



**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ



ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αντιμικροβιακές ιδιότητες ουσιών με προοπτική χρήσης ως υλικά συσκευασίας

Σταμέλος Αλέξιος

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2022

Αντιμικροβιακές ιδιότητες ουσιών με προοπτική χρήσης ως υλικά συσκευασίας
Antimicrobial properties of substances for use in packaging materials

Σταμέλος Αλέξιος

Διεθνές Πανεπιστήμιο Ελλάδος (ΔΙΠΑΕ), Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400
Θεσσαλονίκη ΤΘ 141

Υποβολή Διπλωματικής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή
του Μεταπτυχιακού Διπλώματος του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του
Διεθνούς Πανεπιστημίου της Ελλάδος

Εισηγητής: Λυκοτραφίτη Ελένη

Εξεταστική επιτροπή: Καραγεωργίου Βασίλειος, Jonathan Rhoades

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα Λυκοτραφίτη Ελένη καθηγήτρια στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Διεθνούς Πανεπιστήμιο της Ελλάδος για την καθοδήγηση και την υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια διεκπεραίωσης του πειραματικού μέρους. Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Rhoades Jonathan για την πολύτιμη βοήθεια του κατά την εκπόνηση των πειραμάτων της διπλωματικής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα του τμήματος Φραγκόπουλο Θεόφιλο, για τις οδηγίες που μου παρείχε και τη βοήθειά του σε όλο το πειραματικό μέρος της διπλωματικής μου. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, που μου παρείχαν οικονομική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η ανάγκη για εύρεση καινοτόμων και ασφαλών συσκευασιών με μικρό αντίκτυπο στο περιβάλλον αυξάνεται ραγδαία. Το γεγονός αυτό, καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη καινοτόμων ενεργών συσκευασιών με προοπτική χρήσης σε τρόφιμα. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση διαφόρων ουσιών με προοπτική χρήσης τους σε υλικά συσκευασίας τροφίμων δημιουργώντας μια νέα ενεργή συσκευασία. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του κιτρικού αμμωνίου του τιτανίου (Titanium ammonium citrate) (σε συγκεντρώσεις 0,1 mM και 0,5 mM) ενάντια σε δυο Gram θετικά βακτήρια, την *Listeria monocytogenes* και τον *Staphylococcus aureus* και δύο Gram αρνητικά βακτήρια, την *Escherichia coli* και την *Pseudomonas aeruginosa*. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντική ($p > 0,05$) αντιμικροβιακή δράση του Titanium ammonium citrate έναντι των υπό εξέταση βακτηρίων. Στη συνέχεια, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του Νιτρώδες Νατρίου σε συγκεντρώσεις 2% (w/w) και 5% (w/w) σε μεμβράνες πολυγαλακτικού οξέος (PLA) ενάντια στη *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* και *P. aeruginosa*. Δεν παρατηρήθηκαν ζώνες αναστολής, ωστόσο όλοι οι υπό εξέταση μικροοργανισμοί δεν αναπτύχθηκαν κάτω από τις μεμβράνες. Κατόπιν, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση των συντηρητικών Σορβικό Κάλιο, Βενζοϊκό Νάτριο, Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου και Νιτρώδες Νάτριο, ενσωματωμένα σε μεμβράνες αμύλου με τελική συγκέντρωση 0,54% (w/w), ενάντια στους προαναφερόμενους μικροοργανισμούς. Δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση με την μορφή ζωνών αναστολής. Ωστόσο τα βακτήρια *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* και *P. aeruginosa* δεν αναπτύχθηκαν κάτω από τις μεμβράνες μερικών συντηρητικών αλλά και ούτε και των αντίστοιχων μαρτύρων. Αντιθέτως, η *S. Typhimurium* δεν αναπτύχθηκε κάτω από την μεμβράνη με Βενζοϊκό Νάτριο αλλά αναπτύχθηκε κάτω από τον μάρτυρα. Τέλος, παρασκευάστηκαν συσκευασίες αμύλου εμπλουτισμένες με 0,00075% (w/w) NaNO_2 για την αποθήκευση ωμού κιμά σε συνθήκες ψύξης. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν για 5 μέρες στους 4 °C. Εξετάστηκε το pH των δειγμάτων, η απώλεια υγρασίας, η απώλεια βάρους και έγινε καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX), της Ολικής Ψυχρότροφης Χλωρίδας (ΟΨΧ) και των Γαλακτικών βακτηρίων. Ο πληθυσμός της OMX, ΟΨΧ και των γαλακτικών βακτηρίων του ωμού κιμά στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO_2 ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά 1 log cfu/g την 2^η και 3^η ημέρα δειγματοληψίας σε σχέση με τον αντίστοιχο πληθυσμό στον ωμό κιμά στις συσκευασίες του εμπορίου και του μάρτυρα.

Abstract

The need to find innovative and safe packaging with a small environmental impact is growing rapidly. The development of innovative packaging with a perspective of use in foods is necessary. In the present study, the antimicrobial activity of different solutions was studied with the perspective of use into food packaging materials in order to create new active packaging. Firstly, the antimicrobial activity of Titanium ammonium citrate (0.1 and 0.5 mM) was examined against two Gram-positive bacteria, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and two Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. There was no significant ($p > 0.05$) antimicrobial activity using either of the two concentrations examined against the tested bacteria. Moreover, the antimicrobial properties of polylactic acid (PLA) films containing 2% (w/w) and 5% (w/w) sodium nitrite were examined against seven microorganisms *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. No inhibition zones were observed, although all the bacteria tested did not grow under the films. Furthermore, the antimicrobial properties of sodium nitrite, potassium sorbate, sodium benzoate and propionic acid incorporated in starch films at a final concentration of 0,54% (w/w), were examined against all the bacteria mentioned previously. There were no zones of inhibition observed, however *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. Enteritidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* did not manage to grow under some of the films or their equivalent controls. In contrast, *S. Typhimurium* did not grow under the sodium benzoate film but was able to grow under the control. Starch-based packaging containing 0,00075% (w/w) sodium nitrite (NaNO_2) were developed to improve the storage stability of raw minced meat. The samples were stored at 4 °C for 5 days. The samples were examined for pH, moisture loss, weight loss and the microbial counts of Aerobic Plate Count, Psychotrophic Plate Count and Lactic Acid Bacteria. Population of aerobic mesophiles, psychotrophs and lactic acid bacteria in raw minced meat samples, which were packaged in starch films with 0,00075% (w/w) NaNO_2 were found to be significantly ($p < 0,05$) lower by 1 log cfu/g compared to the raw minced meat samples which were packaged in starch films without NaNO_2 and the control ones in nylon commercial packaging on day 2 and 3.

Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Συσκευασίες και αντιμικροβιακή δράση	12
1.1.1 Γενικά.....	12
1.1.2 Συσκευασίες αμύλου.....	13
1.2 Αντιμικροβιακές ουσίες.....	14
1.2.1 Κιτρικό αμμώνιο τιτανίου.....	14
1.2.2 Νιτρώδες Νάτριο.....	14
1.2.3 Σορβικό Κάλιο	15
1.2.4 Βενζοϊκό Νάτριο	15
1.2.5 Προπιονικό Οξύ.....	15
1.3 Μικροοργανισμοί.....	17
1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	17
1.3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	17
1.3.1.2 Παθολογία.....	17
1.3.1.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα.....	18
1.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.3.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	18
1.3.2.2 Παθολογία.....	18
1.3.2.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα.....	19
1.3.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
1.3.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	19
1.3.3.2 Παθολογία.....	20
1.3.3.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα.....	20
1.3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
1.3.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	21
1.3.4.2 Παθολογία.....	21
1.3.4.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα.....	22
1.3.5 <i>Salmonella enterica</i>	22
1.3.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	22
1.3.5.2 Παθολογία.....	22
1.3.5.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα.....	22
1.3.6 <i>Bacillus cereus</i>	23
1.3.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	23
1.3.6.2 Παθολογία.....	24
1.3.6.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα.....	24
2. Σκοπός της εργασίας.....	25
3. Υλικά και Μέθοδοι	26
3.2.1 Υποστρώματα	26
3.2.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί.....	26
3.2.3 Αντιμικροβιακές ουσίες.....	26
3.3 Μέθοδοι.....	27
3.3.1 Πειραματική διαδικασία για ανάλυση στο Bioscreen C.....	27
3.3.1.1 Προετοιμασία καλλιέργειας παθογόνων μικροοργανισμών	27
3.3.1.2 Τοποθέτηση διαλυμάτων στις κυψελίδες.....	27
3.3.1.3 Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων του Bioscreen	28
3.3.2 Πειραματική διαδικασία παρασκευής μεμβρανών με αντιμικροβιακές ουσίες.....	29
3.3.2.1 Προετοιμασία μεμβρανών από πολυγαλακτικό οξύ	29
3.3.2.2 Προετοιμασία μεμβρανών αμύλου	29
3.3.2.3 Προετοιμασία καλλιεργείων και αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών	30

3.3.3. Αντικροβιακή δράση συσκευασιών αμύλου με ενσωματωμένες αντικροβιακές ουσίες σε νωπό κιμά.....	30
3.3.3.1 Παρασκευή συσκευασιών αμύλου με ενσωματωμένο Νιτρώδες Νάτριο (NaNO_2) ως αντικροβιακό παράγοντα	30
3.3.3.2 Επίδραση συσκευασιών αμύλου με ενσωματωμένο Νιτρώδες Νάτριο (NaNO_2) ως αντικροβιακό παράγοντα στα μικροβιολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του νωπού κιμά	31
4. Αποτελέσματα.....	32
4.1 Αντικροβιακή δράση του Κιτρικού αμμωνίου του τιτανίου	32
4.2 Αντικροβιακή δράση μεμβρανών PLA με προσθήκη Νιτρώδους Νατρίου	33
4.3 Αντικροβιακή δράση μεμβρανών αμύλου με προσθήκη αντικροβιακών ουσιών.....	34
4.4 Αντικροβιακή ικανότητα συσκευασιών αμύλου	37
4.4.1 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά νωπού κιμά.....	37
4.4.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νωπού κιμά	39
5. Συζήτηση.....	43
5.1 Αντικροβιακή δράση του Titanium ammonium Citrate	43
5.2 Αντικροβιακή δράση μεμβρανών PLA.....	43
5.3 Αντικροβιακή δράση μεμβρανών αμύλου	43
5.4 Αντικροβιακή δράση συσκευασιών αμύλου.....	44
5.5 Μελλοντικές προτάσεις.....	46
6. Βιβλιογραφία.....	47

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1: Αντιμικροβιακές ουσίες που ενσωματώθηκαν σε μεμβράνες αμύλου. Σελίδα 27

Πίνακας 2: Επίδραση συγκέντρωσης 0.5 mM του Titanium Ammonium Citrate στην ανάπτυξη τεσσάρων τροφιμογενών βακτηρίων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας. Σελίδα 32

Πίνακας 3: Επίδραση συγκέντρωσης 0.1 mM του Titanium Ammonium Citrate στην ανάπτυξη τεσσάρων τροφιμογενών βακτηρίων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας. Σελίδα 32

Πίνακας 4: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης των μεμβρανών με 0,54% (w/w) Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂), Σορβικό Κάλιο (Potas), Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo), Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) και μεμβράνη – μάρτυρα ενάντια στους μικροοργανισμούς *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*. Σελίδα

34

Ευρετήριο Σχημάτων

Σχήμα 1: Τρυβλία εμβολιασμένα με *Salmonella* Enteritidis (αριστερά) και *Salmonella* Typhimurium (δεξιά) μετά από 24 ώρες επώασης με μεμβράνες PLA και ενσωματωμένη συγκέντρωση 2 % (w/w) και 5 % (w/w) NaNO₂. Σελίδα 33

Σχήμα 2: Τρυβλία εμβολιασμένα με *Salmonella* Typhimurium (αριστερά) και *Salmonella* Enteritidis (δεξιά) μετά από 24 ώρες επώασης με μεμβράνες αμύλου και ενσωματωμένα Νιτρώδες Νάτριο, Σορβικό Κάλιο, Βενζοϊκό Νάτριο και Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου σε τελική συγκέντρωση 0,54% (w/w). Σελίδα 35

Σχήμα 3: Τρυβλία εμβολιασμένα με *Listeria monocytogenes* (επάνω - αριστερά), *Bacillus cereus* (επάνω - δεξιά) και *Staphylococcus aureus* (κάτω) μετά από 24 ώρες επώασης με μεμβράνες αμύλου και μεμβράνες αμύλου και ενσωματωμένα Νιτρώδες Νάτριο, Σορβικό Κάλιο, Βενζοϊκό Νάτριο και Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου σε τελική συγκέντρωση 0,54% (w/w). Σελίδα 35

Σχήμα 4: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα μεμβρανών αμύλου με ενσωματωμένο 0,00075% (w/w) NaNO₂ σε δείγματα νωπού κιμά αποθηκευμένου στους 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή). Σελίδα 37

Σχήμα 5: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης στην Ολική Ψυχρότροφης Χλωρίδα μεμβρανών αμύλου με ενσωματωμένο 0,00075% (w/w) NaNO₂ σε δείγματα νωπού κιμά αποθηκευμένου στους 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή). Σελίδα 38

Σχήμα 6: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης στα γαλακτικά βακτήρια μεμβρανών αμύλου με ενσωματωμένο 0,00075% (w/w) NaNO₂ σε δείγματα νωπού κιμά αποθηκευμένου στους 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή). Σελίδα 39

Σχήμα 7: Μεταβολή του pH του νωπού κιμά σε συσκευασία αμύλου σε θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή). Σελίδα 40

Σχήμα 8: Μεταβολή της υγρασίας του νωπού κιμά σε συσκευασίες αμύλου σε θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή). Σελίδα 41

Σχήμα 9: Μεταβολή της απώλειας βάρους του νωπού κιμά σε συσκευασίες αμύλου σε θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή). Σελίδα 42

Συντμήσεις	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. Enteritidis</i>	<i>Salmonella enterica serovar Enteritidis</i>
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NaNO ₂	Νιτρώδες Νάτριο
C ₆ H ₇ KO ₂	Σορβικό Κάλιο
C ₆ H ₅ COONa	Βενζοϊκό Νάτριο
[CH ₃ CH ₂ COO] ₂ Ca	Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου
PCA	Plate Count Agar
TSBYE	Tryptone Soya Broth Yeast Extract
PLA	Πολυγαλακτικό οξύ
OMX	Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα
cfu	Colony forming unit
MGR	Maximum Growth Rate- Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης
MIC	Ελάχιστη συγκέντρωση για αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμού

1. Εισαγωγή

1.1 Συσκευασίες και αντιμικροβιακή δράση

1.1.1 Γενικά

Στις μέρες μας υπάρχουν πολλών ειδών συσκευασίας (αλουμινίου, πλαστικές, χάρτινες κ.α.) οι οποίες είναι απαραίτητες για την προστασία των τροφίμων. Οι συσκευασίες προστατεύουν το τρόφιμο καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του (από την παραγωγή μέχρι την κατανάλωση) (Robertson, 2005). Υπάρχει μεγάλη ανάγκη για δημιουργία νέων καινοτόμων ασφαλών συσκευασιών (Firouz et al., 2021). Αναλυτικότερα, οι συσκευασίες που είναι διαθέσιμες σήμερα είναι, μεταλλικές, γυάλινες, χάρτινες, πλαστικές, πολυμερή συσκευασίες από βιομάζα, πολυμερείς από μικροοργανισμούς και συσκευασίες από αλιφατικά πολυμερή. Οι πλαστικές (πολυμερείς) συσκευασίες είναι οι πιο διαδεδομένες συσκευασίες στη βιομηχανία τροφίμων λόγω των ιδιοτήτων τους (ευέλικτες, φτηνές στην κατασκευή και ανθεκτικές). Οι πλαστικές συσκευασίες αποτελούνται από δύο κατηγορίες, τα πλαστικά με βάση το πετρέλαιο και τα βιο-πλαστικά. Τα βιο-πλαστικά προέρχονται από ανανεώσιμες ύλες ή/και είναι βιοαποικοδομήσιμα. Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για τα βιο-πλαστικά τα οποία προέρχονται από ανανεώσιμους πόρους και ταυτόχρονα είναι βιοαποικοδομήσιμα ενώ ταυτόχρονα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενεργές συσκευασίες (Alvarez-Pérez et al., 2019).

Ενεργές συσκευασίες ορίζονται οι συσκευασίες που αλλάζουν τις συνθήκες εσωτερικά της συσκευασίας με τέτοιο τρόπο ώστε να επιμηκύνεται η ζωή ή να βελτιώνεται η ασφάλεια του τροφίμου χωρίς να επηρεάζεται η ποιότητα του (EC No 450/2009). Η ενεργή συσκευασία μπορεί να έχει ιδιότητες όπως αντιοξειδωτική δράση, και αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε αλλοιογόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς που εμφανίζονται στα τρόφιμα (Yildirim et al., 2017). Η αντιμικροβιακή δράση επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: α) η ουσία βρίσκεται διαλυμένη μέσα στη συσκευασία και στη συνέχεια η ουσία έρχεται σε επαφή με το τρόφιμο (π.χ. σε αλλαντικά, τρόφιμα σε υγρή μορφή), β) το τρόφιμο δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τη συσκευασία αλλά η ουσία εξατμίζεται μέσα στη συσκευασία και έπειτα απορροφάται από το τρόφιμο (Siracusa, 2016). Στη πρώτη περίπτωση η αντιμικροβιακή ουσία μεταναστεύει με αργό ρυθμό από τη συσκευασία στο τρόφιμο μέσω διάχυσης Υπάρχει πληθώρα ερευνών ως προς την αντιμικροβιακή δράση διάφορων ουσιών όπως η Καρβακρόλη (Mauriello et al., 2021), το Νιτρώδες Νάτριο (Agora & Kaur, 2019), το Σορβικό Κάλιο (Schenk et al., 2018), το Βενζοϊκό Νάτριο (Kumar et al., 2017), και το Προπιονικό Οξύ (Almasi et al., 2021) .

1.1.2 Συσκευασίες αμύλου

Οι συσκευασίες αμύλου αποτελούν ενεργές συσκευασίες, διότι μπορούν να συνδυαστούν με διάφορες αντιμικροβιακές ουσίες (π.χ. αιθέρια έλαια) με αποτέλεσμα να έχουν αντιμικροβιακή δράση (Syafiq et al., 2020). Το άμυλο χρησιμοποιείται ευρέως διότι είναι οικονομικό και βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον. Το άμυλο και τα παράγωγα του αποτελούνται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη (μακρομόρια). Ο συνδυασμός των δύο μακρομορίων παρέχει τις ιδιότητες της μεμβράνης αμύλου. Γενικά το άμυλο αποτελείται από 20-25% αμυλόζη και 75-80% αμυλοπηκτίνη. Η διαδικασία κατασκευής (ζελατινοποίηση) και η ξήρανση παίζουν βασικό ρόλο στην κρυσταλλικότητα, τη μόνωση και την ελαστικότητα του φιλμ. Επιπρόσθετα, μειώνοντας τον ρυθμό ζελατινοποίησης και ξήρανσης αυξάνεται η αντοχή στην τάση εφελκυσμού, η ελαστικότητα και η κρυσταλλικότητα (Siracusa, 2016). Οι συσκευασίες αμύλου μπορούν να συνδυαστούν με ενσωματωμένες αντιμικροβιακές ουσίες όπως Καρβακρόλη (de Souza et al., 2020), Σορβικό Κάλιο (Fidelis et al., 2022), Βενζοϊκό Νάτριο (Wangprasertkul et al., 2021) και Προπιονικό ασβέστιο (Ratnawati & Afifah, 2019). Συγκεκριμένα, οι Ferreira et al., (2019) ενσωμάτωσαν σε μεμβράνες αμύλου φυτικά αιθέρια έλαια από κανέλα, μέντα, δενδρολίβανο, γλυκό πορτοκάλι, περσικό μοσχολέμονο και πιπερόριζα και παρατήρησαν ζώνες αναστολής ενάντια στον *S. aureus*, *E. coli* αλλά και *S. enterica*.

Επιπλέον, έχει μελετηθεί η ενσωμάτωση πρόσθετων σε μεμβράνες αμύλου όπως τα νιτρικά. Συγκεκριμένα, τα νιτρικά ως πρόσθετα έχουν δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την αναστολή ανάπτυξης του *C. botulinum* και των τοξινών του στη συντήρηση του κρέατος και συγκεκριμένα στον κιμά σύμφωνα με τους Govari & Pexara (2015).

Οι μεμβράνες αμύλου έχουν μελετηθεί ως προς τις ικανότητες τους να συντηρούν τον κιμά. Οι Moreno et al. (2015) μελέτησαν τις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των μεμβρανών αμύλου από πατάτα με ενσωματωμένη λακτοφερίνη ή/και λυσοζύμη. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν αλλαγές στη δομή της μεμβράνης με αποτέλεσμα η μεμβράνη να προσφέρει αντιοξειδωτική δράση. Επιπρόσθετα, οι μεμβράνες με λακτοφερίνη και λυσοζύμη έδειξαν αντιμικροβιακή δράση έναντι της *Escherichia coli* και άλλων κολοβακτηριδίων. Οι Khumkomgool et al. (2020) μελέτησαν μεμβράνες αμύλου με ενσωματωμένη σκόνη και εκχύλισμα από το φυτό sarrap σε ποσοστό $\geq 3.3\%$ και τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι μειώθηκε η Ολική Χλωρίδα και επεκτάθηκε η διάρκεια ζωής του κιμά.

1.2 Αντιμικροβιακές ουσίες

1.2.1 Κιτρικό αμμώνιο τιτανίου

Το χημικό στοιχείο τιτάνιο (Ti) ανήκει στην ομάδα 4 και περίοδο 4 του περιοδικού πίνακα. Έχει ατομικό αριθμό 22 και σχετική ατομική μάζα 47,867 u (National Center for Biotechnology Information, 2022). Δεν είναι τοξικό για το ανθρώπινο σώμα για αυτό και χρησιμοποιείται σε πληθώρα επιστημονικών κλάδων (Rodríguez et al., 2022). Ωστόσο, οι Kim et al. (2019) στη βιβλιογραφική έρευνα τους συμπέραναν ότι υπάρχουν σπάνιες περιπτώσεις τοξικότητας του τιτανίου. Το τιτάνιο βρίσκεται ως συστατικό σε κεραμικά και συνθετικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται σε χειρουργικές επεμβάσεις (εμφυτεύματα, οδοντικά σφραγίσματα, ορθοπεδικά εμφυτεύματα κ.α.). Έτσι λοιπόν το τιτάνιο έρχεται σε επαφή με τους βιολογικούς ιστούς και τα υγρά του σώματος. Το Κιτρικό αμμώνιο τιτανίου (Titanium ammonium citrate, TiCit) με μοριακό τύπο $\text{Na}_6[\text{Ti}(\text{C}_6\text{H}_4.5\text{O}_7)_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)] \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ θεωρείται ότι ίσως είναι κατασταλτικό μέσο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ωστόσο δεν έχει μελετηθεί αρκετά για να αποδειχθεί κάτι τέτοιο. Το TiCit στην κρυσταλλική φάση διατηρείται σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι κρύσταλλοι του είναι υδατοδιαλυτοί ωστόσο δεν διαλύονται σε αλκοόλη (CH_3OH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, και *i*- PrOH) (Kefalas et al., 2005). Ουσίες που περιέχουν τιτάνιο χρησιμοποιούνταν μέχρι πρόσφατα ως πρόσθετα στα φαγητά. Συγκεκριμένα το Titanium dioxide (E 171) εγκρίθηκε στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) ως πρόσθετο σε τρόφιμα με τον κανονισμό 1333/2008. Τον Μάρτιο του 2021 θεωρήθηκε μη ασφαλές διότι προκαλεί γονιδιατοξικότητα (βλάβες στο DNA των κυττάρων) (EFSA, 2021).

1.2.2 Νιτρώδες Νάτριο

Το Νιτρώδες Νάτριο (NaNO_2) είναι μια λευκή/υποκίτρινη κρυσταλλική σκόνη η οποία χρησιμοποιείται σε πληθώρα εφαρμογών. Το NaNO_2 χρησιμοποιείται και στη βιομηχανία τροφίμων και συγκεκριμένα για την καταπολέμηση των ενδοσπορίων του *Clostridium botulinum* (Chellapandi & Prisilla, 2018). Το Νιτρώδες Νάτριο έχει χαρακτηριστεί ως πρόσθετο τροφίμων σύμφωνα με τον Ε.Κ.1333/2008 (Council regulation 2008/1333/EC) της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την κωδική ονομασία E250 και επιτρέπεται η χρήση του σε συγκεκριμένη τρόφιμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Η αντιμικροβιακή δράση των νιτρωδών έχει μελετηθεί και στο Milano-Τύπου σαλάμι όπου ανέστειλε την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* και ειδών *Salmonella* (Dalzini et al., 2022) και *Pseudomonas aeruginosa* (Cox et al., 2010)

1.2.3 Σορβικό Κάλιο

Το Σορβικό Κάλιο ($C_6H_7KO_2$) είναι ένα λευκό άλας με μεγάλη διαλυτότητα στο νερό. Το Σορβικό Κάλιο είναι πρόσθετο τροφίμων σύμφωνα με τον Ε.Κ.1333/2008 (Council regulation 2008/1333/EC) της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την κωδική ονομασία E202 και επιτρέπεται η χρήση του σε συγκεκριμένα τρόφιμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αντιμικροβιακή δράση του σορβικού καλίου έχει παρατηρηθεί ενάντια στην *E. coli* σε μεμβράνη αμύλου εμπλουτισμένου με οξείδιο του ψευδαργύρου (Raigond et al., 2018), ενάντια στον *Staphylococcus aureus* με ελάχιστη συγκέντρωση για αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμού (MIC) 2.5 mg/mL και στον *Bacillus cereus* με MIC 5 mg/mL (Fink & Filip, 2021), ενάντια στην *L. monocytogenes* σε μπούτια κοτόπουλου που ξεπλύθηκαν με 5% (w/v) Σορβικό Κάλιο και αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 7 ημέρες (Gonzalez-Fandos & Dominguez, 2007), ενάντια στη *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Batista et al., 2019) όταν προστέθηκε μαζί με Καρβακρόλη σε σάλτσα ντομάτας.

1.2.4 Βενζοϊκό Νάτριο

Το Βενζοϊκό Νάτριο (C_6H_5COONa) είναι λευκή κρυσταλλική ουσία η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως συντηρητικό τροφίμων. Το Βενζοϊκό Νάτριο έχει χαρακτηριστεί ως πρόσθετο τροφίμων σύμφωνα με τον Ε.Κ.1333/2008 (Council regulation 2008/1333/EC) της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την κωδική ονομασία E 211 και επιτρέπεται η χρήση του σε συγκεκριμένα τρόφιμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αντιμικροβιακή δράση του πρόσθετου έχει παρατηρηθεί στους μικροοργανισμούς *E. coli* με MIC 12,5 mg/mL και *S. aureus* με MIC 6,25 mg/mL (Zhang et al., 2019) καθώς και για την *P. aeruginosa* με MIC 25 mg/mL (Cabezas-Pizarro et al., 2018), την *S. enterica* με MIC 13 mm ζώνη αναστολής και *L. monocytogenes* με MIC 12 mm ζώνη αναστολής (Chen & Zhong, 2018a) και τον *Bacillus cereus* με MIC 0,5 mg/mL σε διάλυμα 5% (v/v) DMSO (Pedrosa et al., 2020).

1.2.5 Προπιονικό Οξύ

Το Προπιονικό Οξύ ($C_3H_6O_2$) είναι οργανική χημική ένωση και χρησιμοποιείται ως συντηρητικό τροφίμων. Το Προπιονικό Οξύ έχει χαρακτηριστεί ως πρόσθετο τροφίμων σύμφωνα με τον Ε.Κ.1333/2008 (Council regulation 2008/1333/EC) της Ευρωπαϊκής Ένωσης με την κωδική ονομασία E 280 και επιτρέπεται η χρήση του σε συγκεκριμένα τρόφιμα σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις. Αντιμικροβιακή δράση του πρόσθετου έχει παρατηρηθεί σε διάφορους παθογόνους και δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς. Συγκεκριμένα, οι Kim & Lee (2021) μέτρησαν το MIC στα 5 μ M προπιονικού οξέος για την *E. coli* ATCC 25922 και MIC στα 2,5 μ M προπιονικού οξέος για την *E. coli* O-157 ATCC 43895. Οι Wang et al. (2014) βρήκαν ότι απαιτείται συγκέντρωση MIC 25 mM προπιονικού οξέος σε pH 5,8 η για την καταστροφή του *S. aureus* ενώ

οι Wemmenhove et al. (2016) ανέφεραν συγκέντρωση MIC 11 mM αδιάσπαστου προπιονικού οξέος σε pH 5,2 με 5,6 για την καταστροφή της *L. monocytogenes*. Οι Bushell et al., (2019) διαπίστωσαν ότι το προπιονικό οξύ σε συγκέντρωση 20 mM και pH 6 περιόρισε την ανάπτυξη της *P. aeruginosa* σε σχέση με άλλα οργανικά οξέα. Τέλος, οι Karetkin et al. (2019) δημιούργησαν μοντέλο για τον υπολογισμό της αναστολής που προκαλεί το προπιονικό οξύ στον *B. cereus*.

1.3 Μικροοργανισμοί

1.3.1 *Escherichia coli*

1.3.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Η *E. coli* ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae και ζει στον γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των ζώων. Η *E. coli* είναι Gram αρνητικό, ζυμωτικό (ζυμώνει και την λακτόζη) βακτήριο το οποίο παράγει καταλάση. Είναι μεσόφιλο και αναπτύσσεται από 7 - 45°C με κατάλληλη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 37°C, ενεργότητα νερού $a_w > 0,95$ και άριστο pH ανάπτυξης το 7 (Adams & Moss, 2008). Μπορεί να αναπτυχθεί σε όξινες συνθήκες σε pH 4 – 4,5 και να επιβιώσει ακόμα και σε pH 3.6 για εβδομάδες. Ο κάθε ορότυπος της *E. coli* έχει διαφορετικές τιμές D (Η θερμοκρασία και ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του πληθυσμού ενός οργανισμού κατά 90%). Για παράδειγμα, το στέλεχος K-12 έχει $D_{60} = 0,11$ με 0,32 λεπτά το DM 18,3 έχει $D_{60} = 15$ λεπτά και το AW 1,7 έχει $D_{60} = 71$ λεπτά (Dlusskaya et al., 2011). Από τους πιο συχνά απομονωμένους παθογόνους ορότυπους είναι η *E. coli* O157:H7 και επιβιώνει για 0,5-1,5 λεπτά στους 60 °C (Weiss & Hammes, 2005).

1.3.1.2 Παθολογία

Υπάρχει πληθώρα εξελιγμένων *E. coli* κλώνων (παθογόνοι ορότυποι της *E. coli*) οι οποίοι έχουν προσαρμοστεί έτσι ώστε να προκαλούν διάφορες αρρώστιες. Οι κλώνοι αυτοί έχουν αποκτήσει ιδιότητες λοιμογόνου δράσης και μπορούν να προκαλέσουν διάρροια, ουρολοιμώξη, σήψη και μηνιγγίτιδα (Nataro & Kaper 1998). Οι παθογόνοι του εντερικού σωλήνα χωρίζονται σε 6 υποείδη της *E. coli*: την εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC) που προκαλεί διάρροια, διάρροια με αίμα και αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο, την εντεροτοξική *E. coli* (ETEC) η οποία προκαλεί υδαρή διάρροια, την εντεροπαθογόνο *E. coli* (EPEC) που προκαλεί διάρροια σε βρέφη, την εντεροσυσσωρευόμενη *E. coli* (EAEC) που δημιουργεί επίμονη διάρροια σε βρέφη και ενήλικες, την εντεροδιεισδυτική *E. coli* (EIEC) που προκαλεί φλεγμονώδη κολίτιδα και δυσεντερία και την εντεροδιαχέσιμη *E. coli* (DAEC) που προκαλεί διάρροια σε μικρά παιδιά. Η EHEC εγκαθίσταται στα επιθηλιακά κύτταρα και παράγει την τοξίνη Shiga (Stx) παρόμοια τοξίνη με αυτή της *Shigella dysenteriae*. Η συγκεκριμένη τοξίνη προκαλεί τη χειρότερη μορφή διάρροιας σε σχέση με τα υπόλοιπα προαναφερόμενα υποείδη (Montville et al., 2017). Η Stx διαλύει το RNA των ριβοσωμάτων (υπεύθυνα για τη σύνθεση πρωτεϊνών) με αποτέλεσμα τα επιθηλιακά κύτταρα να λύνονται. Τέλος η EHEC και συγκεκριμένα ο ορότυπος O157:H7 πρωτοεμφανίστηκε στις αρχές της δεκαετίας του 80 και από τότε ευθύνεται για πληθώρα κρουσμάτων και εξάρσεων σε όλο τον κόσμο.

1.3.1.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα

Η *E. coli* είναι κολοβακτηρίδιο και δείκτης εντερικής ρύπανσης. Μέσω των κοπράνων μεταδίδεται στο χώμα, νερό και συνεπώς και στα τρόφιμα. Ο πληθυσμός της *E. coli* στα φρέσκα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα είναι μικρότερος από 10 cfu/g. Παθογόνοι ορότυποι της *E. coli* (π.χ η EHEC) μπορούν να επιμολύνουν φρέσκα προϊόντα και κυρίως προϊόντα με σπανάκι (Feng, 2014). Η EHEC έχει την ικανότητα να δημιουργεί βιοφίλμ σε αρκετές επιφάνειες και σε διάφορες θερμοκρασίες οι οποίες σχετίζονται με την παραγωγή τροφίμων. Στη βιομηχανία τροφίμων, το βιοφίλμ της EHEC μπορεί να αποτελέσει πηγή επιμόλυνσης των τελικών προϊόντων και να δημιουργηθούν νέοι παθογόνοι ορότυποι της (Nesse et al., 2014). Ορότυποι EHEC έχουν βρεθεί σε γάλα, πουλερικά, βοδινό κρέας, χοιρινό κρέας, λουκάνικα, πουλερικά και θαλασσινά προϊόντα. Πολλές περιπτώσεις τροφικών δηλητηριάσεων από εντεροαιμορραγική *E. coli* έχουν καταγραφεί στην Ευρώπη και τον κόσμο. Για παράδειγμα το 2011, στην Ευρώπη, εμφανίστηκαν 3100 κρούσματα οξείας γαστρεντερίτιδας και 850 περιπτώσεις ασθενών με αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο τα οποία προκλήθηκαν από την EHEC ορότυπο O104 (Gaspar et al., 2014), που απομονώθηκε από φύτες φασολιών εισαγόμενες από την Αίγυπτο. Η EHEC (ορότυπος O111:H8 και ορότυπος OI-122) ήταν υπεύθυνη για ξέσπασμα όπου καταναλώθηκαν σπιτικά burgers το 2019 σε βρεφονηπιακό σταθμό (14 παιδιά και 13 ενήλικες) στη Βραζιλία (Spano et al., 2021).

1.3.2 *Staphylococcus aureus*

1.3.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το είδος *S. aureus* ανήκει στην οικογένεια Micrococcaceae στο γένος *Staphylococcus*. Ο *S. aureus* είναι Gram θετικό, καταλάση θετικό, οξειδάση αρνητικό, προαιρετικά αερόβιο, ακίνητο, μη σπορογόνο, σφαιρικό βακτήριο. Ο *S. aureus* είναι μεσόφιλο και αναπτύσσεται σε εύρος θερμοκρασίας από 6-48 °C, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C. Ο μικροοργανισμός έχει $D_{62} = 20$ με 65 δευτερόλεπτα και $D_{72} = 4,1$ δευτερόλεπτα στο γάλα. Άριστο pH για την ανάπτυξη του είναι 6-7 με ελάχιστο το 4 και μέγιστο το 10. Τα περισσότερα στελέχη του *S. aureus* αναπτύσσονται σε 5-7% NaCl με κάποιους να αναπτύσσονται ακόμα και σε 20% NaCl. Ο *S. aureus* αναπτύσσεται σε περιβάλλον με $a_w > 0.99$ αλλά ως αλατοανεκτικό βακτήριο αναπτύσσεται και σε a_w ως 0.84 (Doyle et al., 2019; Adams & Moss 2008).

1.3.2.2 Παθολογία

Ο *S. aureus* παράγει τις θερμοάντοχες εντεροτοξίνες A, B, C, D, E, G, H, J και I. Οι εντεροτοξίνες του σταφυλόκοκκου παράγονται σε μικρές ποσότητες στη φάση εκθετικής ανάπτυξης. Η ποσότητα παραγωγής εξαρτάται από το στέλεχος του *S. aureus*, με τις εντεροτοξίνες τύπου B και C να

παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σε σχέση με τις υπόλοιπες (Montville et al., 2017). Για την παραγωγή εντεροτοξινών, ο πληθυσμός του *S. aureus* πρέπει να ξεπεράσει τα 10^5 cfu/g τροφίμου. Η εντεροτοξίνη Α ευθύνεται για τα περισσότερα κρούσματα, ωστόσο πολλές αναφορές έχουν γίνει και για την εντεροτοξίνη Β. Οι εντεροτοξίνες του *S. aureus* είναι αρκετά ανθεκτικές σε ακραίες συνθήκες όπως υψηλή θερμοκρασία και χαμηλό pH. Η τροφοτοξίνωση από τον *S. aureus* προκαλείται από τις θερμοάντοχες τοξίνες και όχι από τον ίδιο τον μικροοργανισμό που τις παράγει. Τα συμπτώματα που περιλαμβάνουν ναυτία, διάρροια, εμετό και κοιλιακές κράμπες, εμφανίζονται μετά από 2 έως 6 ώρες μετά την κατάποση της μολυσμένης τροφής με ανάρρωση μετά από 1 με 3 ημέρες (Becker et al., 2015). Η απουσία πυρετού οφείλεται στο ότι η τροφική δηλητηρίαση προκαλείται από την εντεροτοξίνη και όχι από τον μικροοργανισμό. Ένα ηg εντεροτοξίνης ανά g τροφίμου είναι ικανό να προκαλέσει τα παραπάνω συμπτώματα. Διάφοροι παράγοντες παίζουν ρόλο στην επίδραση της εντεροτοξίνης του *S. aureus* στον άνθρωπο (ευαισθησία του ατόμου, ποσότητα τροφής, τύπος τοξίνης). Τέλος, η εντεροτοξίνη ενεργεί στον εντερικό σωλήνα και η εμετική αντίδραση σχετίζεται με την αλληλεπίδραση της τοξίνης και του νευρικού συστήματος (Montville et al., 2017).

1.3.2.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα

Η τροφική δηλητηρίαση από *S. aureus* είναι αρκετά συχνή. Οι βιότοποι του *S. aureus* είναι μέρη του ανθρώπινου σώματος όπως μύτη, χέρια, σάλιο και οισοφάγος και γενικότερα δέρμα και τρίχες. Σε μερικούς ανθρώπους ο *S. aureus* αποτελεί μόνιμη χλωρίδα του σώματος τους (Montville et al., 2017). Αυτό σημαίνει ότι η μόλυνση με σταφυλόκοκκο προέρχεται συνήθως από τη μη σωστή διαχείριση των τροφίμων στις βιομηχανίες. Ο *S. aureus* εμφανίζεται σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και στο γάλα σε περίπτωση που το ζώο είχε μαστίτιδα (Mørk et al., 2012). Ο *S. aureus* μπορεί να μην επιβιώσει κατά την επεξεργασία ενός τροφίμου, ωστόσο η θερμοάντοχη εντεροτοξίνη που παράγει μπορεί να αντέξει τις υψηλές θερμοκρασίες της επεξεργασίας. Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις τροφοτοξινώσεων από *S. aureus* στον κόσμο όπως: σε σχολείο στην Σουηδία 14 κρούσματα, που προκλήθηκε από κατανάλωση τυριού Tomme (Johler et al., 2015), στο Λουξεμβούργο με 31 κρούσματα, σε εκδήλωση που προκλήθηκε μάλλον από την κατανάλωση μακαρονοσαλάτας (Mosson et al., 2015) και σε πάρτι στη Γερμανία με 13 κρούσματα που προκλήθηκε από κατανάλωση παγωτού (Fetsch et al., 2014).

1.3.3 *Listeria monocytogenes*

1.3.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το είδος *L. monocytogenes* ανήκει στο γένος *Listeria* της οικογένειας Listeriaceae. Το

συγκεκριμένο είδος μαζί με την *L. ivanovii* είναι παθογόνα για τον άνθρωπο. Η *L. monocytogenes* είναι Gram θετικό, προαιρετικά αναερόβιο, κυλινδρικό, κινητό, μη σπορογόνο βακτήριο. Η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες από 0-42°C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 30-37°C και άριστο pH 7 (Adams & Moss, 2008). Η ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* στη θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με το είδος του τροφίμου, τις συνθήκες και άλλες παραμέτρους όπως η αλατότητα (Doyle et al., 2001). Το κύριο χαρακτηριστικό της *L. monocytogenes* είναι η ικανότητα της να αναπτύσσεται και να προσαρμόζεται σε υψηλά επίπεδα αλατότητας από 9%~14% NaCl (Shabala et al., 2008).

1.3.3.2 Παθολογία

Τα μολυσμένα τρόφιμα είναι η κύρια πηγή μόλυνσης με *L. monocytogenes* στα σποραδικά κρούσματα και στις εξάρσεις. Η εστία της λοίμωξης εμφανίζεται στο εντερικό επιθήλιο όπου κύτταρα της *L. monocytogenes* εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Hof, 2001). Πολλοί είναι οι παράγοντες που παίζουν ρόλο για το αν η ασθένεια από *L. monocytogenes* θα προκαλέσει μια απλή γαστρεντερίτιδα ή θα καταλήξει σε απειλή για τη ζωή. Αυτοί οι παράγοντες σχετίζονται με τη λοιμογόνο ικανότητα των ορότυπων του είδους (κυριότεροι ορότυποι: 4b, 1/2a, και 1/2b), την συγκέντρωση των παθογόνων που καταναλώθηκαν με τη τροφή και την κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου. Η ασθένεια που προκαλεί η *L. monocytogenes* ονομάζεται λιστερίωση και μπορεί να εμφανιστεί με τη μορφή ελαφριάς γρίπης στους υγιείς ενήλικες. Άλλα συμπτώματα συμπεριλαμβάνουν πυρετό, διάρροια, αρθρομυαλγία, ναυτία και πονοκέφαλο. Η γαστρεντερίτιδα από *L. monocytogenes* αυτοπεριορίζεται και δεν προκαλεί σοβαρές επιπλοκές σε υγιείς ενήλικες αλλά σε έγκυες μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο του εμβρύου ή μηνιγγίτιδα αμέσως μετά τη γέννησή του και σε ηλικιωμένους εμφανίζεται υψηλή θνησιμότητα γιατί οδηγεί σε μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος που οδηγεί σε μηνιγγίτιδα/εγκεφαλίτιδα (Ooi & Lorber, 2005). Σε 253 περιπτώσεις λιστερίωσης στην Κίνα από το 2011 μέχρι το 2016, παρατηρήθηκε 25,7% θνησιμότητα ενώ η λοιμογόνος δόση υπολογίζεται στα 100 κύτταρα έως 6 εκατομμύρια CFU/g τροφίμου. (Li et al., 2018; Johnsen et al., 2010; Farber et al., 1996).

1.3.3.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα

Η *L. monocytogenes* αποτελεί σημαντική απειλή για τη βιομηχανία τροφίμων, εξαιτίας της ικανότητάς της να αναπτύσσεται σε χαμηλή θερμοκρασία (ψυχρότροφο), σε υψηλή αλατότητα και στην ικανότητα της να δημιουργεί βιοφίλμ (Mørseth & Langsrud 2004). Η κύρια πηγή μόλυνσης των τροφίμων είναι οι κακές συνθήκες υγιεινής στις βιομηχανίες (κυρίως γαλακτοβιομηχανίες) και στα σφαγεία, ενώ η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται σε ειδικές εστίες στον εξοπλισμό και στις

κτιριακές εγκαταστάσεις (Carpentier & Cerf, 2011). Η *L. monocytogenes* έχει απομονωθεί από διάφορα προϊόντα όπως, το σοκολατένιο γάλα, τυρί, κρέας, κοτόπουλο, ψαρικά και έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες (Melo & Faleiro, 2015; Gudbjörnsdottir et al., 2004; Little et al., 2007; Hanson et al., 2019). Έχουν αναφερθεί πολλές εξάρσεις τροφικών δηλητηριάσεων από *L. monocytogenes* στον κόσμο. Συγκεκριμένα στην Ευρώπη από το 2008-2018 καταγράφηκαν 47 κρούσματα λιστερίωσης που προκλήθηκαν από κατανάλωση τυριού, 63 κρούσματα από ιχθυρά και θαλασσινά προϊόντα, 190 κρούσματα που προκλήθηκαν από προϊόντα κρέατος και κρεατοσκευάσματα καθώς και 375 κρούσματα που προκλήθηκαν από προϊόντα όπως λαχανικά, χυμοί, προϊόντα αρτοποιίας, δημητριακά, ρύζι, ξηροί καρποί και αμύγδαλα (EFSA, 2020).

1.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το είδος *P. aeruginosa* ανήκει στο γένος *Pseudomonas* της οικογένειας Pseudomonadaceae είναι Gram αρνητικό, απόλυτα αερόβιο, ραβδόμορφο, ψυχρότροφο, κινητό, μη σπορογόνο βακτήριο. Η *P. aeruginosa* αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 4°C - 42°C με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37°C (Montville et al. 2017). Η *P. aeruginosa* αποτελεί απειλή για τα τρόφιμα λόγω της πρωτεολυτικής και λιπολυτικής ικανότητας της που την καθιστούν ως αλλοιογόνο βακτήριο στα τρόφιμα (Inat et al., 2021).

1.3.4.2 Παθολογία

Η *P. aeruginosa* αποτελεί κλινικό παθογόνο βακτήριο υπεύθυνο για για πολλές ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις. Μεταδίδεται μέσω της σωματικής επαφής, των μολυσμένων αντικειμένων και μέσω της κατάποσης μολυσμένου τροφίμου και νερού. Αναλυτικότερα, μπορεί να προκαλέσει μόλυνση σε έγκαυμα, επιπεφυκίτιδα, ουρολοίμωξη και οστεομυελίτιδα (σε ασθενή με διαβήτη). Σε περίπτωση τραύματος η *P. aeruginosa* προκαλεί κερατίτιδα, ωτίτιδα και θυλακίτιδα, ενώ σε ευπαθείς ομάδες μπορεί να προκαλέσει κακοήθη ωτίτιδα, σήψη, μηνιγγίτιδα (σε νεογέννητα), ενδοκαρδίτιδα, οστεομυελίτιδα και χρόνια πνευμονία. Με τη βοήθεια των μαστιγίων, η *P. aeruginosa* έρχεται σε επαφή με τα κύτταρα και ενεργοποιεί το type III σύστημα έκκρισης. Το σύστημα αυτό επιτρέπει στο βακτήριο να εισάγει τοξίνες (μέσω του pili) κατευθείαν στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτικών κυττάρων (Fakhkhari et al., 2022; Conrad et al., 2011). Οι τελεστικές πρωτεΐνες υπεύθυνες για την τοξικότητα της *P. aeruginosa* είναι οι: ExoY, ExoS, ExoT, ExoU. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες (ειδικότερα η ExoS) και ο συνδυασμός αυτών επιτρέπουν στον παθογόνο να εισβάλει και να αναπτύσσεται στους ξενιστές που προσβάλλει (Engel & Balachandran, 2009).

1.3.4.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα

Η *P. aeruginosa* βρίσκεται σε υγρό περιβάλλον όπως το χώμα, το νερό, τα τρόφιμα και τα νοσοκομειακά γεύματα (Fakhkhari et al., 2022). Αν και κλινικό βακτήριο, η *P. aeruginosa* αποτελεί σημαντική απειλή για τη βιομηχανία τροφίμων διότι προσαρμόζεται και αναπτύσσεται εύκολα σε μη ευνοϊκά περιβάλλοντα ενώ ταυτόχρονα έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει βιοφιλμ με αποτέλεσμα να επιμολύνει τα τρόφιμα. Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί διασταύρωση βιοφιλμ της *P. aeruginosa* και με άλλους δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς όπως τον *S. aureus* (Xu et al., 2019). Η *P. aeruginosa* έχει εντοπιστεί σε πόσιμο νερό και σε γαλακτοβιομηχανίες (Schauer et al., 2021, Casanovas-Massana et al., 2010). Στα τρόφιμα έχει απομονωθεί από κρέας πουλερικών, μοσχαρίσιο κιμά, ωμό κρέας, κρέας από βοοειδή, ωμό και καπνιστό ψάρι (Inat et al., 2021, Bantawa et al., 2018, Benie et al., 2017).

1.3.5 *Salmonella enterica*

1.3.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ορότυποι *Salmonella* Enteritidis και *Salmonella* Typhimurium ανήκουν στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Είναι Gram αρνητικά, κινητά, ραβδόμορφα, προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα βακτήρια. Είναι μεσόφιλα με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 35 - 37°C ενώ μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες από 5-45°C. Το άριστο pH ανάπτυξης είναι pH 6-7 ενώ μπορούν να αναπτυχθούν και σε pH από 3,5- 3,8 (Bhunja et al., 2018).

1.3.5.2 Παθολογία

Τα συμπτώματα μη τυφοειδούς σαλμονέλλωσης είναι κυρίως γαστρεντερίτιδα διάρροια συνοδευόμενη με αίμα, πυρετό πονόκοιλο, ναυτία, εμετό, πονοκέφαλο και μυαλγία (Ehuwa et al., 2021). Εμφανίζονται σε 6 με 72 ώρες μετά την κατάποση ελάχιστων κυττάρων. Αυτό εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του ορότυπου, την ανθεκτικότητα του ατόμου που μολύνεται και τον αριθμό ζωντανών κυττάρων που καταναλώνεται. Η ασθένεια μπορεί να διαρκέσει από 2 έως και 7 ημέρες. Τα συμπτώματα είναι ελαφριά σε υγιείς ενήλικες χωρίς να χρειάζεται κάποια μορφή θεραπείας. Αντιθέτως σε ηλικιωμένους και παιδιά η αφυδάτωση που προκαλεί η σαλμονέλλα μπορεί να αποβεί μοιραία (WHO, 2018). Οι ορότυποι *Salmonella* Enteritidis και *Salmonella* Typhimurium αποτελούν μη τυφοειδή σαλμονέλλες και προκαλούν κυρίως γαστρεντερίτιδα ενώ οι τυφοειδή σαλμονέλλες (*Salmonella* Typhi και *Salmonella* Paratyphi) προκαλούν τυφοειδή πυρετό (Johnson et al., 2018).

1.3.5.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα

Τα είδη Σαλμονέλλας είναι φυσική χλωρίδα σε οικόσιτα και άγρια ζώα όπως: πουλερικά, άγρια

πουλιά, χοίρους, βοοειδή και τρωκτικά. Επίσης, οι άνθρωποι που έχουν ασθενήσει μπορεί να είναι φορείς σαλμονέλλας για αρκετό καιρό (Montville et al., 2017). Σαλμονέλλα έχει απομονωθεί από φρέσκο κρέας και προϊόντα κρέατος, κοτόπουλο και προϊόντα κοτόπουλου, αυγά και προϊόντα που περιέχουν αυγά, ψάρια και δίθυρα μαλάκια, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, φρούτα και λαχανικά, ξηρούς καρπούς, καρύδες, σοκολάτες, λάδι, έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, μπαχαρικά, βότανα και στο πόσιμο νερό [Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH), 2003]. Η ασυμπτωματική *S. Enteritidis* σε πτηνοτροφικές μονάδες αποτελεί κίνδυνο υγείας μιας και μπορεί να μεταφερθεί στον άνθρωπο μέσω των τροφίμων όπως αυγά, κρέας και κοτόπουλο (Sadeyen et al., 2004). Στις κτηνοτροφικές μονάδες (βοοειδή και χοίροι) τα βακτήρια μεταφέρονται μέσω των ζωοτροφών, το περιβάλλον και τον εξοπλισμό στα τελικά προϊόντα (Holschbach & Peek, 2018). Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Ασθενειών των ΗΠΑ υπολογίζει ότι η Σαλμονέλλα προκαλεί 1.35 εκατομμύρια μολύνσεις, 26.500 εισαγωγές σε νοσοκομεία και 420 θανάτους στις ΗΠΑ κάθε χρόνο [Center for Disease Control and Prevention (CDC), 2022]. Το 2019 καταγράφηκαν 121 κρούσματα σαλμονέλλωσης σε 5 χώρες της Ευρώπης που προκλήθηκαν από προϊόντα με βάση το σουσάμι [European Food Safety Authority (EFSA), 2021a]. Πρόσφατα, σε 10 χώρες της Ευρώπης και το Ηνωμένο Βασίλειο (Μάρτιο με Απρίλιο του 2022) καταγράφηκαν 150 περιπτώσεις μόλυνσης με *S. Typhimurium* και 49 εισαγωγές σε νοσοκομείο, οι οποίες προκλήθηκαν από κατανάλωση μολυσμένης σοκολάτας (Larkin et al., 2022).

1.3.6 *Bacillus cereus*

1.3.6.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Το είδος *B. cereus* ανήκει στην οικογένεια Bacillaceae στο γένος *Bacillus*. Ο *B. cereus* είναι Gram θετικό, ραβδόμορφο, αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο, σπορογόνο, βακτήριο. Ο *B. cereus* είναι μεσόφιλο βακτήριο, μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 4 - 48°C με άριστη τους 28 - 35°C, σε pH 4,9-9,3, και a_w 0,92- 0,99 (Silva, 2016). Ο *B. cereus* έχει την ικανότητα να παράγει ενδοσπόρια. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν την παραγωγή των ενδοσπορίων καθώς και τις ιδιότητες τους (Hayrapetyan et al., 2016). Η επιβίωση του *B. cereus* στην αλυσίδα παραγωγής τροφίμων εξαρτάται σημαντικά από τα ενδοσπόρια που δημιουργεί. Τα ενδοσπόρια του *B. cereus* αντέχουν ακραίες τιμές θερμοκρασίας, πίεσης και pH ενώ παράλληλα αντέχουν στη χρήση απολυμαντικών, ακτινοβολίας, αποξήρανσης και άλλων στρες που μπορεί να προκληθούν. Ωστόσο, τα ενδοσπόρια δεν αποτελούν απειλή για τη βιομηχανία τροφίμων εάν δεν εκβλαστήσουν (Markland & Hoover, 2016).

1.3.6.2 Παθολογία

Η τροφική δηλητηρίαση από τον *B. cereus* μπορεί να προκληθεί με δύο τρόπους (εμετικό ή διαρροϊκό σύνδρομο) ανάλογα με τις ιδιότητες του ορότυπου. Το εμετικό σύνδρομο προκαλείται από την θερμοάντοχη τοξίνη cereulide η οποία προκαλεί εμετό, ενώ σε μεγάλες δόσεις μπορεί να προκαλέσει βλάβη στον εγκέφαλο και το συκώτι. Η cereulide παράγεται από τον *B. cereus* όταν αυτός βρίσκεται στο τρόφιμο. Παράλληλα, η διάρροια προκαλείται από κατάποση κυττάρων ή και ενδοσπορίων του *B. cereus* που παράγουν εντεροτοξίνες. Ο *B. cereus* εγκαθίσταται στο έντερο και παράγει εντεροτοξίνες με αποτέλεσμα να προκαλείται το εντερικό σύνδρομο (Jovanovic et al., 2021). Τα συμπτώματα συνήθως διαρκούν 12 με 24 ώρες και είναι ήπια σε υγιείς ανθρώπους. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις ο *B. cereus* μπορεί να προκαλέσει βακτηριαιμία και μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος (McDowell et al., 2021).

1.3.6.3 Εμπλεκόμενα Τρόφιμα

Ο *B. cereus* έχει απομονωθεί από γάλα, λαχανικά, κρέας, ψάρι, προϊόντα με βάση το ρύζι, πατάτες, ζυμαρικά, γαλακτοκομικά προϊόντα, σάλτσες, αρτοσκευάσματα, έτοιμες σούπες, έτοιμες σαλάτες και άλλα προϊόντα (Jessberger et al., 2020). Έχουν αναφερθεί πολλές εξάρσεις τροφικών δηλητηριάσεων που προκλήθηκαν από τον *B. cereus* παγκοσμίως. Στην Αυστραλία καταμετρήθηκαν $1,9 \times 10^4$ cfu/g *B. cereus* σε βοδινό κρέας, σε ένα εστιατόριο προκαλώντας 41 περιστατικά τροφικής δηλητηρίασης (Thirkell et al., 2019). Στη Γαλλία το 2007 με 2014 καταγράφηκαν 74 εξάρσεις οι οποίες προκλήθηκαν κυρίως από μολυσμένα λαχανικά και προϊόντα με βάση το άμυλο (Glasset et al., 2016).

2. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης διάφορων ουσιών με προοπτική χρήσης τους σε ενεργές συσκευασίες. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση του Titanium ammonium citrate (TiCit) με μοριακό τύπο $\text{Na}_6[\text{Ti}(\text{C}_6\text{H}_4.5\text{O}_7)_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)], 16\text{H}_2\text{O}$. Η αντιμικροβιακή δράση του TiCit εξετάστηκε σε δύο συγκεντρώσεις (0.5 mM και 0.1 mM) έναντι των παθογόνων βακτηρίων *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* και *P. aeruginosa*. Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η αντιμικροβιακή δράση συντηρητικών σε μεμβράνες αμύλου. Οι μεμβράνες αμύλου και πολυγαλακτικού οξέος, εμπλουτίστηκαν με τα συντηρητικά: Σορβικό Κάλιο, Βενζοϊκό Νάτριο, Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου και Νιτρώδες Νάτριο κατά τη διάρκεια παρασκευής τους. Η μέθοδος περιελάμβανε την τοποθέτηση των μεμβρανών σε τρυβλία, που είχαν εμβολιαστεί προηγουμένως με καλλιέργειες των προαναφερόμενων μικροοργανισμών αλλά και με *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium και *Bacillus cereus*. Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των συσκευασιών αμύλου εμπλουτισμένων με NaNO_2 .

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1 Υποστρώματα

Τα μικροβιολογικά και χημικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ήταν από τις εταιρείες Lab M (Lancashire, UK), Biolab (Budapest, Hungary), Scharlau (Barcelona, Spain), Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά και υποστρώματα:

1. Plate Count Agar (PCA)
2. Tryptone Soy Broth (30g/L απιονισμένου νερού)
3. Yeast Extract (6g/L απιονισμένου νερού)
4. Mueller Hinton Agar (38g/L απιονισμένου νερού)
5. de Man Rogosa & Sharpe Agar (MRSA)
6. Άμυλο καλαμποκιού
7. Γλυκερόλη
8. Αραιωτικό Ringer's solution ¼ strength
9. Tryptone Soy Broth Yeast Extract με πυκνότητα x 2.5 (3g Yeast Extract & 15g Tryptone Soy Broth ανά 200mL) (TSBYE x 2.5)

Τα παραπάνω υποστρώματα, οι θρεπτικοί ζωμοί και τα αραιωτικά αποστειρώθηκαν πριν τη χρήση τους στους 121°C για 15 λεπτά και επιπρόσθετη αποστείρωση πραγματοποιήθηκε στις μεμβράνες με χρήση UV για 15 λεπτά στα 240 nm.

3.2.2 Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Για την εκτέλεση των πειραμάτων αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μικροοργανισμοί:

- *Escherichia coli* EHEC: O157:H7 (NCTC 12079)
- *Staphylococcus aureus* ATTC 6538
- *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT 4
- *Salmonella enterica* serovar Typhimurium NCTC 12023
- *Bacillus cereus*
- *Listeria monocytogenes* Scott A
- *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.3 Αντιμικροβιακές ουσίες

Η ουσία που εξετάστηκε για αντιμικροβιακή δράση ήταν το Titanium ammonium citrate με μοριακό τύπο $\text{Na}_6[\text{Ti}(\text{C}_6\text{H}_4.5\text{O}_7)_2(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)], 16\text{H}_2\text{O}$ και μοριακό βάρος 1040,39 g/mol. Οι ουσίες

που ενσωματώθηκαν σε μεμβράνες αμύλου παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Αντιμικροβιακές ουσίες που ενσωματώθηκαν σε μεμβράνες αμύλου.

Όνομα ένωσης στα Ελληνικά	Όνομα ένωσης στα Αγγλικά	Μοριακός τύπος
Νιτρώδες Νάτριο	Sodium Nitrite	NaNO₂
Σορβικό Κάλιο	Potassium Sorbate	C₆H₇KO₂
Βενζοϊκό Νάτριο	Sodium Benzoate	C₆H₅COONa
Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου	Propionic acid calcium salt	[CH₃CH₂COO]₂Ca

3.3 Μέθοδοι

3.3.1 Πειραματική διαδικασία για ανάλυση στο Bioscreen C

Οι ουσίες του πίνακα 1 διατηρήθηκαν σε στερεή μορφή στους 4°C και μεταφέρθηκαν σε ζυγό ακριβείας (TR-64, Denver Instrument Company, New York, USA) και στη συνέχεια διαλύθηκαν σε υπερκάθαρο νερό. Ακολούθησε ανάδευση μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Οι ουσίες κατόπιν αποστειρώθηκαν με φίλτρα διήθησης με άνοιγμα πόρων 0.22 μm (Membrane Solutions, USA) και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα γυάλινα μπουκαλάκια. Συγκεκριμένα, για το Titanium ammonium citrate ζυγίστηκαν 5.6 mg σε 5 mL υπερκάθαρο νερό (1 mmol) και 2.5 mg σε 5 mL υπερκάθαρο νερό (0.2 mmol). Η εξεταζόμενη αντιμικροβιακή ουσία τοποθετήθηκε σε κυψέλες των 300 μmL σε ποσότητα 150 μmL άρα η ουσία αραιώνεται στο μισό. Λόγο αυτής της αραιώσης, η τελική συγκέντρωση της ουσίας ήταν 0,5 mmol και 0,1 mmol αντίστοιχα.

3.3.1.1 Προετοιμασία καλλιέργειας παθογόνων μικροοργανισμών

Για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, η αρχική προετοιμασία των παθογόνων μικροοργανισμών ήταν η ίδια. Παρασκευάστηκαν υγρές 24 ώρες καλλιέργειες σε θρεπτικό ζωμό 9 mL και επώαστηκαν στους 37°C. 1 mL κάθε υγρής καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένο φιαλίδιο erpendorf (Hamburg, Germany) και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε 12000 rcf. Μετά τη φυγοκέντριση, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και προστέθηκε 1 mL αραιωτικού.

3.3.1.2 Τοποθέτηση διαλυμάτων στις κυψελίδες

Το μηχάνημα Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finland) έχει υποδοχές για 2 πλάκες και η κάθε πλάκα περιλαμβάνει 100 κυψελίδες. Οι πλάκες είναι αποστειρωμένες με υπεριώδη ακτινοβολία γ. Σε κάθε κυψελίδα τοποθετήθηκαν 150 μL αποστειρωμένης ουσίας, 30 μL

ζωμού με τον κάθε υπό μελέτη παθογόνο μικροοργανισμό και 120 μL TSBYE x 2.5 (συμπυκνωμένος ζωμός). Τα δείγματα στις κυψελίδες των πλακών τοποθετήθηκαν στην ειδική θήκη του μηχανήματος. Η διαδικασία των μετρήσεων ξεκίνησε όταν επιτεύχθηκε η επιθυμητή θερμοκρασία (37°C) και μετρήσεις καταγράφηκαν ανά 30 λεπτά για 24 ώρες. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας έγινε στα 580 nm. Για τον έλεγχο της στειρότητας της ουσίας η καλλιέργεια αντικαταστάθηκε με αποστειρωμένο αραιωτικό σε 3 κυψελίδες. Στους μάρτυρες των μικροοργανισμών, η ουσία αντικαταστάθηκε με αποστειρωμένο αραιωτικό. Πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις για κάθε συνδυασμό. Η διαδικασία τοποθέτησης των διαλυμάτων στις κυψελίδες πραγματοποιήθηκε μέσα στο Safety Cabinet TopSafe 1.2 (Euroclone S.p.A., Milano, Italy).

3.3.1.3 Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων του Bioscreen

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων για χρόνο T=0 (πριν την έναρξη της ανάπτυξης των βακτηρίων) οι οποίες αντιπροσωπεύουν την οπτική πυκνότητα του θρεπτικού ζωμού. Στη συνέχεια, η τιμή του μέσου όρου αφαιρέθηκε από όλες τις επόμενες μετρήσεις. Οι υπολογισμένες τιμές οι οποίες ήταν μηδενικές ή αρνητικές αντικαταστάθηκαν με την αυθαίρετη τιμή του 0,001. Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (MGR) των βακτηρίων. Για κάθε συνδυασμό ουσίας-μικροοργανισμού σχεδιάστηκε ημιλογαριθμική γραφική παράσταση ανάπτυξης του μικροοργανισμού, με το λογάριθμο της οπτικής πυκνότητας (άξονας Y) σε συνάρτηση με το χρόνο (άξονας X). Από την κάθε καμπύλη ανάπτυξης που σχεδιάστηκε, επιλέχθηκε το διάστημα της εκθετικής φάσης κατά το οποίο ο ρυθμός ανάπτυξης ήταν μεγαλύτερος. Για την επιλογή του διαστήματος, θα έπρεπε να ισχύει ότι: το χρονικό διάστημα θα έπρεπε να διαρκεί το λιγότερο μία ώρα και η ελάχιστη οπτική πυκνότητα θα έπρεπε να είναι ίση με 0,01.

Ο μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης υπολογίζεται από το χρονικό διάστημα που επιλέχθηκε με την εξίσωση:

$$MGR = \frac{\ln(At_2/At_1)}{t_2 - t_1}$$

όπου At₁, At₂ η οπτική πυκνότητα στο χρόνο t₁ και t₂ αντίστοιχα και t₁, t₂ η χρονική στιγμή στην αρχή και στο τέλος του επιλεγόμενου χρονικού διαστήματος αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο μέσος όρος του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης των 3 επαναλήψεων για κάθε μικροοργανισμό ανά ουσία καθώς και για τους μάρτυρες των μικροοργανισμών. Έπειτα, εξετάστηκε ο λόγος των μέσων όρων, (ουσίας-μικροοργανισμού με το αντίστοιχο μάρτυρα του

μικροοργανισμού). Ο στατιστικός έλεγχος t-test μεταξύ των δοκιμών και των μαρτύρων, με επίπεδο σημαντικότητας 0,05 πραγματοποιήθηκε σε λογιστικό φύλλο. Τέλος, υπολογίστηκε η λανθάνουσα φάση ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα, η χρονική στιγμή όπου η αύξηση της οπτικής πυκνότητας σε σχέση με την αρχική τιμή στο $T=0$ ισούται τουλάχιστον με 0,01, θεωρείται η αρχή της εκθετικής φάσης με την προϋπόθεση ότι η ανάπτυξη συνεχίστηκε κανονικά. Συνεπώς, η χρονική στιγμή της προηγούμενης μέτρησης θεωρήθηκε το τέλος της λανθάνουσας φάσης και το χρονικό διάστημα από την αρχή των μετρήσεων η διάρκεια αυτής. Σημειωτέον ότι τα αποτελέσματα είναι κατά προσέγγιση, αφού οι ακριβείς υπολογισμοί περιορίζονται από το χρονικό διάστημα μεταξύ των μετρήσεων (κάθε 30 λεπτά). Ο στατιστικός έλεγχος t-test δεν πραγματοποιήθηκε για τις τιμές της λανθάνουσας φάσης αφού στις περισσότερες περιπτώσεις δεν μπορούσε να υπολογιστεί η τυπική απόκλιση.

3.3.2 Πειραματική διαδικασία παρασκευής μεμβρανών με αντιμικροβιακές ουσίες

3.3.2.1 Προετοιμασία μεμβρανών από πολυγαλακτικό οξύ

Για την παρασκευή μεμβρανών πολυγαλακτικού οξέος (PLA) με 2% (w/w) NaNO_2 , ζυγίστηκαν 0,13 g PLA και 0,0026 g NaNO_2 . Για την παρασκευή μεμβρανών πολυγαλακτικού οξέος με 5% (w/w) NaNO_2 ζυγίστηκαν 0,13 g PLA και 0,0065 g NaNO_2 . Το PLA τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη με μαγνήτη ανάδευσης και προστέθηκαν 2,6 mL χλωροφορμίου (Lab Alley, Texas, Spicewood). Η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε σύστημα reflux (σύστημα στο οποίο τα αέρια του διαλύματος επιστρέφουν στο διάλυμα) σε θερμοκρασία 50°C για 30 λεπτά. Μετά την ολική διάλυση του PLA και όταν το διάλυμα απέκτησε θερμοκρασία δωματίου (20 - 22°C) προστέθηκε με αργό ρυθμό το NaNO_2 και έγινε ανάδευση για 30 λεπτά. Από το διάλυμα μεταφέρθηκαν 1,5 mL σε γυάλινο καλούπι 6 x 6 cm. Τέλος, τα παραγόμενα καλούπια έμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 4 μέρες μέχρι την στερεοποίησή τους.

3.3.2.2 Προετοιμασία μεμβρανών αμύλου

Για την παρασκευή 150g υδατικού διαλύματος θερμοπλαστικού αμύλου σε κωνικές φιάλες, χρησιμοποιήθηκε 5,5% (w/v) αμύλου επί ξηρού από καλαμπόκι επί του διαλύματος και 30% (w/w) γλυκερόλη επί του αμύλου. Οι αντιμικροβιακές ουσίες διαλύθηκαν σε απιονισμένο νερό σε τέτοια συγκέντρωση ώστε η τελική συγκέντρωση στις μεμβράνες να είναι 0,54% (w/w). Το άμυλο και η γλυκερόλη τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο (JP Selecta™ Precisdig Water Bath, Βαρκελώνη, Ισπανία) ρυθμισμένο στους 80°C υπό διαρκή ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα στις 200 στροφές (rpm) για 40 λεπτά. Το τελικό διάλυμα θερμοπλαστικού αμύλου απλώθηκε σε ειδικά ταψιά plexiglass (PMMA) τα οποία τοποθετήθηκαν

σε φούρνο στους 40°C για 24 ώρες. Στο σύνολο κατασκευάστηκαν 8 μεμβράνες αμύλου-ουσίας (2 μεμβράνες για κάθε ουσία) και 1 μεμβράνη αμύλου χωρίς την ουσία.

3.3.2.3 Προετοιμασία καλλιιεργειών και αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών

Εικοσιτετράωρη υγρή καλλιέργεια από κάθε υπό μελέτη βακτήριο αραιώθηκε και μεταφέρθηκαν 100 μl με τη μέθοδο της επιφανειακής εξάπλωσης (χρησιμοποιήθηκαν αραιωμένες καλλιέργειες με $1,7 \times 10^5$ cfu/mL *L. monocytogenes*, 4×10^4 *S. aureus*, $3,1 \times 10^5$ *B. cereus*, $3,4 \times 10^5$ *Salmonella* Enteritidis, $3,2 \times 10^5$ *Salmonella* Typhimurium, $2,5 \times 10^5$ *E. coli* και $3,1 \times 10^5$ *P. aeruginosa*) σε τρυβλία με Mueller Hinton άγαρ. Οι μεμβράνες αποστειρώθηκαν σε λάμπα UV για 30 λεπτά (15 λεπτά η κάθε πλευρά της μεμβράνης) και τοποθετήθηκαν σε άδεια αποστειρωμένα τρυβλία Petri. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες τεμαχίστηκαν ασηπτικά σε τετράγωνα τμήματα με εμβαδόν 1 cm² και τοποθετήθηκαν στα επιμολυσμένα τρυβλία με τρόπο ώστε να μην δημιουργούνται κενά ή φυσαλίδες μεταξύ μεμβράνης και υποστρώματος. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37°C για 24 ώρες και μετρήθηκαν τυχόν ζώνες αναστολής σε mm.

3.3.3. Αντικροβιακή δράση συσκευασιών αμύλου με ενσωματωμένες αντιμικροβιακές ουσίες σε νωπό κιμά

3.3.3.1 Παρασκευή συσκευασιών αμύλου με ενσωματωμένο Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂) ως αντιμικροβιακό παράγοντα

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές συσκευασίες: συσκευασία αμύλου, συσκευασία αμύλου με ενσωματωμένο Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂) και συσκευασία εμπορίου. Η συσκευασία εμπορίου ήταν από nylon (Sanitas nylon food packages). Για την παραγωγή συσκευασιών αμύλου παρασκευάστηκαν 2 ίδιες μεμβράνες με 7% (w/v) άμυλου επί ξηρού και 50% (w/w) γλυκερόλη επί του αμύλου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 50 g (10 g για μικροβιολογική ανάλυση, 10 g για μέτρηση απώλεια υγρασίας) νωπού κιμά. Καθότι το όριο που θέτει ΕΚ. 1333/2008 για το NaNO₂ στο νωπό κιμά είναι 150 ppm (0,15 g/kg) η τελική συγκέντρωση της ουσίας στις μεμβράνες ήταν 0,00075% (w/w). Η αντιμικροβιακή ουσία διαλύθηκε σε απιονισμένο νερό σε τέτοια συγκέντρωση ώστε η τελική συγκέντρωση στις μεμβράνες να είναι 0,00075% (w/w). Το άμυλο και η γλυκερόλη τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη. Η κωνική τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο (JP Selecta™ Precisdig Water Bath, Βαρκελώνη, Ισπανία) στους 80 °C με μαγνητικό αναδευτήρα για 40 λεπτά σε 200 rpm. Κατόπιν προστέθηκε η εκάστοτε διαλυμένη ουσία και το τελικό διάλυμα αναδευτήκε για ακόμα 10 λεπτά στο υδατόλουτρο. 50g από το τελικό διάλυμα απλώθηκε σε ειδικά πλαστικά ταψιά τα οποία τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 40°C για 24 ώρες. Στο σύνολο κατασκευάστηκαν 16 μεμβράνες αμύλου με NaNO₂ και 16 μεμβράνες αμύλου χωρίς ουσία. Οι μεμβράνες αποστειρώθηκαν με UV

(15 λεπτά κάθε πλευρά, στα 240 nm). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συγκόλληση των μεμβρανών μεταξύ τους για να σχηματίσουν οι συσκευασίες.

3.3.3.2 Επίδραση συσκευασιών αμύλου με ενσωματωμένο Νιτρωδες Νάτριο (NaNO_2) ως αντιμικροβιακό παράγοντα στα μικροβιολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του νωπού κιμά

Στις συσκευασίες αμύλου με και χωρίς αντιμικροβιακή ουσία, προστέθηκαν 50g νωπού κιμά και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ψύξης ($4\pm 1^\circ\text{C}$) για 5 μέρες. Εξετάστηκαν κάθε μέρα 2 συσκευασίες για κάθε δείγμα για όλη τη διάρκεια του πειράματος. Σε όλα τα δείγματα εξετάστηκε η Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, η Ολική Ψυχρότροφη Χλωρίδα και ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων. Επιπλέον, μετρήθηκε η απώλεια υγρασίας, η απώλεια βάρους και το pH.

Για τον μικροβιολογικό έλεγχο, 10 g κιμά τοποθετήθηκαν σε σακούλες stomacher με 90 mL αραιωτικό και ομογενοποιήθηκαν για 30 δευτερόλεπτα σε μέτρια ταχύτητα. Στη συνέχεια 1 mL από το ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετήθηκε σε αραιωτικά των 9 mL και πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις. 20 μl από κάθε αραιώση μεταφέρθηκαν σε τρυβλία Petri για όλους τους υπό μελέτη πληθυσμούς. Έγινε καταμέτρηση της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) στους 30°C για 3 ημέρες, των ψυχρότροφων βακτηρίων στο ίδιο υπόστρωμα στους $4\pm 1^\circ\text{C}$ για 7 ημέρες και των γαλακτικών βακτηρίων στο MRSA στους 30°C για 3 ημέρες σε μικρο-αερόφιλες συνθήκες. Το pH μετρήθηκε κατόπιν από το ομογενοποιημένο δείγμα (Orion, 3-Star, USA, Μασαχουσέτη).

Για τη μέτρηση της υγρασίας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του ξηρού βάρους κατά την οποία σε 1 g νωπού κιμά από κάθε δείγμα σε κάθε δειγματοληψία μετρήθηκε το βάρος πριν και μετά την ξήρανση (130°C για 1 ώρα). Ο συντελεστής της απώλειας της υγρασίας υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Απώλεια υγρασίας} = \frac{B_{\alpha\rho\chi} - B_{\tau\epsilon\lambda}}{B_{\alpha\rho\chi}} 100$$

Όπου $B_{\alpha\rho\chi}$ είναι το βάρος πριν την ξήρανση και το $B_{\tau\epsilon\lambda}$ το βάρος μετά την ξήρανση (AOAC, 2012).

Για τον υπολογισμό της απώλειας βάρους τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο (4°C) ζυγίστηκαν σε κάθε δειγματοληψία και η απώλεια βάρους υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{Απώλεια Βάρους} = \frac{B_{\alpha\rho\chi} - B_{\tau\epsilon\lambda}}{B_{\alpha\rho\chi}} 100$$

Όπου το $B_{\alpha\rho\chi}$ είναι το αρχικό βάρος την ημέρα 0 ενώ το $B_{\tau\epsilon\lambda}$ είναι το βάρος της ημέρας της κάθε δειγματοληψίας.

4. Αποτελέσματα

4.1 Αντιμικροβιακή δράση του Κιτρικού αμμωνίου του τιτανίου

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 2 και 3) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όσον αφορά τους λόγους του μέγιστου ρυθμού ανάπτυξης (MGR), τους λόγους της μέγιστης οπτικής πυκνότητας και της λανθάνουσας φάσης ανάπτυξης ως προς τον μάρτυρα, όταν χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση 0,5 mM του Titanium Ammonium Citrate.

Πίνακας 2: Επίδραση συγκέντρωσης 0,5 mM του Titanium Ammonium Citrate στην ανάπτυξη τεσσάρων τροφιμογενών βακτηρίων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.

Βακτήριο	Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (h^{-1})		Λανθάνουσα φάση (h)		Μέγιστη οπτική πυκνότητα	
	Ratio test: μάρτυρας	T-test ¹	Ratio test: μάρτυρας	T-test	Ratio test: μάρτυρας	T-test
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.02	0.727 2	0.80	0.015 3	1.06	0.223 7
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.06	0.445 1	1.17	0.144 9	0.93	0.009 8
<i>Escherichia coli</i>	1.08	0.183 8	1.50	0.356 6	0.95	0.134 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.92	0.006 5	0.99	0.887 3	1.00	0.942 4

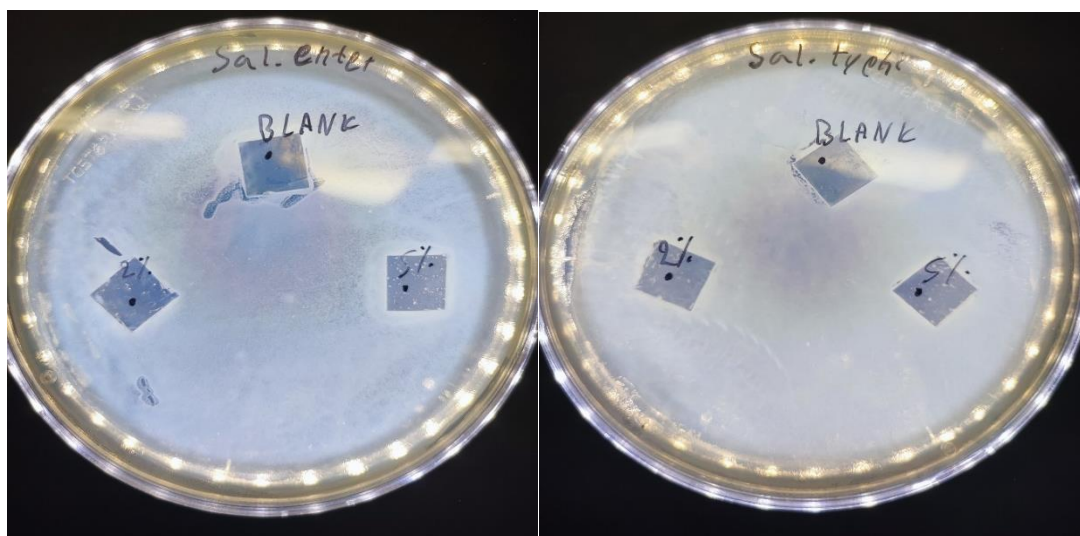
Κανένα από τα βακτήρια δεν ανεστάλη σε βιολογικά σημαντικό βαθμό από το Titanium Ammonium Citrate σε καμία από τις υπό μελέτη συγκεντρώσεις. Στις λίγες περιπτώσεις που παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($P < 0,05$) διαφορά μεταξύ του τεστ και του ελέγχου, η διαφορά ήταν μικρή.

Πίνακας 3: Επίδραση συγκέντρωσης 0,1 mM του Titanium Ammonium Citrate στην ανάπτυξη τεσσάρων τροφιμογενών βακτηρίων με μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.

Βακτήριο	Μέγιστος ρυθμός ανάπτυξης (h^{-1})		Λανθάνουσα φάση (h)		Μέγιστη οπτική πυκνότητα	
	Ratio test: μάρτυρας	T-test ¹	Ratio test: μάρτυρας	T-test	Ratio test: μάρτυρας	T-test
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.03	0.428 9	0.82	0.088 1	1.02	0.114 9
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.93	0.225 0	0.67	0.073 4	0.96	0.257 0
<i>Escherichia coli</i>	1.07	0.090 5	1.42	0.428 8	0.96	0.039 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.99	0.892 5	1.15	0.374 7	0.96	0.295 3

4.2 Αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών PLA με προσθήκη Νιτρώδους Νατρίου

Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεμβρανών από Πολυγαλακτικό οξύ εμπλουτισμένες με 2% και 5% (w/w) NaNO_2 έδειξαν ότι μετά από 24 ώρες ανάπτυξης, αναστολή παρουσίασε μόνο η *S. Enteritidis* και μόνο κάτω από τη μεμβράνη, χωρίς να υπάρχει ζώνη αναστολής εκτός της μεμβράνης σε σχέση με τον μάρτυρα. Στη συγκέντρωση 2% (w/w) μετά από 48 ώρες αναπτύχθηκε και κάτω από τη μεμβράνη ενώ στο 5% (w/w) δεν αναπτύχθηκε ούτε στις 48 ώρες σε σχέση με τον μάρτυρα. Η *S. Typhimurium* αναπτύχθηκε κάτω από τις μεμβράνες στις 24 και στις 48 ώρες στο 2% (w/w) και στο 5% (w/w) όπως και όλα τα υπόλοιπα υπό μελέτη παθογόνα (*B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* και *P. aeruginosa*) σε σχέση με τον μάρτυρα.



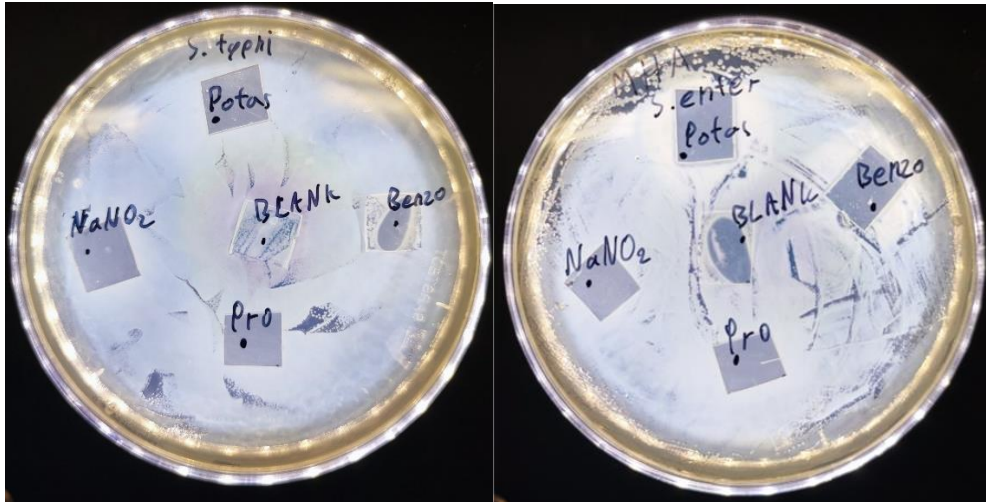
Σχήμα 1: Τρυβλία εμβολιασμένα με *Salmonella* Enteritidis (αριστερά) και *Salmonella* Typhimurium (δεξιά) μετά από 24 ώρες επώασης με μεμβράνες PLA και ενσωματωμένη συγκέντρωση 2% (w/w) και 5% (w/w) NaNO_2 .

4.3 Αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών αμύλου με προσθήκη αντιμικροβιακών ουσιών

Τα αποτελέσματα των μεμβρανών αμύλου εμπλουτισμένων με τις αντιμικροβιακές ουσίες Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂), Σορβικό Κάλιο (Potas), Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo), Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) σε τελική συγκέντρωση 0,54% (w/w), δεν έδειξαν αντιμικροβιακή δράση με τη μορφή ζωνών αναστολής πέρα από την αντιμικροβιακή μεμβράνη όπως και στις μεμβράνες PLA. Ωστόσο οι μικροοργανισμοί *S. Enteritidis*, *B. cereus* και *L. monocytogenes*, δεν αναπτύχθηκαν κάτω από συγκεκριμένες μεμβράνες αμύλου και τον μάρτυρα. Αντιθέτως, η *S. Typhimurium* αναπτύχθηκε κάτω από τις μεμβράνες με Νάτριο (NaNO₂), Σορβικό Κάλιο (Potas), και Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) και τον μάρτυρα αλλά όχι κάτω από τη μεμβράνη με Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo). Η *S. Enteritidis* αναπτύχθηκε κάτω από τις μεμβράνες Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂), Σορβικό Κάλιο (Potas), Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo), Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) αλλά δεν αναπτύχθηκε καθόλου κάτω από τον μάρτυρα. Ο *B. cereus* αναπτύχθηκε κάτω από το Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo) και τα Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) ενώ δεν αναπτύχθηκε κάτω από το Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂), το Σορβικό Κάλιο (Potas) και τον μάρτυρα. Η *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε κάτω από τις μεμβράνες με Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) και Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂) αλλά δεν αναπτύχθηκε κάτω από τον μάρτυρα, το Σορβικό Κάλιο (Potas) και το Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo). Τέλος, ο *S. aureus* αναπτύχθηκε κάτω από όλες τις μεμβράνες (Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂), Σορβικό Κάλιο (Potas), Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo), Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) και μάρτυρα).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης των μεμβρανών με 0,54% (w/w) Νιτρώδες Νάτριο (NaNO₂), Σορβικό Κάλιο (Potas), Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo), Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro) και μεμβράνη – μάρτυρα ενάντια στους μικροοργανισμούς *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*.

	Νιτρώδες Νάτριο (NaNO ₂),	Σορβικό Κάλιο (Potas)	Βενζοϊκό Νάτριο (Benzo)	Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου (Pro)	Μάρτυρας
<i>S. Enteritidis</i>	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Μη-ανάπτυξη
<i>S. Typhimurium</i>	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Μη-ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη
<i>B. cereus</i>	Μη-ανάπτυξη	Μη-ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Μη-ανάπτυξη
<i>L. monocytogenes</i>	Ανάπτυξη	Μη-ανάπτυξη	Μη-ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Μη-ανάπτυξη
<i>S. aureus</i>	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη	Ανάπτυξη



Σχήμα 2: Τρυβλία εμβολιασμένα με *Salmonella* Typhimurium (αριστερά) και *Salmonella* Enteritidis (δεξιά) μετά από 24 ώρες επώασης με μεμβράνες αμύλου και ενσωματωμένα Νιτρώδες Νάτριο, Σορβικό Κάλιο, Βενζοϊκό Νάτριο και Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου σε τελική συγκέντρωση 0,54% (w/w).



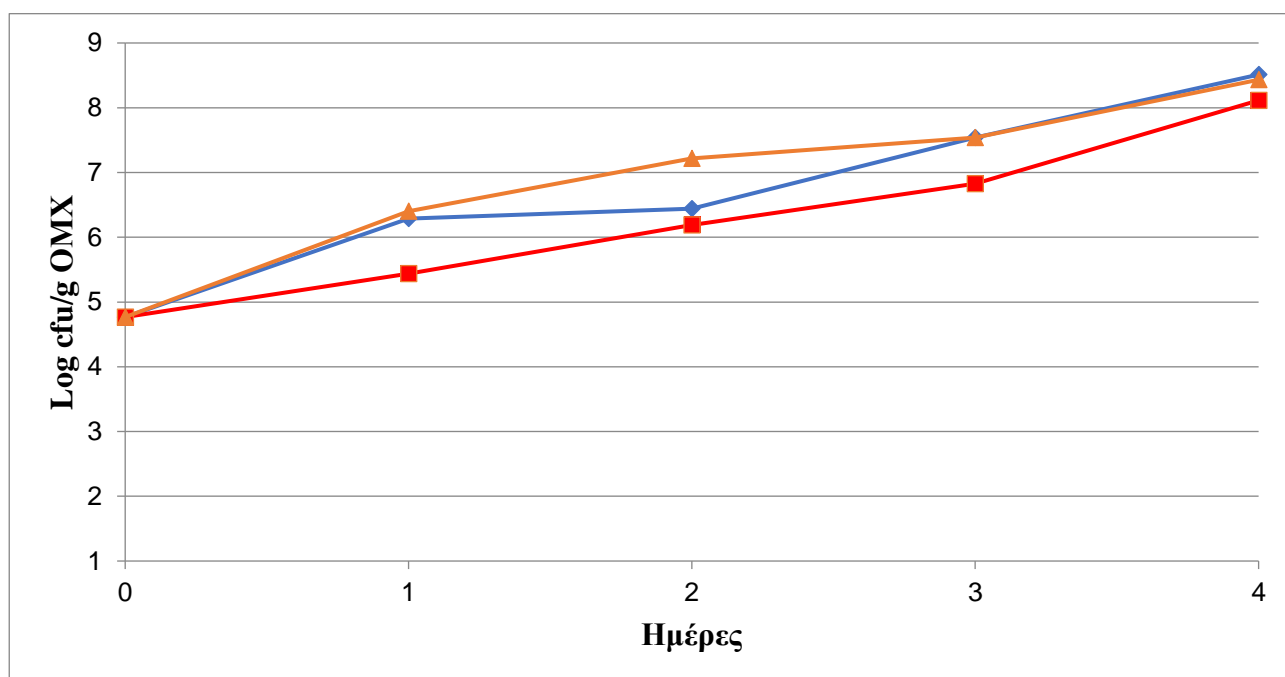
Σχήμα 3: Τρυβλία εμβολιασμένα με *Listeria monocytogenes* (επάνω - αριστερά), *Bacillus cereus* (επάνω - δεξιά) και *Staphylococcus aureus* (κάτω) μετά από 24 ώρες επώασης με μεμβράνες αμύλου και μεμβράνες αμύλου και ενσωματωμένα Νιτρώδες Νάτριο, Σορβικό Κάλιο, Βενζοϊκό

Νάτριο και Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου σε τελική συγκέντρωση 0,54% (w/w).

4.4 Αντιμικροβιακή ικανότητα συσκευασιών αμύλου

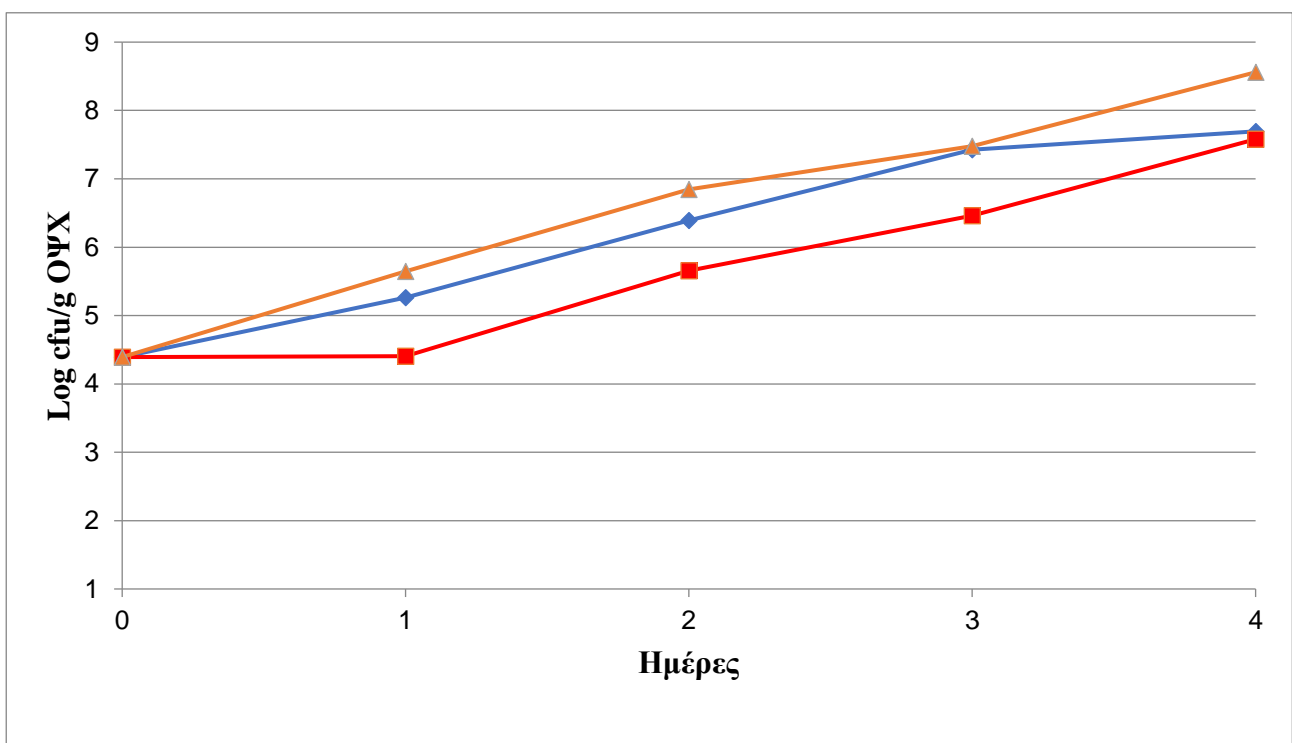
4.4.1 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά νωπού κιμά

Παρακάτω παρουσιάζονται γραφικές παραστάσεις που δείχνουν τη μεταβολή της μικροβιολογικής χλωρίδας του νωπού κιμά που συντηρήθηκε σε τρεις διαφορετικές συσκευασίες (αμύλου, αμύλου με NaNO_2 και πλαστική συσκευασία εμπορίου). Συγκεκριμένα, στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας στον νωπό κιμά στις 3 συσκευασίες στις 4 μέρες αποθήκευσης υπό ψύξη. Ο πληθυσμός της OMX του νωπού κιμά στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO_2 ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά 1 log cfu/g σε σχέση με τον πληθυσμό στον νωπό κιμά στη συσκευασία του εμπορίου την 1^η, 2^η και 3^η ημέρα δειγματοληψίας και σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά 1 log cfu/g την 1^η και 3^η ημέρα σε σχέση με τον πληθυσμό στον νωπό κιμά στον μάρτυρα. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p > 0,05$) διαφορά στους πληθυσμούς OMX στον νωπό κιμά μεταξύ των δειγμάτων του μάρτυρα και της πλαστικής συσκευασίας εμπορίου.



Σχήμα 4: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα μεμβρανών αμύλου με ενσωματωμένο 0,00075% (w/w) NaNO_2 σε δείγματα νωπού κιμά αποθηκευμένου στους 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO_2 (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO_2 (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή).

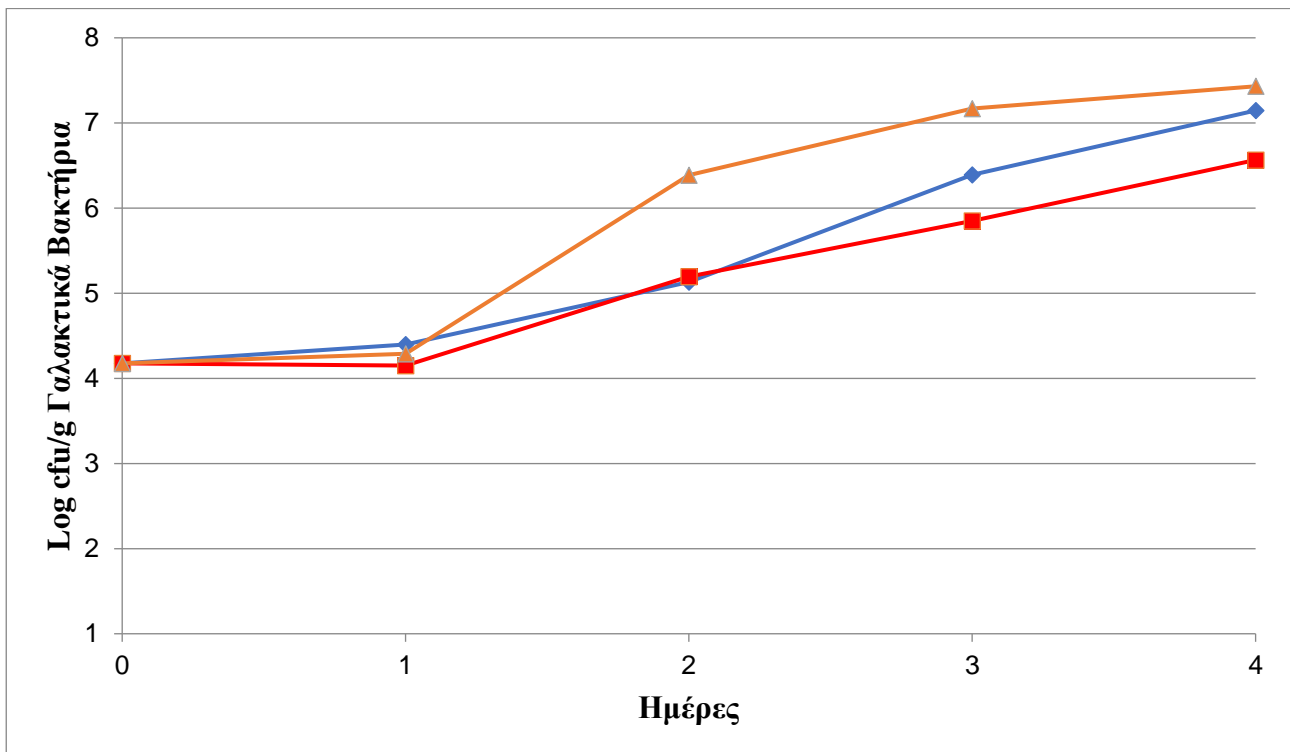
Στο Σχήμα 5, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού της Ολικής Ψυχρότροφης Χλωρίδας (ΟΨΧ) στον νωπό κιμά στις 3 συσκευασίες στις 4 μέρες αποθήκευσης υπό ψύξη. Παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) κατά 1 log cfu/g λιγότερο του πληθυσμού της ΟΨΧ του νωπού κιμά στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO_2 την 1^η, 2^η, 3^η και 4^η ημέρα δειγματοληψίας σε σχέση με τον πληθυσμό στον νωπό κιμά στην πλαστική συσκευασία του εμπορίου. Παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) κατά 1 log cfu/g του πληθυσμού της ΟΨΧ του νωπού κιμά στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO_2 την 1^η, 2^η και 3^η ημέρα δειγματοληψίας σε σχέση με τον πληθυσμό στον νωπό κιμά στον μάρτυρα. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική ($p > 0,05$) διαφορά στους πληθυσμούς στον νωπό κιμά μεταξύ των δειγμάτων του μάρτυρα και της πλαστικής συσκευασίας εμπορίου.



Σχήμα 5: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης στην Ολική Ψυχρότροφη Χλωρίδα μεμβρανών αμύλου με ενσωματωμένο 0,00075% (w/w) NaNO_2 σε δείγματα νωπού κιμά αποθηκευμένου στους 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO_2 (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO_2 (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή).

Στο Σχήμα 6, παρουσιάζεται η μεταβολή του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων στον νωπό κιμά στις 3 συσκευασίες στις 4 μέρες αποθήκευσης υπό ψύξη. Συγκεκριμένα, ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων του νωπού κιμά στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO_2 ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά 1 log cfu/g σε σχέση με τον πληθυσμό στον νωπό κιμά στην πλαστική συσκευασία του εμπορίου την 2^η, 3^η και 4^η ημέρα δειγματοληψίας και σημαντικά

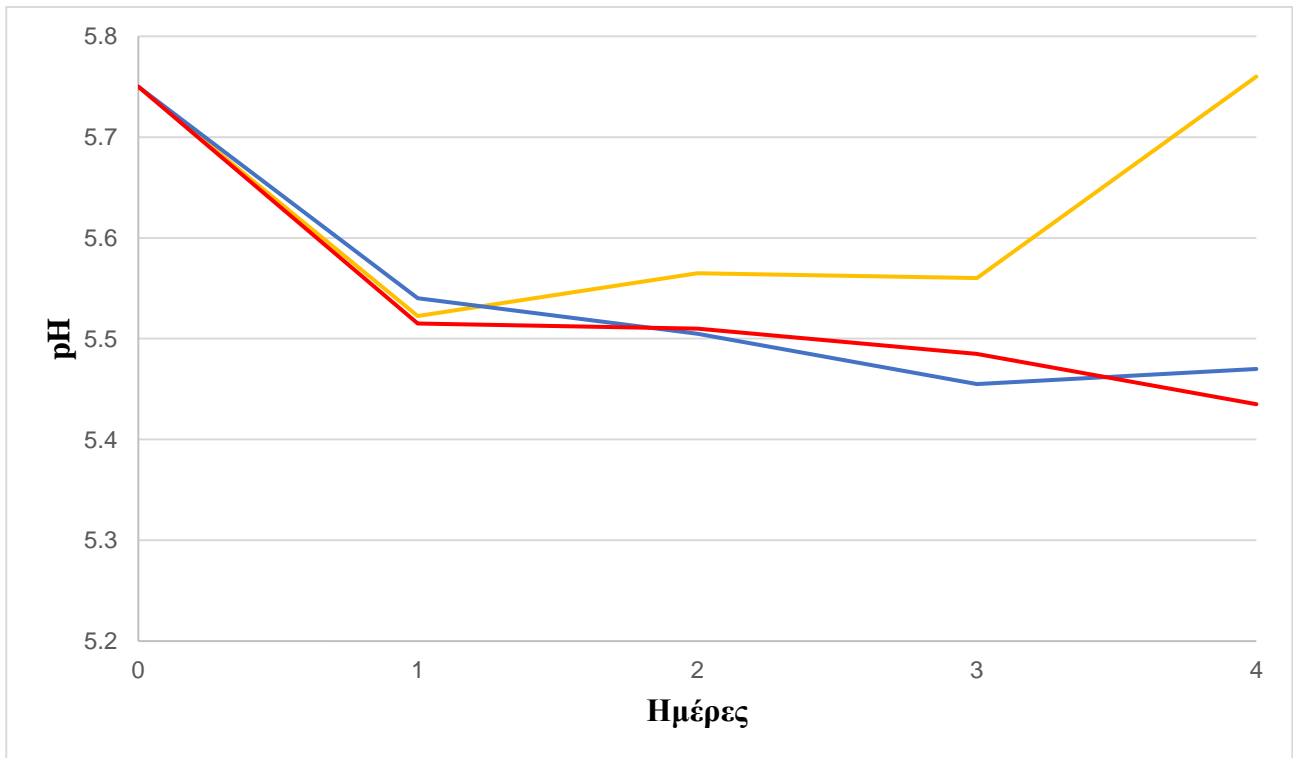
($p < 0,05$) μικρότερος κατά 0,5 log cfu/g σε σχέση με τον πληθυσμό στον νωπό κιμά στον μάρτυρα την 3^η και 4^η ημέρα δειγματοληψίας. Τέλος, ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων του νωπού κιμά στον μάρτυρα ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά ~1 log cfu/g σε σχέση με τον πληθυσμό στην συσκευασία εμπορίου την 2^η και 3^η ημέρα.



Σχήμα 6: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης στα γαλακτικά βακτήρια μεμβρανών αμύλου με ενσωματωμένο 0,00075% (w/w) NaNO_2 σε δείγματα νωπού κιμά αποθηκευμένου στους 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO_2 (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO_2 (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή).

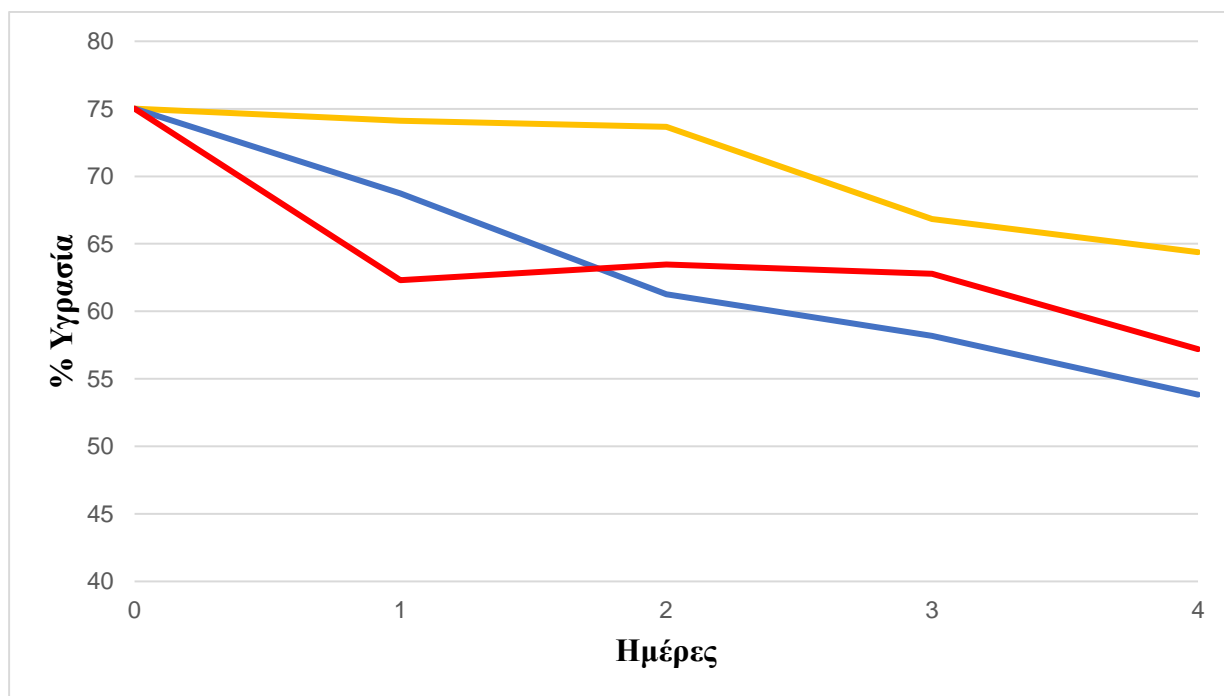
4.4.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νωπού κιμά

Παρακάτω παρουσιάζονται γραφικές παραστάσεις που δείχνουν τη μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών (pH, υγρασία, βάρος,) του νωπού κιμά που συντηρήθηκε σε τρεις διαφορετικές συσκευασίες (αμύλου, αμύλου με NaNO_2 και πλαστική συσκευασία εμπορίου). Συγκεκριμένα, στο Σχήμα 7, εμφανίζεται η μεταβολή του pH του νωπού κιμά σε κάθε συσκευασία κατά τη διάρκεια του πειράματος. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική ($p > 0,05$) διαφορά μεταξύ του pH στο νωπό κιμά στον μάρτυρα, στην συσκευασία του εμπορίου και στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO_2 .



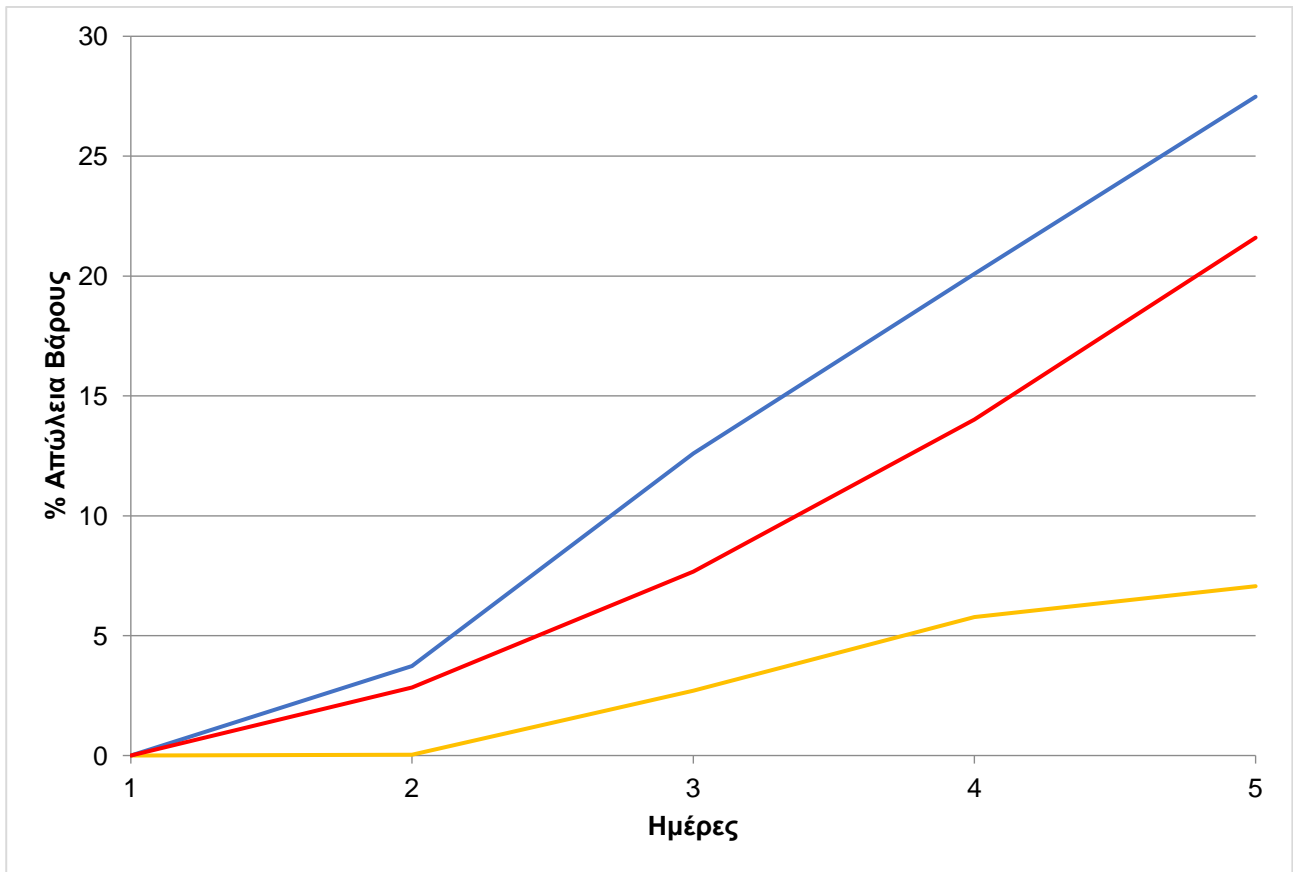
Σχήμα 7: Μεταβολή του pH του νωπού κιμά σε συσκευασίες αμύλου σε θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή).

Σχήμα 8 εμφανίζεται η μεταβολή της υγρασίας του νωπού κιμά σε κάθε συσκευασία. Η υγρασία του νωπού κιμά στην πλαστική συσκευασία του εμπορίου ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μεγαλύτερη κατά 10% την 1^η, 3^η και 4^η ημέρα σε σχέση με την υγρασία του νωπού κιμά στην συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂.



Σχήμα 8: Μεταβολή της υγρασίας του νωπού κιμά σε συσκευασίες αμύλου σε θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C. Συσκευασία αμύλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμύλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή).

Στο Σχήμα 9, εμφανίζεται η απώλεια του βάρους του νωπού κιμά σε κάθε συσκευασία. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική ($p > 0,05$) διαφορά στη μεταβολή του βάρους του κιμά στις συσκευασίες μεταξύ του μάρτυρα, του αμύλου εμπλουτισμένη με 0,00075% (w/w) NaNO₂ και του εμπορίου. Ωστόσο, την 4η και 5η ημέρα παρατηρήθηκε ότι βάρους του κιμά στις συσκευασίες με 0,00075% (w/w) NaNO₂ μειώθηκε κατά 10 % και 14% αντίστοιχα περισσότερο σε σχέση με την συσκευασία εμπορίου. Τέλος το βάρους του κιμά στον μάρτυρα μειώθηκε κατά 15% και 20% παραπάνω σε σχέση με τον κιμά στη συσκευασία του εμπορίου.



Σχήμα 9: Μεταβολή της απώλειας βάρους του νοπού κιμά σε συσκευασίες αμούλου σε θερμοκρασία αποθήκευσης 4°C. Συσκευασία αμούλου χωρίς NaNO₂ (Μπλε Γραμμή), Συσκευασία αμούλου με 0,00075% (w/w) NaNO₂ (Κόκκινη Γραμμή) και συσκευασία εμπορίου (Πορτοκαλί Γραμμή).

5. Συζήτηση

5.1 Αντιμικροβιακή δράση του Κιτρικού αμμωνίου του τιτανίου

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν ότι το Κιτρικό αμμώνιο του τιτανίου σε συγκεντρώσεις 0,5 mM και 0,1 mM δεν παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* και *L. monocytogenes*. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα συμπεράσματα των Rodríguez et al. (2022) οι οποίοι χρησιμοποίησαν παρόμοια χημική ουσία ($K_2[Ti(Citrate)_3]$) σε συγκέντρωση 1 με 100 μM ενώ δεν παρατήρησαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των μικροοργανισμών *E. coli* (ATCC 25922) *K. pneumoniae* (ATCC 700603), *A. baumannii* (ATCC 19606), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) και *S. aureus* (ATCC 43300). Αντιθέτως οι Gritsenko et al. (2015) ερευνώντας την χημική ουσία $Ti(citrate)_3^{8-}$, σε συγκέντρωση 50 mM, παρατήρησαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση ειδικά στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης του *S. aureus*. Οι δύο προαναφερόμενες δημοσιεύσεις έχουν χρησιμοποιήσει διαφορετικές συγκεντρώσεις με μεγάλη διαφορά. Συνεπώς, για να εξακριβωθεί το αν το Titanium ammonium citrate έχει αντιμικροβιακή δράση απαιτούνται περισσότερα πειράματα υπό διαφορετικές συνθήκες (pH, αλατότητα, θερμοκρασία) και με διαφορετικές συγκεντρώσεις.

5.2 Αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών PLA

Η αντιμικροβιακή δράση 2% και 5% (w/w) του $NaNO_2$ σε μεμβράνες PLA περιορίστηκε στην περιοχή κάτω από τις μεμβράνες. Οι Dalzini et al. (2022), παρατήρησαν αντιμικροβιακή δράση των νιτρικών (συγκέντρωση 150 mg/kg) έναντι της *L. monocytogenes* και των *Salmonella spp.* σε σαλάμι Μιλάνου. Οι Erdohan et al. (2013), εξέτασαν την αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών PLA εμπλουτισμένων με απόσταγμα φύλλων ελιάς σε συγκεντρώσεις από 0,9 mg έως 5,4 mg και παρατήρησαν ζώνες αναστολής σε τρυβλία επιμολυσμένα με *S. aureus*. Χρειάζονται παραπάνω πειραματικές διαδικασίες με διαφορετικές τεχνικές και συγκεντρώσεις για να διαπιστωθεί πιθανή αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών πολυγαλακτικού οξέος.

5.3 Αντιμικροβιακή δράση μεμβρανών αμύλου

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση σε μεμβράνες αμύλου με ενσωματωμένες τις ουσίες Νιτρώδες Νάτριο, Σορβικό Κάλιο, Βενζοϊκό Νάτριο και Προπιονικά Άλατα Ασβεστίου ενάντια στους υπό εξέταση μικροοργανισμούς. Το γεγονός ότι σε κάποιες περιπτώσεις οι μικροοργανισμοί δεν αναπτύχθηκαν κάτω από τον μάρτυρα μπορεί να οφείλεται στην ιδιότητα του αμύλου να απορροφά την υγρασία. Οι μεμβράνες αμύλου έχουν την ιδιότητα να απορροφούν την υγρασία όπως αναφέρουν και οι Bertuzzi et al. (2007a), συνεπώς στο

πείραμα εικάζεται ότι μείωσαν την υγρασία της περιοχής κάτω από τη μεμβράνη με αποτέλεσμα να περιοριστεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Οι De Moraes et al. (2020) εντόπισαν μικρή αντιμικροβιακή δράση του Βενζοϊκού Κάλιου σε μεμβράνες αμύλου έναντι της *Listeria innocua* σε φέτες τυριού. ενώ ο συνδυασμός μεμβρανών με Βενζοϊκό Κάλιο και μεταχείριση του τροφίμου με παλμικό φως (Pulsed Light) έδειξαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (μείωση κατά 2 log CFU ανά φέτα τυριού).

Οι López et al. (2013) διαπίστωσαν ότι η αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού με Σορβικό Κάλιο μειώθηκε με το πέρασμα του χρόνου εξαιτίας της φυσικής οξείδωσης. Ωστόσο, παρατήρησαν αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών από καλαμπόκι εμπλουτισμένων με Σορβικό Κάλιο σε συγκέντρωση 0,3 % (w/w), ενάντια στους μικροοργανισμούς *Candida* spp., *Penicillium* spp., *S. aureus* και *Salmonella* spp. Τα ευρήματα της παρούσας διπλωματικής και τα αποτελέσματα των López et al. (2013) έδειξαν να υπάρχει αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών από άμυλο καλαμποκιού εμπλουτισμένα με 0,3 % (w/w) Σορβικό Κάλιο έναντι της *S. Enteritidis*, ωστόσο απαιτείται περισσότερη έρευνα για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα.

5.4 Αντιμικροβιακή δράση συσκευασιών αμύλου

Όπως προαναφέρθηκε, ο πληθυσμός της OMX του νωπού κιμά στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO₂; ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά 1 log cfu/g την 1^η, 2^η και 3^η ημέρα σε σχέση με τους πληθυσμούς της OMX στον νωπό κιμά στη συσκευασία εμπορίου και σημαντικά ($p < 0,05$) κατά 1 log cfu/g την 1^η και 3^η ημέρα δειγματοληψίας σε σχέση με τον πληθυσμό του κιμά στον μάρτυρα. Ο πληθυσμός της OΨΧ του νωπού κιμά στη συσκευασία με 0,00075% w/w NaNO₂; ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά 1 log cfu/g την 1^η, 2^η, 3^η και 4^η ημέρα σε σχέση με τους πληθυσμούς της OΨΧ στον νωπό κιμά στη συσκευασία εμπορίου και σημαντικά ($p < 0,05$) κατά 1 log cfu/g την 1^η, 2^η και 3^η ημέρα δειγματοληψίας σε σχέση με τον πληθυσμό του κιμά στον μάρτυρα. Γεγονός που υπονοεί ότι η συσκευασία αμύλου με την προαναφερόμενη ουσία συντηρεί καλύτερα τον κιμά στο ψυγείο.

Ο πληθυσμός των γαλακτικών βακτηρίων στον νωπό κιμά στη συσκευασία με 0,00075% (w/w) NaNO₂ ήταν στατιστικά σημαντικά ($p < 0,05$) μικρότερος κατά 1 log cfu/g την 2^η, 3^η και 4^η σε σχέση με τον πληθυσμό των γαλακτικών βακτηρίων στον νωπό κιμά στην πλαστική συσκευασία του εμπορίου και του μάρτυρα την 2^η και 3^η ημέρα αποθήκευσης στους 4°C. Παρόμοια αποτελέσματα με την παρούσα εργασία βρήκαν οι Chatkitanan & Harnkarnsujarit (2020), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι μεμβράνες από θερμοπλαστικό άμυλο εμπλουτισμένο με 1 % και 2 % (w/w) NaNO₂ ανέστειλαν

την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων, των ζυμών και μυκήτων σε συσκευασίες για χοιρινές μπριζόλες αποθηκευμένες στους 4°C για 12 μέρες ενώ βελτίωσαν το κόκκινο χρώμα του νωπού κρέατος. Επιπλέον, μεμβράνες αμύλου εμπλουτισμένες με 5% (w/w) NaNO₂ σε συσκευασίες υπό κενό για χοιρινές μπριζόλες αποθηκευμένες στους 4 °C για 9 μέρες έδειξαν σημαντική (p<0,05) αντιμικροβιακή δράση έναντι των γαλακτικών και ψυχρότροφων βακτηρίων την 6^η μέρα αποθήκευσης (Chatkitanan & Harnkarnsujarit, 2021).

Η απώλεια υγρασίας ήταν σημαντικά μεγαλύτερη (p<0,05) στον κιμά στις συσκευασίες αμύλου σε σχέση με του εμπορίου την 1^η, 3^η και 4^η ημέρα δειγματοληψίας. Αυτό συμβαίνει διότι η μεμβράνη από άμυλο είναι πορώδης με αποτέλεσμα το τρόφιμο να αλληλοεπιδρά μέσω της συσκευασίας με την ατμόσφαιρα (Bertuzzi et al., 2007b).

5.5 Μελλοντικές προτάσεις

Το Titanium ammonium citrate δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση σε συγκεντρώσεις έως και 0,5 mM, συνεπώς θα μπορούσε να ερευνηθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και να μελετηθεί με άλλες τεχνικές η αντιμικροβιακή του δράση. Όσον αφορά την αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών PLA και αμύλου θα πρέπει να εξεταστεί ο μηχανισμός δράσης τους, αν διαχέονται στο τρόφιμο ή αν η δράση είναι μόνο επιφανειακή. Επιπλέον θα μπορούσε να μελετηθεί η αύξηση της συγκέντρωσης των ουσιών στις μεμβράνες και αν αυτό θα επέφερε παράταση της διάρκειας ζωής και άλλων τροφίμων ενώ πληροί τα νομοθετικά κριτήρια. Όσον αφορά τις συσκευασίες αμύλου με NaNO_2 , η ενσωμάτωση 0,00075% w/w NaNO_2 σε μεμβράνες αμύλου ήταν το ανώτερο όριο στο τρόφιμο σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία (Council regulation 2008/1333/EC). Αυτό δεν σημαίνει ότι όλη η συγκέντρωση μπορεί να μετανάστευσε στο τρόφιμο. Συνεπώς, θα πρέπει να ερευνηθεί η ποσότητα μετανάστευσης του NaNO_2 στο τρόφιμο και να εξεταστεί αν είναι εφικτή η αύξηση της ουσίας για καλύτερα αποτελέσματα, χωρίς να γίνει το τρόφιμο μη κανονικό και μη ασφαλές σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Νομοθεσία. Επιπρόσθετη έρευνα μπορεί να πραγματοποιηθεί για την αντιμικροβιακή δράση των μεμβρανών αμύλου με NaNO_2 και σε άλλα τρόφιμα. Ένα επόμενο βήμα για την έρευνα της αντιμικροβιακής δράσης των μεμβρανών αμύλου με NaNO_2 στον νωπό κιμά θα μπορούσε να είναι το Challenge test. Δηλαδή η τεχνητή επιμόλυνση του νωπού κιμά με γνωστό πληθυσμό παθογόνων βακτηρίων και η τοποθέτηση του μολυσμένου νωπού κιμά σε συσκευασίες αμύλου με NaNO_2 για να διαπιστωθεί η πιθανή αντιμικροβιακή του δράση.

6. Βιβλιογραφία

- Adams, M. & Moss, M., 2008. Food microbiology. 3rd ed. Cambridge, UK: RSC Publishing, pp.185-256.
- Almasi, L., Radi, M., Amiri, S., & Torri, L. (2021). Fully dilutable *Thymus vulgaris* essential oil: acetic or propionic acid microemulsions are potent fruit disinfecting solutions. *Food Chemistry*, 343, 128411.
- Alvarez-Pérez, O. B., Torres-León, C., Diaz-Herrera, R., Gomes-Araujo, R., Aguirre-Joya, J. A., Ventura-Sobrevilla, J. M., Aguilar-González A., & Aguilar, C. N. (2019). Packaging Biodegradability: Trends in Food Industry Applications. In Rui M. S. Cruz (Eds) *Food Packaging* (pp. 32-64). CRC Press.
- AOAC (2012). AOAC official methods of analysis (18th ed.): Moisture on meat and meat products (950.46), Gaithersburg, USA..
- Arora, D. S., & Kaur, N. (2019). Antimicrobial potential of fungal endophytes from *Moringa oleifera*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(2), 628-648.
- Bantawa, K., Rai, K., Subba Limbu, D., & Khanal, H. (2018). Food-borne bacterial pathogens in marketed raw meat of Dharan, eastern Nepal. *BMC Research Notes*, 11(1), 618.
- Batista, A. F. P., dos Santos, A. R., da Silva, A. F., Trevisan, D. A. C., Ribeiro, L. H., Campanerut-Sá, P. A. Z., Benicio, A. F., Miguel, M. J., & Mikcha, J. M. G. (2019). Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by combined carvacrol and potassium sorbate *in vitro* and in tomato paste. *LWT*, 100, 92-98.
- Becker, K., Skov, R. L., & von Eiff, C. (2015). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology*, 354-382.
- Benie, C. K. D., Nathalie, G., Adjéhi, D., Solange, A., Desire, K., Bourahima, B. & Mireille, D. (2017). Prevalence and Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Bovine Meat, Fresh Fish and Smoked Fish. *Archives of Clinical Microbiology*, 8(3) 1-9.
- Bertuzzi, M. A., Vidaurre, E. C., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007a). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 972-978.
- Bertuzzi, M. A., Armada, M., & Gottifredi, J. C. (2007b). Physicochemical characterization of starch based films. *Journal of Food Engineering*, 82(1), 17-25.
- Bhunja, A. K. (2018). *Salmonella enterica*. In *Foodborne microbial pathogens* (pp. 271-287). Springer, New York, NY.
- Bushell, F. M. L., Tonner, P. D., Jabbari, S., Schmid, A. K., & Lund, P. A. (2019). Synergistic

- impacts of organic acids and pH on growth of *Pseudomonas aeruginosa*: A comparison of parametric and Bayesian non-parametric methods to model growth. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3196.
- Cabezas-Pizarro, J., Redondo-Solano, M., Umaña-Gamboa, C., & Arias-Echandi, M. L. (2018). Antimicrobial activity of different sodium and potassium salts of carboxylic acid against some common foodborne pathogens and spoilage-associated bacteria. *Revista argentina de microbiología*, 50(1), 56-61.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 1-8.
- Casanovas-Massana, A., Lucena, F., & Blanch, A. R. (2010). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in water-bottling plants on the basis of procedures included in ISO 16266: 2006. *Journal of Microbiological Methods*, 81(1), 1-5.
- Center for Disease Control and Prevention. 2022. Salmonella. [online] Available at: <<https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>> [Accessed 18 April 2022].
- Chatkitanan, T., & Harnkarnsujarit, N. (2020). Development of nitrite compounded starch-based films to improve color and quality of vacuum-packaged pork. *Food Packaging and Shelf Life*, 25, 100521.
- Chatkitanan, T., & Harnkarnsujarit, N. (2021). Effects of nitrite incorporated active films on quality of pork. *Meat Science*, 172, 108367.
- Chellapandi, P., & Prisilla, A. (2018). *Clostridium botulinum* type A-virulome-gut interactions: a systems biology insight. *Human Microbiome Journal*, 7-8, 15-22.
- Chen, H., & Zhong, Q. (2018a). Antibacterial activity of acidified sodium benzoate against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes* in tryptic soy broth and on cherry tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, 274, 38-44.
- Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food (Text with EEA relevance) [2009].
- Conrad, J. C., Gibiansky, M. L., Jin, F., Gordon, V. D., Motto, D. A., Mathewson, M. A., Stopka, W. G., Zelasko, D. C., Shrout, J. D., & Wong, G. C. (2011). Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 100(7), 1608-1616.
- Council regulation 2008/1333/EC on food additives (2008) Official Journal L354, p. 16. [Accessed April 2022].
- Hanson, H., Whitfield, Y., Lee, C., Badiani, T., Minielly, C., Fenik, J., Makrostergios, T., Kopko,

C., Majury, A., Hillyer, E., Fortuna, L., Maki, A., Murphy, A., Lombos, M., Zittermann, S., Yu, Y., Hill, K., Kong, A., Sharma D. & Warshawsky, B. (2019). *Listeria monocytogenes* associated with pasteurized chocolate milk, Ontario, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, 25(3), 581.

Dalzini, E., Merigo, D., Caproli, A., Monastero, P., Cosciani-Cunico, E., Losio, M. N., & Daminelli, P. (2022). Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Milano-Type Salami Made with Alternative Formulations to the Use of Synthetic Nitrates/Nitrites. *Microorganisms*, 10(3), 562.

De Moraes, J. O., Hilton, S. T., & Moraru, C. I. (2020). The effect of Pulsed Light and starch films with antimicrobials on *Listeria innocua* and the quality of sliced cheddar cheese during refrigerated storage. *Food Control*, 112, 107134.

de Souza, A. G., Dos Santos, N. M. A., da Silva Torin, R. F., & dos Santos Rosa, D. (2020). Synergic antimicrobial properties of Carvacrol essential oil and montmorillonite in biodegradable starch films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1737-1747.

Dlusskaya, E. A., McMullen, L. M., & Gänzle, M. G. (2011). Characterization of an extremely heat-resistant *Escherichia coli* obtained from a beef processing facility. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 840-849.

Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W., & Scott, V. N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 64(3), 410-429.

Doyle, M., Diez-Gonzalez, F. & Hill, C., 2019. *Food microbiology*. 5th ed. Washington, DC: ASM Press.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Jordan, K., Sampers, I., Wagner, M., Felicio, M. T. D. S., Georgiadis, M., Messens, W., Mosbach-Schulz, O., & Allende, A. (2020). The public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. *EFSA Journal*, 18(4):6092.

EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF), Younes, M., Aquilina, G., Castle, L., Engel, K. H., Fowler, P., Fernandez, M. J. F., Fürst, P., Gundert-Remy, U., Gürtler, R., Husøy, T., Manco, M., Mennes, W., Moldeus, P., Passamonti, S., Shah, R., Waalkens-Berendsen, I., Wölfle, D., Corsini, E., Cubadda, F., Groot, D. D., FitzGerald, R., Gunnare, S., Gutleb, A. C., Mast, J., Mortensen, A., Oomen, A., Piersma, A., Plichta, V., Ulbrich, B., Loveren, H. V., Benford, D., Bignami, M., Bolognesi, C., Crebelli, R., Dusinska, M., Marcon, F., Nielsen, E., Schlatter, J., Vleminckx, C., Barmaz, S., Carfí, M., Civitella, C., Giarola, A., Rincon, A. M., Serafimova, R.,

Smeraldi, C., Tarazona, J., Tard, A., & Wright, M. (2021). Safety assessment of titanium dioxide (E171) as a food additive. *EFSA Journal*, 19(5), e06585.

Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). *Salmonella*, food safety and food handling practices. *Foods*, 10(5), 907.

Engel, J., & Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Current Opinion in Microbiology*, 12(1), 61-66.

Erdohan, Z. Ö., Çam, B., & Turhan, K. N. (2013). Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. *Journal of Food Engineering*, 119(2), 308-315.

European Food Safety Authority (EFSA) (2021a). Multi-country outbreak of multiple *Salmonella enterica* serotypes linked to imported sesame-based products. *EFSA Supporting Publications*, 18(10), 6922E.

Fakhkhari, P., Tajeddin, E., Azimirad, M., Salmazadeh-Ahrabi, S., Abdi-Ali, A., Nikmanesh, B., B. Eshratie, B., Gouya, M. M., Owlia, P., Zali M. R., & Alebouyeh, M. (2022). Involvement of *Pseudomonas aeruginosa* in the occurrence of community and hospital acquired diarrhea, and its virulence diversity among the stool and the environmental samples. *International Journal of Environmental Health Research*, 32(1), 61-71.

Farber, J. M., Ross, W. H., & Harwig, J. (1996). Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 30(1-2), 145-156.

Feng P. 2014. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in fresh produce—a food safety dilemma. *Microbiol Spectrum* 2(4):EHEC-0010-2013.

Ferreira, L.R.; Rosário, D.K.A., Silva, P.I., Carneiro, J.C.S.; Pimentel Filho, N.J., & Bernardes, P.C., Cinnamon essential oil reduces adhesion of food pathogens to polystyrene. *Int. Food Res. J.* 2019, 26, 1103–1110

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

Fidelis, J. C. F., Marchi, L. B., Scapim, M. R., Gobetti, N. D., Yamashita, F., & Monteiro, A. R. G. (2022). Development of biodegradable films containing pomegranate peel extract and potassium sorbate. *LWT*, 160, 113302.

Fink, R., & Filip, S. (2021). Substitution of potassium sorbate preservative by fermented wheat flour in the production of biscuits. Safety, nutritional and sensory characteristic potentials. *Acta Alimentaria*, 50(2), 269-278.

- Firouz, M. S., Mohi-Alden, K., & Omid, M. (2021). A critical review on intelligent and active packaging in the food industry: Research and development. *Food Research International*, 141, 110113.
- Glasset, B., Herbin, S., Guillier, L., Cadel-Six, S., Vignaud, M. L., Grout, J., Pairaud, S., Michel, V., Hennekinne, J. A., Ramarao, N., & Brisabois, A. (2016). *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 21(48), 30413. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.48.30413>
- Gonzalez-Fandos, E., & Dominguez, J. L. (2007). Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. *Food Control*, 18(7), 842-846.
- Govari, M. & Pexara, A. (2015). Nitrates and Nitrites in meat products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 66(3), 127-140.
- Gritsenko, V. A., Ajsuvakova, O. P., Tinkov, A. A., Bezryadin, S. G., Gatiatulina, E. R., Ivanova, V. Y., Chevela V. V., & Nikonorov, A. A. (2015). The effect of the Ti (IV)-citrate complex on *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation. *Archives of Biological Sciences*, 67(3), 981-992.
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg, A. M., Niclasen, O., & Bredholt, S. (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiology*, 21(2), 217-225.
- Hayrapetyan, H., Abee, T., & Groot, M. N. (2016). Sporulation dynamics and spore heat resistance in wet and dry biofilms of *Bacillus cereus*. *Food Control*, 60, 493-499.
- Hof, H. (2001). *Listeria monocytogenes*: a causative agent of gastroenteritis? *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(6), 369-373.
- Holschbach, C. L., & Peek, S. F. (2018). *Salmonella* in dairy cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 34(1), 133-154.
- İnat, G., Sırıken, B., Başkan, C., Erol, İ., Yıldırım, T., & Çiftci, A. (2021). Quorum sensing systems and related virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chicken meat and ground beef. *Scientific Reports*, 11(1):15639.
- Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E., & Märklbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins*, 12(11), 701.
- Johler, S., Weder, D., Bridy, C., Huguenin, M. C., Robert, L., Hummerjohann, J., & Stephan, R. (2015). Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 2944-2948.

- Johnsen, B. O., Lingaas, E., Torfoss, D., Strøm, E. H., & Nordøy, I. (2010). A large outbreak of *Listeria monocytogenes* infection with short incubation period in a tertiary care hospital. *Journal of Infection*, 61(6), 465-470.
- Johnson, R., Mylona, E., & Frankel, G. (2018). Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 20(9), e12939.
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F., M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719-3761.
- Karetkin, B. A., Guseva, E. V., Evdokimova, S. A., Mishchenko, A. S., Khabibulina, N. V., Grosheva, V. D., Menshutina, N. D., & Panfilov, V. I. (2019). A quantitative model of *Bacillus cereus* ATCC 9634 growth inhibition by bifidobacteria for synbiotic effect evaluation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35:89, 1-13.
- Kefalas, E. T., Panagiotidis, P., Raptopoulou, C. P., Terzis, A., Mavromoustakos, T., & Salifoglou, A. (2005). Mononuclear titanium (IV)- citrate complexes from aqueous solutions: PH-specific synthesis and structural and spectroscopic studies in relevance to aqueous titanium (IV)- citrate speciation. *Inorganic Chemistry*, 44(8), 2596-2605.
- Khumkomgool, A., Saneluksana, T., & Harnkarnsujarit, N. (2020). Active meat packaging from thermoplastic cassava starch containing sappan and cinnamon herbal extracts via LLDPE blown-film extrusion. *Food Packaging and Shelf Life*, 26, 100557.
- Kim, K. T., Eo, M. Y., Nguyen, T. T. H., & Kim, S. M. (2019). General review of titanium toxicity. *International Journal of Implant Dentistry*, 5(1), 1-12.
- Kim, M. & Lee, D. G. (2021). Propionic acid induces apoptosis-like death in *Escherichia coli* O157. *Journal of Basic Microbiology*. 62(1), 22-34.
- Kumar, M., Bala, R., Gondil, V. S., Pandey, S. K., Chhibber, S., Jain, D. V. S., Sharma R. K. & Wangoo, N. (2017). Combating food pathogens using sodium benzoate functionalized silver nanoparticles: synthesis, characterization and antimicrobial evaluation. *Journal of Materials Science*, 52(14), 8568-8575.
- Larkin, L., de la Gandara, M. P., Hoban, A., Pulford, C., Jourdan-Da Silva, N., de Valk, H., Browning, L., Falkenhorst, G., Simon, S., Lachmann, R., Dryselius, R., Karamehmedovic N., Börjesson S., van Cauteren D., Laisnez V., Mattheus W., Pijnacker R., van den Beld M., Mossong J., Ragimbeau C., Vergison A., Thorstensen Brandal. L., Lange H., Garvey P., Salgaard Nielsen C. , Herrera Leon. S., Varela C., Chattaway M., Weill F.-X., Brown D., & McKeown, P. (2022). Investigation of an international outbreak of multidrug-resistant monophasic *Salmonella*

Typhimurium associated with chocolate products, EU/EEA and United Kingdom, February to April 2022. *Euro Surveill*, 27(15), 2200314.

Li, W., Bai, L., Fu, P., Han, H., Liu, J., & Guo, Y. (2018). The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(8), 459-466.

Little, C. L., Taylor, F. C., Sagoo, S. K., Gillespie, I. A., Grant, K., & McLauchlin, J. (2007). Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiology*, 24(7-8), 711-717.

López, O. V., Giannuzzi, L., Zaritzky, N. E., & García, M. A. (2013). Potassium sorbate controlled release from corn starch films. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1583-1591.

Markland, S. M., & Hoover, D. G. (2016). *Bacillus cereus* mechanisms of resistance to food processing. In *The diverse faces of Bacillus cereus* (pp. 45-59). Elsevier Press.

Mauriello, E., Ferrari, G., & Donsì, F. (2021). Effect of formulation on properties, stability, carvacrol release and antimicrobial activity of carvacrol emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, 111424.

McDowell, R. H., Sands, E. M., & Friedman, H. (2021). *Bacillus cereus*. In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.

Melo, J., Andrew, P. W., & Faleiro, M. L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*, 67, 75-90.

Montville, T., Matthews, K. & Kniel, K., 2017. *Food microbiology: an introduction*. 4rd ed. Washington, D.C.: ASM Press.

Moreno, O., Atarés, L., & Chiralt, A. (2015). Effect of the incorporation of antimicrobial/antioxidant proteins on the properties of potato starch films. *Carbohydrate Polymers*, 133, 353-364.

Mørk, T., Kvitle, B., & Jørgensen, H. J. (2012). Reservoirs of *Staphylococcus aureus* in meat sheep and dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, 155(1), 81-87.

Mossong, J., Decruyenaere, F., Moris, G., Ragimbeau, C., Olinger, C. M., Johler, S., Perrin, M., Hau, P., & Weicherding, P. (2015). Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak combining case-control, traditional typing and whole genome sequencing methods, Luxembourg, June 2014. *Eurosurveillance*, 20(45), 30059.

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142-201.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Element Summary for AtomicNumber 22, Titanium. Retrieved November 15, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/element/Titanium>.

Nesse, L. L., Sekse, C., Berg, K., Johannesen, K. C., Solheim, H., Vestby, L. K., & Urdahl, A. M. (2014). Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2042-2049.

Ooi, S. T., & Lorber, B. (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1327-1332.

Pedrosa, M. C., Ueda, J. M., Heleno, S., Melgar, B., Ivanov, M., Soković, M., Carocho M, Ferreira I.C.F.R., & Barros, L. (2020). Antimicrobial Activity of Aqueous Plant Extracts as Potential Natural Additives. *Proceedings*, 70, 79.

Raigond, P., Sood, A., Kalia, A., Joshi, A., Kaundal, B., Raigond, B. & Chakrabarti, S. K. (2018). Antimicrobial activity of potato starch-based active biodegradable nanocomposite films. *Potato Research*, 62(1), 69-83.

Ratnawati, L., & Afifah, N. (2019, November). Effect of antimicrobials addition on the characteristic of arrowroot starch-based films. *AIP Conference Proceedings*, Vol. 2175, 020011.

Robertson, G.L. (2005). *Food Packaging: Principles and Practice*, Second Edition (2nd ed.). CRC Press, p. 1-6.

Rodríguez, I., Fernández-Vega, L., Maser-Figueroa, A. N., Sang, B., González-Pagán, P., & Tinoco, A. D. (2022). Exploring Titanium (IV) Complexes as Potential Antimicrobial Compounds. *Antibiotics*, 11(2), 158.

Sadeyen, J. R., Trotereau, J., Velge, P., Marly, J., Beaumont, C., Barrow, P. A., Bumstead, Nat & Lalmanach, A. C. (2004). *Salmonella* carrier state in chicken: comparison of expression of immune response genes between susceptible and resistant animals. *Microbes and Infection*, 6(14), 1278-1286.

Silva Evelyn F.V.M. (2016). Modeling the inactivation of psychrotrophic *Bacillus cereus* spores in beef slurry by 600MPa HPP combined with 38–70°C: comparing with thermal processing and estimating the energy requirements. *Food and Bioproducts Processing*, 99, pp. 179–187.

Schauer, B., Wald, R., Urbantke, V., Loncaric, I., & Baumgartner, M. (2021). Tracing Mastitis Pathogens—Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals*, 11(2), 279.

Schenk, M., Ferrario, M., & Guerrero, S. (2018). Antimicrobial activity of binary and ternary mixtures of vanillin, citral, and potassium sorbate in laboratory media and fruit purées. *Food and*

Bioprocess Technology, 11(2), 324-333.

Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (SCVPH) (2003). European Union (EU)/SANCO. Opinion of the SCVPH on Salmonellae in foodstuffs. Adopted on 14-15 April. SCVPH, Brussels.

Shabala, L., Lee, S. H., Cannesson, P., & Ross, T. (2008). Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of Food Protection*, 71(6), 1169-1177.

Siracusa, V. (2016). Packaging material in the food industry. In *Antimicrobial food packaging* (Chapter 7). In: Barros Velazquez (Ed.) *Antimicrobial food packaging* (pp. 95-106). Academic Press.

Spano, L. C., Guerrieri, C. G., Volpini, L. P. B., Schuenck, R. P., Goulart, J. P., Boina, E., Regina C., Recco N., Ribeiro-Rodrigues R., dos Santos L. F. & Fumian, T. M. (2021). EHEC O111: H8 strain and norovirus GII. 4 Sydney [P16] causing an outbreak in a daycare center, Brazil, 2019. *BMC Microbiology*, 21(1), 1-9.

Syafiq, R., Sapuan, S. M., Zuhri, M. Y. M., Ilyas, R. A., Nazrin, A., Sherwani, S. F. K., & Khalina, A. (2020). Antimicrobial activities of starch-based biopolymers and biocomposites incorporated with plant essential oils: A review. *Polymers*, 12(10), 2403.

Thirkell, C.E., Sloan-Gardner, T.S., Kaczmarek, M.C., & Polkinghorne, B.G. (2019). An outbreak of *Bacillus cereus* toxin-mediated emetic and diarrhoeal syndromes at a restaurant in Canberra, Australia *Communicable Diseases Intelligence* (2018) 2019; 43 (<https://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.40>) Epub 16/09/2019.

Wang, Y., Dai, A., Huang, S., Kuo, S., Shu, M., Tapia, C. P., Yu, J., Two, A., Zhang H., Gallo, R.L, & Huang, C. M. (2014). Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. *Beneficial Microbes*, 5(2), 161-168.

Wangprasertkul, J., Siriwatanapong, R., & Harnkarnsujarit, N. (2021). Antifungal packaging of sorbate and benzoate incorporated biodegradable films for fresh noodles. *Food Control*, 123, 107763.

Weiss, A., & Hammes, W. P. (2005). Efficacy of heat treatment in the reduction of salmonellae and *Escherichia coli* O157: H–on alfalfa, mung bean and radish seeds used for sprout production. *European Food Research and Technology*, 221(1), 187-191.

Wemmenhove, E., van Valenberg, H. J.F., Zwietering, M. H., van Hooijdonk, T. C.M., & Wells-Bennik, M. H.J. (2016). Minimal inhibitory concentrations of undissociated lactic, acetic, citric and propionic acid for *Listeria monocytogenes* under conditions relevant to cheese. *Food Microbiology*,

58, 63-67.

WHO. 2018. *Salmonella* (non-typhoidal). [online] Available at: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))> [Accessed 17 April 2022].

Xu, Z., Xie, J., Soteyome, T., Peters, B. M., Shirliff, M. E., Liu, J., & Harro, J. M. (2019). Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety. *Current Opinion in Food Science*, 26, 57-64.

Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M. K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B. & Coma, V. (2017). Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 165-199.

Zhang, S., Xiong, J., Lou, W., Ning, Z., Zhang, D., & Yang, J. (2019). Antimicrobial activity and action mechanism of triglycerol monolaurate on common foodborne pathogens. *Food Control*, 98, 113-119.