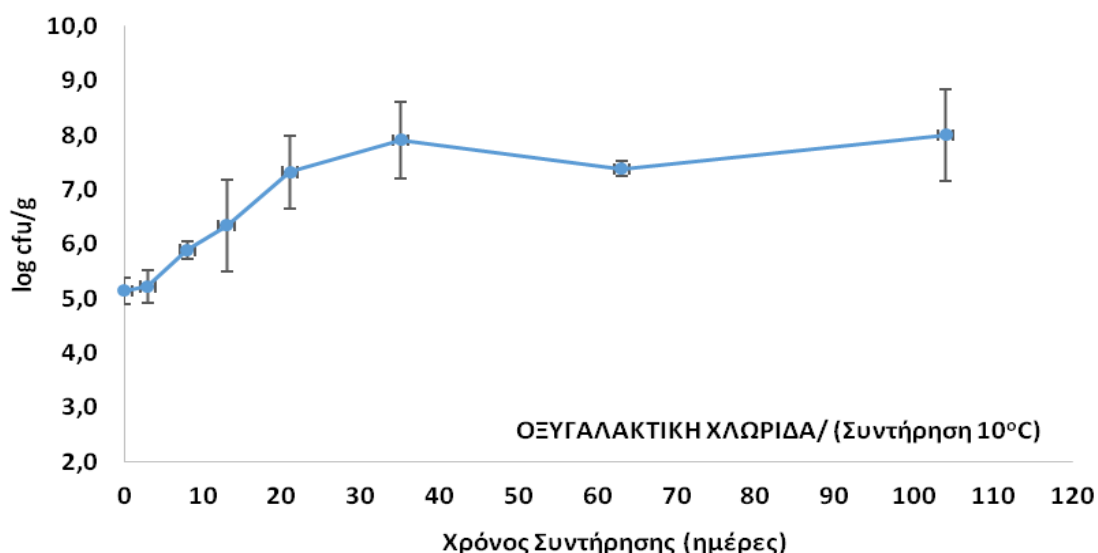
3.2.2 Εξέλιξη της της οξυγαλακτικής χλωρίδας

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η εξέλιξη των πληθυσμών των Οξυγαλακτικών βακτηρίων τα οποία συντηρούνταν υπό συσκευασία κενού στους 5, 10 και 15°C. Στο **Διάγραμμα 3.4** παρουσιάζεται η εξέλιξη των Οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα μπέικον. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν της τάξης του 10^4 cfu/g και παρουσιάστηκε φάση προσαρμογής (lag phase) η οποία όμως ήταν πολύ σύντομη. Από την 5^η ημέρα συντήρησης και μετά ο πληθυσμός των Οξυγαλακτικών βακτηρίων άρχισε να αυξάνεται σταδιακά και μπήκε στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης η οποία ολοκληρώθηκε την 25^η ημέρα συντήρησης, οπότε και εισήλθε στην στατική φάση. Ο πληθυσμός ήταν της τάξης του 10^8 cfu/mL και παρέμεινε σταθερό για όλη την διάρκεια της συντήρησης στους 5°C.



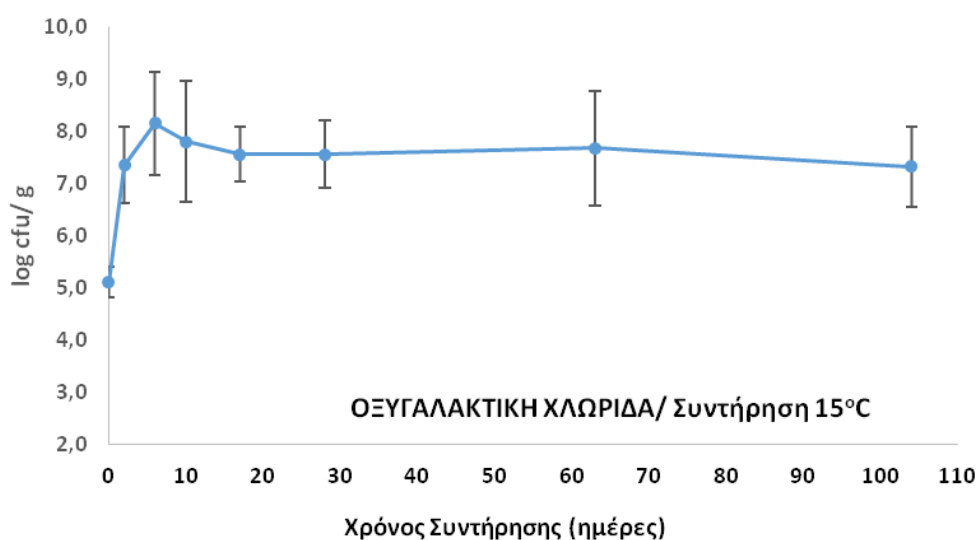
Διάγραμμα 3.4 Μεταβολή του πληθυσμού της Οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό.

Στο **Διάγραμμα 3.5** είναι σαφές ότι ο μικροβιακός πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που διατηρήθηκαν στους 10°C ξεκινά από την τάξη των 10^5 cfu/g. Παρατηρήθηκε πάλι η φάση της προσαρμογής η οποία ήταν σύντομη, περίπου 3 μέρες, και μετά ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων άρχισε να αυξάνεται μέχρι και την 35^η ημέρα, οπότε από αυτό το σημείο και μετά σταθεροποιήθηκε.



Διάγραμμα 3.5 Μεταβολή του πληθυσμού της Οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Στο **Διάγραμμα 3.6** παρουσιάζεται η εξέλιξη του πληθυσμου της οξυγαλακτικής χλωρίδας στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 15°C. Ο πληθυσμός ξεκίνησε από ένα υψηλό μικροβιακό φορτίο της τάξης του 10^5 cfu/g. Χωρίς να παρατηρηθεί στάδιο προσαρμογής ο πληθυσμος αυξήθηκε μέχρι και την 6^η ημέρα κατά 3 log cycles. Την 16^η μέρα ο πληθυσμός ήταν μειωμένος περίπου κατά 0,6 log cycle και έπειτα παρέμεινε σταθερός μέχρι το τέλος των πειραματικών δοκιμών.



Διάγραμμα 3.6 Μεταβολή του πληθυσμού της Οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Όπως παρατηρείται στα **Διαγράμματα 3.4, 3.5 και 3.6**, η συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων έφτασε σε τιμές μεγαλύτερες του 7 log CFU/g σε 6 μέρες για την θερμοκρασία αποθήκευσης 5°C, 3 μέρες για την θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C και σε 2 μέρες για θερμοκρασία αποθήκευσης 15°C.

Οι Rodriguez-Catrula & Garre (2023) ερεύνησαν την ανάπτυξη LAB βακτηρίων σε συσκευασμένο σε κενό βόειο κρέας σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 0-10°C. Σύμφωνα με την μελέτη τους, η συγκέντρωση οξυγαλακτικών βακτηρίων έφτασε σε τιμές μεγαλύτερες του 7 logCFU/g σε 432 ώρες (χαμηλό pH) και 205 ώρες (υψηλό pH) στην θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C και 213 ώρες (χαμηλό pH) και 103 ώρες (υψηλό pH) στην θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C.

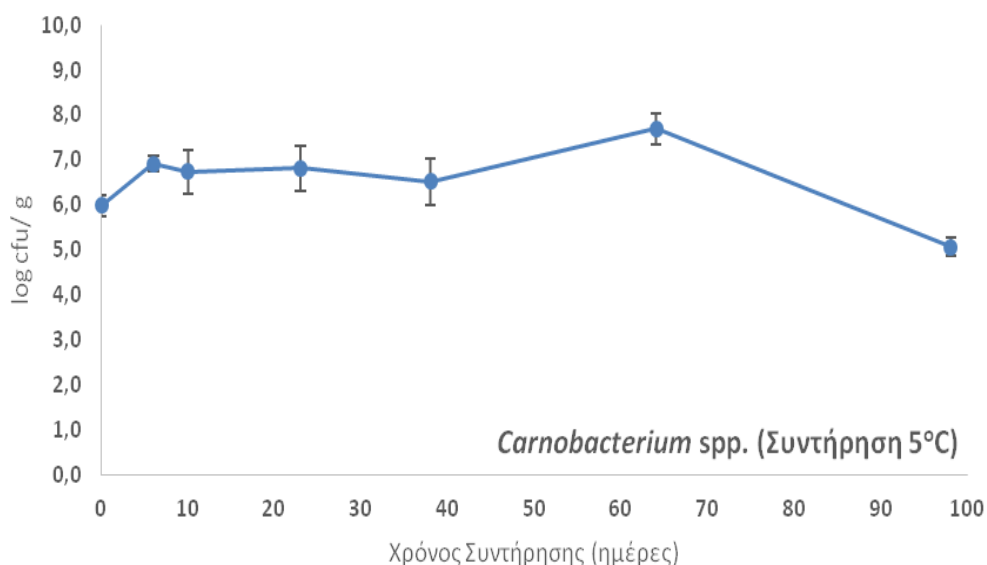
Σε σύγκριση των δύο ερευνών, κατά την μελέτη των Rodriguez-Catrula & Garre οι συγκέντρωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων φτάνουν σε αργότερο χρόνο τις τιμές μεγαλύτερες του 7 log CFU/g σε σχέση με την παρούσα μελέτη. Ειδικότερα, στο συσκευασμένο σε κενό βόειο κρέας η τιμή αυτή παρατηρήθηκε σε 8,5-10 μέρες στους 4°C, δηλαδή 2,5 με 4 μέρες παραπάνω από αυτές της μελέτης στο συσκευασμένο σε κενό μπέικον με θερμοκρασία αποθήκευσης τους 5°C. Αντίστοιχα, στην θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C, οι Rodriguez-Catrula & Garre έφτασαν τιμή μεγαλύτερη του 7 logCFU/g σε 4-9 μέρες, δηλαδή 1-6 μέρες περισσότερες από όσες χρειάστηκαν για την παρούσα μελέτη.

3.2.3 Εξέλιξη του πληθυσμού *Carnobacterium* spp.

Ακολουθούν τρία διαγράμματα στα οποία παρουσιάζεται η εξέλιξη των πληθυσμών βακτηρίων του γένους *Carnobacterium* τα οποία συντηρούνταν υπό συσκευασία κενού στους 5, 10 και 15°C.

Στο **Διάγραμμα 3.7** είναι σαφές ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο των βακτηρίων *Carnobacterium* στα δείγματα ήταν υψηλό περίπου 10^6 cfu/g. Μέσα σε 6 μέρες ο πληθυσμός αυξήθηκε μόνο κατά 1 log cycle και παρέμεινε σταθερός για τις επόμενες 30

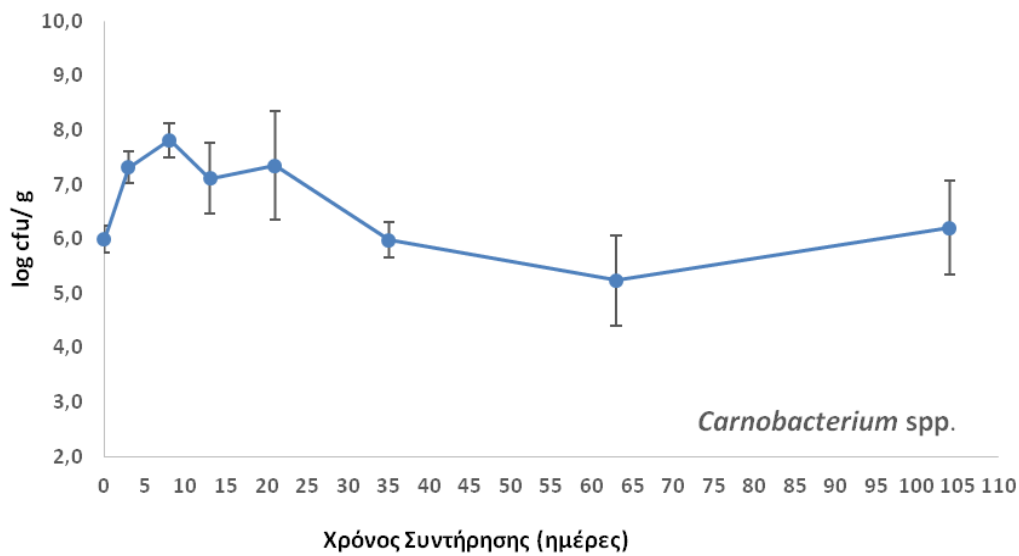
ημέρες των πειραματικών δοκιμών στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 5°C. Την 64^η ημέρα παρατηρήθηκε το μέγιστο μικροβιακό φορτίο περίπου 1,5 log cycles πάνω από το αρχικό μικροβιακό φορτίο. Από το σημείο αυτό και μετά ο πληθυσμός μειώθηκε - φάση θανάτου.



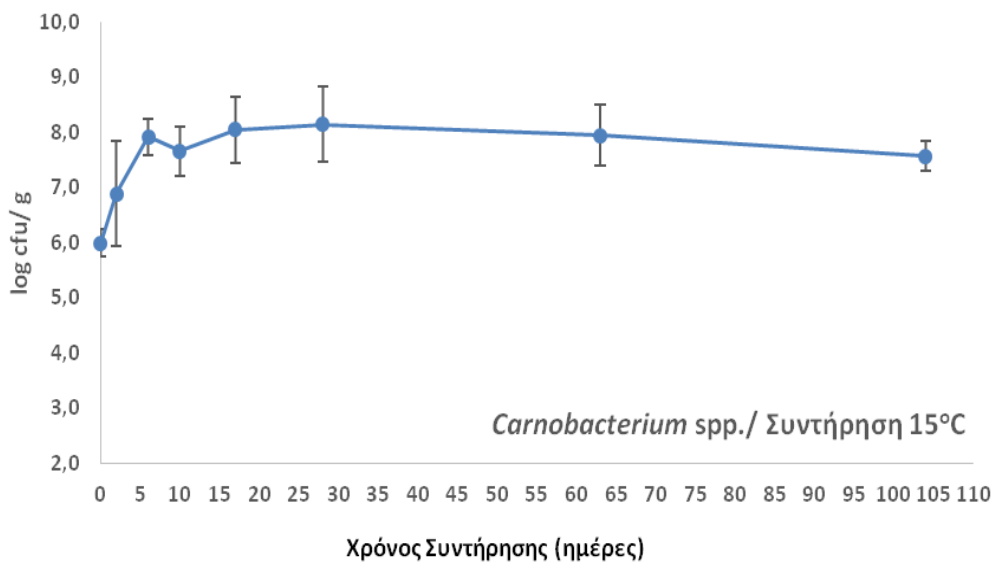
Διάγραμμα 3.7 Μεταβολή του πληθυσμού των *Carnobacterium spp.* μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Στο **Διάγραμμα 3.8** παρουσιάζεται η εξέλιξη του πληθυσμού των βακτηρίων *Carnobacterium spp.* στα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 10°C. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο ήταν υψηλό της τάξης του 10^6 cfu/g και χωρίς να παρατηρείται φάση προσαρμογής το φορτίο αυξήθηκε κατά 2 log cycles μέσα σε 10 ημέρες. Μέχρι την 20^η μέρα παρατηρήθηκε μικρή μείωση περίπου 1 log cycle και στην συνέχεια μεγαλύτερη μείωση μέχρι το φορτίο να είναι της τάξης του 10^5 cfu/g. Από εκείνη την μέρα και μετά ο πληθυσμός των δειγμάτων παρέμεινε σταθερός στα 10⁵-10⁶ cfu/g μέχρι το πέρας των πειραματικών δοκιμών.

Στο **Διάγραμμα 3.9** είναι σαφές ότι το αρχικό μικροβιακό φορτίο των βακτηρίων *Carnobacterium spp.* ήταν υψηλό, της τάξης του 10^6 cfu/g. Από την αρχή των πειραμάτων ο μικροβιακός πληθυσμός των δειγμάτων μπήκε στην φάση της λογαριθμικής ανάπτυξης. Το μικροβιακό φορτίο αυξήθηκε κατά 2 log cycles τις πρώτες 6 ημέρες και στην συνέχεια παρέμεινε σταθερό για όλη την διάρκεια συντήρησης στους 15°C.



Διάγραμμα 3.8 Μεταβολή του πληθυσμού των *Carnobacterium spp.* μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.



Διάγραμμα 3.9 Μεταβολή του πληθυσμού των *Carnobacterium spp.* μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Η παρούσα πειραματική μελέτη παρουσιάζει, μεταξύ άλλων, την ανάπτυξη των *Carnobacterium spp.* που παρατηρείται σε συσκευασμένο σε κενό προϊόν μπέικον σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5, 10 και 15°C. Όπως παρατηρείται στα **Διαγράμματα 3.7, 3.8 και 3.9** η μέγιστη συγκέντρωση των βακτηρίων παρουσιάζεται την 64^η μέρα σε

ποσότητα 10^7 cfu/g, την 8^η μέρα σε ποσότητα 10^8 cfu/g και την 6^η μέρα σε ποσότητα 10^8 cfu/g σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5, 10 και 15°C αντίστοιχα.

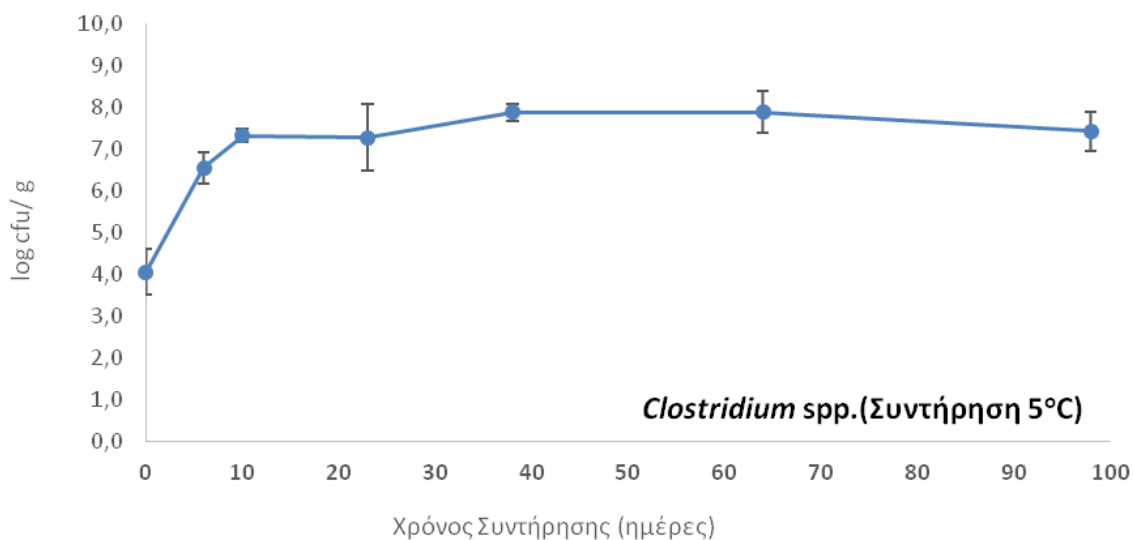
Οι Annalisa Casaburi, Antonella Nasi, Ilario Ferrocino, Rossella Di Monaco, Gianluigi Mauriello, Francesco Villani και Danilo Ercolini (2011) σε μία αντίστοιχη έρευνα μελέτησαν την δραστηριότητα του *Carnobacterium maltaromaticum* που σχετίζεται με την αλλοίωση σε κρέας αποθηκευμένο στον αέρα και σε κενό αέρος. Η μελέτη τους έδειξε ότι σε δείγματα κρέατος μετά από 0 και 7 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C σε συσκευασίες αέρα και κενού η συγκέντρωση κάποιων στελεχών των *Carnobacterium* έφτασαν τη τιμή 7,94 log CFU/g την 7^η ημέρα του πειράματος ξεκινώντας από συγκεντρώσεις της τάξεως του 4,25 log CFU/g.

Σε σύγκριση των δύο ερευνών, παρατηρείται πως κατά την μελέτη των Annalisa Casaburi, Antonella Nasi, Ilario Ferrocino, Rossella Di Monaco, Gianluigi Mauriello, Francesco Villani και Danilo Ercolini (2011) ο πληθυσμός των *Carnobacterium* αναπτύσσεται σε τιμές μεγαλύτερες του 10^7 cfu/g στην 1η εβδομάδα του πειράματος όπως συνέβη και στην παρούσα μελέτη με εξαίρεση τον πληθυσμό *Carnobacterium* spp. βακτηρίων που αποθηκεύτηκαν στην θερμοκρασία 5°C. Τέλος, και στις 2 μελέτες σημειώνεται η μεταβολή του pH στην ανάπτυξη των *Carnobacterium* έχει μεγαλύτερη επιρροή από την μεταβολή της θερμοκρασίας συντήρησης.

3.2.4 Εξέλιξη του πληθυσμού *Clostridium* spp.

Ακολουθούν τέσσερα διαγράμματα στα οποία παρουσιάζεται η εξέλιξη των πληθυσμών βακτηρίων του γένους *Clostridium* τα οποία συντηρούνταν υπό συσκευασία κενού στους 5, 10 και 15°C.

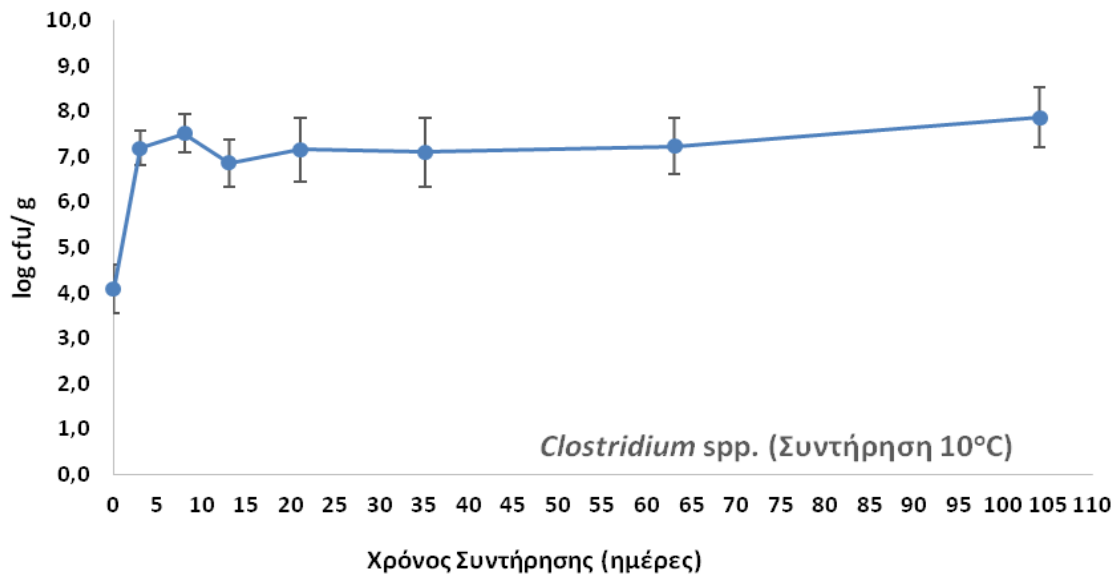
Στο **Διάγραμμα 3.10** παρουσιάζεται η εξέλιξη των βακτηρίων *Clostridium* spp. στα δείγματα μπέικον. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των *Clostridium* ήταν της τάξης του 10^4 cfu/g και δεν παρουσιάστηκε φάση προσαρμογής. Αντίθετα ο πληθυσμός τους ανέβηκε πολύ σύντομα – μέσα σε 10 ημέρες – κατά 3 log cycle. Από την 10^η ημέρα επώασης και μετά ο πληθυσμός των *Clostridium* spp. αυξήθηκε κατά 0.5 log cycle, έφτασε περίπου 10^8 cfu/mL και παρέμεινε σταθερό για όλη την διάρκεια της συντήρησης στους 5°C.



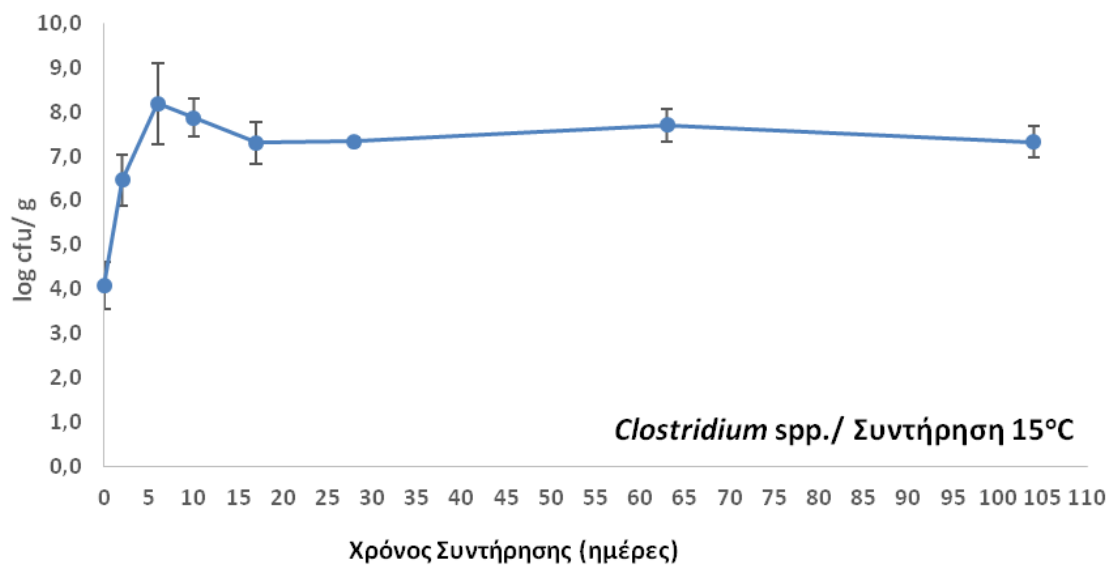
Διάγραμμα 3.10 Μεταβολή του πληθυσμού των *Clostridium spp.* μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπέικον που συντηρούνταν στους 5°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Στο **Διάγραμμα 3.11** παρουσιάζεται η εξέλιξη των βακτηρίων *Clostridium spp.* στα δείγματα μπέικον που αποθηκεύτηκαν στους 10°C. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των βακτηρίων ήταν 10^4 cfu/g και δεν παρουσιάστηκε φάση προσαρμογής. Αντίθετα ο πληθυσμός τους ανέβηκε πολύ σύντομα - μέσα σε 3 μέρες - κατά 3 log cycle. Από την 3^η μέρα και μετά ο πληθυσμός των *Clostridium spp.* αυξήθηκε κατά 0,5 log cycle και την 13^η μέρα μειώθηκε κατά 1 log cycle, έφτασε περίπου 10^7 cfu/g και παρέμεινε σταθερός μέχρι το τέλος των πειραματικών δοκιμών των δειγμάτων.

Στο **Διάγραμμα 3.12** παρουσιάζεται η εξέλιξη των βακτηρίων *Clostridium spp.* στα δείγματα μπέικον. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των *Clostridium spp.* ήταν της τάξης του 10^4 cfu/g και δεν παρουσιάστηκε φάση προσαρμογής. Αντίθετα ο πληθυσμός τους ανέβηκε πολύ σύντομα - μέσα σε 6 ημέρες - κατά 4 log cycle. Από την 6^η ημέρα επώασης και μετά ο πληθυσμός των *Clostridium spp.* βακτηρίων μειώθηκε κατά 1 log cycle, έφτασε περίπου 10^7 cfu/mL και παρέμεινε σταθερό για όλη την διάρκεια της συντήρησης στους 15°C.



Διάγραμμα 3.11 Μεταβολή του πληθυσμού των *Clostridium spp.* μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπίκρον που συντηρούνταν στους 10°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.



Διάγραμμα 3.12 Μεταβολή του πληθυσμού των *Clostridium spp.* μικροοργανισμών (cfu/g) σε δείγματα μπίκρον που συντηρούνταν στους 15°C σε συσκευασίες υπό κενό. Στον οριζόντιο άξονα είναι ο χρόνος συντήρησης.

Η παρούσα πειραματική μελέτη παρουσιάζει, μεταξύ άλλων, την ανάπτυξη των *Clostridium spp.* που παρατηρείται σε συσκευασμένο σε κενό προϊόν μπίκρον σε θερμοκρασίες αποθήκευσης 5, 10 και 15°C. Όπως παρατηρείται στα **Διαγράμματα 3.10, 3.11 και 3.12**, η μέγιστη συγκέντρωση των βακτηρίων ήταν της τάξης του 10^7 - 10^8 cfu/g και παρουσιάστηκε περίπου μετά την 8^η μέρα και στις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης.

Οι Samart et al., (2023) σε μία αντίστοιχη έρευνα μελέτησαν ανθεκτικούς στο κρύο μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση του βοείου κρέατος συσκευασμένου σε κενό, υπό χρόνου-θερμοκρασίας που προσδιορίζεται με καλλιέργεια και qPCR. Η μελέτη τους έδειξε ότι σε δείγματα βοδινού κρέατος η ανάπτυξη *Clostridium* spp. υποδεικνύει ότι το συσκευασμένο σε κενό κρέας είναι αποθηκευμένο για μεγάλο χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 7 ημέρες). Αναλυτικότερα, η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης των *Clostridium* spp. φτάνει, την 28^η ημέρα συσκευασίας, τα 5,3 log CFU/g σε θερμοκρασία συντήρησης 10°C. Σε σύγκριση των δύο ερευνών, παρατηρείται πως κατά την μελέτη των Samart et al. (2023), ο πληθυσμός στο χρονικό διάστημα των 28 ημερών που διήρκησε το πείραμα αναπτύσσεται έως τα 5,3 log CFU/g, που ενδεχομένως να υπήρχε παραπάνω ανάπτυξη εάν το χρονικό διάστημα μεγάλωνε, ενώ στην παρούσα μελέτη κατά την 28η μέρα των πειραμάτων στην ίδια θερμοκρασία συντήρησης (10°C) ο πληθυσμός των βακτηρίων *Clostridium* spp. βρίσκεται στην φάση στασιμότητας και είναι σχεδόν 2 log cycles αυξημένος, της τάξης του 10⁷ cfu/g. Συνοψίζοντας, οι δύο μελέτες συμφωνούν ότι η ανάπτυξη του *Clostridium* spp. υποδεικνύει ότι το συσκευασμένο σε κενό κρέας είναι αποθηκευμένο για μεγάλο χρονικό διάστημα πάνω από 7 ημέρες.

3.3 Εκτίμηση διάρκειας ζωής υπό σταθερές θερμοκρασίες – ισόθερμο

Επιλέχθηκε να γίνει η πρόβλεψη της διάρκειας ζωής των δειγμάτων με βάση τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η επιλογή αυτή έγινε με βάση επιστημονικά δεδομένα, καθώς και από το γεγονός ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσίασαν «φάση προσαρμογής» (lag phase).

Δείγματα συντηρούμενα στους 5°C: Σε ό,τι αφορά τον πληθυσμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα που συντηρούνταν στους 5°C με χρήση των δεδομένων που είχαν παραχθεί προέκυψε η ακόλουθη καμπύλη (**Διαγ. 3.13**).

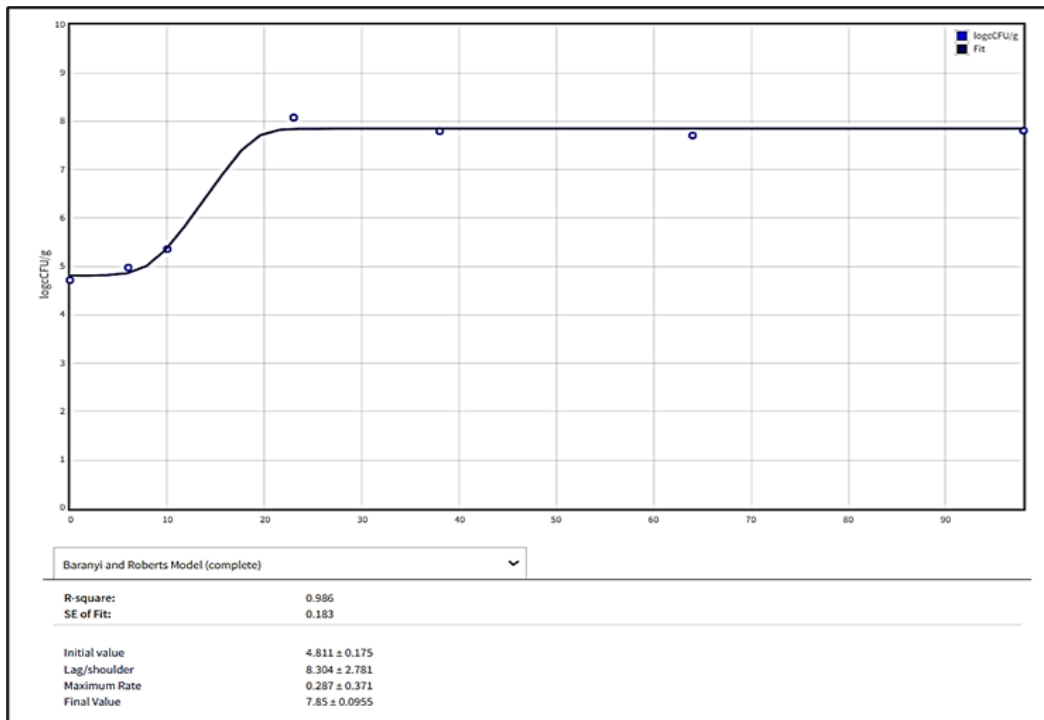
Μοντέλο: *Baranyi & Roberts – complete model*

Αρχικό μικροβιακό φορτίο: 4.811

Φάση προσαρμογής: 8.304

μ: ειδικός ρυθμός ανάπτυξης 0.287

Αν θέσουμε ως τελική τιμή αλλοίωσης N τους 8 λογαριθμικούς κύκλους (8 log cycles) και τοποθετήσουμε όλες τις ως άνω τιμές στην παρακάτω εξίσωση



Διάγραμμα 3.13 Το μοντέλο *Baranyi & Roberts – complete model* από την διαδικτυακή πηγή μικροβιολογικών δεδομένων *Combase* που χρησιμοποιήθηκε για την θεωρητική εκτίμηση διάρκειας ζωής των δειγμάτων μπέικον που συντηρήθηκαν στους 5°C.

$$t = \frac{1}{\mu} \cdot \log \log \left(\frac{Nt}{No} \right) + \lambda$$

θα προκύψει η τιμή **9 ημέρες**.

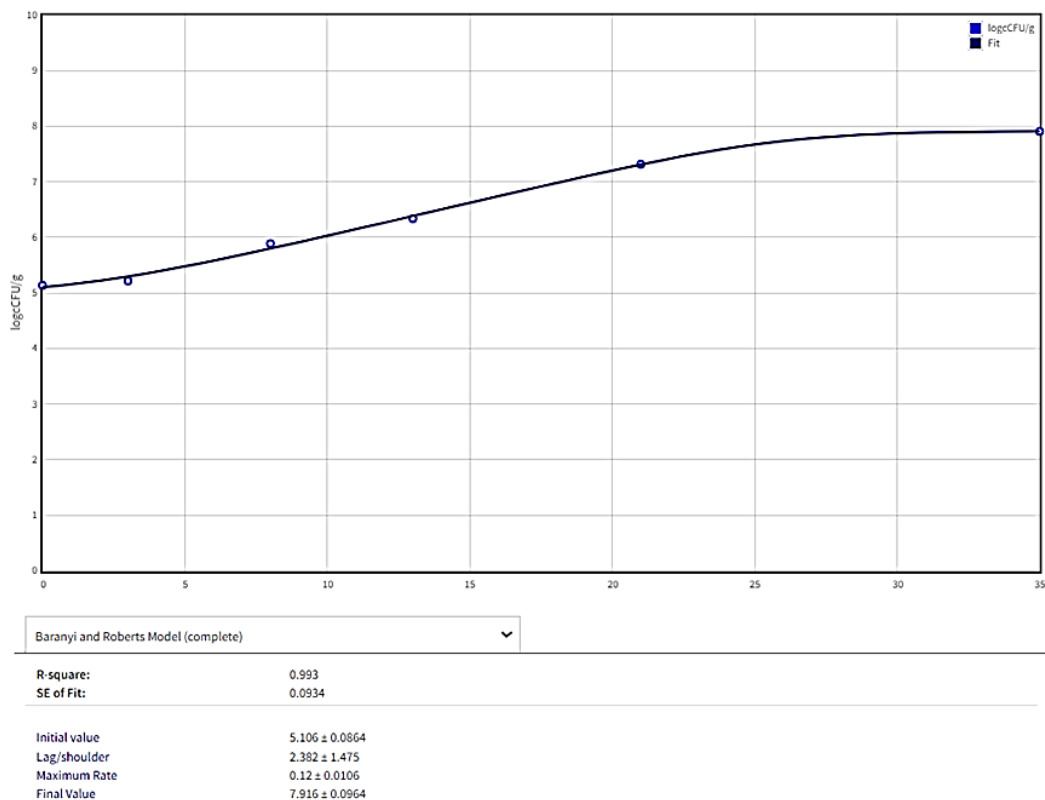
Δείγματα συντηρούμενα στους 10°C: Κατά τον ίδιο τρόπο και χρησιμοποιώντας την *Combase* προέκυψε το ακόλουθο διάγραμμα/ μοντέλο:

Μοντέλο: *Baranyi & Roberts – complete model*

Αρχικό μικροβιακό φορτίο: 5.016

Φάση προσαρμογής: 2.382

μ: ειδικός ρυθμός ανάπτυξης 0.12



Διάγραμμα 3.14 Το μοντέλο *Baranyi & Roberts – complete model* από την διαδικτυακή πηγή μικροβιολογικών δεδομένων *Combase* που χρησιμοποιήθηκε για την θεωρητική εκτίμηση διάρκειας ζωής των δειγμάτων μπέικον που συντηρήθηκαν στους 10°C.

Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο έγινε ο υπολογισμός της διάρκειας ζωής και ήταν **περίπου 4 ημέρες**.

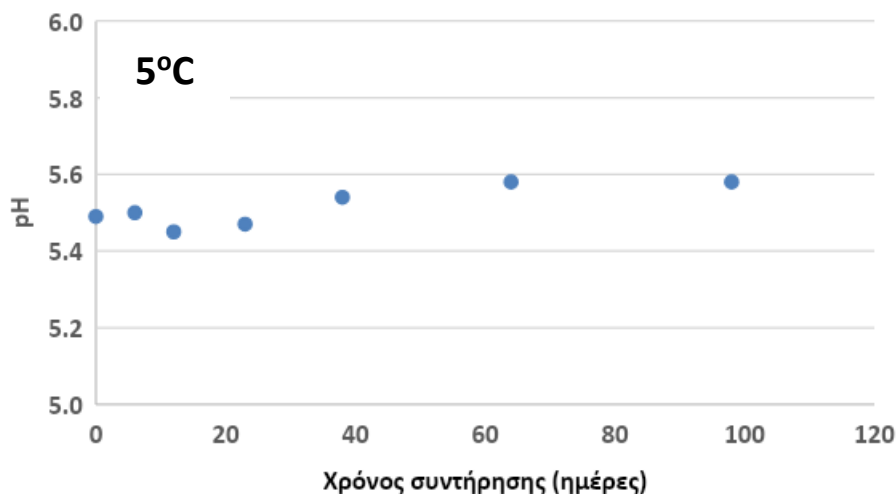
Σε όλη όμως την παραπάνω διαδικασία θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η εκτίμηση της διάρκειας ζωής είναι απολύτως θεωρητική και θα πρέπει να γίνει και περαιτέρω μελέτη επαλήθευσης.

3.4 Αποτελέσματα pH

Τα αποτελέσματα pH παρουσιάζονται σε τρεις πίνακες (Πιν. 3.2, 3.3, 3.4). Κάθε πίνακας αντιστοιχεί στα δείγματα κάθε θερμοκρασίας 5, 10 και 15°C αντίστοιχα. Στην πρώτη στήλη παρουσιάζεται ο χρόνος σε ημέρες (days) και στην δεύτερη στήλη παρουσιάζεται το pH των δειγμάτων.

3.4.1 Μεταβολές των τιμών pH στα δείγματα μπέικον.

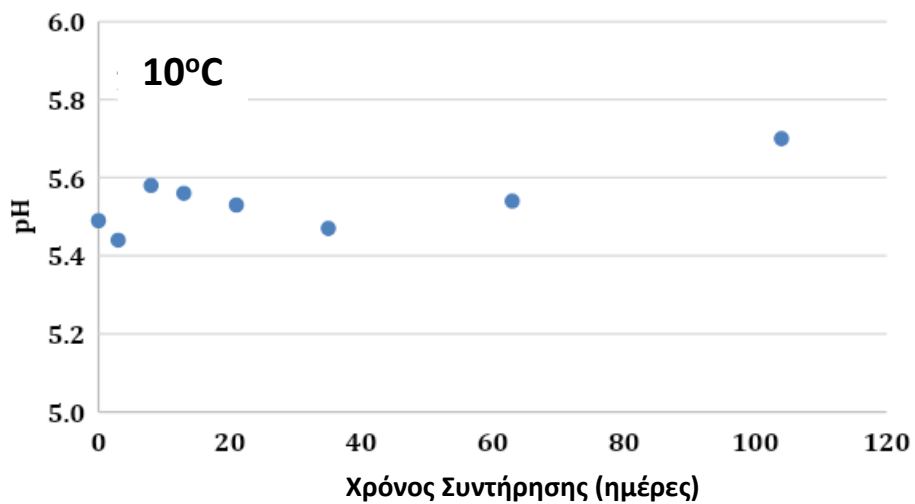
Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η εξέλιξη των τιμών pH στα δείγματα συσκευασμένου υπό κενό μπέικον τα οποία συντηρούνταν στους 5°C, 10°C και 15°C. Γενικά δεν διαπιστώθηκαν μεγάλες μεταβολές στις τιμές pH. Στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 5°C οι τιμές pH κυμάνθηκαν από 5.4 έως 5.6 δηλαδή μέσα σε μία ζώνη 0.2 μονάδων (Διάγραμμα 3.15).



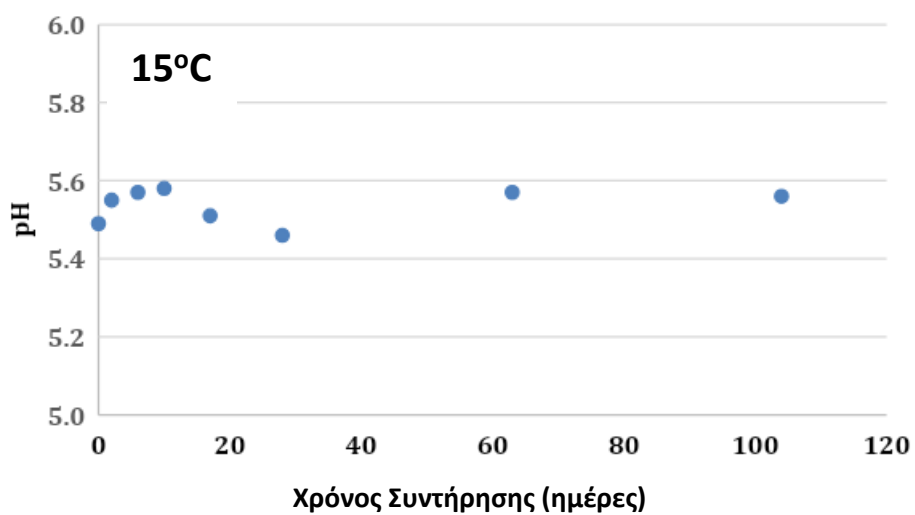
Διάγραμμα 3.15 Μεταβολές του pH για τα δείγματα μπέικον που διατηρήθηκαν στους θερμοκρασία 5°C

Επίσης στο Διάγραμμα 3.16 και 3.17 παρουσιάζεται η μεταβολή των τιμών pH για τα δείγματα που συντηρούνταν στους 10°C και 15°C, αντίστοιχα. Σε ό,τι αφορά τα δείγματα των 10°C και πάλι η διακύμανση των τιμών ήταν σε μία στενή περιοχή από 5.4 έως 5.6 με μία μοναδική εξαίρεση την τελευταία ημέρα μέτρησης όπου η τιμή ήταν ελαφρά υψηλότερη (5.7).

Τέλος είναι ενδιαφέρον να υπογραμμιστεί ότι παρόμοια ήταν και η τάση που παρουσιάστηκε στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 15°C, δηλαδή η τιμή pH κινήθηκε στην περιοχή 5.4 έως 5.6, δηλαδή και πάλι παρουσίασαν πολύ μικρή διακύμανση.



Διάγραμμα 3.16 Μεταβολές του pH για τα δείγματα μπέικον που διατηρήθηκαν στους θερμοκρασία 10°C.



Διάγραμμα 3.17 Μεταβολές του pH για τα δείγματα μπέικον που διατηρήθηκαν στους θερμοκρασία 15°C.

Κεφάλαιο 4

Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη την παρούσα μελέτη αλλά και την εκτενή βιβλιογραφία που πλαισιώνει το πείραμα και τις τεχνικές που επιλέχθηκαν εξάγονται κάποια βασικά συμπεράσματα. Αρχικά, παρατηρήθηκε υψηλό μικροβιακό φορτίο σε όλα τα δείγματα μπέικον και τις μικροβιολογικές ομάδες, που ίσως οφείλεται στην προχωρημένη ανάπτυξη της μικροβιακής χλωρίδας κατά την έναρξη των πειραμάτων.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε και πειραματικά πως η συντήρηση στους 5°C φέρει πιο βραδεία αλλοίωση του προϊόντος συγκριτικά με τους 10 και τους 15°C και διαπιστώθηκε η διαφορετική δυναμική των μικροοργανισμών ανάλογα την θερμοκρασία συντήρησης. Στην διαδικτυακή βάση δεδομένων Combase και την κατάλληλη προσεγγιστική εξίσωση, συγκεκριμένα το μοντέλο *Baranyi & Roberts – complete model*, χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα μικροοργανισμών δείκτης τα οξυγαλακτικά βακτήρια και εκτιμήθηκε η διάρκεια ζωής των δειγμάτων μπέικον. Ειδικότερα, βρέθηκαν 9 ημέρες διάρκεια ζωής για τα δείγματα μπέικον που συντηρήθηκαν στους 5°C και 4 ημέρες για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 10°C.

Συνοψίζοντας, ο στόχος της παρούσας πτυχιακής, δηλαδή η μελέτη της μικροβιολογικής κινητικής αλλοίωσης των κρεατοσκευασμάτων και ο προσδιορισμός χρόνου ζωής τους, ήταν η δημιουργία ενός μοντέλου που προβλέπει το μικροβιακό φορτίο του προϊόντος ανάλογα το χρονικό διάστημα συντήρησης και την θερμοκρασία.

Βιβλιογραφία

A. Beterams, T. Tolksdorf, A. Martin, K. Stingl, N. Bandick, F. Reich. (2023). Change of Campylobacter, Escherichia coli and Salmonella counts in packaged broiler breast meat stored under modified atmosphere and vacuum conditions at 4 and 10°C based on cultural and molecular biological quantification. *Food Control* 145. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109337>

S. K. SAGOO, C. L. LITTLE, G. ALLEN, K. WILLIAMSON, AND K. A. GRANT. (2007). Microbiological Safety of Retail Vacuum-Packed and Modified-Atmosphere-Packed Cooked Meats at End of Shelf Life. *Journal of Food Protection, Vol. 70, No. 4, Pages 943–951*.

H. Korkeala and P. Mäkelä. (1989). Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. *International Journal of Food Microbiology, 9, 33-43*.

E. Chenoll, M.C. Macián , P. Elizaquível and R. Aznar. (2006). Lactic acid bacteria associated with vacuum-packed cooked meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072*. doi:[10.1111/j.1365-2672.2006.03081.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03081.x)

Magdevis Y. Rodriguez-Caturla, Alberto Garre, Carmen Josefina Contreras Castillo, Marcel H. Zwietering, Heidy M.W. den Besten, Anderson S. Sant'Ana. (2023). Shelf life estimation of refrigerated vacuum packed beef accounting for uncertainty. *International Journal of Food Microbiology Volume 405*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110345>

George Katsaros; Petros Taoukis. (2021). Microbial Control by High Pressure Processing for Shelf-Life Extension of Packed Meat Products in the Cold Chain: Modeling and Case Studies. *Applied Sciences*. doi: [10.3390/app11031317](https://doi.org/10.3390/app11031317)

Fan Zhao, Guanghong Zhou, Keping Ye, Shuaiwu Wang, Xinglian Xu, Chunbao Li. (2015). Microbial changes in vacuum-packed chilled pork during storage. *Meat Science, Volume 100, Pages 145-149*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.004>

Annalisa Casaburi, Paola Piombino, George-John Nychas, Francesco Villani, Danilo Ercolini. (2015). Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage. *Food Microbiology Volume 45, Part A, Pages 83-102.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.002>

Xinfu Li, Cong Li, Hua Ye, Zhouping Wang, Xiang Wu, Yanqing Han, Baocai Xu. (2019). Changes in the microbial communities in vacuum-packaged smoked bacon during storage. *Food Microbiology, Volume 77, February 2019, Pages 26-37.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.007>

Annalisa Casaburi, Antonella Nasi, Ilario Ferrocino, Rossella Di Monaco, Gianluigi Mauriello, Francesco Villani, and Danilo Ercolini. (2011). Spoilage-Related Activity of *Carnobacterium maltaromaticum* Strains in Air-Stored and Vacuum-Packed Meat. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 7382–7393. doi: [10.1128/AEM.05304-11](https://doi.org/10.1128/AEM.05304-11)

Joseph Wambui and Roger Stephan. (2019). Relevant Aspects of *Clostridium estertheticum* as a Specific Spoilage Organism of Vacuum-Packed Meat. *microorganisms*, 7, 142. doi: [10.3390/microorganisms7050142](https://doi.org/10.3390/microorganisms7050142)

Birgit GrothLaursena, Lene Bay, Ilse Cleenwerck, Marc Vancanneyt, Jean Swings, Paw Dalgaard, Jørgen J. Leisner. (2005). *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 28 151–164. doi: [10.1016/j.syapm.2004.12.001](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.001)

Laura Cavill, Ana L. Renteria-Monterrubio, Christopher R. Helps, Janet E.L. Corry. (2011). Detection of cold-tolerant clostridia other than *Clostridium estertheticum* in raw vacuum-packed chill-stored meat. *Food Microbiology*, 28, 957-963. doi: [10.1016/j.fm.2011.01.003](https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.003)

Rafael D. Chaves, Alessandra R. Silva, Anderson S. Sant'Ana, Felipe B. Campana & Pilar R. Massaguer. (2012). Gas-producing and spoilage potential of Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria isolated from chilled vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1750–1756. doi: [10.1111/j.1365-2621.2012.03030.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03030.x)

Π. Κοτζεκίδου - Ρούκα, «Μικροβιολογία Τροφίμων & Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων», Εκδόσεις Γιαχούδη, 2009

Σπυρίδων Β. Ραμαντάνης, «Τεχνολογία κρέατος και προϊόντων του», Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, 2020

Σπυρίδων Ε. Παπαδάκης, «Συσκευασία Τροφίμων», Εκδόσεις Τζιόλα, 2022

Γεροπούλου Ευαγγελία – Κουκουλίδου Όλγα, «Μελέτη της μεταβολής του πληθυσμού των κολοβακτηριοειδών και της E.coli σε νωπά μη συσκευασμένα και συσκευασμένα τεμάχια κοτόπουλου κατά τη διάρκεια της συντήρησής τους στους +5°C», Πτυχιακή Εργασία, 2014.

Πηγές Εικόνων

Εικόνα Εξωφύλλου:

<https://kountourosbros.com/product/%CE%BC%CF%80%CE%B5%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CE%BD-%CF%87%CE%BF%CE%B9%CF%81%CE%B9%CE%BD%CE%BF/>

Εικόνα 1.1: Προσωπικό αρχείο.

Εικόνα 2.1: Προσωπικό αρχείο.

Εικόνα 2.2: Προσωπικό αρχείο.

Εικόνα 2.3: Προσωπικό αρχείο.

Εικόνα 2.4: Προσωπικό αρχείο.

Εικόνα 2.5: <https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/129-5206-reinforced-clostridal-agar.html>

Εικόνα 2.6: <https://ingecentre.fr/catalogue/ph-metre-6348/?lang=es>

Εικόνα 2.7: <https://www.futurehealthconcepts.com/steam-sterilizers-autoclaves/amscocentury-sterilizer-v116.html>

Εικόνα 2.8: <http://www.maascientific.com/Laboratory-equipments.html>

Εικόνα 2.9: Προσωπικό αρχείο.

Εικόνα 2.10: Προσωπικό αρχείο.