

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΣΕ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

**Β. Κουσιάρης<sup>1,2</sup>, Μ. Χ. Γιαννακούρου<sup>2</sup>, Ν.Γ. Στοφόρος<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

<sup>2</sup>Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, Ελλάδα

(\*[stoforos@aua.gr](mailto:stoforos@aua.gr))

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μαθηματική περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης σε ισοθερμοκρασιακές και δυναμικές συνθήκες είναι απαραίτητη για την εκτίμηση της ασφάλειας και της ποιότητας των τροφίμων. Ωστόσο, στη βιβλιογραφία, δεν έχει δοθεί έμφαση στην αξιολόγηση της επίδρασης του χρησιμοποιούμενου δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ στον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης. Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε ένα πλήθος δυναμικών θερμοκρασιακών προφίλ με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητάς τους να προσδιορίζουν με ακρίβεια τις κινητικές παραμέτρους, και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης, της μικροβιακής ανάπτυξης. Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση των χρησιμοποιούμενων πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων και μεθόδου αριθμητικής ολοκλήρωσης όσον αφορά στη δυνατότητα περιγραφής δεδομένων μικροβιακής ανάπτυξης σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Μικροβιακή ανάπτυξη, εκτίμηση κινητικών παραμέτρων, δυναμικά θερμοκρασιακά προφίλ, πρωτογενή/δευτερογενή μοντέλα, διαστήματα εμπιστοσύνης.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Για μια συστηματική κινητική μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης προτείνεται μία πληθώρα μεθοδολογιών στη βιβλιογραφία, με σκοπό τον προσδιορισμό των παραμέτρων των μαθηματικών εξισώσεων που αφορούν στην ανάπτυξη του επιλεγμένου μικροοργανισμού<sup>[1-4]</sup>. Ωστόσο, για τη μελέτη της μικροβιακής ανάπτυξης σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες, έχει δοθεί μικρή έμφαση στην αξιολόγηση της επίδρασης του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ στον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων, ανεξαρτήτως των μαθηματικών εξισώσεων που δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα<sup>[5]</sup>. Η χρήση ενός δυναμικού μοντέλου για την πρόρρηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες απαιτεί μια πιο ουσιαστική μαθηματική προσέγγιση, ενσωματώνοντας την επίδραση του θερμοκρασιακού προφίλ στις κινητικές παραμέτρους μέσω ενός δευτερογενούς μοντέλου. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων σε πειραματικά δεδομένα της βιβλιογραφίας ή σε *in silico* (ψεύδο-πειραματικά) δεδομένα, με σκοπό την σύγκριση της δυνατότητας περιγραφής της μικροβιακής ανάπτυξης και τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες.

### ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Η μελέτη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες βασίστηκε είτε σε πειραματικές μετρήσεις της μικροβιακής ανάπτυξης από τη βιβλιογραφία, είτε κατά περίπτωση, σε *in silico* δεδομένα. Τα πειραματικά δεδομένα ανακτήθηκαν από δημοσιευμένα άρθρα μέσω προγραμμάτων ψηφιοποίησης διαγραμμάτων (GetData Digitizer 2023). Τα *in silico*, ψεύδο-πειραματικά, δεδομένα δημιουργήθηκαν με κατάλληλα μαθηματικά

μοντέλα, τα ίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δεδομένων και τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων, με την προσθήκη τυχαίου σφάλματος ( $\pm 5-10\%$ ).

Ξεκινώντας από πρωτογενή μοντέλα (εξισώσεις που περιγράφουν τον μικροβιακό πληθυσμό συναρτήσει του χρόνου ανάπτυξης) σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες, όπως των Baranyi and Roberts<sup>[6]</sup>, Εξ. (1) και (2),

$$y(t) = y_0 + \mu_{max} \cdot A(t) - \ln\left(1 - \frac{\exp(\mu_{max} \cdot A(t) - 1)}{\exp(y_{max} - y_0)}\right) \quad (1)$$

όπου

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \ln(\exp(-\mu_{max} \cdot t) + \exp(-\mu_{max} \cdot \lambda) - \exp(-\mu_{max} \cdot (t + \lambda))) \quad (2)$$

και διαφορίζοντας, καταλήγουμε σε εξισώσεις που μπορούν να περιγράψουν τη μικροβιακή ανάπτυξη σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες. Έτσι, με βάση την Εξ. (1) καταλήγουμε στην Εξ. (3):

*Εξίσωση Baranyi*

$$\frac{dy}{dt} = \mu_{max} \cdot \left(\frac{1}{1 + \exp(-Q(t))}\right) \cdot (1 - \exp(y(t) - y_{max})) \quad (3)$$

για

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{max} (T) \quad (4)$$

με αρχικές συνθήκες:  $y(t=0) = y_0$ , και  $Q(t=0) = Q_0 = \ln\left(\frac{1}{e^{\mu_{max} \cdot \lambda} - 1}\right)$

όπου  $y_0$  (lnCFU/g) περιγράφει το φυσικό λογάριθμο της αρχικής μικροβιακής συγκέντρωσης του επιλεγμένου μικροοργανισμού για  $t=0$ ,  $y_{max}$  (lnCFU/g) περιγράφει τη μέγιστη μικροβιακή συγκέντρωση του μικροοργανισμού για ένα δεδομένο σύστημα ανάπτυξης,  $\mu_{max}$  (lnCFU/g/((lnCFU/g) h<sup>-1</sup>)) αναφέρεται στο μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης,  $t$  (h) ο χρόνος και  $A(t)$  ορίζεται ως συνάρτηση προσαρμογής η οποία σχετίζεται με τη φυσιολογική κατάσταση του υπό εξέταση μικροοργανισμού και τιμές της κυμαίνονται από 0 έως  $t$ .  $Q(t)$  (αδιάστατη) είναι μια συνάρτηση προσαρμογής η οποία εκφράσει την φυσιολογική κατάσταση του επιλεγμένου μικροοργανισμού. Εναλλακτικά, για την περιγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες, μπορούν να χρησιμοποιηθεί η εξίσωση του Huang<sup>[1,7]</sup> (Εξ. (5)) ή του Gompertz<sup>[8]</sup> (στη διαφορική της μορφή, Εξ. (6)):

*Εξίσωση Huang*

$$\frac{dy}{dt} = \mu_{max} \cdot \left(\frac{1}{1 + \exp(-a(t-\lambda))}\right) \cdot (1 - \exp(y(t) - y_{max})) \quad (5)$$

*Εξίσωση Gompertz*

$$\frac{dL}{dt} = \mu_{max} \cdot (L - A) \cdot \ln\left(\frac{B-A}{L-A}\right) \quad (6)$$

όπου  $L$  είναι το  $\log_{10}$ (CFU/g) της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών,  $A$  και  $B$ , είναι ο αρχικός και τελικός πληθυσμός. Επειδή όμως για  $t=0$ ,  $L=A$  και δημιουργείται πρόβλημα στην εξίσωση (6), χρησιμοποιείται μια διαφορετική, ψευδο-αρχική τιμή (σύμφωνα με τη μεθοδολογία που προτείνεται από τους Van Impe et al.<sup>[8]</sup>), χρησιμοποιώντας ένα πολύ μικρό  $\Delta L_0$  σε χρόνο  $t=0$  και χρησιμοποιώντας την ακόλουθη σχέση:

$$L_0 = A + \Delta L_0 \quad (7)$$

Ως δευτερογενή μοντέλα (εξισώσεις που περιγράφουν την επίδραση της θερμοκρασίας στις κινητικές παραμέτρους του πρωτογενούς μοντέλου), χρησιμοποιήθηκαν η εξίσωση της τετραγωνικής ρίζας (Square root)<sup>[4,8]</sup>, ή η εξίσωση Arrhenius<sup>[9]</sup>, τόσο για τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης όσο και τη λανθάνουσα φάση:

*Εξίσωση Τετραγωνικής Ρίζας (Square-Root)*

$$\sqrt{\mu_{max}(T)} = b_{\mu} \cdot (T - T_{min}) \quad (8)$$

και

$$\sqrt{\frac{1}{\lambda(T)}} = b_{\lambda} \cdot (T - T_o) \quad (9)$$

Εξίσωση Arrhenius

$$\ln \mu_{max}(T) = \ln \mu_o - \frac{E_{\alpha,\mu}}{RT} \quad (10)$$

και

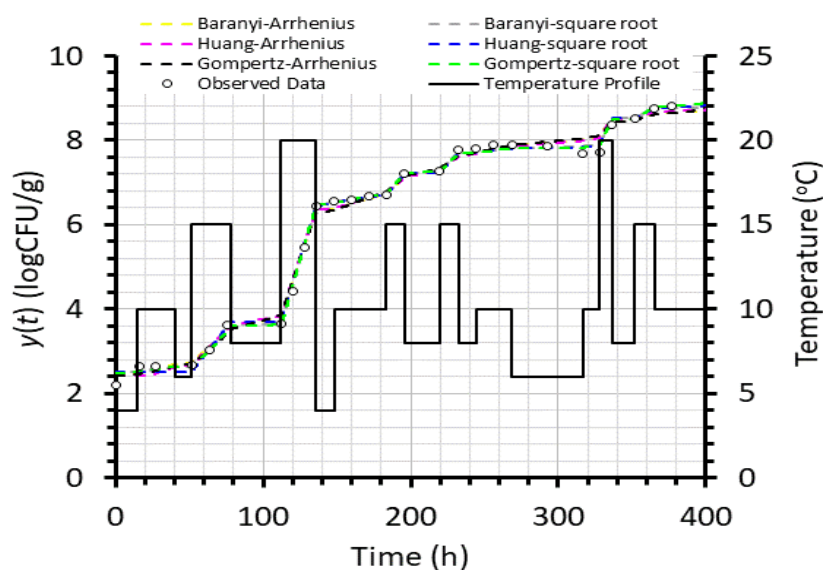
$$\ln \left( \frac{1}{\lambda(T)} \right) = \ln \left( \frac{1}{\lambda_o} \right) - \frac{E_{\alpha,\lambda}}{RT} \quad (11)$$

όπου  $b_{\mu}$  και  $b_{\lambda}$  ( $^{\circ}\text{C} \cdot \text{h}^{-0.5}$ ) είναι παράμετροι προσαρμογής του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και λανθάνουσας φάσης, αντίστοιχα και  $T_{\min}$  και  $T_o$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) είναι οι ελάχιστες θερμοκρασίες του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και λανθάνουσας φάσης, αντίστοιχα. Για την εξίσωση Arrhenius  $\ln \mu_o$  και  $\ln(1/\lambda_o)$  ( $\text{h}^{-1}$ ) είναι οι προεκθετικοί παράγοντες του ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και λανθάνουσας φάση, αντίστοιχα και  $E_{\alpha,\mu}$  και  $E_{\alpha,\lambda}$  ( $\text{J/mole}$ ) είναι οι ενέργειες ενεργοποίησης για τον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης και λανθάνουσα φάση αντίστοιχα.

Τέλος, για την εκτίμηση της μεταβλητότητας των κινητικών παραμέτρων, υπολογίστηκαν τα 95 % διαστημάτων εμπιστοσύνης ( $\pm 95\% \text{ CI}$ ) των μέσων τιμών των κινητικών παραμέτρων [2,5], με σκοπό την αξιολόγηση της δυνατότητας συγκεκριμένων δυναμικών θερμοκρασιακών προφίλ για εκτίμηση αξιόπιστων τιμών κινητικών παραμέτρων. Όλοι οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν στο Microsoft Excel. Για την αριθμητική επίλυση των προτεινόμενων πρωτογενών μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι Runge-Kutta 4ης τάξης (RK4) και Euler, ενώ για την προσαρμογή των δεδομένων και τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία Solver του Microsoft Excel.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

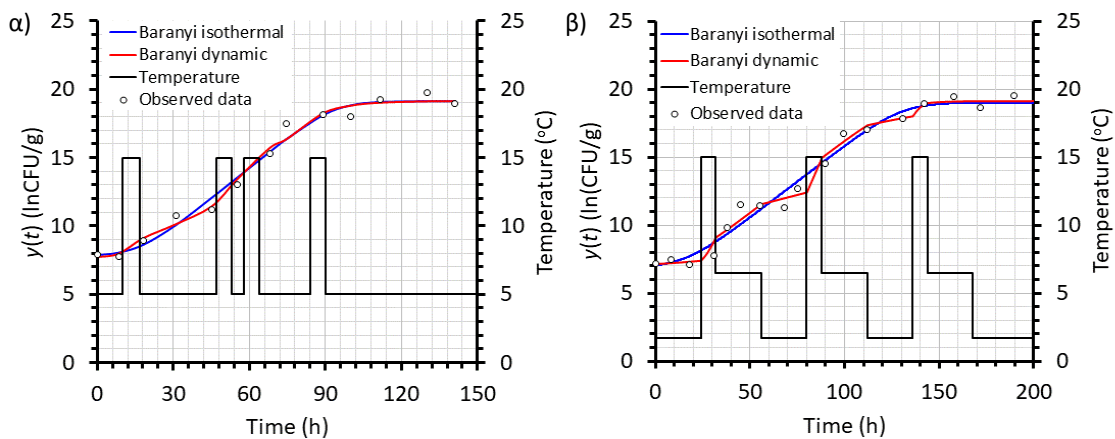
Για τη σύγκριση των χρησιμοποιούμενων δυναμικών πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά δεδομένα των Li et al. [7] και αφορούν την ανάπτυξη της *Salmonella Paratyphi A* σε μαριναρισμένο ψημένο κοτόπουλο. Οι μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες που εφαρμόστηκαν ήταν σε εύρος 4 έως 20 $^{\circ}\text{C}$ . Στο Σχήμα 1 εμφανίζονται όλοι οι συνδυασμοί των 3 πρωτογενών και των 2 δευτερογενών μοντέλων (6 περιπτώσεις) και συνάγεται ότι οι προβλέψεις είναι ανεξάρτητες των χρησιμοποιούμενων τόσο δυναμικών πρωτογενών όσο και δευτερογενών μοντέλων.



**Σχήμα 1.** Σύγκριση της προσαρμογής των καμπυλών ανάπτυξης διαφορετικών δυναμικών μοντέλων πρόρρησης σε πειραματικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης της *Salmonella Paratyphi A* σε μαριναρισμένο ψημένο κοτόπουλο [7].

Οι κινητικές παράμετροι που προσδιορίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα του Σχήματος 1 ήταν πρακτικά ανεξάρτητες από τη μέθοδο που ακολουθήθηκε για την αριθμητική επίλυση των εξισώσεων των δυναμικών μοντέλων: *i.e.*, Runge-Kutta 4ης τάξης vs Euler. Εντούτοις, το χρονικό βήμα που χρησιμοποιείτο για την αριθμητική επίλυση, αν και δεν επηρέαζε την ποιότητα της προσαρμογής, επιδρούσε στις τιμές κάποιων κινητικών παραμέτρων (δεδομένα δεν παρουσιάζονται). Για τις προβλέψεις των μοντέλων του Σχήματος 1 χρησιμοποιήθηκε χρονικό βήμα ίσο προς 0.1 h.

Επιλέγοντας περιπτώσεις κινητικής μελέτης σε δυναμικές θερμοκρασιακές συνθήκες από τη βιβλιογραφία<sup>[3]</sup> (ανάπτυξης *Pseudomonas* spp. σε τσιπούρα σε θερμοκρασιακό εύρος 2 έως 15°C) εφαρμόστηκαν δυο διαφορετικές μαθηματικές προσεγγίσεις, με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας δεδομένων θερμοκρασιακών προφίλ να αποδίδουν αρμόζουσες κινητικές παραμέτρους με στενά διαστήματα εμπιστοσύνης. Στη πρώτη προσέγγιση, χρησιμοποιήθηκαν οι Εξ. (1-2) οι οποίες αναφέρονται στη μικροβιακή ανάπτυξη σε ισοθερμοκρασιακές συνθήκες και στη δεύτερη προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε το δυναμικό μοντέλο Baranyi με το δευτερογενές μοντέλο Square root όπως παρουσιάζεται στις Εξ. (3-4) και Εξ. (8-9).



**Σχήμα 2.** Σύγκριση της προσαρμογής των καμπυλών ανάπτυξης του ισοθερμοκρασιακού και δυναμικού μοντέλου Baranyi σε πειραματικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης των *Pseudomonas* spp. σε τσιπούρα<sup>[3]</sup>.

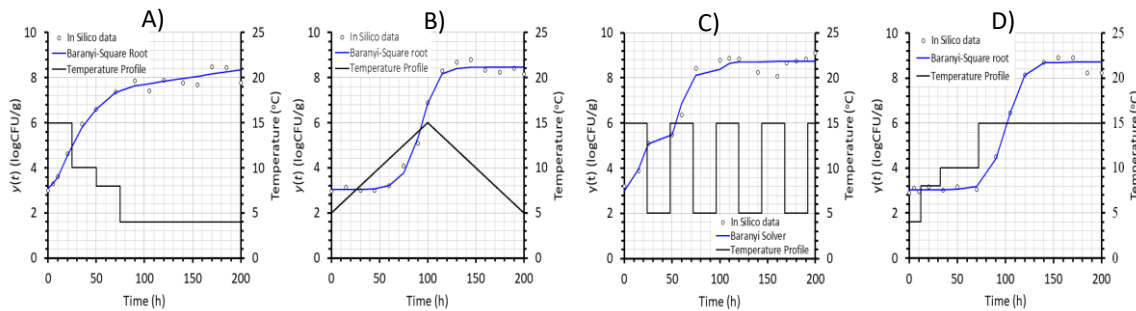
Σύμφωνα με το Σχήμα 2 είτε χρησιμοποιηθεί η ισοθερμοκρασιακή είτε η δυναμική προσέγγιση, δεν υπήρξε ουσιαστική διαφορά στην προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων, λόγω της σιγμοειδούς ανάπτυξης που εμφανίζεται σε τέτοιου είδους θερμοκρασιακά προφίλ. Ωστόσο, στην περίπτωση της δυναμικής προσέγγισης ο προσδιορισμός των παραμέτρων του δευτερογενούς μοντέλου ( $b_{\mu}$ ,  $T_{\min}$ ,  $b_{\lambda}$  και  $T_0$ ), εκτιμήθηκε με χαμηλή εμπιστοσύνη όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 1 για τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης.

Επιπλέον, σε αυτή την εργασία δημιουργήθηκαν *in silico* δεδομένα, με εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιακών προφίλ (Σχήμα 3), με στόχο τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων και της συνακόλουθης αβεβαιότητάς τους (μέσω των 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης). Για τις ψευδοπειραματικές μετρήσεις (*in silico* δεδομένα) ορίστηκαν ως αρχική και μέγιστη μικροβιακή συγκέντρωση ίση με 3 και 8.5 log(CFU/g), αντίστοιχα. Παράλληλα, επιλέχθηκαν τιμές των κινητικών παραμέτρων οι οποίες αναφέρονται στη μικροβιακή ανάπτυξη του *Escherichia coli* σε φύλλα μαρουλιού από τη βιβλιογραφία<sup>[10]</sup> (ίσες με  $b=0.025$  1/°Ch<sup>0.5</sup> και  $T_{\min}=0.408^{\circ}\text{C}$ ) και για την αναπαραγωγή *in silico* δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το δυναμικό μοντέλο Baranyi (πρωτογενές) - Square-root (δευτερογενές) προσθέτοντας 5% τυχαίο σφάλμα στα θεωρητικά σημεία. Το θερμοκρασιακό εύρος που πραγματοποιήθηκε η κινητική μελέτη ήταν μεταξύ 5-20°C και τα

**Πίνακας 1.** Μέσες τιμές ± 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) των κινητικών παραμέτρων του δυναμικού μοντέλου Baranyi με δευτερογενές μοντέλο Square root, όπως εφαρμόστηκε για την περιγραφή της ανάπτυξης των *Pseudomonas spp.* σε τσιπούρα του Σχήματος 2.

	Σχήμα 2α	Σχήμα 2β
Parameter	95% CI	95% CI
$y_0$ (lnCFU/g)	7.7±1.3	7.1±1.0
$y_{max}$ (lnCFU/g)	19.2±1.0	19.1±0.8
$b_{\mu}$ (°C <sup>-1</sup> h <sup>-0.5</sup> )	0.0166±0.0353	0.0283±0.0236
$T_{min}$ (°C)	-10.81±45.04	-5.03±10.67
$b_{\lambda}$ (°C <sup>-1</sup> h <sup>-0.5</sup> )	0.0152±2.7474	0.0115±2.0771
$T_0$ (°C)	-9.17±2542.8	-11.42±2342.4
SSE	3.2065	4.2694
R <sup>2</sup>	0.9872	0.9871

σχήματα των υπό εξέταση θερμοκρασιακών προφίλ επιλέχθηκαν με βάση τη συχνότητα χρήσης τους στη βιβλιογραφία [2-5]. Στη συνέχεια, οι τιμές των κινητικών παραμέτρων ( $y_0$ ,  $y_{max}$ ,  $b$ ,  $T_{min}$ ) υπολογίστηκαν εκ νέου μέσω μη γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιώντας το εργαλείο Solver του προγράμματος Excel και ακολουθήθηκε ο προσδιορισμός των μέσων τιμών και των 95% διαστημάτων εμπιστοσύνης τους (Πίνακας 2).



**Σχήμα 3.** Σύγκριση της ικανότητας διαφόρων χρονοθερμοκρασιακών προφίλ ως προς την καταλληλότητα για προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων σε *in silico* δεδομένα (5% τυπικό σφάλμα) μικροβιακής ανάπτυξης του *Escherichia coli*.

**Πίνακας 2.** Μέσες τιμές και 95% διαστήματα εμπιστοσύνης των κινητικών παραμέτρων για τα επιλεγμένα θερμοκρασιακά προφίλ του Σχήματος 3.

<i>In silico</i> data with 5% standard error				
Curves	$y_0$ (logCFU/g)	$y_{max}$ (logCFU/g)	$b$ (1/°Ch <sup>0.5</sup> )	$T_{min}$ (°C)
Initial Values	3.0	8.5	0.025	-0.41
A	3.1±0.3	23±1.97X10 <sup>7</sup>	0.027±0.022	0.99±12.00
B	3.0±0.3	8.5±0.2	0.026±0.002	-1.20±1.43
C	3.0±0.4	8.6±0.2	0.041±0.572	5.00±140.04
D	3.0±0.2	8.7±0.2	0.026±0.002	0.34±0.49

Σύμφωνα με τον Πίνακα 2, προκύπτει ότι το σχήμα του θερμοκρασιακού προφίλ ενδέχεται να επηρεάζει τον βαθμό επαναπροσδιορισμού των κινητικών παραμέτρων καθώς και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης τους. Πιο συγκεκριμένα, στις καμπύλες ανάπτυξης του σχήματος 3 (B, D) οι τιμές των κινητικών παραμέτρων που υπολογίσθηκαν δεν διαφέρουν από τις αρχικές τιμές που είχαν οριστεί πριν από τη μη γραμμική παλινδρόμηση. Επιπλέον, στις αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης τα διαστήματα εμπιστοσύνης όλων των υπό εξέταση κινητικών παραμέτρων εκτιμήθηκαν σε ένα μικρό εύρος, υποδεικνύοντας ότι σε τέτοιου είδους θερμοκρασιακά προφίλ μπορεί να επιτευχθεί με αξιοπιστία η εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων (μικρή αβεβαιότητα). Ωστόσο, δεν παρατηρείται η ίδια συμπεριφορά σε θερμοκρασιακά προφίλ όπως απεικονίζονται στις καμπύλες ανάπτυξης των Σχημάτων 3 (A, C), όπου τουλάχιστον μία από τις τιμές των κινητικών παραμέτρων που υπολογίσθηκαν διαφέρουν από τις αρχικές τιμές που είχαν οριστεί πριν από τη μη γραμμική παλινδρόμηση. Παράλληλα, τα διαστήματα εμπιστοσύνης που προέκυψαν από τις καμπύλες ανάπτυξης του Σχήματος 3 (A, C), περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος τιμών των οποίων τα διαστήματα εμπιστοσύνης δεν έχουν φυσική υπόσταση, όπως για παράδειγμα  $T_{\min} = 5.00 \pm 140.04$  °C. Επομένως, δεν προτείνεται η εκτίμηση των κινητικών παραμέτρων με χρήση ανάλογων θερμοκρασιακών προφίλ. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη δημιουργία *in silico* δεδομένων σε συγκεκριμένα θερμοκρασιακά προφίλ όπως παρουσιάζονται στην καμπύλη ανάπτυξης του Σχήματος 3 (A) παρατηρήθηκε μια μη προσδοκώμενα υψηλή αβεβαιότητα της παραμέτρου μέγιστης μικροβιακής συγκέντρωσης ( $\gamma_{\max}$ ), τα αίτια της οποίας χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Huang, L. (2017). *Curr. Op. Food Sci.*, 14, 85-92.
- [2] Longhi DA, Martins WF, da Silva NB, Carciofi BAM, de Aragão GMF, Laurindo JB. (2017). *Int. J. Food Microbiol.*, 240, 57-62.
- [3] Koutsoumanis K. (2001). *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4), 1821–1829.
- [4] Tarlak, F. (2021). *Food and Health*, 7(3), 194-202.
- [5] Giannakourou, M. C., Saltaouras, K. P., & Stoforos, N. G. (2021). *J. Food Sci.*, 86(6), 2172-2193.
- [6] Baranyi, J, Roberts TA. (1994). *Int. J. Food Microbiol.*, 23(3-4), 277-294.
- [7] Li, M, Huang, L, Yuan Q. (2017). *Food Control*, 74, 17-24.
- [8] Van Impe, JF, Nicolai BM, Martens T, Baerdermaeker JD, Vandewalle J. (1992). *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(9), 2901-2909.
- [9] Skinner, GE, Larkin, JW, Rhodehamel, EJ. (1994). *J. Food Safety*, 14(3), 175-217.
- [10] de Oliveira Elias, S, Noronha, TB., Tondo, EC. (2018). *Food Microbiol.*, 72, 206-213.