

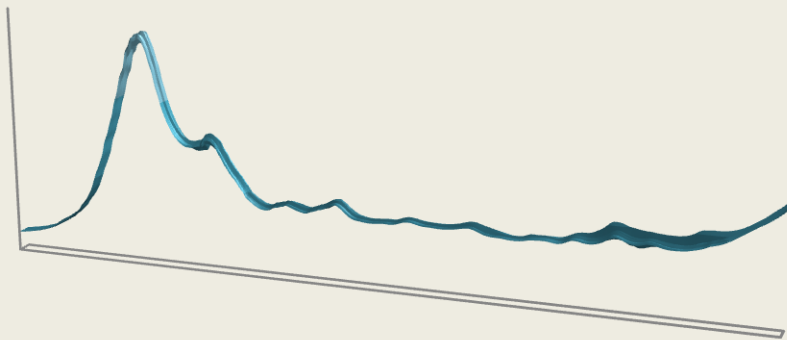
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων και
Διατροφή του Ανθρώπου

Κατεύθυνση: Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων



Τεχνικές ανάλυσης
εικόνας/σήματος με
εφαρμογές στον έλεγχο της
ποιότητας και ασφάλειας
τροφίμων

Μεταπτυχιακή μελέτη
Μαυρουδής Γ. Ηρακλής
Αθήνα 2015



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:

ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ:

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή μελέτη

**ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ/ΣΗΜΑΤΟΣ ΜΕ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μαυρουδής Γ. Ηρακλής

Επιβλέπων καθηγητής:

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς

Τριμελής Επιτροπή:

Καθ. Γ.-Ι. Νυχάς

Επ. Καθ. Ευστ. Πανάγου

Καθ. Η. Ηλιόπουλος

ΑΘΗΝΑ 2015

**Η επιστήμη είναι δεδομένα. Ακριβώς όπως τα σίτια χτίζονται με
τούβλα, έτσι και η επιστήμη χτίζεται με δεδομένα.
Αλλά όπως ένας σωρός τούβλα δεν κάνει ένα σπίτι, έτσι και μια
συλλογή δεδομένων δεν είναι απαραίτητα επιστήμη.**

Ανρί Πουανκαρέ, 1854-1912,
Γάλλος Μαθηματικός

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Το κρέας και τα συστατικά του	2
1.2 Ποιότητα κρέατος	3
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του κρέατος	5
1.4 Κυριότερα αλλοιογόνα βακτήρια	6
1.5 Ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί (SSO)	7
1.5.1 Δραστηριότητα SSO	7
1.6 Μικροβιολογία νωπού κρέατος	10
1.7 Μικροβιολογία συσκευασμένου κρέατος	11
1.8 Κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη βακτηριακή ανάπτυξη στο κρέας. 13	
1.8.1 Θερμοκρασία	13
1.8.2 Συγκέντρωση γλυκόζης	15
1.8.3 ΡΗ	15
1.8.4 Ενεργότητα ύδατος (A_w)	15
1.9 Χημικές αλλαγές κατά την αλλοίωση του κρέατος	16
1.10 Σκοπός της μελέτης	21
Βιβλιογραφία 1 ^{ου} κεφαλαίου	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο ΟΡΓΑΝΑ	25
2.1 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος με βάση τους μεταβολίτες	26
2.2 Ανάλυση πολυφασματικών εικόνων (multispectral imaging)	27
2.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	28
Βιβλιογραφία 2 ^{ου} κεφαλαίου	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	31
3.1 Δημιουργία δειγμάτων	32
3.2 Εμβολιασμός κρέατος	32
3.3 Δειγματοληψία	33

3.4	Υποστρώματα και επώαση	33
3.5	Μέτρηση PH	34
3.6	Συλλογή εικόνων με το VideometerLab	34
3.7	Συλλογή φασματικών δεδομένων με την ανάλυση υπέρυθρου FTIR	36
	Βιβλιογραφία 3 ^{ου} κεφαλαίου	38
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	39
4.1	Μικροβιολογικές αναλύσεις	40
4.2	PH	46
4.3	Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων από το VideometerLab	51
4.3.1	Ποσοτικός προσδιορισμός αλλοίωσης	54
4.3.2	Ποιοτικός προσδιορισμός αλλοίωσης	60
4.4	Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων από το FTIR	70
4.4.1	Πρωτογενής ανάλυση των δεδομένων	70
4.4.2	Ιεραρχική ομαδοποίηση και ανάπτυξη μοντέλων για κάθε ομάδα	74
	Βιβλιογραφία 4 ^{ου} κεφαλαίου	79
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	78
	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	80
	Βιβλιογραφία Συμπερασμάτων	81

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά για την ανάθεση του θέματος της παρούσης εργασίας. Τον ευχαριστώ ειδικότερα που με έφερε σε επαφή με έναν αναπτυσσόμενο και πρωτοποριακό τομέα της επιστήμης της τεχνολογίας τροφίμων.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή Ευστάθιο Πανάγου ο οποίος μου προσέφερε την απαραίτητη καθοδήγηση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μελέτης. Χαίρει της εκτίμησης μου καθώς είναι ένας καθηγητής ιδιαίτερα προσιτός με τον οποίο μπορείς να μοιραστείς προβληματισμούς και απορίες.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Παναγιώτη Τσακανίκα και στον υποψήφιο διδάκτορα Δημήτρη Παυλίδη για την καθοδήγηση και τις συμβουλές τους που με οδήγησαν να εμβαθύνω τις γνώσεις μου τόσο στη στατιστική ανάλυση όσο και στη μικροβιολογία.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ ανήκει σε όλους τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και μου παρείχαν σημαντική ψυχολογική και υλική βοήθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κρέας αποτελεί πηγή ποικίλων θρεπτικών συστατικών για τον άνθρωπο αλλά συγχρόνως είναι και εστία συγκέντρωσης μικροβιακών ομάδων. Οι ομάδες αυτές βρίσκουν στην επιφάνεια του κρέατος τα συστατικά που ευνοούν την ανάπτυξη τους και τη λειτουργία του μεταβολισμού τους. Ο μεταβολισμός αυτός οδηγεί σε ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα, τους μεταβολίτες, οι οποίοι τελικά αλλοιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος. Η άμεση καταγραφή και ανάλυση των μεταβολιτών μπορεί να δώσει γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα για το επίπεδο της αλλοίωσης. Για αυτό το λόγο τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένα νέο πεδίο έρευνας τα *metabolomics* το οποίο συνδυάζει διαφορετικούς κλάδους τη επιστήμης όπως η μικροβιολογία, τα μαθηματικά και η επιστήμη των υπολογιστών με σκοπό την ανάπτυξη μοντέλων που θα εκτιμούν ποιοτικά αλλά και ποσοτικά το μικροβιακό πληθυσμό. Η εφαρμογή αυτών των μοντέλων μπορεί να δώσει σχετικά ακριβείς πληροφορίες για την ποιότητα του κρέατος.

Σε αυτό το πεδίο έρευνας εφαρμόζονται αναλυτικές μέθοδοι όπως η φασματοσκοπία και η πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο καινοτόμες τεχνικές. Η πρώτη ήταν η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και η δεύτερη η ανάλυση πολυφασματικών εικόνων (18 μήκη κύματος) που λήφθησαν από το όργανο VideometerLab. Τα δεδομένα από τις δύο αυτές μεθόδους συνδυάστηκαν με τα δεδομένα από τη μικροβιολογική ανάλυση. Οι μικροοργανισμοί που διαλέξαμε για να μελετήσουμε το μεταβολικό τους προφίλ ήταν η *Serratia liquefaciens* και η *Hafnia Alvei*, δύο είδη της οικογένειας των *Enterobacteriaceae*. Αυτοί οι ψυχρότροφοι, Gram αρνητικοί μικροοργανισμοί ανήκουν στους κύριους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς του κρέατος. Δείγματα κρέατος που εμβολιάστηκαν με τους παραπάνω μικροοργανισμούς αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 4°C και 10°C.

Από την καταγραφή της μικροβιακής ανάπτυξης, τα δείγματα που αποθηκεύτηκαν στους 4°C εμφάνισαν φάση προσαρμογής κάτι που δεν συνέβη με τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους 10°C. Ο μέγιστος ρυθμός αύξησης μ_{max} ήταν μεγαλύτερος στους 10°C από τους 4°C και για τους δύο μικροοργανισμούς. Για τη δημιουργία των μοντέλων πρόβλεψης, έγινε χρήση της μερικής γραμμικής παλινδρόμησης (PLS) κατά την οποία τα δεδομένα από τις μικροβιακές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές ενώ τα φασματοσκοπικά δεδομένα ως ανεξάρτητες.

Κατά τη δημιουργία του μοντέλου από τα δεδομένα της πολυφασματικής ανάλυσης των εικόνων των δειγμάτων επιλέχθηκαν τα μήκη κύματος που είχαν τις πιο ακραίες τιμές συντελεστών παλινδρόμησης με στόχο την κατασκευή εξισώσεων που θα εκτιμούν τον πληθυσμό του κάθε μικροοργανισμού. Επίσης κάνοντας χρήση της ανάλυσης διαχωρισμού PLS-DA έγινε κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε μία από τις 3

κλάσεις ποιότητας που είχαν οριστεί από την οργανοληπτική ανάλυση σε φρέσκο, ημιφρέσκο και αλλοιωμένο. Η κατηγοριοποίηση σύμφωνα με τη διαχωριστική ανάλυση έδωσε σωστά αποτελέσματα σε ποσοστό 85.2% για την *Serratia liquefaciens* και σε ποσοστό 79.2% για τη *Hafnia Alvei*. Για την εκτίμηση της απόδοσης των μοντέλων υπολογίστηκαν οι δείκτες επίδοσης Bias Factor και Accuracy Factor καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης. Οι δείκτες επίδοσης ήταν όλοι κοντά στη μονάδα και για τα δύο μοντέλα που σημαίνει ότι τα μοντέλα μας είχαν αρκετά καλή προβλεψιμότητα.

Στη συνέχεια αφού έγινε συλλογή των φασματοσκοπικών δεδομένων με το όργανο του FTIR, εφαρμόστηκε μια προεπεξεργασία στα δεδομένα αυτά ώστε να κανονικοποιηθούν. Μετά την κανονικοποίηση των δεδομένων υπολογίστηκε η δεύτερη παράγωγος ώστε να συλληχθούν τα δεδομένα εκείνα που παρουσιάζουν ακρότατα έτσι ώστε να μειωθεί ο όγκος των δεδομένων που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία του μοντέλου πρόβλεψης. Το μοντέλο που δημιουργήθηκε εμφάνισε αρκετά καλή συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών και η επικύρωσή του με βάση τους δείκτες επίδοσης ήταν επιτυχής. Τέλος, εφαρμόστηκε μια ιεραρχική ομαδοποίηση για το χωρισμό του συνολικού φάσματος σε επιμέρους ομάδες. Αναπτύχθηκαν μοντέλα για την κάθε ομάδα και είδαμε κατά πόσον αυτά τα μοντέλα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν αντί ενός μοντέλου για όλο το σύνολο των δεδομένων μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τον όγκο των δεδομένων και φαινόμενα όπως η πολυσυγγραμικότητα. Τελικά, τα μοντέλα για δύο ομάδες από αυτές που δημιουργήθηκαν είχαν καλή προβλεψιμότητα και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να προσδιορίσουν ξεχωριστά το καθένα την ταυτότητα της αλλοίωσης.

Λέξεις κλειδιά: αλλοίωση κρέατος, μεταβολίτες, πολύφασματική ανάλυση εικόνας, φασματοσκοπία υπερύθρου, πολύμεταβλητή στατιστική

ABSTRACT

Meat is a source of various nutrients for humans but in the same time is considered as hearth of the concentration of microbial groups. These groups found in the meat surface components that favour the development and function of their metabolism. The metabolism leads to intermediate and final products, the metabolites, which eventually alter the organoleptic characteristics of meat. Direct recording and analysis of metabolites can give quick and reliable results on the level of the spoilage. For this reason, a new field of research has been developed recently, metabolomics, which combines different sectors of science such as microbiology, mathematics and computer science in order to develop models that estimate qualitatively and quantitatively the microbial population. The application of these models can provide relatively accurate information on the quality of meat.

In this field of research analytical and rapid methods are applied such as spectroscopy and multivariate statistical analysis. In the present work two innovative techniques were assessed. The first was the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and the second was the multispectral image analysis, which use a band of 18 wavelengths by the VideometerLab instrument. The data collected by these methods after the interaction of light on the surface of meat samples were combined with the data from the microbial analysis. Two species of the family of Enterobacteriaceae were chosen in order to study their metabolic profile. The two microorganisms were *Serratia liquefaciens* and *Hafnia Alvei* which are psychotropic and Gram negative bacteria belonging to the main spoilage microorganisms. Samples of sterile meat were inoculated with the above microorganisms and were stored at two different temperatures namely, 4°C and 10°C.

By recording the microbial growth, the samples stored at 4°C showed lag phase which was not the case with the samples stored at 10°C. The maximum growth rate μ_{max} was greater at 10°C than at 4°C for both microorganisms. For the development of predictive models linear regression was applied using the microbiological data as the dependent variable and the spectral data as independent variables. After developing the predictive model using the data from the analysis of multispectral images of meat samples the important wavelengths, which had the most extreme regression coefficients values, were selected. Relying on these values two equations were constructed that estimate the population of each microorganism. Also using discriminant function analysis the samples were classified into one of the three classes defined by sensory analysis in fresh, semifresh and spoiled. Categorization according to discriminant analysis gave correct results in rate 85.2% for *Serratia liquefaciens* and 79.2% for *Hafnia Alvei*. To assess the performance of the model performance indicators were calculated such as Bias Factor, Accuracy Factor and correlation coefficient. All the performance indicators were close to unit for both models indicating that our models had fairly good predictability.

Next step was the selection of spectral data from FTIR. Firstly, a pretreatment was applied to data for their normalization. After normalization the second derivative was calculated in order to select data with extreme values minimizing the range of data. These data was used to generate the predictive model. The predictive model showed fairly good correlation between observed and predicted values and the model was successfully validated by the indicator factors. Finally, an hierarchical cluster analysis was applied for the separation of the overall spectrum into sub-groups. Predictive models for each group were developed in order to investigate whether these models could be used instead of a model with the entire data set by reducing in this way the volume of data and phenomena such as multilinearity. Finally, the performance two of the models examined was satisfactory and these models could be used individually to identify the identity of the spoilage.

Key words: meat spoilage, metabolites, multispectral imaging, infrared spectroscopy, multivariate statistics.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το κρέας και τα συστατικά του

Το κρέας αποτελεί από την εποχή της Νεολιθικής εποχής περί τα 8500 π.Χ μία από τις βασικές, ίσως τη βασικότερη τροφή του ανθρώπου [1]. Η κατανάλωσή του συνέβαλε στην εξέλιξη του ανθρώπου και του ανθρώπινου εγκεφάλου καθώς είναι πηγή ποικίλων θρεπτικών συστατικών. Περιέχει πρωτεΐνες υψηλής θρεπτικής αξίας, κάλιο, μαγνήσιο, σίδηρο και ψευδάργυρο όπως και συζευγμένο λινελαϊκό οξύ με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου. Ειδικότερα είναι από τα λίγα τρόφιμα που περιέχει σημαντική ποσότητα της βιταμίνης B₁₂ η οποία είναι απαραίτητη για τη δημιουργία του DNA και των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Πίνακας 1. Χημική σύσταση του μυϊκού ιστού ενήλικων θηλαστικών μετά τη νεκρική ακαμψία

	βάρος %
Νερό	75,0
Πρωτεΐνες	19,0
Ινώδεις	11,5
Σαρκοπλασματικές	5,5
Συνδετικές	2,0
Λιπίδια	2,5
Υδατάνθρακες	1,2
Γαλακτικό οξύ	0,9
γλυκογόνο	0,1
Γλυκόζη και ενδιάμεσα γλυκολυτικής οδού	0,2
Διαλυτά μη πρωτεϊνούχα συστατικά	1,65
Κρεατίνη	0,55
Μονοφωσφορική ινοσίνη	0,30
NAD / NADP	0,30
Νουκλεοτίδια	0,10
Αμινοξέα	0,35
Καρνοσίνη, ανσερίνη	0,35
Ανόργανα συστατικά	0,65
Σύνολο διαλυτού φωσφόρου	0,20
Κάλιο	0,35
Νάτριο	0,05
Μαγνήσιο	0,02
Άλλα μέταλλα	0,23
Βιταμίνες	

1.2 Ποιότητα κρέατος

Η ποιότητα του κρέατος καθορίζεται από την αναλογία λίπους-άπαχου κρέατος και παράγοντες όπως το χρώμα, η οσμή, η ελαστικότητα η τρυφερότητα και η γεύση [2].

Πίνακας 2. Δείκτες ποιότητας του κρέατος [3]

Σύσταση του κρέατος	Ποσότητα προϊόντος προς πώληση Ποσοστό λίπους προς το άπαχο κρέας Μέγεθος και σχήμα των μυών
Εμφάνιση και τεχνολογικά χαρακτηριστικά	Υφή και χρώμα του λίπους Ποσοστό ενδομυϊκού λίπους Χρώμα και ικανότητα συγκράτησης νερού του άπαχου κρέατος Χημική σύσταση του άπαχου κρέατος
Γευστικότητα	Υφή και τρυφερότητα Χυμώδες Γεύση
Υγιεινή	Ποιότητα των θρεπτικών συστατικών Χημική ασφάλεια Μικροβιολογική ασφάλεια
Ηθικά κριτήρια	Αποδεκτή εκτροφή των ζώων

Το χρώμα είναι ένας από τους πιο σημαντικούς δείκτες φρεσκότητας του κρέατος. Το χρώμα οφείλεται στην παρουσία χρωστικών στο κρέας με κύρια την μυογλοβίνη. Η μυογλοβίνη έχει την ικανότητα να δεσμεύει οξυγόνο και να προσδίδει κατά μεγάλο ποσοστό το ερυθρό χρώμα στο κρέας. Αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό τμήμα τη σφαιρίνη και μια προσθετική ομάδα την αίμη. Η αίμη αποτελείται από έναν δακτύλιο πορφυρίνης που στο κέντρο της βρίσκεται ένα άτομο σιδήρου (Fe^{2+}). Ο σίδηρος σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με άλλες ενώσεις όπως το μοριακό οξυγόνο (O_2), το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Έτσι προκύπτουν η οξυμυοσφαιρίνη, η νιτροζομυοσφαιρίνη και η ανθρακοξυμυοσφαιρίνη [4].

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικές καταστάσεις της μυογλοβίνης

Χρωστική ουσία	Συνδεδετική ένωση	Αριθμός οξειδωσης σιδήρου	Χρώμα
Οξυμυοσφαιρίνη	H ₂ O	Fe ⁺⁺	Μοβ-κόκκινο / Μοβ-ροζ
Νιτροζομυοσφαιρίνη	NO	Fe ⁺⁺	Έντονο κόκκινο/έντονο ροζ
Μεταμυογλοβίνη		Fe ⁺⁺⁺	Καφέ/γκρί
Ανθρακοξυμυοσφαιρίνη	CO	Fe ⁺⁺	Έντονο κόκκινο

Η γευστικότητα (palatability) του κρέατος είναι ο κυριότερος δείκτης ποιότητας του κρέατος. Περιλαμβάνει τρία χαρακτηριστικά: α) την τρυφερότητα β) το χυμώδες και γ) το άρωμα (οσμή και γεύση) του μαγειρεμένου κρέατος. Επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις βιοχημικές μεταβολές που παίρνουν μέρος μετά τη θανάτωση του ζώου. Η διακοπή λειτουργίας του κυκλοφορικού συστήματος οδηγεί τους ιστούς στην αναερόβια γλυκόλυση προκαλώντας συσσώρευση μεταβολικών προϊόντων και γαλακτικού οξέος στους μύες. Αυτό οδηγεί σε μείωση του pH σε συνήθεις τιμές 5,6-6. Η ραγδαία όμως μείωση του pH είτε λόγω της κατάστασης (stress) του ζώου πριν τη σφαγή, είτε λόγω αυξημένης θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού (IΣN) (WHC, water holding capacity). Το νερό αποτελώντας το 75% των ουσιών του κρέατος επηρεάζει σημαντικά την τρυφερότητα, το χυμώδες του κρέατος. Η δυνατότητα του κρέατος να συγκρατεί νερό κάτω από την επίδραση διαφόρων πιέσεων επηρεάζει την εμφάνιση και το χρώμα του. Μειωμένη WHC συνεπάγεται απώλεια βάρους άρα και οικονομική απώλεια. Επιπλέον, η μειωμένη WHC ευνοεί την ανάπτυξη μικροοργανισμών και περιορίζει τη διάρκεια συντήρησης του κρέατος [5, 6]. Η σκληρότητα του κρέατος επηρεάζεται από τη σμίκρυνση των σαρκομεριδίων που επέρχεται κατά τη φάση της νεκρικής ακαμψίας. Όσο πιο έντονη είναι η σμίκρυνση τόσο πιο σκληρό είναι το κρέας. Η τρυφερότητα του κρέατος εξαρτάται από την θερμοκρασία στην οποία διατηρείται ο μυϊκός ιστός μέχρι να επέλθει η νεκρική ακαμψία. Το βέλτιστο εύρος θερμοκρασίας είναι 7-15°C. Μετά τη νεκρική ακαμψία επέρχεται η ωρίμανση του κρέατος με τη δράση των καλπεϊνών. Η δράση αυτών των ενδογενών πρωτεολυτικών ενζύμων επιφέρει την τρυφεροποίηση του κρέατος. Το τρυφερότερο κρέας επιτυγχάνεται από το συνδυασμό των δύο προαναφερθέντων διαδικασιών. Η οσμή του κρέατος προκαλείται από πτητικές ουσίες που ελευθερώνονται κατά το μαγείρεμα ενώ η γεύση από μη πτητικές ουσίες.

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα του κρέατος

Το κρέας είναι το τμήμα του σφάγιου το οποίο είναι κατάλληλο για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Μετά τη σφαγή του ζώου λαμβάνουν μέρος βιοχημικές μεταβολές που μετατρέπουν τον μυϊκό ιστό σε κρέας. Κατά σειρά οι μεταβολές αυτές είναι οι α) αναερόβια γλυκόλυση β) νεκρική ακαμψία και γ) ωρίμανση. Ο ρυθμός και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιούνται οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του κρέατος. Το κρέας εξαιτίας της μεγάλης ποικιλίας συστατικών μπορεί να εξελιχθεί σε εστία μικροβιακής επιμόλυνσης. Το επίπεδο, το εύρος και ο τύπος της επιμόλυνσης καθορίζεται από τις συνθήκες εκτροφής και σφαγής των ζώων. Οι πηγές της μικροβιακής χλωρίδας μπορεί να είναι το αβιοτικό περιβάλλον με το οποίο έρχεται σε επαφή το ζώο (αέρας, έδαφος, νερό), ο οργανισμός του ζώου (δέρμα, εντερικός σωλήνας) και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται κατά την επεξεργασία του κρέατος. Επίσης ρόλο στο είδος της επιμόλυνσης παίζουν τα ειδικά χαρακτηριστικά κάθε ζώου, η προέλευσή του και η εποχή σφαγής του [7].

Η επικράτηση ενός συγκεκριμένου είδους μικροοργανισμού στην επιφάνεια του κρέατος εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επεξεργασία, την αποθήκευση, τη διανομή και τη συντήρηση του [8]. Οι παράγοντες αυτοί οδηγούν στην επικράτηση των E(S)SO (ephemeral (specific) spoilage organisms), μικροοργανισμών που διαθέτουν τελικά τον κατάλληλο μηχανισμό για τον πολλαπλασιασμό τους πάνω από το όριο που χαρακτηρίζει την αλλοίωση. Χωρίζονται σε 5 κατηγορίες οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη [9]

Ενδογενείς (intrinsic)	Δομή του κρέατος a_w , pH, παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων οξειδοαναγωγικό δυναμικό, σύσταση θρεπτικών συστατικών (περιεκτικότητα υδρογονανθράκων και κυρίως γλυκόζης).
Παράγοντες κατά την επεξεργασία (Processing)	Μπορούν να επηρεάσουν τη βασική μικροβιακή κοινότητα του τροφίμου.
Εξωγενείς (extrinsic)	Θερμοκρασία, σχετική υγρασία και σύσταση της ατμόσφαιρας κατά τη διανομή και συντήρηση.
Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες (Implicit)	Αναφέρεται σε φαινόμενα όπως ο ανταγωνισμός και ο συνεργισμός μεταξύ των βακτηρίων.
Συνεργιστικοί παράγοντες (the emergent effects)	Παράγοντες που αλληλεπιδρούν, καταλήγοντας σε φαινόμενα τα οποία είναι εντονότερα από ότι εάν οι παράγοντες αυτοί δρούσαν ο καθένας από μόνος του.

1.4 Κυριότερα αλλοιογόνα βακτήρια

Τα βακτήρια που έχουν τον πρωτεύοντα ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος είναι:

- *Pseudomonads spp*
- *Enterobacteriaceae*
- Γαλακτικά βακτήρια
- *Brochothrix thermosphacta*

Η μικροβιακή χλωρίδα που αναπτύσσεται σε συνθήκες ψύξης παρουσία αέρα αποτελείται από gram-αρνητικά βακτήρια. Οι ψευδομονάδες κυριαρχούν εκτός και αν η ενεργότητα του νερού είναι μικρότερη από 0,98 εξαιτίας του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης παρουσία οξυγόνου. Η αλλοίωση που επιφέρουν χαρακτηρίζεται από έντονες σηπτικές οσμές και από επιφανειακή γλίτσα. Οι ψευδομονάδες δεν αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες, σε 20% CO₂ και σε κρέας αποθηκευμένο υπό κενό.

Από την άλλη πλευρά τα εντεροβακτήρια προκαλούν αλλοίωση είτε σε αερόβιες είτε σε αναερόβιες συνθήκες. Είναι ανθεκτικά στο CO₂ και χρειάζεται συγκέντρωση άνω του 40% για να ανασταλεί η ανάπτυξή τους.

Τα γαλακτικά βακτήρια προκαλούν αλλοίωση ρίχνοντας το pH του κρέατος. Αναπτύσσονται σε αναερόβιες συνθήκες και είναι ανθεκτικά στο CO₂.

Τέλος το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* επιφέρει τη δημιουργία χημικών και βουτυρικών οσμών απουσία οξυγόνου. Η ανάπτυξή τους αναστέλλεται από το συνδυασμό χαμηλού οξυγόνου (<1%) και υψηλής συγκέντρωσης CO₂ (>40%) [14].

Πίνακας 5. Κυρίαρχη αλλοίωση στο νωπό κρέας που αποθηκεύεται στους 0-4°C υπό διάφορες συγκεντρώσεις αερίων [7, 15]

Σύσταση του αέρα	Βακτήρια που αναπτύσσονται
Αέρας	<i>Pseudomonas spp</i>
>50% CO ₂ with O ₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
50% CO ₂	<i>Enterobacteriaceae</i> lactic acid bacteria
<50% CO ₂ with O ₂	<i>B. thermosphacta</i> , lactic acid bacteria
100% CO ₂	Lactic acid bacteria
Αποθήκευση υπό κενό	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>B. thermosphacta</i> , <i>Sh. putrefaciens</i>

1.5 Ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί (SSO)

1.5.1 Δραστηριότητα SSO

Ο όρος «ειδικοί αλλοιογόνοι οργανισμοί» αναφέρεται στους μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση. Οι μικροοργανισμοί SSO καταναλώνουν ως τροφή ουσίες που υπάρχουν στο κρέας κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της εμφάνισής του [6]. Αυτό έχει αρνητικό αντίκτυπο στη διάθεση του καταναλωτή να αγοράσει το προϊόν με συνέπεια το κρέας να μην θεωρείται ποιοτικό. Η μικροβιακή σύσταση διαφέρει από τους SSO, καθώς αρχικά η συγκέντρωση των SSO αποτελεί ένα πολύ μικρό μέρος της μικροβιακής χλωρίδας. Κατά τη διάρκεια συντήρησης του κρέατος όμως οι SSO αυξάνονται με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό από ότι η υπόλοιπη μικροβιακή χλωρίδα καταναλώνοντας ουσίες που υπάρχουν στην επιφάνεια του κρέατος. Κατά το μεταβολισμό των ουσιών αυτών οι μικροοργανισμοί παράγουν ορισμένους μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του κρέατος.[8]

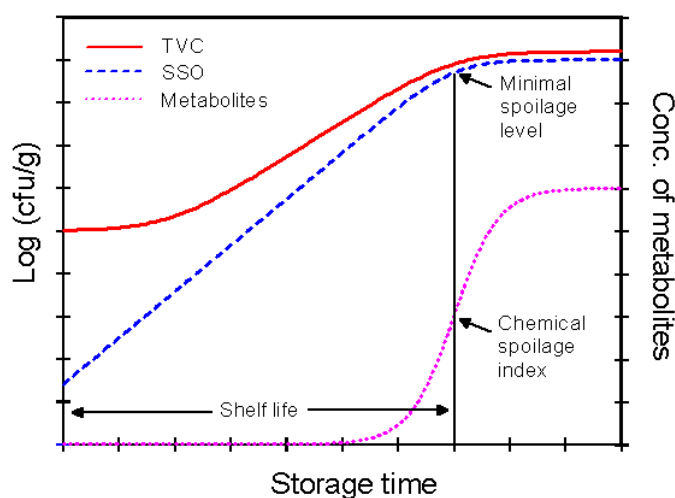
Πίνακας 6. Ουσίες που καταναλώνουν οι SSO

ουσία	Αερόβιες συνθήκες				Αναερόβιες συνθήκες			
	Pseudomonas spp	Brochothrix thermosphacta	Enterobacter spp	Γαλακτικά Βακτήρια	Pseudomonas spp	Brochothrix thermosphacta	Enterobacter spp	Γαλακτικά Βακτήρια
Γλυκόζη/ φωσφορική 6 γλυκόζη	1	1	1	1	1	1	1	1
Γαλακτικό οξύ	2		2					
Πυροσταφυλικό οξύ	3							
Γλυκονικό οξύ/ φωσφορικό 6 γλυκογόνο	4							
Αμινοξέα	5	2	3				2	2
Ριβόζη		3						
Γλυκερόλη		4						

Πίνακας 7. Παραγωγή μεταβολικών προϊόντων κατά τη συντήρηση του κρέατος σε αέρα και σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες (MAP (modified atmosphere packaging)) [10]

Μικροοργανισμοί	Μεταβολικά προϊόντα	
	Αερόβια	Αναερόβια
<i>Pseudomonas</i> spp.	Αμμωνία, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθυλεστέρες, μεθυλεστέρες, πουτρεσκίνη, καδαβερίνη	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη, 3-μεθυλο-βουτανόλη, 3-μεθυλο-βουτανάλη, βουτανεδιόλη	Γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, διακετύλιο, ισο-βουτυρικό οξύ, ισο-βαλερικό οξύ, αιθανόλη, 3-μεθυλο-βουτανόλη, 3-μεθυλο-βουτανάλη, 2,3 βουτανεδιόλη, λιπαρά οξέα
<i>Enterobacter</i> spp.	Εστέρες, υδρόθειο, αμίνες	-
Γαλακτικά βακτήρια	L, D-γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, H ₂ O ₂ , αιθανόλη, λιπαρά οξέα, υδρόθειο	L, D-γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, H ₂ O ₂ , αιθανόλη, λιπαρά οξέα, υδρόθειο

Παρότι η αλλοίωση δεν είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ασφάλεια των τροφίμων η έλλειψη εμπιστοσύνης που δημιουργεί στους καταναλωτές επιφέρει τεράστιες οικονομικές και περιβαλλοντικές συνέπειες. Γι αυτό το λόγο η αλλοίωση χαρακτηρίζεται ως δείκτης που καθορίζει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος.



Σχήμα 1. Επίδραση των SSO στη διάρκεια ζωής του τροφίμου [11].

Όπως φαίνεται στο σχήμα 1 η διάρκεια ζωής μπορεί να προβλεφθεί από:

1. Την αρχική συγκέντρωση των SSO στο τρόφιμο
2. Το ρυθμό αύξησης των SSO
3. Από τη συγκέντρωση των SSO που αντιστοιχεί στο ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης.

Η αλλοίωση των τροφίμων είναι μια δυναμική διαδικασία καθώς υπάρχουν αλλαγές στην πορεία της διαδικασίας και στους διαφορετικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του τροφίμου και τις συνθήκες αποθήκευσης του. Η διαδικασία αυτή οφείλεται στη δραστηριότητα των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών και όχι στην ενζυματική ή χημική δραστηριότητα. Γι αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί μοντέλα που μπορούν να προβλέψουν το ρυθμό ή το στάδιο στο οποίο βρίσκεται η αλλοίωση [12]. Τα μοντέλα αυτά θα πρέπει να επικυρώνονται ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής του τροφίμου. Συγκρίνοντας τις τιμές του μικροβιακού πληθυσμού ενός τροφίμου από μια μικροβιακή ανάλυση με τις τιμές που προβλέπει το μοντέλο για το συγκεκριμένο τρόφιμο μπορούν να υπολογιστούν κάποιοι δείκτες που επικυρώνουν το μοντέλο. Ο ένας είναι ο δείκτης προκατάληψης (Bias Factor) ο οποίος δείχνει τη συστηματική υπέρ- ή υποεκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Τιμές του δείκτη προκατάληψης από 0.85-1.25 δηλώνουν επιτυχή επικύρωση του μοντέλου [13]. Ο δεύτερος δείκτης είναι ο συντελεστής ακριβείας (Accuracy Factor) που περιγράφει τη μέση απόκλιση των πραγματικών τιμών με αυτές που προβλέπει το μοντέλο [14].

1.6 Μικροβιολογία νωπού κρέατος

Το κρέας είναι ευρέως γνωστό ότι μπορεί να αλλοιωθεί γρήγορα όταν αποθηκεύεται σε αερόβιες συνθήκες (υπό την παρουσία ατμόσφαιρας που αποτελείται από αέρα). Η αλλοίωση αυτή προκαλείται από την ταχεία ανάπτυξη των ψευδομονάδων. Ψυχροτροπικά είδη όπως *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, *P. putida* και *P. fluorescens* έχουν απομονωθεί από μη συσκευασμένο κρέας που παρουσιάζει σημάδια αλλοίωσης [16]. Η *P. fluorescens* εμφανίζεται συχνότερα σε νωπά κρέατα, αν και για μεγάλες περιόδους αποθήκευσης του κρέατος κυρίαρχο ρόλο παίζει η *P. fragi*. Υψηλότερες συγκεντρώσεις CO₂ (10%) αναστέλλουν την ανάπτυξη τόσο της *P. fluorescens* όσο και της *P. fragi* στο κόκκινο κρέας. Η *P. fragi* αντιπροσωπεύει το κυρίαρχο είδος ανάμεσα στις ψευδομονάδες ανεξάρτητα της συσκευασίας του κρέατος. Όλα τα υπόλοιπα είδη απαντώνται κατά κύριο λόγο σε μη συσκευασμένο κρέας, δηλαδή υπό αερόβιες συνθήκες. Όταν ο πληθυσμός των ψευδομονάδων φτάσει 10⁷-10⁸ CFU/g σχηματίζεται μια γλίτσα στην επιφάνεια του κρέατος παράγοντας συγχρόνως μια άσχημη σηπτική μυρωδιά. Αυτές όμως οι αλλαγές του κρέατος συμβαίνουν όταν οι ψευδομονάδες έχουν καταναλώσει τα αποθέματα γλυκόζης και γαλακτικού οξέος και έχουν αρχίσει να μεταβολίζουν αζωτούχες ενώσεις, κυρίως αμινοξέα [8]. Όταν η διάχυση της γλυκόζης από το εσωτερικό στην επιφάνεια του κρέατος δεν μπορεί να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες ενός μεγάλου αριθμού βακτηρίων, ξεκινά η αποικοδόμηση πρωτεϊνών και αμινοξέων η οποία συνοδεύεται από την απελευθέρωση αμμωνίας, αμινών και σουλφιδίων [17]. Έτσι εμφανίζεται η χαρακτηριστική σηπτική οσμή του αλλοιωμένου κρέατος. Η πρωτεολυτική δράση των ψευδομονάδων βοηθά τη διεύθυνσή τους στο κρέας. Η δυνατότητα αυτή των πρωτεολυτικών βακτηρίων τους επιτρέπει να αποκτήσουν ανταγωνιστικό πλεονέκτημα έναντι άλλων βακτηριακών ομάδων ή ειδών, καθώς είναι σε θέση να αποκτήσουν πρόσβαση σε νέες πηγές θρεπτικών ουσιών που δεν είναι διαθέσιμες σε άλλα μικρόβια με ασθενέστερες ή καθόλου πρωτεολυτικές ιδιότητες [8].

Το γένος *Shewanella* είναι ένα γένος μικροβίων που εμφανίζεται συχνά στο κρέας και σχετίζεται με την *Pseudomonas spp.* Το είδος *Shewanella putrefaciens* απελευθερώνει ουσίες χαρακτηριστικές της αλλοίωσης του κρέατος καθώς και υδρόθειο. Η ένωση αυτή σε συνδυασμό με μια μυϊκή χρωστική προκαλεί πρασίνισμα του κρέατος. Η *S. putrefaciens* θεωρείται η κύρια αιτία αλλοίωσης σε κρέας συσκευασμένο σε κενό σε θερμοκρασίες ψύξης, ιδιαίτερα σε υψηλές τιμές PH.

Πολλά είδη της οικογένειας Enterobacteriaceae έχουν βρεθεί σε βόειο, αρνίσιο, χοιρινό κρέας, σε κρέας κοτόπουλου και σε εντόσθια. Τα γένη που συμβάλλουν στην αλλοίωση είναι τα: *Serratia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Proteus* και *Hafnia*. Από την άποψη της πιθανότητας να χαλάσει το κρέας, τα πιο σημαντικά είναι τα: *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei* και *Enterobacter (Pantoea) agglomerans*. Το γένος *Serratia* είναι οι πιο συχνό γένος της οικογένειας των Enterobacteriaceae που βρίσκεται στο κρέας. Το *S. liquefaciens*, ειδικότερα, απομονώνεται από κρέας που είναι

αποθηκευμένο σε διάφορες ατμόσφαιρες. Τα *S. grimesii* και *S. proteamaculans* είναι άλλα τέτοια είδη [15].

Τα είδη *Citrobacter freundii* και *Proteus vulgaris* έχουν ανιχνευθεί σε μοσχαρίσιο κιμά αποθηκευμένο σε αερόβια ή τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Το είδος *Hafnia alvei* βρίσκεται συχνά σε κιμά αποθηκευμένο σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα (MAP) ή σε κενό. Εκπρόσωποι του γένους *Rahnella*, η οποία διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αλλοίωσης, έχουν επίσης απομονωθεί από βοείου κρέας συσκευασμένο σε κενό αέρος καθώς και σε κρέας αποθηκευμένο σε MAP στα τελευταία στάδια της αποθήκευσης [18].

1.7 Μικροβιολογία συσκευασμένου κρέατος

Η συσκευασία σε κενό αέρος και σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα ευνοεί τα αναερόβια βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των γαλακτικών βακτηρίων και του *Brochothrix thermosphacta*. Τα γαλακτικά βακτήρια, συγκεκριμένα, είναι άκρως ανταγωνιστικά σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Τα γένη *Lactobacillus*, *Carnobacterium* και *Leuconostoc* σχετίζονται με την αλλοίωση του κατεψυγμένου κρέατος. Τα ψυχρότροφα γαλακτικά βακτήρια, που συναντώνται πιο συχνά στο κρέας, περιλαμβάνουν το *Lactobacillus sakei*, ο οποίος θεωρείται ένας παράγοντας αλλοίωσης του κρέατος που έχει συσκευαστεί σε κενό αέρος και σε MAP. Είναι σαφές από τη σχετική βιβλιογραφία ότι μόνο τα ψυχροτροπικά βακτήρια γαλακτικού οξέος, όπως τα είδη *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. luchuensis*, *Carnobacterium divergens*, *C. maltaromaticum* και *Leuconostoc spp.*, μπορούν να φτάσουν σε μεγάλους αριθμούς κυττάρων σε κρέας συσκευασμένο σε MAP και σε κενό αέρος και που είναι αποθηκευμένο σε θερμοκρασίες ψύξης. Είδη όπως *L. sakei* και *L. algidus* έχουν απομονωθεί από κρέας συσκευασμένο σε κενό στους 4°C. Εάν η θερμοκρασία πέσει στον 1°C, τα *Lactobacillus spp.*, *Weissella spp.* και *Leuconostoc mesenteroides* γίνονται τα κυρίαρχα είδη.

Σε αποθηκευμένο κρέας, το γένος *Carnobacterium* αντιπροσωπεύεται από τα είδη *C. divergens* και *C. maltaromaticum*. Το *C. divergens* έχει απομονωθεί σε δείγματα μη συσκευασμένου και σε κρέας συσκευασμένο σε κενό. Το ψυχροτροπικό βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* θεωρείται σημαντικός αλλοιογόνος μικροοργανισμός. Αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες και σε κρέας συσκευασμένο σε κενό. Έχει απομονωθεί σε δείγματα μοσχαρίσιου κρέατος όπως και σε δείγματα χοιρινού μόνο όμως μέχρι το μισό του χρόνου ζωής του καθώς μετέπειτα τα γαλακτικά βακτήρια υπερσχύουν εξαιτίας των καλύτερων ανταγωνιστικών ικανοτήτων που έχουν [19].

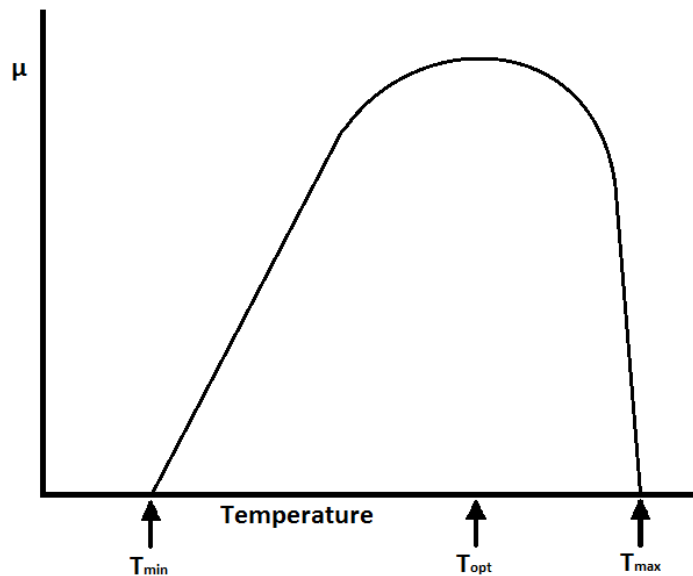
**Πίνακας 8. Τα γένη των βακτηρίων που εντοπίζονται συνήθως στο νωπό κρέας που αποθηκεύεται σε διάφορες συνθήκες [20].
(MAP (modified atmosphere packaging), VP (vacuum packaging))**

Gram θετικό	Συνθήκες αποθήκευσης			Gram αρνητικό	Συνθήκες αποθήκευσης		
	Αέρας	MAP	VP		Αέρας	MAP	VP
Bacillus	+		+	Achromobacter	+		
Brochothrix	+	+	+	Acinetobacter	+	+	+
Carnobacterium	+	+	+	Aeromonas	+		+
Corynebactenum	+			Alcaligenes	+	+	+
Clostridium			+	Alteromonas	+	+	+
Enterococcus	+	+		Campylobacter	+		
Kocuria	+			Chromobacterium	+		
Kurthia	+			Citrobacter	+	+	
Lactobacillus	+	+	+	Enterobacter	+	+	
Lactococcus	+			Escherichia	+		
Leuconostoc	+	+	+	Flavobacterium	+		
Listeria	+	+		Hafnia	+	+	+
Microbacterium	+	+	+	Klebsiella	+		
Micrococcus	+	+		Kluyvera	+		
Paenibacillus	+			Moraxella	+		
Staphylococcus	+	+	+	Pantoea	+		+
Streptococcus	+	+		Proteus	+	+	
Weissella	+	+	+	Providencia	+	+	+
				Pseudomonas	+	+	+
				Serratia	+	+	+
				Shewanella	+		
				Vibrio	+		
				Yersinia	+		+
				Moraxella	+		

1.8 Κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη βακτηριακή ανάπτυξη στο κρέας

1.8.1 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την αλλοίωση και την ασφάλεια του κρέατος [8]. Η μεταφορά του προϊόντος από τη στιγμή αγοράς από τον καταναλωτή έως ότου φτάσει στο σπίτι είναι ένα σημείο που δεν μπορούν να προβλεφθούν πιθανές επιδράσεις της εναλλαγής της θερμοκρασίας στο κρέας. Το πιο πιθανό αποτέλεσμα είναι η μείωση της διάρκειας ζωής του προϊόντος όπως προβλέπεται από τον παραγωγό, ο οποίος μπορεί να εγγυηθεί το shelf life του κρέατος για συγκεκριμένες θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας, συσκευασίας και μέχρι τη μεταφορά στη λιανική. Η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να λάβει χώρα σε ένα εύρος θερμοκρασιών από -12°C έως 100°C σε ατμοσφαιρική πίεση. Η πιο σημαντική απαίτηση είναι το νερό να βρίσκεται σε υγρή μορφή και να είναι διαθέσιμο.



Σχήμα 2. Ρυθμός ανάπτυξης μ των μικροοργανισμών συναρτήσει της θερμοκρασίας

Η παραπάνω γραφική παράσταση σχετίζει το ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε σχέση με τη θερμοκρασία. Μπορούμε να πούμε ότι κάθε μικροοργανισμός έχει μια ελάχιστη και μια μέγιστη τιμή θερμοκρασίας στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί. Αυτές είναι γνωστές ως θεμελιώδεις θερμοκρασίες και σε μεγάλο βαθμό χαρακτηριστικές για κάθε οργανισμό αν και επηρεάζονται από τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών, το pH και το a_w . Με βάση τις θεμελιώδεις θερμοκρασίες οι μικροοργανισμοί μπορούν να ταξινομηθούν σε κατηγορίες οι οποίες παρατίθενται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Προτιμώμενες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη μικροβιακών ομάδων [21]

Μικροβιακή ομάδα	Ελάχιστη Θερμοκρασία (°C)	Βέλτιστη Θερμοκρασία (°C)	Μέγιστη Θερμοκρασία (°C)
ψυχρόφιλα	-12	5-15	20
ψυχρότροφα	-8	20-25	35
μεσόφιλα	5	30-45	50
θερμόφιλα	35	45-60	70
εξαιρετικά θερμόφιλα	70	85-90	100

Στη μικροβιολογία τροφίμων σημαντικότερο ρόλο παίζουν οι μεσόφιλοι και οι ψυχρότροφοι οργανισμοί. Κατά κανόνα οι μεσόφιλοι οργανισμοί αναπτύσσονται πιο γρήγορα στη βέλτιστη για αυτούς θερμοκρασία σε σχέση με τους ψυχρότροφους και έτσι η αλλοίωση των προϊόντων που είναι αποθηκευμένα στο θερμοκρασιακό εύρος που ευνοεί τους μεσόφιλους είναι ταχύτερη από ότι η αλλοίωση σε συνθήκες ψύξης. Μεταξύ των μικροοργανισμών που είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να γίνει μια διάκριση. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που χαρακτηρίζονται ως πραγματικά ή αυστηρά ψυχρόφιλοι, που η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξή τους είναι 12°C-15°C και δεν μπορούν να αυξηθούν πάνω από 20°C. Αποτέλεσμα αυτής της ευαισθησίας σε ήπιες θερμοκρασίες είναι να περιορίζεται η ανάπτυξη των ψυχρόφιλων σε πολικές θερμοκρασίες. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει μικροοργανισμούς που χαρακτηρίζονται ως ψυχρότροφοι ή προαιρετικά ψυχρόφιλοι, οι οποίοι θα αναπτυχθούν στις ίδιες χαμηλές θερμοκρασίες όπως οι αυστηρά ψυχρόφιλοι αλλά έχουν υψηλότερη βέλτιστη και μέγιστη θερμοκρασία ανάπτυξης. Η αντοχή αυτή των ψυχρότροφων σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών τους καθιστά ιδιαίτερα σημαντικούς στην αλλοίωση κρέατος που διατηρείται με απλή ψύξη. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που γίνεται εμφανές από το σχήμα είναι ότι η καμπύλη είναι ασύμμετρη. Η ανάπτυξη μειώνεται ταχύτερα πάνω από τη βέλτιστη θερμοκρασία παρά κάτω από αυτήν. Καθώς η θερμοκρασία πέφτει κάτω από τη βέλτιστη ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται ως αποτέλεσμα εν μέρη της επιβράδυνσης της ενζυμικής δραστηριότητας εντός του κυττάρου. Τη σημαντικότερη συμβολή στην επιβράδυνση και ενδεχόμενη παύση της μικροβιακής ανάπτυξης σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι οι αλλαγές στην δομή της κυτταρικής μεμβράνης που εμποδίζει την παροχή των ενζυμικών συστημάτων με θρεπτικά συστατικά. Οι μικροοργανισμοί που είναι ανθεκτικοί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες έχουν το χαρακτηριστικό ότι η μεμβράνη των κυττάρων τους περιέχει λιπαρά οξέα με μικρότερου μήκους ανθρακική αλυσίδα κάτι που σημαίνει ότι έχουν μικρότερο σημείο τήξης καθιστώντας τις μεμβράνες ικανές να παραμένουν υγρές και λειτουργικές σε χαμηλές θερμοκρασίες. Καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται πάνω από τη βέλτιστη, ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων μειώνεται πολύ πιο γρήγορα εξαιτίας της μη αναστρέψιμης μετουσίωσης των πρωτεϊνών του κρέατος και της θερμικής διάσπασης

της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο πιο γρήγορα θανατώνονται οι μικροοργανισμοί [22].

1.8.2 Συγκέντρωση γλυκόζης

Όλα τα βακτήρια που προκαλούν αλλοίωση του κρέατος καταναλώνουν ως μέσο για την ανάπτυξη τους διαλυτές ενώσεις που περιέχονται στο μυϊκό ιστό και ειδικότερα γλυκόζη και αμινοξέα. Η γλυκόζη αποτελεί την βασικότερη οργανική ουσία που χρησιμοποιούν όλα τα βακτήρια για την ανάπτυξή τους. Όταν αυτή βρίσκεται στα επιφανειακά στρώματα του κρέατος τότε δεν συμβαίνει καμία υποβάθμιση άλλων ουσιών. Όταν όμως τα αποθέματα γλυκόζης τελειώσουν τα βακτήρια στρέφονται σε εναλλακτικές ενεργειακές πηγές όπως τα αμινοξέα, η αμμωνία και σε κάποιες μικρές ποσότητες οργανικών σουλφιδίων και αμινών που υπάρχουν στο κρέας προκαλώντας δυσάρεστες οσμές στο κρέας [23]. Το ποσό της γλυκόζης στο κρέας αποτελεί παράγοντα που καθορίζει τη σχέση μεταξύ της ανάπτυξης των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και του χρόνου που εμφανίζεται η αλλοίωση. Υπό φυσιολογικές τιμές PH η συγκέντρωση της γλυκόζης κυμαίνεται από 100-1000μg ανά γραμμάριο κρέατος. Αισθητικές αποκλίσεις αρχίζουν να γίνονται ορατές όταν ο βακτηριακός πληθυσμός φτάσει στα 10^8 CFU/g και όταν τα επίπεδα της γλυκόζης κυμαίνονται περί τα 100μg. Αν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι υψηλότερη (1000μg/g) τότε οι αισθητικές αλλαγές όπως η επιφανειακή γλίτσα και οι δυσάρεστες οσμές συμβαίνουν όταν τα μικρόβια φτάσουν στα 10^9 CFU/g. Όταν το PH είναι υψηλό, η συγκέντρωση της γλυκόζης θα είναι χαμηλή και η αλλοίωση θα γίνεται εμφανής στα 10^6 CFU/g μικρόβια.

1.8.3 PH

Το PH συνδέεται έμμεσα με την αλλοίωση του κρέατος. Κρέας με υψηλότερες τιμές από το φυσιολογικό (6 και άνω) τείνει να αλλοιωθεί πιο γρήγορα. Τα περισσότερα βακτήρια έχουν μέγιστη τιμή PH γύρω στο 7 και ελάχιστη γύρω στο 5 για την ανάπτυξή τους. Χαμηλότερες τιμές PH στο κρέας οδηγούν στη μετουσίωση των μυϊκών πρωτεϊνών και σε μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού [24].

1.8.4 Ενεργότητα ύδατος (A_w)

Η ενεργότητα ύδατος είναι σε συνεργασία με τη θερμοκρασία ο κυριότερος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Σε κρέας με $a_w > 0,95$ η επικρατούσα μικροβιακή χλωρίδα περιλαμβάνει τα *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Moraxella* και *Bacillus*. Τα βακτήρια αυτά προκαλούν αλλοίωση του χρώματος και δημιουργούν επιφανειακή γλίτσα. Σε κρέας συντηρημένο σε αναερόβιες συνθήκες για $a_w > 0,95$ και σε χαμηλές θερμοκρασίες τα γαλακτικά βακτήρια επικρατούν παράγοντας οξέα προκαλώντας πρασίνισμα του κρέατος και γλίτσα. Σε πολύ υψηλές τιμές a_w και σε υψηλές θερμοκρασίες το *Clostridium* spp. επικρατεί, προκαλώντας τοξικές οσμές από τον αναερόβιο καταβολισμό των πρωτεϊνών [25].

1.9 Χημικές αλλαγές κατά την αλλοίωση του κρέατος

Η αλλοίωση του κρέατος οφείλεται στους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται πάνω σε αυτό. Τα ενδογενή ένζυμα δεν παίζουν κανένα σημαντικό ρόλο καθώς η δραστηριότητα τους καθίσταται ανενεργή μετά τη μεταθανάτια γλυκόλυση που επέρχεται στο κρέας. Κατά αυτόν τον τρόπο η μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών με την παραγωγή πτητικών και μη ουσιών, αλλά και πρόδρομων μορίων κατά το μεταβολισμό των θρεπτικών ουσιών που υπάρχουν στο κρέας, θεωρείται υπεύθυνη για την αλλοίωση του κρέατος. Οι κυριότερες μεταβολές που συμβαίνουν στο κρέας κατά την αλλοίωση του είναι οι αλλαγές στο χρώμα και στην υφή της επιφάνειάς του καθώς και η παραγωγή δύσοσμων ουσιών. Οι μεταβολές αυτές παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον παρακάτω πίνακα [8].

Πίνακας 10. Συχνές μεταβολές σε προϊόντα κρέατος από συνήθη βακτήρια [15, 26]

Μεταβολή	Προϊόντα κρέατος	Βακτήρια
Γλίτσα	Κρέας	Pseudomonas, Lactobacillus, Enterococcus, Weissella, Brochothrix
Πρασίνισμα H ₂ O ₂	Κρέας	Weissella, Leuconostoc, Enterococcus, Lactobacillus
Πρασίνισμα H ₂ S	Κρέας αποθηκευμένο υπό κενό	Shewanella
Παραγωγή H ₂ S	Ώριμο κρέας	Vibrio, Enterobacteriaceae
Θειώδης οσμή	Κρέας αποθηκευμένο υπό κενό	Clostridium, Hafnia
Οσμή λαχανικών	Μπέικον	Providencia
Σήψη	Ζαμπόν	Enterobacteriaceae, Proteus
Μόλυνση οστών	Σύνολο των κρεάτων	Clostridium, Enterococcus
Οξύνιση	Ζαμπόν	Lactic acid bacteria, Enterococcus, Micrococcus, Bacillus, Clostridium

Η ανίχνευση των μεταβολικών προϊόντων που παράγουν οι επικρατούντες αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί από τον καταβολισμό των θρεπτικών συστατικών είναι σημαντική και ένδειξη της αλλοίωσης του κρέατος. Γι αυτό το λόγο καταβάλλεται ερευνητική προσπάθεια ώστε να εντοπίζονται έγκαιρα αυτές οι ουσίες. Αρκετές μικροβιακές μελέτες έχουν αναδείξει τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν οι μικροοργανισμοί. Για παράδειγμα έχει γίνει γνωστό ότι οι Ψευδομονάδες και συγκεκριμένα η *P.fragi* είναι το μοναδικό βακτήριο που παράγει αιθυλεστέρες σε αερόβιες συνθήκες αποθήκευσης του κρέατος. Λόγω της αριθμητικής κυριαρχίας των ψευδομονάδων σε φυσικά επιμολυσμένο κρέας, οι αιθυλεστέρες είναι σημαντικός δείκτης αλλοίωσης. Έχουν μια γλυκιά, φρουτώδη οσμή και η παραγωγή τους συμπίπτει με τα αρχικά στάδια της αλλοίωσης. Οι ψευδομονάδες παράγουν επίσης διάφορες ενώσεις του θείου. Οι ενώσεις αυτές έχουν μια χαρακτηριστική σηπτική οσμή και παράγονται στα τελικά στάδια της αλλοίωσης. Παρά το γεγονός ότι πολλά στελέχη των εντεροβακτηρίων παράγουν τις ίδιες ουσίες με τις ψευδομονάδες υπάρχουν δύο διαφορές που μας κάνουν να διακρίνουμε την παρουσία καθενός από τους δύο μικροοργανισμούς σε αλλοιωμένο κρέας. Η μία είναι ότι τα εντεροβακτήρια σχηματίζουν σουλφίδια του υδρογόνου σε αντίθεση με τις ψευδομονάδες οι οποίες σχηματίζουν αποκλειστικά αυτές διμεθυλοσουλφίδια. Τα εντεροβακτήρια και κάποια στελέχη του *Brochothrix thermosphacta* παράγουν κατά το μεταβολισμό τους κάποιες αλκοόλες και οξέα. Πολλά πειράματα εμβολιασμού σε *pure* υπόστρωμα έχουν δείξει υψηλές συγκεντρώσεις ακετοΐνης/διακετυλίου που οφείλονται στα Εντεροβακτήρια και στο *Brochothrix thermosphacta*. Οι συγκεντρώσεις ακετοΐνης/διακετυλίου ανιχνεύονται στα αρχικά στάδια της αλλοίωσης όπως κάνουν και οι εστέρες. Στα προηγμένα στάδια της αλλοίωσης υπάρχει μια μείωση της συγκέντρωσης των ουσιών αυτών που οφείλεται στο γεγονός ότι οι ψευδομονάδες μεταβολίζουν αυτές τις ουσίες. Η ακετοΐνη, το διακετύλιο και η 3-μεθυλοβουτανόλη που παράγεται από το *Brochothrix thermosphacta* είναι ουσίες που συνδέονται με το μπαγιάτεμα του κρέατος που γίνεται αντιληπτό με ένα κρεμώδες, τυρώδες άρωμα. Γενικά τα θετικά κατά Gram βακτήρια δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση υπό αερόβιες συνθήκες. Η έκκριση αμμωνίας που είναι υπεύθυνη για την αύξηση του PH στα προηγμένα στάδια της αλλοίωσης από πολλά μικρόβια οφείλεται στο μεταβολισμό των αμινοξέων. Επιπλέον ο μεταβολισμός των αμινοξέων οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων αμινών, όπως η πουτρεσκίνη και η καδαβερίνη [27].

Η αλλοίωση του κρέατος που συντηρείται σε συνθήκες κενού ή τροποποιημένων ατμοσφαιρών έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά. Οι βαριές, σηπτικές οσμές που εκκρίνει το αλλοιωμένο κρέας σε αερόβιες συνθήκες αντικαθίσταται από ελαφριές, όξινες μυρωδιές. Αυτές οι μυρωδιές προκύπτουν από τα τελικά, όξινα προϊόντα της ζύμωσης της γλυκόζης, δηλαδή της κύριας διαδικασίας που παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια για την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Όταν τα αποθέματα γλυκόζης είναι ελλιπή σε κρέατα με υψηλό PH τότε οι οργανισμοί χρησιμοποιούν τη ριβόζη όπως κάνει το *Brochothrix thermosphacta* ή εναλλακτικά τη γλυκερόλη. Η απουσία οξυγόνου και η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άνθρακα είναι οι αιτίες καταστολής της

ανάπτυξης των αρνητικά κατά Gram βακτηρίων όπως οι ψευδομονάδες. Η επικράτηση των γαλακτικών βακτηρίων και του *Brochothrix thermosphacta* σε τέτοιες συνθήκες επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής του κρέατος καθώς ο μεταβολισμός των θρεπτικών συστατικών που χρειάζονται είναι βραδύτερος [28]. Τα γαλακτικά βακτήρια χωρίζονται σε δύο κατηγορίες με βάση τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθούν, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά. Τα ομοζυμωτικά είδη (homofermenters) μετατρέπουν τη γλυκόζη σε 90% γαλακτικό οξύ κατά το γλυκολυτικό σχήμα Embden-Meyerhof, ενώ τα ετεροζυμωτικά είδη (heterofermenters) μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα (κύκλος φωσφοροπεντοζών). Η συσσώρευση γαλακτικού οξέος όπως και η παραγωγή οξικού οξέος από τη στροφή από τον ομοζυμωτικό στον ετεροζυμωτικό μεταβολισμό των γαλακτικών βακτηρίων αποτελούν αξιόπιστο μέσο για την παρακολούθηση της ποιότητας του κρέατος και την κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης. Τα εντεροβακτήρια είναι ο κύριος παραγωγός της καδαβερίνης ενώ η πουτρεσκίνη παράγεται από τη συνεργιστική δράση εντεροβακτηρίων και γαλακτικών βακτηρίων. Τα γαλακτικά βακτήρια παράγουν ορνιθίνη από την αργινίνη η οποία στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνεται προς πουτρεσκίνη από τα εντεροβακτήρια [8, 29].

Πίνακας 11. Παράγοντες και πρόδρομες ουσίες που επηρεάζουν την παραγωγή οσμών τελικών προϊόντων των αρνητικών κατά Gram βακτηριδίων (π.χ. *Pseudomonas spp.*, *Shewanella putrefaciens*, *Moraxella*) [15]

Τελικό προϊόν	Κρέας/τύπος κρέατος	Παράγοντες	Πρόδρομες ουσίες
Ενώσεις του θείου Σουλφίδια	+	Θερμοκρασία και υπόστρωμα (γλυκόζη) περιορισμός	Κυστίνη, κυστεΐνη, μεθειονίνη
Διμεθυλο σουλφίδιο	+		Μεθανοθειόλη, μεθειονίνη
Διμεθυλο Δισουλφίδιο	+		Μεθειονίνη
Μεθυλ-μερκαπτάνη	+		Μη διαθέσιμα δεδομένα
Μεθανοθειόλη	+		Μεθειονίνη
Υδρόθειο	± (Παραγωγή μόνο από <i>Shewanella putrefaciens</i>)	Υψηλό pH	Κυστίνη, κυστεΐνη
Διμεθυλο- τρισουλφίδιο	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα	Μεθειονίνη, μεθανοθειόλη
Εστέρες Μεθυλεστέρες (οξικό)	+	Χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης	Μη διαθέσιμα δεδομένα
Αιθυλεστέρες (οξικό)	+	Χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης	Μη διαθέσιμα δεδομένα
Κετόνες	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα	Μη διαθέσιμα δεδομένα
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	+		
Αλειφατικοί υδρογονάνθρακες	+		
Αλδεΐδες 2-μεθυλοβουτανόλη	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα	Ισολευκίνη
Αλκοόλες Μεθανόλη	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα	Μη διαθέσιμα δεδομένα
Αιθανόλη	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα	Μη διαθέσιμα δεδομένα
2-μεθυλοπροπανόλη	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα	Βαλίνη
2-μεθυλοβουτανόλη	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα	Ισολευκίνη
Άλλες ενώσεις Αμμωνία	+	Χαμηλή συγκέντρωση γλυκόζης.	Αμινοξέα

Πίνακας 12 Τελικά προϊόντα του βακτηρίου *Brochothrix thermosphacta* σε πρότυπο σύστημα με βάση το κρέας ή σε φυσικά χαλασμένο κρέας (M) ή πουλερικά (P) [15]

Τελικό προϊόν	M/P	Παράγοντες	Πρόδρομες ουσίες
Αερόβιες συνθήκες Ακετοΐνη	+	Γλυκόζη (h), pH (h/l), T (h/l)	Γλυκόζη (mj), αλανίνη (mn), διακετύλιο
Οξικό οξύ	+	Γλυκόζη (h), pH (h/l), T (h/l)	Γλυκόζη (mj), αλανίνη (mn)
L-γαλακτικό οξύ	np	Θερμοκρασία (h), pH (h), O ₂ (l)	Γλυκόζη
Μυρμηκικό οξύ	+	Θερμοκρασία (h), pH (h),	Γλυκόζη
Αιθανόλη	+	Θερμοκρασία (h), Γλυκόζη	nad
CO ₂	+	nad	Γλυκόζη
Ισο-βουτυρικό οξύ	+	Γλυκόζη (l), Θερμοκρασία (l), pH (h)	Βαλίνη, λευκίνη
Ισο-Valeric οξύ	+	Γλυκόζη (l), T (l), pH (h)	Βαλίνη, λευκίνη
2-μεθυλοβουτυρικό	+	Γλυκόζη (l), pH (h)	Ισο-λευκίνη
3-μεθυλοβουτανόλη	+	Γλυκόζη (h), pH (l)	nad
2,3-βουτανοδιόλη	+	Γλυκόζη (h), T (h/l)	Διακετύλιο
Διακετύλιο	+	nad	nad
2-μεθυλοπροπανόλη	+	Γλυκόζη (h)	Βαλίνη
L-γαλακτικό οξύ	+	Γλυκόζη (h), pH (h), T (ns)	Γλυκόζη
Οξικό οξύ	+	O ₂ (h), Γλυκόζη (l)	Γλυκόζη
Αιθανόλη	+	T (h), pH (h)	nad
Μυρμηκικό	+	T (h), pH (h)	nad

(h): υψηλό pH, συγκέντρωση γλυκόζης, ή θερμοκρασία αποθήκευσης

(l): χαμηλό pH, συγκέντρωση γλυκόζης, ή θερμοκρασία αποθήκευσης

(h/l): αντιφατικά αποτελέσματα

(ns): ασήμαντος παράγοντας

(mj): σημαντική συμβολή

(mn): μικρή συμβολή

(np): δεν υπάρχει παραγωγή κάτω από αυστηρά αερόβιες συνθήκες

nad: δεν υπάρχουν στοιχεία

T: θερμοκρασία.

Πίνακας 13. Παράγοντες και πρόδρομες ουσίες που επηρεάζουν το μέγιστο σχηματισμό των τελικών προϊόντων των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (*Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* spp., *Carnobacterium* sp.) σε πρότυπο σύστημα με βάση το κρέας ή σε φυσικά χαλασμένο κρέας [15]

Τελικό προϊόν	Ομοζυμωτικών	Ετεροζυμωτικών
L -γαλακτικό οξύ	+	+
D -γαλακτικό οξύ	+	+
Οξικό οξύ	+	+
Ακετοΐνη / διακετύλιο	+	Μη διαθέσιμα δεδομένα
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	+	-
Μυρμηκικό οξύ	+	+
Αιθανόλη	+	+

1.10 Σκοπός της μελέτης

Η ανάγκη των σημερινών βιομηχανιών τροφίμων απαιτεί μη επεμβατικές μεθόδους που δίνουν άμεσα πληροφορίες για την κατάσταση των τροφίμων ώστε να προληφθούν οι κατασχέσεις τους που οδηγούν σε σοβαρές οικονομικές απώλειες και να προστατευτούν οι καταναλωτές. Ο στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν να μελετηθούν νέες, σύγχρονες, ταχείες μέθοδοι στον τομέα της αλλοίωσης των τροφίμων και να ερευνηθεί η αποτελεσματικότητά τους. Εξετάστηκαν τα δεδομένα από την εξέλιξη της μικροβιακής χλωρίδας σε δείγματα βόειου κρέατος σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες μελετώντας ταυτόχρονα και κάποια οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επίσης, έγινε συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων που λήφθηκαν από τα φασματοσκοπικά όργανα FTIR και VideometerLab. Συσχετίζοντας τα φασματοσκοπικά δεδομένα με τα δεδομένα της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης με χρήση πολυμεταβλητής στατιστικής έγινε προσπάθεια για ποσοτικοποίηση των μεταβολικών προϊόντων των μικροβίων που αποτελούν δείκτες αλλοίωσης. Τέλος, με την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων έγινε ο ποιοτικός χαρακτηρισμός των δειγμάτων κρέατος μετά την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σε ομάδες που καθορίζονται *a priori* με βάση τα όρια του αριθμού των μικροοργανισμών που μπορούν να χαρακτηρίσουν ένα τρόφιμο ως αλλοιωμένο σύμφωνα με την κοινοτική νομοθεσία.

Βιβλιογραφία 1^{ου} κεφαλαίου

1. Adams, M. R., and M. O. Moss. "**The microbiology of food preservation.**" (2007).
2. Cross, H. R., Ron Moen, and M. S. Stanfield. "**Training and testing of judges for sensory analysis of meat quality [Textural properties].**" *Food Technology* (1978).
3. Warriss, Paul D. "**Meat science. Cabi**", 2001.
4. Mancini, R. A., and MCy Hunt. "**Current research in meat color.**" *Meat science* 71.1 (2005): 100-121.
5. Huff-Lonergan, Elisabeth, and Steven M. Lonergan. "**Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes.**" *Meat science* 71.1 (2005): 194-204.
6. Μπλούκας, Ι. Γ. "**Τεχνολογία κρέατος**" εκδόσεις Σταμούλης Αθήνα (2007).
7. Paramithiotis, Spiros, P. N. Skandamis, and George-John E. Nychas. "**Insights into fresh meat spoilage.**" *Safety of meat and processed meat*. Springer New York, 2009. 55-82.
8. Nychas, George-John E., et al. "**Meat spoilage during distribution.**" *Meat Science* 78.1 (2008): 77-89.
9. Nychas, G. J. E., P. N. Skandamis, and J. N. Sofos. "**Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP).**" *Improving the safety of fresh meat* (2005): 461-502.
10. Νυχάς, Γ.Ι. "**Σημειώσεις στη Μικροβιολογία Τροφίμων**" Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.
11. Dalgaard, Paw, Lone Gram, and Hans Henrik Huss. "**Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres.**" *International Journal of Food Microbiology* 19.4 (1993): 283-294.
12. Dalgaard, Paw, Peter Buch, and Steen Silberg. "**Seafood Spoilage Predictor—development and distribution of a product specific application software.**" *International Journal of Food Microbiology* 73.2 (2002): 343-349.
13. Mejlholm, Ole, and Paw Dalgaard. "**Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for psychrotolerant Lactobacillus spp. in seafood and meat products.**" *International journal of food microbiology* 167.2 (2013): 244-260.
14. Ross, T. "**Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology.**" *Journal of Applied Bacteriology* 81.5 (1996): 501-508.
15. Borch, Elisabeth, Marie-Louise Kant-Muermans, and Ylva Blixt. "**Bacterial spoilage of meat and cured meat products.**" *International journal of food microbiology* 33.1 (1996): 103-120.
16. Nychas, George-John E., Douglas L. Marshall, and John N. Sofos. "**Meat, poultry, and seafood.**" (2007): 105-140.

17. Doulgeraki, Agapi I., et al. "**Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions.**" *International journal of food microbiology* 157.2 (2012): 130-141.
18. Kameník, Josef. "**The microbiology of meat spoilage: a review.**"
19. Marshall, DOUGLAS L., and M. F. Bal'a. "**Microbiology of meats.**" *Meat science and applications* (2001): 149-169.
20. Casaburi, Annalisa, et al. "**Bacterial populations and the volatilome associated to meat spoilage.**" *Food microbiology* 45 (2015): 83-102.
21. Feiner, Gerhard. "**Meat products handbook: Practical science and technology.**" Elsevier, 2006.
22. Adams, M.R., Moss, M.O. "**Third Edition Food Microbiology**" Royal Society of Chemistry, 2008
23. Bell, R. GRAHAM. "**Meat packaging: Protection, preservation, and presentation.**" *Meat science and applications* (2001): 463-490.
24. Robinson, Richard K. "**Encyclopedia of food microbiology.**" Ed. Carl A. Batt. Academic press, 1999.
25. Oyarzabal, Omar A., Backert, Steffen "**Microbial Food Safety**" Springer 2012 New York
26. Skandamis, Panagiotis N., and George-John E. Nychas. "**Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions.**" *International journal of food microbiology* 79.1 (2002): 35-45.
27. Dainty, R. H., and B. M. Mackey. "**The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes.**" *Journal of Applied Bacteriology* 73.s21 (1992): 103s-114s.
28. Koutsoumanis, K. P., I. Geornaras, and J. N. Sofos. "**Microbiology of land muscle foods.**" *Food science and technology-New York-Marcel Dekker-* 149.1 (2006): 52.
29. Stutz, H. K., et al. "**Bacteria and volatile compounds associated with ground beef spoilage.**" *Journal of Food Science* 56.5 (1991): 1147-1153.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΟΡΓΑΝΑ

2.1 Ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος με βάση τους μεταβολίτες

Περισσότερες από 50 μέθοδοι (οργανοληπτικές, φυσικοχημικές, μικροβιολογικές) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της αλλοίωσης ή της επιμόλυνσης του κρέατος. Το γεγονός όμως, ότι οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους είναι χρονοβόρες, παρέχοντας αναδρομικές πληροφορίες, απαιτώντας παράλληλα πολύ καλά εκπαιδευμένο προσωπικό, τις καθιστά μη εύχρηστες στις βιομηχανίες κρέατος [1].

Γι αυτό το λόγο οι πλέον πρόσφατες έρευνες έχουν στραφεί στη χρήση αναλυτικών μεθόδων που με βάση μαθηματικές εξισώσεις προσπαθούν να προβλέψουν την κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Χρησιμοποιώντας ως δείκτες της αλλοίωσης τα μεταβολικά προϊόντα των βακτηρίων που αναπτύσσονται στο κρέας μπορεί να γίνει μια έγκυρη πρόβλεψη του σταδίου που έχει προχωρήσει η αλλοίωση δημιουργώντας κάποια μοντέλα πρόβλεψης. Οι μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται ως δείκτες αλλοίωσης θα πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια:

- να βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα ή να είναι απόντες στο νωπό κρέας.
- να αυξάνονται αναλογικά με την περίοδο αποθήκευσης
- να παράγονται από την κυρίαρχη χλωρίδα και να σχετίζονται με οργανοληπτικά χαρακτηριστικά

Ένας νέος κλάδος της μικροβιολογίας, η προρρητική μικροβιολογία (predictive microbiology) προσεγγίζει με μεγαλύτερη ακρίβεια την κατάσταση της αλλοίωσης συσχετίζοντας πολυπαραγοντικές, αναλυτικές τεχνικές με μικροβιολογικές και φυσικοχημικές παραμέτρους [2]. Η πολυπαραγοντική ανάλυση περιλαμβάνει τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων για διάφορες μεταβλητές και ιδιότητες του κρέατος. Στη συνέχεια ένα μαθηματικό μοντέλο χρησιμοποιείται για να περιγράψει την αλληλεπίδραση (interaction) μεταξύ των μεταβλητών. Διαφορετικά πολυπαραγοντικά μοντέλα χρησιμοποιούνται για διαφορετικό σκοπό όπως η ανάλυση πιθανοτήτων, η ανάλυση σημαντικών παραγόντων και η ανάλυση της χρονικής εξέλιξης των δειγμάτων. Χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές μεθόδους μπορούμε να πάρουμε δεδομένα για τη χημική σύνθεση του δείγματος. Ενδεχόμενες αλλαγές στο φάσμα του δείγματος με την πάροδο του χρόνου μπορούν να συσχετισθούν με τη μικροβιακή μεταβολική δραστηριότητα. Η μετέπειτα ποσοτικοποίηση των μεταβολικών προϊόντων με στατιστικές μεθόδους όπως η PLS-R μπορεί να προσδιορίσει το στάδιο της αλλοίωσης και το είδος της. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο φασματοσκοπικές μέθοδοι που εκπέμπουν ακτινοβολία με μήκος κύματος από το ορατό φάσμα έως το εγγύς υπέρυθρο.

2.2 Ανάλυση πολυφασματικών εικόνων (multispectral imaging)

Η πρώτη μέθοδος είναι η ανάλυση της εικόνας που λαμβάνεται για κάθε δείγμα κρέατος από το όργανο VideometerLab. Το όργανο αυτό είναι πολύ εύκολο στη χρήση ενσωματώνοντας τη φωτογραφική κάμερα και την τεχνολογία των υπολογιστών με την προηγμένη ψηφιακή ανάλυση εικόνας και διάφορες στατιστικές. Παρέχει μια γρήγορη εκτίμηση της ομοιομορφίας ακόμη και ανομοιογενών δειγμάτων από το συνδυασμό όλων των παραπάνω παραμέτρων. Δεν απαιτεί καμία προετοιμασία του δείγματος και το δείγμα παραμένει άθικτο μετά την έξοδο από το όργανο. Χρησιμοποιώντας τεχνολογία LED συνδυάζει μετρήσεις από 18 μήκη κύματος σε μία ενιαία, υψηλής ανάλυσης, πολυφασματική εικόνα. Κάθε pixel στην εικόνα αποτελεί ένα φάσμα.

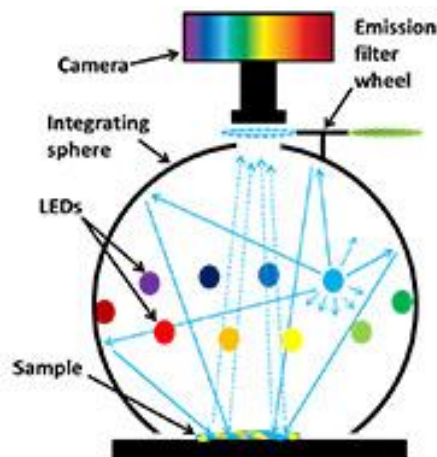


Εικόνα 3. VideometerLab

Χαρακτηριστικά οργάνου [3]

- Η σφαίρα ενσωμάτωσης παρέχει ομοιογενή και διάχυτο φωτισμό
- Πολυφασματική ανάλυση σε λιγότερο από 6 δευτερόλεπτα
- Μέχρι 19 φασματικές ζώνες στο εύρος 405 nm έως 970 nm
- Επιλογή φθορισμού διαθέσιμη
- Κάμερα υψηλής ανάλυσης CCD (2056x2056 pixels)
- Βελτιωμένη αναλογία σήματος-θορύβου από ατομικές και αυτοματοποιημένες προσαρμογές της έντασης του φωτός σε κάθε ζώνη μήκους κύματος
- Βελτιωμένος προσδιορισμός του χρώματος σε σύγκριση με την παραδοσιακή τεχνολογία RGB
- Αυξημένη σταθερότητα λόγω της τεχνολογίας LED

Το σύστημα καταγράφει τις ανακλάσεις στην επιφάνεια του δείγματος με μία μονοχρωματική πρότυπη συσκευή. Ένα δείγμα κρέατος τοποθετείται μέσα σε μια σφαίρα Ulbricht (μια σφαίρα λευκή στο εσωτερικό η οποία διασφαλίζει διάχυτο και χωρικά ομοιογενή φωτισμό) με την κάμερα τοποθετημένη πάνω από το δείγμα. Η επικάλυψη της σφαίρας και η καμπυλότητά της εξασφαλίζει την ομοιόμορφη ανάκλαση του φωτός σε ολόκληρο το χώρο. Στην άκρη της σφαίρας είναι αντιδιαμετρικά τοποθετημένοι δίοδοι εκπομπής φωτός LED που εκπέμπουν ακτινοβολία σε μία στενή φασματική ζώνη. Όταν λαμβάνεται η φωτογραφία, οι δίοδοι εκπέμπουν διαδοχικά μονοχρωματική ακτινοβολία και η ανάκλαση από το συγκεκριμένο μήκος κύματος καταγράφεται από την κάμερα που βρίσκεται στην κορυφή. Το αποτέλεσμα είναι μια μονοχρωματική εικόνα η οποία τελικά αποτελεί έναν υπερφασματικό κύβο διαστάσεων 1280 × 960 × 18. Το σύστημα καλιμπράρεται ραδιομετρικά και γεωμετρικά χρησιμοποιώντας πλακέτες ακριβείας. Στη συνέχεια γίνεται ρύθμιση του φωτός με βάση τον τύπο του αντικείμενου που καταγράφεται. Η ομογενοποίηση του φωτός και το καλιμπράρισμα διασφαλίζει ένα βέλτιστο δυναμικό εύρος και ελαχιστοποιεί τις σκιές που μπορεί να υπάρξουν καθώς και τις όποιες κατοπτρικές ανακλάσεις [4].



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος Videometer

2.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Η δεύτερη σύγχρονη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του προφίλ της αλλοίωσης είναι η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Η συγκεκριμένη φασματοσκοπία αποτελεί μία ταχεία, μη επεμβατική τεχνική που δίνει ένα φάσμα, μέσω της απορρόφησης της ακτινοβολίας από πηγή laser. Κάθε δείγμα απορροφά ποσότητα από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία και κάποια άλλη ποσότητα αυτής διέρχεται μέσα από αυτό. Κάθε δείγμα έχει και διαφορετική απορρόφηση άρα και ένα ξεχωριστό φάσμα απορρόφησης αποτελώντας κατά αυτόν τον τρόπο το «αποτύπωμα» του τροφίμου. Οι τιμές του φάσματος αντιστοιχούν στις

συχνότητες των δονήσεων μεταξύ των δεσμών των ατόμων που απαρτίζουν στη συγκεκριμένη περίπτωση το κρέας [5]. Εφόσον κάθε τρόφιμο αποτελείται από έναν μοναδικό συνδυασμό ατόμων η φασματοσκοπία του υπέρυθρου μπορεί να εξελιχθεί πολύ χρήσιμη για την ποιοτική ανάλυση του κρέατος. Αξίζει να αναφερθεί ότι το FTIR χρησιμοποιείται στις βιομηχανίες τροφίμων για την αντιμετώπιση της νοθείας και τον προσδιορισμό της προέλευσης ορισμένων τροφίμων. Επιπλέον ο αριθμός των κορυφών του φάσματος αποτελεί άμεση ένδειξη της ποσότητας ορισμένων ενώσεων που αποτελούν το τρόφιμο ή μπορεί να συσχετισθούν με ενώσεις που είναι αποτέλεσμα του μεταβολισμού των βακτηρίων που πιθανόν να έχουν αναπτυχθεί στο τρόφιμο.

Ο συνδυασμός της ακρίβειας και της ευαισθησίας του FTIR με μια μεγάλη ποικιλία αλγορίθμων οδηγεί σε όλο και πιο ευρεία χρήση του FTIR στις βιομηχανίες τροφίμων.



Εικόνα 5. Φασματογράφος FTIR

Βιβλιογραφία 2^{ου} κεφαλαίου

1. Argyri, Anthoula A., et al. **“Rapid qualitative and quantitative detection of beef filets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks.”** *Sensors and Actuators B: Chemical* 145.1 (2010): 146-154.
2. Nychas, G-JE, Drosinos, EH **“Spoilage of Meat”** Agricultural University of Athens, Athens, Greece, Elsevier (2014)
3. www.analytik.co.uk/multispectral-imaging.htm
4. Panagou, Efstathios Z., et al. **“Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage.”** *International journal of food microbiology* 174 (2014): 1-11.
5. JASCO **“Fourier Transform Infrared Spectrometer FT/IR-4000 and 6000 series Operation Manual ”** P/N:0302-1899A (2004).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δημιουργία δειγμάτων

Μοσχαρίσιο κρέας βάρους 12 κιλών από τοπικό κρεοπωλείο μεταφέρθηκε στο εργαστήριο όπου αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασίες ψύξης. Το κρέας χωρίστηκε σε δύο μέρη των 6 κιλών για τον πιο εύκολο τεμαχισμό του. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον τεμαχισμό του κρέατος και τη λήψη από αυτό στείρων δειγμάτων ήταν η εξής. Σε πρώτη φάση τα δύο κομμάτια κρέατος ψεκάστηκαν με αλκοόλη 100% και έγινε ανάφλεξη και πυράκτωση έτσι ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο επιμόλυνσης του κρέατος καθώς τα βακτήρια αναπτύσσονται στην επιφάνεια του κρέατος και μόνο ελάχιστα από αυτά έχουν την ικανότητα να εισχωρούν στο εσωτερικό. Στη συνέχεια το κρέας μεταφέρθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής όπου επικρατούν ασηπτικές συνθήκες. Εκεί έγινε η αφαίρεση της εξωτερικής επιφάνειας του κρέατος και στη συνέχεια ο τεμαχισμός του σε επιμέρους φιλέτα με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας. 180 στείρα δείγματα των 30 γραμμαρίων το καθένα περίπου αποθηκεύτηκαν σε τρυβλία στους 4°C.

3.2 Εμβολιασμός κρέατος

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολισμό του κρέατος ήταν δύο είδη της οικογένειας των εντεροβακτηρίων. Συγκεκριμένα ήταν η *Serratia liquefaciens* και η *Hafnia alvei*. Οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί ανήκουν στους κύριους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς και έχουν συσχετισθεί με την παραγωγή βιογενών αμινών όπως η τυραμίνη, η καδαβερίνη και η πουτρεσκίνη οι οποίες προκαλούν τροφολοιμώξεις [1]. Οι Hernandez-Jover et al [2] παρουσίασαν έναν αποδεκτό δείκτη για την ποσότητα των βιογενών αμινών (biogenic amine index) στο κρέας. Ο δείκτης αυτός είναι το άθροισμα της καδαβερίνης, της πουτρεσκίνης, της τυραμίνης και της ισταμίνης με τα παρακάτω όρια

- Φρέσκο κρέας: BAI<5mg/kg
- Κρέας στα πρώτα στάδια της αλλοίωσης: 5<BAI<20mg/kg
- Χαμηλής ποιότητας κρέας: 20<BAI<50mg/kg
- Αλλοιωμένο κρέας: BAI>50 mg/kg [3]

Τα βακτήρια *Serratia liquefaciens* και *Hafnia alvei* έχουν απομονωθεί από παλαιότερα μικροβιολογικά πειράματα στο εργαστήριο μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου. Η ανανέωσή τους έγινε σε 100 mL Nutrient Broth δύο φορές ανά 18 ώρες. Μετά τη δεύτερη ανανέωση σωληνάκια με την καλλιέργεια τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα της φυγοκέντρισης. Εκεί πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στις 14000rpm/min στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και ξεπλύθηκε με ορό Ringer. Έγινε καλή ανάδευση και επανέωρηση του ιζήματος και κατόπιν μεταφορά του πάλι για φυγοκέντριση στις ίδιες συνθήκες με πριν. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε μία φορά ώστε να απομακρυνθούν πλήρως πιθανά υπολείμματα θρεπτικών συστατικών από τα κύτταρα

των μικροοργανισμών. Ο εμβολιασμός με την ποσότητα των μικροοργανισμών που κρίθηκε κατάλληλη ώστε να αποκαλύψει το μεταβολικό τους προφίλ ήταν περίπου 2 log/gr. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης όπου το κρέας εμβολιάστηκε με την ίδια ποσότητα βακτηριακού διαλύματος και στις δύο επιφάνειες. 60 τρυβλία με κρέας εμβολιάστηκαν με την *S.liquefaciens*, άλλα τόσα με την *Hafnia Alvei*, ενώ τα υπόλοιπα 60 τα αφήσαμε στείρα. Στη συνέχεια 30 τρυβλία από κάθε μία από τις 3 κατηγορίες κρέατος που προέκυψαν αποθηκεύτηκαν στους 4°C και τα άλλα 30 από κάθε κατηγορία στους 10°C.

3.3 Δειγματοληψία

10 γραμμάρια κόβονταν από κάθε δείγμα κρέατος και εισάγονταν σε πλαστική σακούλα στην οποία συμπληρώναμε 90g αραιωτικού ορού Ringer διατηρώντας ασηπτικές συνθήκες. Στη συνέχεια το δείγμα ομογενοποιούνταν στη συσκευή stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό λαμβάνοντας έτσι την πρώτη δεκαδική αραιώση. Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις παίρνοντας κάθε φορά 1mL προηγούμενης αραιώσης και προσθέταμε αυτό σε 9mL αραιωτικού υγρού. Οι αραιώσεις που πραγματοποιούσαμε κάθε φορά είχαν εξάρτηση από το πληθυσμιακό επίπεδο στο οποίο βρίσκονταν οι μικροοργανισμοί οι οποίοι καταμετρούνταν ανά 24 ώρες. Ο ενοφθαλμισμός 1mL από κάθε αραιώση σε τρυβλία που περιείχαν το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα έγινε με τη μέθοδο της επίστρωσης ώστε να απλωθεί σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια το εμβόλιο. Εκτός του ενοφθαλμισμού των διαλύματος με τα εντεροβακτήρια στο επιλεκτικό υπόστρωμα που ευνοεί την ανάπτυξη αυτών έγινε και εμβολιασμός αυτών σε γενικό υπόστρωμα όπως και των στείρων δειγμάτων ώστε να ελέγχεται η καθαρότητα των δειγμάτων.

3.4 Υποστρώματα και επώαση

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (ΟΜΧ): Χρησιμοποιήθηκαν δύο μη επιλεκτικά υποστρώματα. Το ένα ήταν το Plate Count Agar (PCA, Biolife, Italy) και το άλλο το Tryptone Soya Agar (TSA, Biolife, Italy). Και τα δύο αυτά υποστρώματα επιτρέπουν την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού ειδών βακτηρίων με τη μόνη διαφορά ότι το PCA περιέχει γλυκόζη οπότε το καθιστά λίγο πιο κατάλληλο σε περιπτώσεις που θέλουμε να καταμετρήσουμε τυχόν επιμολύνσεις που περιέχουν τα δείγματα. Η καταμέτρηση της μικροβιακής χλωρίδας και στα δύο υποστρώματα έγινε για λόγους εξέτασης της καθαρότητας των δειγμάτων αλλά και για λόγους επαναληψιμότητας μειώνοντας την πιθανότητα πειραματικού σφάλματος. Τα τρυβλία με το PCA αποθηκεύτηκαν για επώαση στους 25°C για 2 ημέρες και κατόπιν έγινε η καταμέτρησή τους. Τα τρυβλία με το TSA αποθηκεύτηκαν για επώαση στους 35°C για 1 ημέρα πριν γίνει η καταμέτρηση.

Εντεροβακτήρια: Ποσότητα 1mL από τη σειρά των διαδοχικών αραιώσεων ενοφθαλμίστηκε στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Biolife, Italy) και αφού το υπόστρωμα έπηξε ρίξαμε και δεύτερη στρώση υποστρώματος καθώς τα συγκεκριμένα εντεροβακτήρια θεωρούνται προαιρετικά αναερόβια. Μετά την πήξη και της δεύτερης στρώσης τα τρυβλία αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία επώασης 37°C για 1 ημέρα.

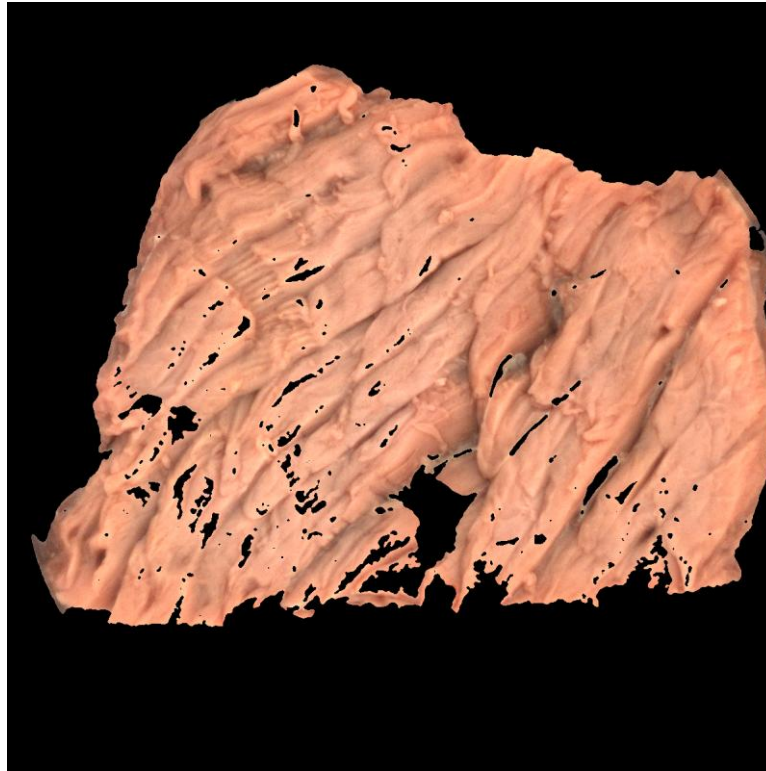
Για κάθε δείγμα έγινε επανάληψη δύο φορές και στην καταμέτρηση ελέγχθησαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά κάθε αποικίας.

3.5 Μέτρηση PH

Μετά από κάθε δειγματοληψία έγινε μέτρηση του PH (Metrohm 691 pH meter) με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο ομογενοποιημένο δείγμα. Το όργανο πριν από κάθε μέτρηση είχε βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

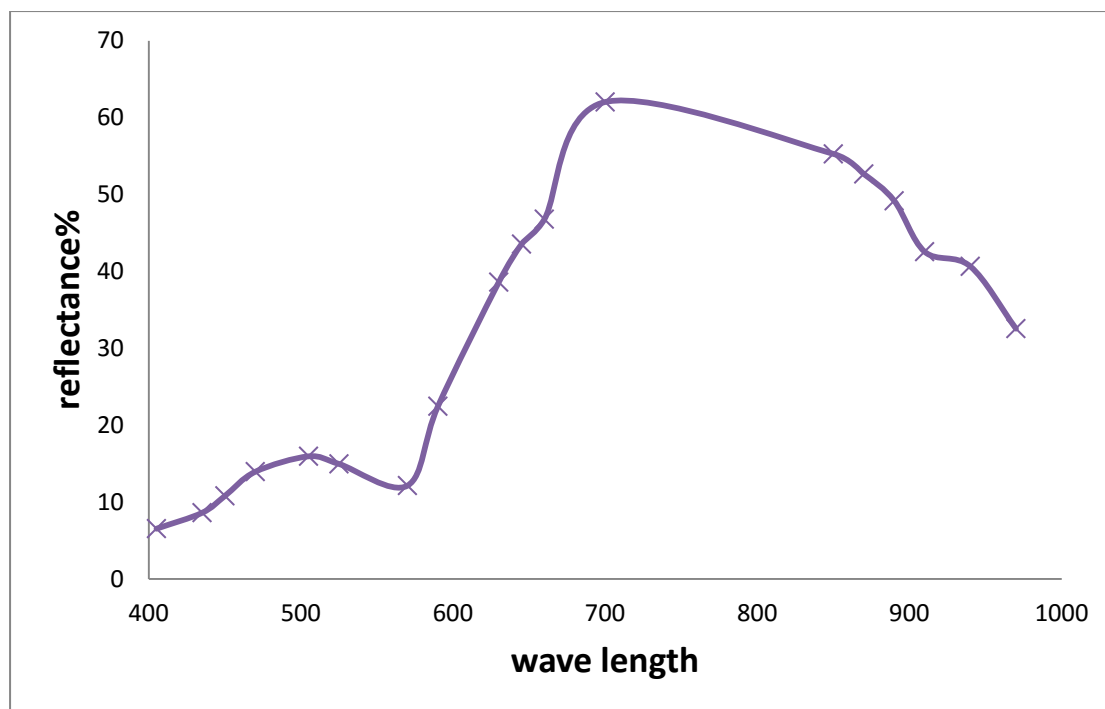
3.6 Συλλογή εικόνων με το VideometerLab

Πριν από κάθε δειγματοληψία τα δείγματα του κρέατος, στείρα και εμβολιασμένα τοποθετούνταν στο όργανο VideometerLab για να μας δώσουν πολλαπλές πολυφασματικές εικόνες. Αφού κάναμε το light setup βάση των αρχικών ρυθμίσεων για τη λήψη φωτογραφιών των δειγμάτων κρέατος, κάθε δείγμα τοποθετούνταν κάτω από τη σφαίρα Ulbricht λαμβάνοντας την εικόνα του. Κάθε εικόνα συγκροτεί μια πολυφασματική εικόνα από 18 μήκη κύματος που κάθε ένα αποτελεί στιγμιότυπο. Τα μήκη κύματος κυμαίνονται από το υπεριώδες (405nm) έως το εγγύς υπέρυθρο(970nm). Για τη μικροβιολογική ανάλυση όμως αυτό που μας ενδιαφέρει είναι ο μυϊκός ιστός του κρέατος. Η εικόνα επομένως περιέχει πληροφορίες που δεν σχετίζονται με την ανάλυση όπως το τρυβλίο Petri και όλη η περιφέρεια του, το λίπος και ο συνδετικός ιστός του κρέατος. Για την εξαγωγή αυτών των στοιχείων από τις πληροφορίες που θα χρησιμοποιήσουμε στην ανάλυση πρέπει να γίνει μια προεπεξεργασία. Το βήμα αυτό της προεπεξεργασίας περιλαμβάνει τη δημιουργία μιας μάσκας η οποία απομονώνει μόνο το τμήμα του μυϊκού ιστού που μας ενδιαφέρει. Η δημιουργία της μάσκας αυτής πραγματοποιήθηκε μεγιστοποιώντας την αντίθεση μεταξύ χρήσιμης και άχρηστης πληροφορίας ορίζοντας έτσι ένα όριο λειτουργίας. Με βάση το κατώφλι αυτό γίνεται διαχωρισμός των περιοχών του κρέατος σε περιοχές που μας είναι χρήσιμες και σε αυτές που δεν είναι. Εφαρμόζοντας μια διακριτική ανάλυση (discriminant analysis) μπορεί κάθε περιοχή να ενταχθεί σε μία από τις δύο ομάδες. Με αυτόν τον τρόπο λαμβάνουμε την περιοχή κύριου ενδιαφέροντος (ROI) που τα φασματικά δεδομένα αυτής της περιοχής χρησιμοποιούνται για περαιτέρω στατιστική ανάλυση [4].



Εικόνα 6. Περιοχή ROI δείγματος κρέατος

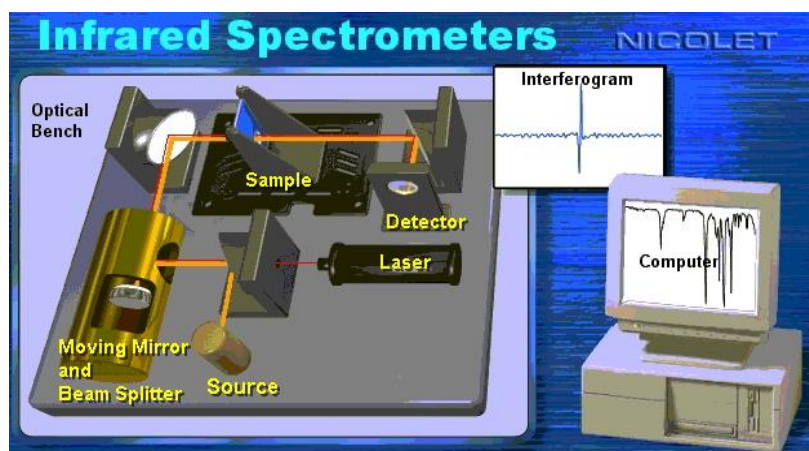
Για κάθε εικόνα πήραμε ένα φάσμα με το μέσο όρο της ανάκλασης του κάθε pixel στην περιοχή ROI σε κάθε προσπίπτων μήκος κύματος. Οι διαδικασίες μετασχηματισμού και διαχωρισμού υλοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού του VideometerLab (version 2.12.39).



Εικόνα 7. Τυπικό φάσμα ανάκλασης από το υπεριώδες έως το εγγύς υπέρυθρο

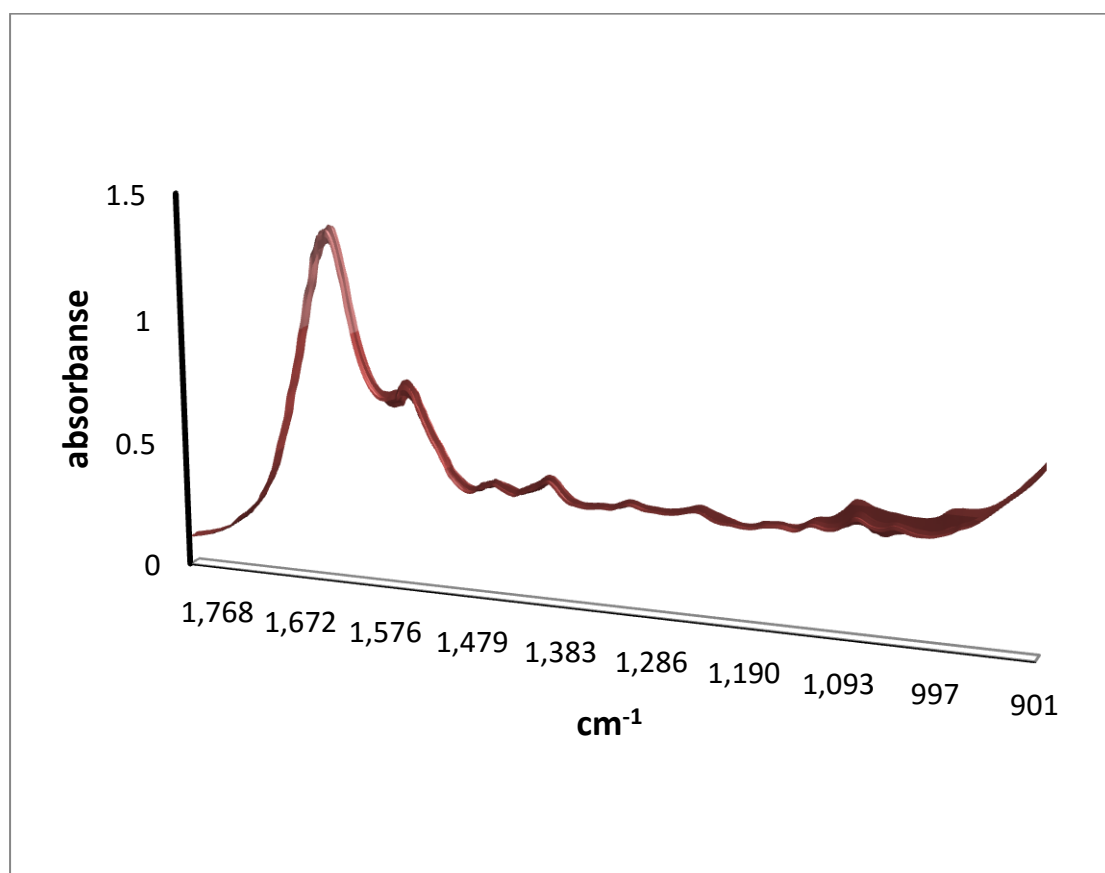
3.7 Συλλογή φασματικών δεδομένων με την ανάλυση υπέρυθρου FTIR

Κατά τον τεμαχισμό του δείγματος για τις μικροβιολογικές και οργανοληπτικές αναλύσεις ένα μέρος από αυτό περίπου 1g εισάγονταν στο ψυγείο ώστε μετά το πέρας της δειγματοληψίας να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση με το φασματοφωτόμετρο FTIR. Το φασματοφωτόμετρο ήταν τύπου Nicolet 6700 εφοδιασμένο με ανιχνευτή (detector) DLaTGS (δευτεριωμένη L-αλανίνη ενισχυμένη με θειική τριγλυκίνη) και έναν διαχωριστή δέσμης (beamsplitter) από KBr.



Εικόνα 8. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του FTIR

Το φάσμα κάθε δείγματος συλλέχθηκε χρησιμοποιώντας έναν κρύσταλλο από ZnSe 45°ATR (εξασθενημένης ολικής ανάκλασης). Τα δείγματα τοποθετούνταν πάνω στον κρύσταλλο έτσι ώστε η αερόβια επιφάνεια του κρέατος να είναι σε στενή επαφή με τον κρύσταλλο και κατόπιν με την ειδική λαβή που έχει το μηχάνημα συμπιέζονταν ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη επαφή με τον κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος μπορεί να δώσει 12 εξωτερικές ανακλάσεις και με την εφαρμογή ενός παροδικού πεδίου επιτρέπει την διείσδυση της δέσμης σε βάθος 1.01μm από την επιφάνεια του δείγματος [5]. Το φασματοφωτόμετρο ήταν ρυθμισμένο να λειτουργεί με το λογισμικό Omnic Software-έκδοση 7,3 μεταξύ των κυματαριθμών 4000-650cm⁻¹. Ο αριθμός των σαρώσεων για κάθε μέτρηση ήταν 250 και η κάθε μέτρηση είχε διάρκεια 5 λεπτά. Πριν από κάθε μέτρηση των δειγμάτων λαμβάναμε και μία παρόμοια μέτρηση της καθαρής επιφάνειας του κρυστάλλου (background) έτσι ώστε να μειωθούν οι απώλειες λόγω θορύβου οι άλλων σφαλμάτων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη μέτρηση. Στο τέλος κάθε μέτρησης λαμβάναμε το φάσμα της απορρόφησης κάθε δείγματος στο εύρος των μηκών κυμάτων που προαναφέραμε. Η επιφάνεια του κρυστάλλου καθαριζόταν με προσοχή με απορρυπαντικό. Στη συνέχεια ξεπλενόταν με αποσταγμένο νερό και αιθανόλη και στέγνωμα με μπατονέτα.



Εικόνα 9. Τυπικό φάσμα απορρόφησης του FTIR

Βιβλιογραφία 3^{ου} κεφαλαίου

1. Özoğul, F. "**Production of biogenic amines by *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Hafnia alvei* using a rapid HPLC method.**" *European Food Research and Technology* 219.5 (2004): 465-469
2. Hernández-Jover, Teresa, et al. "**Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products.**" *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45.6 (1997): 2098-2102.
3. Durlu-Özkaya, Fügen, Kamuran Ayhan, and Nilüfer Vural. "**Biogenic amines produced by Enterobacteriaceae isolated from meat products.**" *Meat Science* 58.2 (2001): 163-166.
4. Panagou, E. Z., et al. "**Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage.**" *International journal of food microbiology* 174 (2014): 1-11.
5. Perkins, W.D. "**Fourier Transform-Infrared Spectroscopy**". Part 1. Instrumentation. Topics in Chemical Instrumentation. Ed. Frank A. Settle, Jr. *Journal of Chemical Education* 63 (1986) A5-A10.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Πραγματοποιώντας δειγματοληψίες σε κομμάτια βόειου κρέατος εμβολιασμένα με τους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς από την οικογένεια των εντεροβακτηρίων, *Hafnia Alvei* και *Serratia liquefaciens* παρακολουθήσαμε την κινητική ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες 4°C και 10°C. Η συχνότητα των δειγματοληψιών καθορίστηκε από τη θερμοκρασία στην οποία είχαν αποθηκευτεί τα δείγματα. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των δειγματοληψιών για κάθε μικροοργανισμό σε γενικό και επιλεκτικό υπόστρωμα στις δύο θερμοκρασίες.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα δειγματοληψιών για τη *S.liquefaciens* στους 10^οC

Time (h)	sample	VRBGA (logcfu/g)	TSA (logcfu/g)	PCA (logcfu/g)	pH
0	Control A	2,30103	2,7160033	2,6627578	5,59
0	Control B	2,2787536	2,5797836	2,8325089	5,68
12	01a	2,8692317	2,8573325	2,7853298	5,54
12	01b	2,5682017	2,7242759	2,7853298	5,54
24	02a	3,2253093	3,307496	3,2718416	5,42
24	02b	3,2278867	3,39794	3,2966652	5,56
36	03a	3,39794	3,4409091	3,5314789	5,51
36	03b	3,2576786	3,8573325	3,9242793	5,52
48	04a	3,9684829	3,9777236	4,2201081	5,48
48	04b	4,1731863	5,0334238	4,9822712	5,75
60	05a	4,6627578	5,4668676	5,376577	5,81
60	05b	4,5390834	5,1271048	5,1875207	5,61
72	06a	5,6627578	6,2380461	6,064458	5,55
72	06b	4,4265113	5,1760913	5,155336	5,5
84	07a	5,8920946	6,2810334	6,3053514	5,57
84	07b	6,60206	7,1003705	7,1003705	5,79
96	08a	5,5682017	6,2878017	5,4742163	5,53
96	08b	6,6627578	7,2600714	7,3180633	5,61
108	09a	5,9637878	7,0791812		5,48
108	09b	6,2988531	8,2878017	8,2201081	5,47
114	10			9,4771213	5,8
120	11a	6,6720979	8,1931246	8,3944517	5,5
120	11b	6,4593925	7,42	7,9637878	5,68
132	12a	7,6731863	7,8117539	8,8783979	5,69
132	12b	7,93	8,46	8,53	5,62
144	13a	8,4777236	8,6702617	9,2853298	5,89
144	13b	8,6205739	8,850248	8,8541084	5,87
156	14a	8,7781513	8,88	8,96	5,7
156	14b	8,2380461	8,3802112	8,4065402	5,53
168	15a	9,7323938	9,8864907		6,27
168	15b	9	9,8864907		5,86

Πίνακας 15. Αποτελέσματα δειγματοληψιών για τη *S.liquefaciens* στους 4^οC

Time (h)	sample	VRBGA (logcfu/g)	TSA (logcfu/g)	PCA (logcfu/g)	pH
0	Control A	2.301029996	2.716003344	2.662758	5.59
0	Control B	2.278753601	2.579783597	2.832509	5.68
24	01	2.568201724	2.591064607	2.491362	5.55
48	02a	2.748188027	2.763427994	2.799341	5.61
48	02b	2.755874856	2.84509804	2.80618	5.55
72	03	2.707570176	2.897627091	3.184691	5.35
96	04	3.170261715	3.322219295	3.462398	5.51
120	05a	3.755874856	4.303196057	4.294466	5.6
120	05b	3.257678575	3.681241237	6.356026	5.5
144	06a	4.390935107	4.462397998	4.32838	5.57
144	06b	3.755874856	6.549003262	6.187521	5.53
168	07a	4.209515015	4.73239376	8.394452	5.48
168	07b	3.602059991	3.477121255	6.832509	5.37
192	08a	5.190331698	5.602059991	5.653213	5.52
192	08b	4.591064607	5.397940009	7.50515	5.43
216	09a	5.413299764	5.838849091	5.851258	5.54
216	09b	4.86332286	5.146128036	5.653213	5.47
216	09b_rep	5.290034611	6	5.944483	5.75
240	10a	5.698970004	6.328379603	6.296665	5.48
240	10b	5.204119983	6.008600172	cont*	5.5
264	11a	6.056904851	6.672097858	6.60206	5.55
264	11b	6.158362492	7.068185862	8.724276	6.05
300	12a	7.968482949	8.195899652	8.206826	5.72
300	12b	6.57634135	6.934498451	8.462398	5.81
324	13a	7.959041392	8.42975228	8.20412	5.81
324	13b	6.944482672	7.544068044	8.845098	5.67
324	13b_rep	6.318063335	7.342422681	8.225309	5.57
372	14a	8.267171728	8.995635195	8.977724	5.96
372	14b	8.672097858	8.973127854	9.880814	6.14
372	14b_rep	8.672097858	8.643452676	9.740363	6.41
396	15a	9.06	9.12	9.184	6.52
396	15b	9.4	9.47	9.83	6.83

*cont: επιμολυσμένα δείγματα

*rep: επανάληψη δειγματοληψίας

Πίνακας 16. Αποτελέσματα δειγματοληψιών για τη Hafnia Alvei στους 10°C

Time (h)	sample	VRBGA (logcfu/g)	TSA (logcfu/g)	PCA (logcfu/g)	pH
0	Control A	2,30103	2,662758	2,113943	5,59
0	Control B	2,278754	2,579784	2,342423	6,32
0	Control C	2,278754	2,146128	2,322219	5,58
12	01a	2,612784	2,857332	2,361728	5,51
12	01b	2,579784	2,556303	2,447158	5,53
24	02a	2,799341	2,845098	2,845098	5,68
24	02b	2,544068	2,643453	2,826075	5,51
36	03a	3,285557	3,431364	3,653213	5,64
36	03b	3,748188	3,973128	4,041393	5,52
48	04a	4,214844	4,662758	4,278754	5,58
48	04b	4,10721	4,178977	4,491362	5,68
60	05a	4,986772	5,322219	5,117271	5,52
60	05b	4,431364	4,819544	5,004321	5,62
72	06a	4,90309	5,212188	4,845098	5,43
72	06b	5,399674	5,792392	5,414973	5,65
84	07a	6,281033	6,281033	6,819544	5,56
84	07b	5,991226	6,103804	6,20412	5,34
96	08a	7,178977	7,082785	7,064458	5,65
96	08b	6,892095	8,198657	8,103804	5,61
108	09a	7,439333	7,457882	7,454845	5,6
108	09b	7,653213	8,418301	8,506505	5,73
120	10	7,690196	9,217484	9,318063	5,77
132	11a	7,235528	7,285557	7,245513	5,54
132	11b	7,672098	7,944483	8,394452	5,66
144	12a	8,173186	8,311754	8,378398	5,71
144	12b	8,374748	7,681241	7,518514	5,51
156	13a	8,732394	8,897627	8,995635	5,78
156	13b	8,59	8,88	8,92	6,17
168	14a	9,060698	9,136721	9,136721	5,65
168	14b	9,09691	9,079181	9,130334	5,67
180	15	9,50515	9,432969	9,501059	5,86

Πίνακας 17. Αποτελέσματα δειγματοληψιών για τη Hafnia Alvei στους 4°C

Time (h)	sample	VRBGA (logcfu/g)	TSA (logcfu/g)	PCA (logcfu/g)	pH
0	Control A	2,30103	2,662758	2,1139434	5,59
0	Control B	2,278754	2,579784	2,3424227	6,32
0	Control C	2,278754	2,146128	2,3222193	5,58
24	01	2,278754	2,322219	2,30103	5,55
48	02a	2,518514	2,69897	2,5563025	5,59
48	02b	2,60206	2,39794	2,30103	5,65
72	03	2,778151	2,579784	2,5797836	5,48
96	04	3,11059	3,230449	3,0791812	5,58
120	05a	3,184691		5,1367206	
120	05b	3,100371	3,322219	4,0681859	5,61
144	06a	3,755875	3,838849	3,7160033	5,48
144	06b	4,004321		7,1303338	5,49
168	07a	4,049218	4,431364	4,1903317	5,5
168	07b	4,267172	5,276462	4,155336	5,37
192	08a	4,579784	5,114	8,064458	5,53
192	08b	6,20412	6,32	5,4297523	5,65
216	09a	5,40824	6	5,8750613	5,48
216	09b	5,374748	5,792392	5,3617278	5,51
240	10a	4,724276	5,340444	4,8325089	5,53
240	10b	5,209515	5,732394	cont*	5,7
264	11a	5,799341	6,214844	6,0681859	5,6
264	11b	5,934498	6,117271	8,3201463	5,59
300	12a	6,643453	7,0086	6,8692317	5,54
300	12b	6,819544	7,357935	8,3856063	6,06
348	13a	7,08636	7,136721	7,25042	5,5
348	13a_rep	6,763428	7,20412	7,2900346	5,57
348	13b	8,09691	8,232996	9,8920946	6,37
396	14a	7,653213	7,832509	7,8573325	5,49
396	14b	8,20412	8,257679	9,8129134	6,15
396	14b_rep	8,225309	8,245513	8,845098	6,08
420	15	8,623249	9,11059	9,5682017	5,91

*cont: επιμολυσμένα δείγματα

*rep: επανάληψη δειγματοληψίας

Πίνακας 18. Αποτελέσματα δειγματοληψιών για τα στείρα δείγματα στους 10°C (αριστερά) και στους 4°C (δεξιά).

Time (h)	sample	PCA (logCFU/g)	pH	Time (h)	sample	PCA (logCFU/g)	pH
0	Control_A	1	5,47	0	Control_A	1	5,47
0	Control_B	1	5,62	0	Control_B	1	5,62
12	01a	1	5,62	24	01	1	5,59
12	01b	1	5,59	48	02a	1	5,56
24	02a	1	5,42	48	02b	1,954243	5,57
24	02b	1	5,58	72	03a	3,127105	5,41
36	03a	1	5,55	72	03b	1	5,57
36	03b	1	5,75	96	04a	1	5,54
48	04a	1	5,69	96	04b	2,2	5,62
48	04b	1	5,65	120	05a	1	5,49
60	05a	4,130334	5,38	120	05b	cont	5,819544
60	05b	1	5,55	144	06a	cont	5,57
72	06a	1	5,45	144	06b	cont	5,52
72	06b	1	6,22	168	07a	cont	5,48
84	07a	5,42	5,832509	168	07b	1	5,55
84	07b	1	5,5	192	08a	cont	5,44
96	08a	1	5,62	192	08b	cont	5,71
96	08b	cont*	5,82	216	09a	cont	5,39
108	09a	ont	5,38	216	09b	cont	5,59
108	09b	cont	5,35	216	09c	cont	4,58
114	10	1	5,55	240	10a	1	5,55
120	11a	1	5,53	240	10b	cont	
120	11b	1	5,49	240	10c	1	5,61
132	12a	1	5,41	264	11a	cont	5,65
132	12b	5,181844	5,49	264	11b	1	5,63
144	13a	1	5,49	264	11c	cont	5,56
144	13b	cont	5,81	300	12a	2	5,47
156	14a	1	5,53	300	12b	cont	5,49
156	14b	7,80618	5,59	324	13a	1	5,58
168	15a	cont	5,66	324	13b	cont	5,63
168	15b	1	5,61	348	14a	cont	
				348	14b	cont	
				372	15a	cont	5,69
				372	15b	cont	5,67
				396	16a	1	5,51
				396	16b	cont	6,86
				396	17a	1	5,84
				396	17b	1	5,6
				420	19a	cont	6,23
				420	19b	1	5,55

*cont: επιμολυσμένα δείγματα

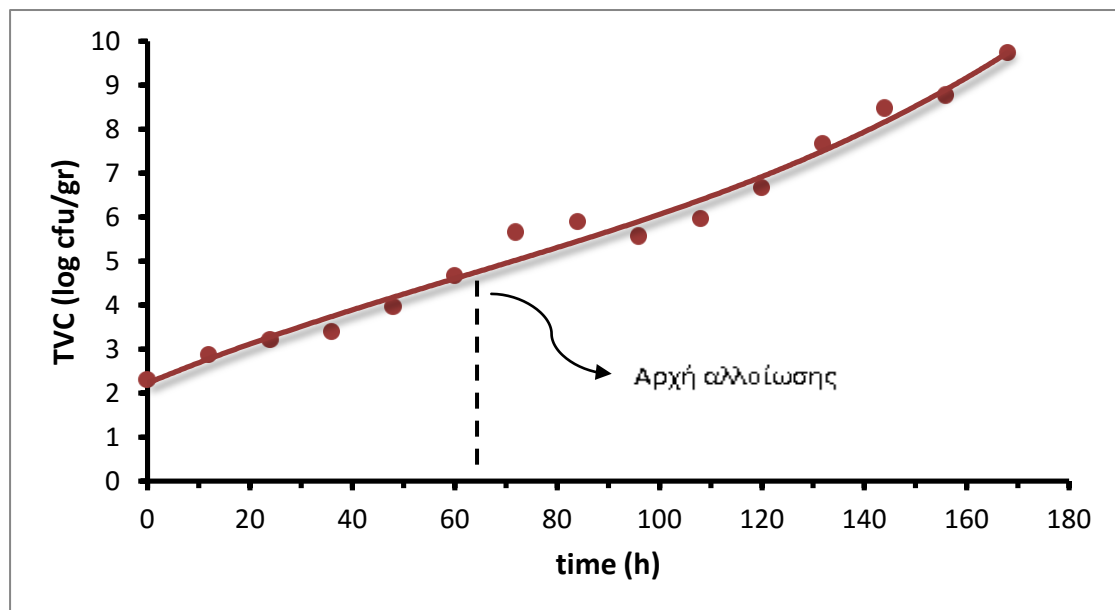
Παράλληλα με την παρακολούθηση του ρυθμού ανάπτυξης των εμβολιασμένων δειγμάτων γινόταν και καταγραφή του ΡΗ. Σε γενικές γραμμές μπορούμε να πούμε ότι επιτύχαμε να μην έχουμε αυξημένες τιμές των κυττάρων στα γενικά υποστρώματα σε σχέση με το επιλεκτικό υπόστρωμα καθώς εμείς θέλαμε να καταγράψουμε τη μεταβολική δραστηριότητα των εντεροβακτηρίων και όχι άλλων πιθανών μικροοργανισμών που να δρουν ανταγωνιστικά έναντι αυτών. Οι θερμοκρασίες επηρέασαν τις κινητικές παραμέτρους της ανάπτυξης των δύο μικροοργανισμών. Στους 4°C παρατηρήθηκε μια εκτεταμένη φάση προσαρμογής ενώ στους 10°C δεν είχαμε καθόλου lag phase και τα βακτήρια και των δύο ειδών πέρασαν κατευθείαν στην εκθετική φάση. Ο μέγιστος ρυθμός αύξησης μ_{max} επίσης ήταν μεγαλύτερος στους 10°C για τον κάθε μικροοργανισμό από το μ_{max} στους 4°C. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα εντεροβακτήρια παρουσιάζουν έναν αργό και σταθερό ρυθμό ανάπτυξης για αυτό παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση μόνο όταν ο αριθμός τους έχει αυξηθεί πολύ κατά την επεξεργασία του κρέατος. Συνήθως χρησιμοποιούνται ως δείκτες υγιεινής των τροφίμων [1]. Στην πλειονότητα των στεύρων δειγμάτων δεν είχαμε επιμολύνσεις. Αυτά που παρέμειναν στείρα τα χρησιμοποιήσαμε στις φασματοσκοπικές μεθόδους ως δείκτες αναφοράς για να παρατηρήσουμε τυχόν αλλαγές στο φάσμα τους σε σχέση με το φάσμα των εμβολιασμένων δειγμάτων. Αλλά και κάποιες επιμολύνσεις που παρουσιάστηκαν σε στείρα δείγματα δείχνουν πόσο ευαλλοίωτο τρόφιμο είναι το κρέας.

4.2 ΡΗ

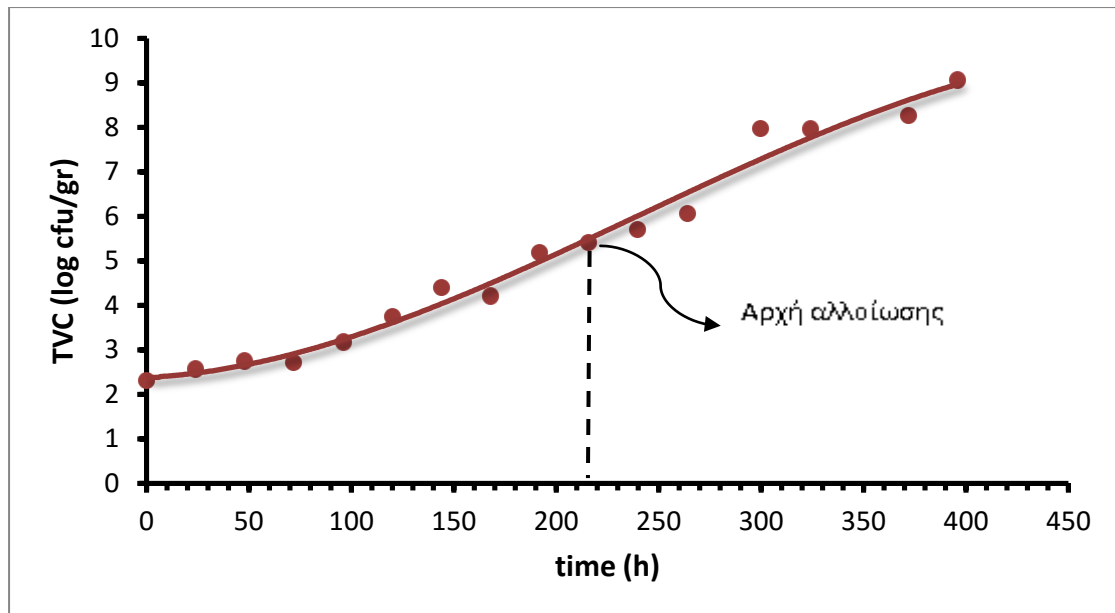
Το ΡΗ του κρέατος κυμάνθηκε σε φυσιολογικές τιμές 5,5-5,8 με διάφορες αυξομειώσεις για τις οποίες πιθανόν να ευθύνεται ότι τα δείγματα μπορεί να είχαν διαφορετική συγκέντρωση γαλακτικού οξέος. Γενικά το ΡΗ δεν αποτελεί δείκτη της αλλοίωσης. Μόνο όταν το κρέας έχει αλλοιωθεί και θεωρείται απορριπτέο έχουμε μια αύξηση του ΡΗ. Αυτό έγινε από τους 8 λογαρίθμους και άνω.

Με βάση τα αποτελέσματα από τις μικροβιολογικές αναλύσεις, τον οργανοληπτικό έλεγχο και τα όρια που έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για το μικροβιακό πληθυσμό στα τρόφιμα μπορούμε να κατατάξουμε τα δείγματα σε 3 κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι το φρέσκο κρέας το οποίο πληροί τα μικροβιακά κριτήρια από τη νομοθεσία η οποία οριοθετεί τον αποδεκτό μικροβιακό πληθυσμό στο κρέας στους 5 λογαρίθμους. Όταν ο μικροβιακός πληθυσμός φτάσει τους 6-7 λογαρίθμους έχουμε την έκκριση οσμών και αλλαγή κάποιων οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, σημάδια της αρχικής αλλοίωσης του κρέατος ενώ άνω των 7 λογαρίθμων το κρέας θεωρείται αλλοιωμένο και μη αποδεκτό προς κατανάλωση [2]. Η θερμοκρασία αποθήκευσης έπαιξε ρόλο στο χρονικό διάστημα που επήλθε η αλλοίωση από τον κάθε μικροοργανισμό. Στο κρέας που αναπτύχθηκε η *S. liquefaciens* η αλλοίωση άρχισε να γίνεται εμφανής την τρίτη ημέρα για τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους 10°C ενώ για τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους 4°C η αλλοίωση ξεκίνησε από την δέκατη ημέρα. Παραπλήσια ήταν και τα αποτελέσματα για

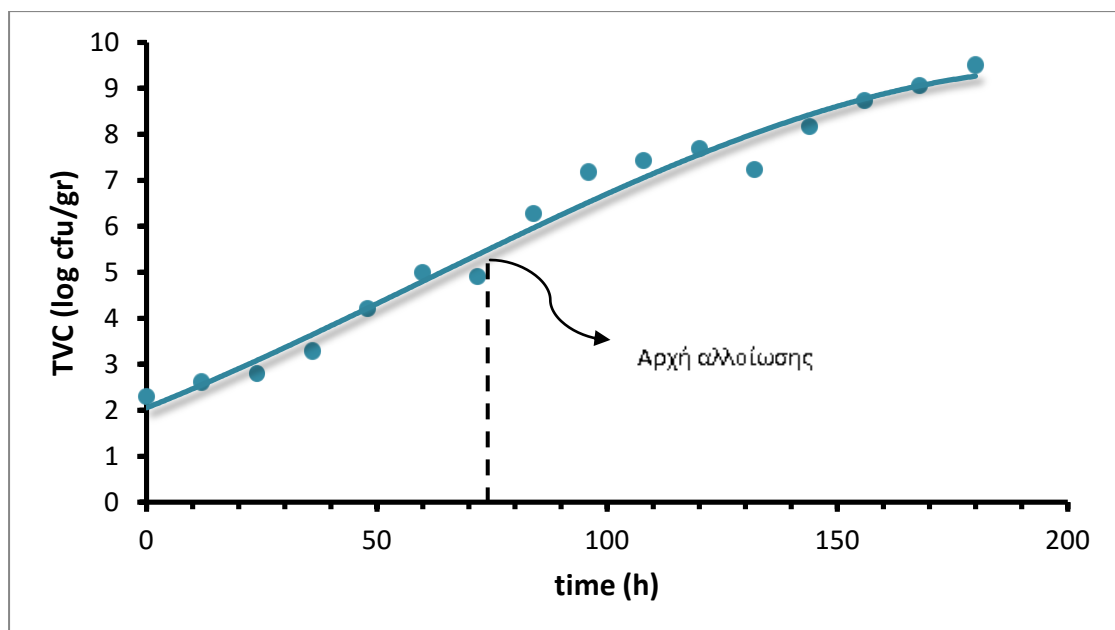
τα δείγματα στα οποία αναπτύχθηκε η *Hafnia Alvei* με τη διαφορά ότι στους 4°C η αλλοίωση ξεκίνησε μία ημέρα αργότερα. Η ίδια διαφορά υπήρξε και στο χρονικό σημείο στο οποίο το κρέας πλέον θεωρούνταν αλλοιωμένο και απορριπτό κάτι που οφείλεται στην ικανότητα της *S.liquefaciens* να προσαρμόζεται πιο γρήγορα σε χαμηλές θερμοκρασίες από τη *Hafnia Alvei* [3]. Η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων κρέατος έγινε για τη δημιουργία μοντέλων που αναπτύχθηκαν σε συνδυασμό με τα φασματοσκοπικά δεδομένα από το FTIR και το Videometer, τα οποία θα κατατάσσουν στη συνέχεια τα δείγματα σε μία από τις υπάρχουσες κατηγορίες..



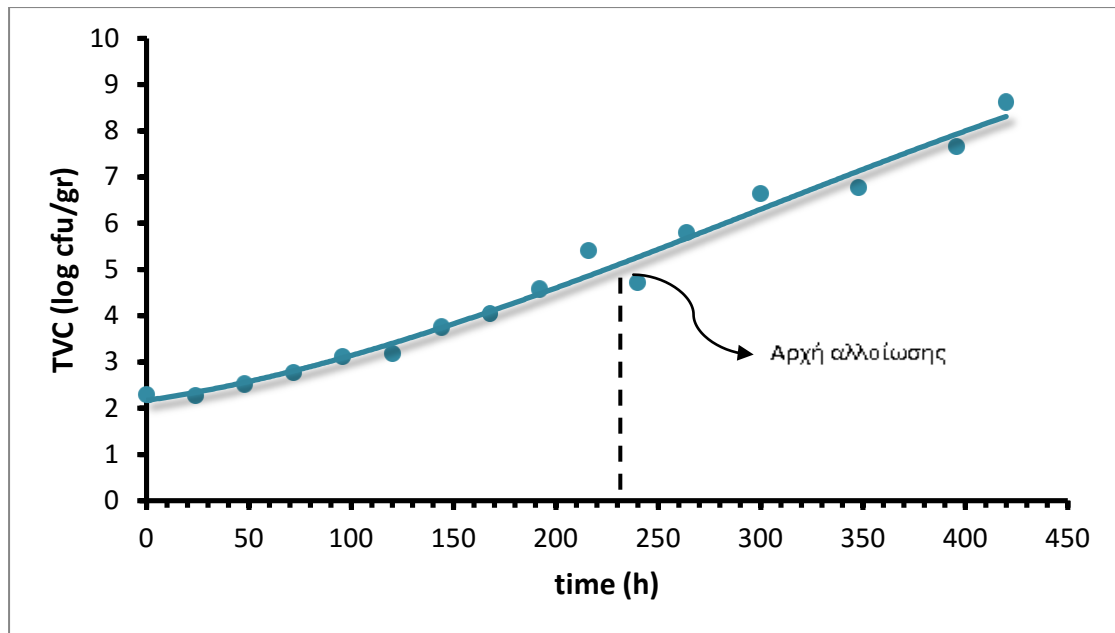
Σχήμα 1. Ανάπτυξη *S.liquefaciens* στους 10°C



Σχήμα 2. Ανάπτυξη *S.liquefaciens* στους 4°C



Σχήμα 3. Ανάπτυξη *Hafnia Alvei* στους 10°C



Σχήμα 4. Ανάπτυξη *Hafnia Alvei* στους 4°C

Τα μικροβιολογικά δεδομένα προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο του Baranyi [4] το οποίο περιγράφει αλλαγές των μικροβιακών πληθυσμών σε σχέση με το χρόνο με βάση κάποιες παραμέτρους [5]. Οι παράμετροι αυτές είναι:

1. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag phase)
2. Η ελάχιστη ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης (y_o)
3. Η μέγιστη ασύμπτωτη της σιγμοειδούς καμπύλης ή ο τελικός πληθυσμός (y_{max})
4. Το μέγιστο ρυθμό αύξησης (μ_{max})

Η βέλτιστη προσαρμογή στο μοντέλο του Baranyi γίνεται με μη γραμμική παλινδρόμηση κατά την οποία οι παράμετροι υπολογίζονται με βάση την εξίσωση Baranyi:

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

Όπου:

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

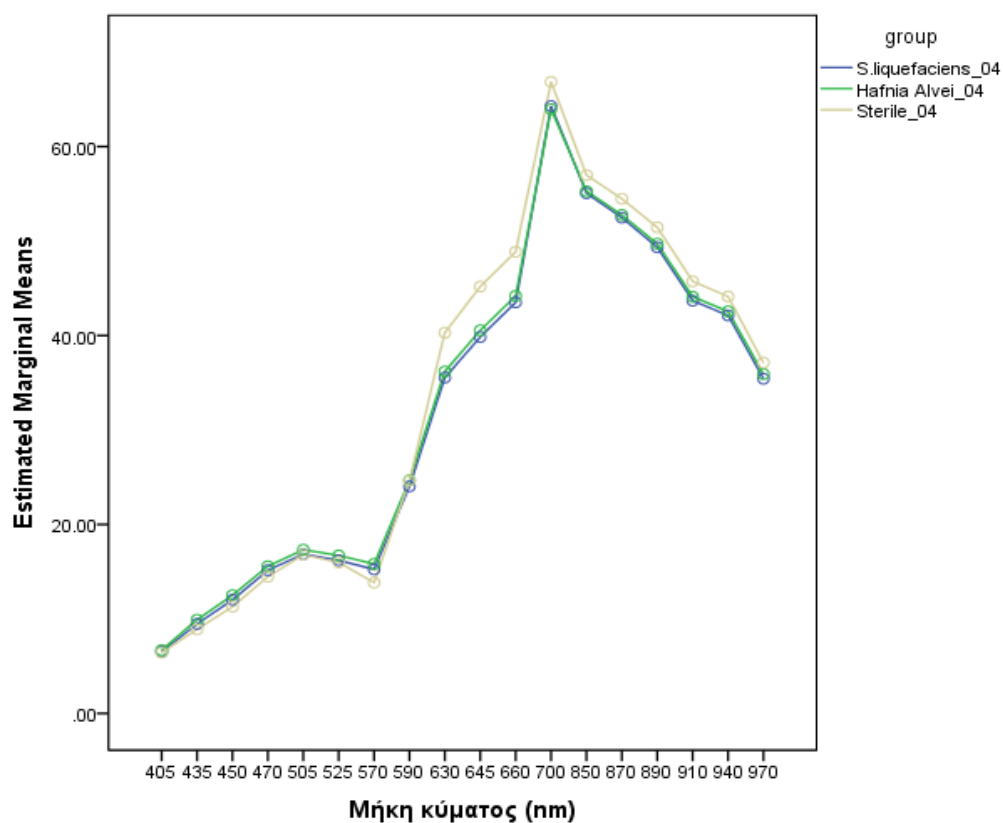
Η μη γραμμική παλινδρόμηση στο μοντέλο έγινε με το πρόγραμμα DMFit σε περιβάλλον Excel (Microsoft Office 2007). Τα αποτελέσματα των παραμέτρων του μοντέλου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 19. Εκτιμώμενοι παράγοντες κινητικής για τους δύο μικροοργανισμούς που μελετήθηκαν

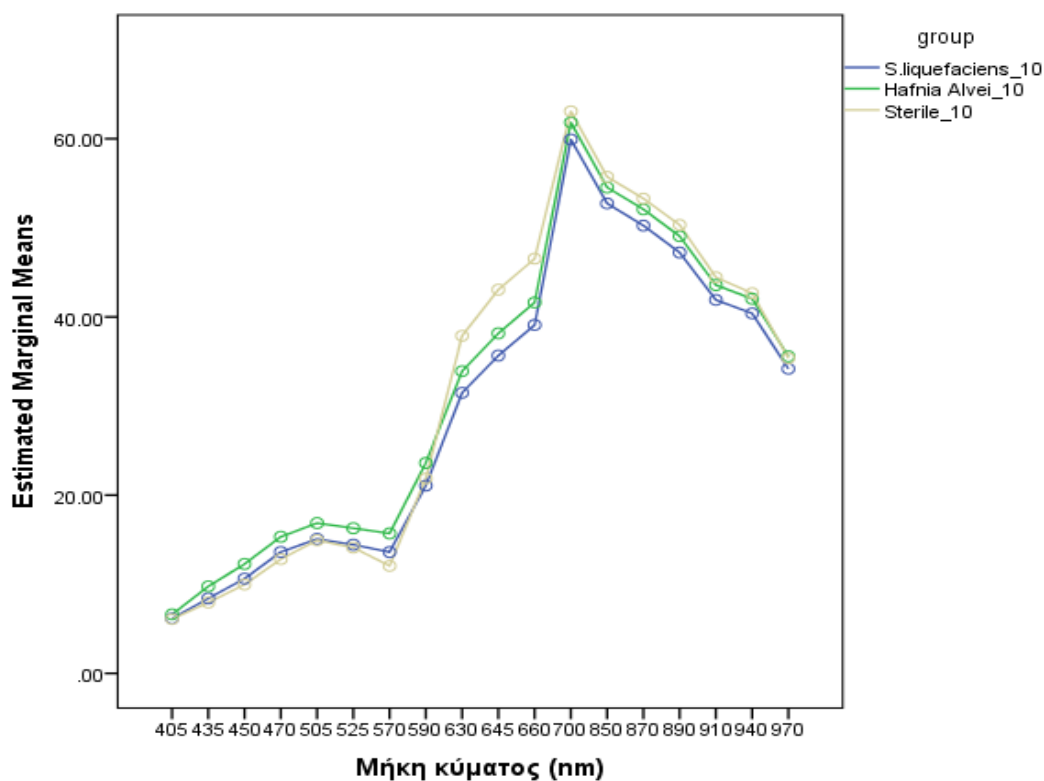
Μικροοργανισμός	T (°C)	Lag phase (h)	y_o (logcfu/g)	y_{end} (logcfu/g)	μ_{max} (h ⁻¹)	R ²
S. liquefaciens	4	88.52	1.97	8.49	0.021	0.957
	10	0	1.69	8.48	0.040	0.955
Hafnia Alvei	4	47.84	2.03	7.86	0.015	0.955
	10	0	1.31	9.11	0.046	0.953

4.3 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων από το VideometerLab

Μετά τη λήψη των εικόνων από το VideometerLab έγινε σύγκριση των μέσων όρων κάθε φάσματος. Συγκρίνοντας γραφικά την το μέσο όρο της ανάκλασης στείρου και τα δείγματα με τους δύο μικροοργανισμούς και στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης δεν μπορούμε να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα.



Σχήμα 5. Σύγκριση μέσων όρων φασμάτων στείρου και εμβολιασμένων δειγμάτων στους 4°C



Σχήμα 6. Σύγκριση μέσων όρων φασμάτων στείρου και εμβολιασμένων δειγμάτων στους 10°C

Στα σχήματα 5 και 6 φαίνεται η διαφορά στην ανάκλαση συγκρίνοντας τους μέσους όρους από την ανάκλαση κάθε μήκους κύματος σε κάθε δείγμα στείρο και εμβολιασμένο και για τις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης. Οι διαφορές βέβαια αυτές δεν είναι σημαντικές $p\text{-value} > 0,05$ και μπορεί να οφείλονται σε διάφορα σφάλματα κατά την πειραματική διαδικασία. Σύμφωνα με την ανάλυση των κύριων συνιστωσών (principal components analysis) των 18 φασμάτων, τα κύματα ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες (factors). Στον Πίνακα 20 παρουσιάζονται οι ομάδες των κυμάτων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για κάθε τύπο κρέατος. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για όλα τα κρέατα. Σε ορισμένες περιπτώσεις οι ομάδες που συνιστούσε η PCA ήταν δύο (η δεύτερη και τρίτη ομάδα ενώνονται σε μία), προτιμήθηκε όμως η ανάλυση με τις τρεις ομάδες. Για την κάθε ομάδα χρησιμοποιείται η μέση τιμή των φασμάτων που ανήκουν στην εκάστοτε ομάδα.

Πίνακας 20. Κατανομή των φασμάτων σε ομάδες

Ομάδες	Φάσματα
1	1-8
2	9-12
3	13-18

Στον Πίνακα 21 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι συγκρίσεις μεταξύ των κρεάτων μέσα στην κάθε ομάδα spectrum. Δεν παρατηρείται καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τύπων κρέατος για όλες τις ομάδες spectra (όλα τα p-value > 0,05).

Πίνακας 21. Διαφορές των κρεάτων μέσα στην κάθε ομάδα

Ομάδα φάσματος	Κρέας	Mean ± SD	p-value
1	S.liquefaciens 4°C	14,44 ± 2,31	0.692
	Hafnia Alvei 4°C	14,9 ± 3,49	
	Sterile 4°C	14,05 ± 2,19	
	S.liquefaciens 10°C	12,88 ± 2,76	0.109
	Hafnia Alvei 10°C	14,56 ± 3,72	
	Sterile 10°C	12,48 ± 1,4	
2	S.liquefaciens 4°C	45,8 ± 6,92	0.115
	Hafnia Alvei 4°C	46,23 ± 4,83	
	Sterile 4°C	50,3 ± 7,13	
	S.liquefaciens 10°C	41,54 ± 6,83	0.109
	Hafnia Alvei 10°C	43,88 ± 8,5	
	Sterile 10°C	47,64 ± 7,95	
3	S.liquefaciens 4°C	46,35 ± 4,32	0.467
	Hafnia Alvei 4°C	46,72 ± 4,77	
	Sterile 4°C	48,31 ± 4,64	
	S.liquefaciens 10°C	44,45 ± 5,21	0.417
	Hafnia Alvei 10°C	46,14 ± 6,58	
	Sterile 10°C	46,97 ± 3,56	

Με βάση τα παραπάνω δεν μπορούμε να διακρίνουμε ένα φρέσκο με ένα αλλοιωμένο δείγμα κρέατος Γι αυτό το λόγο γίνεται χρήση της πολυμεταβλητής στατιστικής ώστε να αναπτυχθούν όσο το δυνατόν πιο ασφαλείς τεχνικές που θα συσχετίζουν τα φασματοσκοπικά δεδομένα με τα μικροβιολογικά.

4.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός αλλοίωσης

Για να δημιουργήσουμε μοντέλα πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού με βάση τα δεδομένα που πήραμε από τις πολυφασματικές εικόνες χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS). Η PLS είναι μια μέθοδος που συσχετίζει τα δεδομένα από δύο μήτρες X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (μεταβλητές απόκρισης, εξαρτημένες) με ένα γραμμικό πολυπαραγοντικό μοντέλο. Η εξαιρετικά μεγάλη χρησιμότητά της πηγάζει από το γεγονός ότι αυξάνει την ακρίβεια των παραμέτρων του μοντέλου όσο αυξάνεται ο αριθμός των σχετικών μεταβλητών και των παρατηρήσεων. Στόχος της μεθόδου είναι να εξαγάγει τις λανθάνουσες μεταβλητές (latent variables) οι οποίες περιγράφουν τη μέγιστη διασπορά των αρχικών δεδομένων, ενώ παράλληλα οδηγεί στην μοντελοποίηση των αποκρίσεων [6]. Για να απαλλαχτούμε από τις πολυάριθμες και συσχετιζόμενες ανεξάρτητες μεταβλητές που οδηγούν σε overfitting κάθε λογισμικό PLS-R παρέχει έναν πρακτικό τρόπο για την εκπαίδευση του μοντέλου και την πρόβλεψη της σημαντικότητας κάθε παράγοντα, τη διασταυρούμενη επικύρωση (cross validation, CV). Κατά την CV τα δεδομένα διακρίνονται σε κάποιες ομάδες από τις οποίες χρησιμοποιώντας τη μία μετά την άλλη δημιουργούνται μοντέλα με τα δεδομένα που απομένουν. Μετά τη δημιουργία ενός μοντέλου καταμετρώνται οι διαφορές μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της μεταβλητής Y . Το άθροισμα των τετραγώνων αυτών των διαφορών δίνει μια εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης του μοντέλου. Κάθε μοντέλο πριν τη χρησιμοποίησή του για την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού θα πρέπει να επικυρώνεται. Αυτό πρέπει να γίνεται με ανεξάρτητα, αντιπροσωπευτικά δείγματα, εάν υπάρχουν. Διαφορετικά μπορεί να γίνει μια επανεκτίμηση του μοντέλου αφού τα δεδομένα τυχαιοποιηθούν [7]. Επειδή τα δείγματα που είχαμε δεν ήταν αρκετά για να δημιουργήσουμε ένα σετ δεδομένων επικύρωσης, εφαρμόστηκε η μέθοδος leave-one-out-cross validation που χρησιμοποιεί από ένα σύνολο δεδομένων n , τα $n-1$ για την εκπαίδευση του μοντέλου και το 1 εναπομένει για την επικύρωσή του [8]. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την PLS ήταν το Unscrambler ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

Το μοντέλο που εξάγουμε εφαρμόζοντας τη PLS μπορεί να περιγραφεί από μία εξίσωση που έχει τη μορφή:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_iX_i + \varepsilon \quad (3)$$

Όπου:

B_1, B_2, \dots, B_i , οι συντελεστές παλινδρόμησης

B_0 , ο σταθερός όρος (τιμή του y όταν $X=0$)

ε_j , το σφάλμα που αντιστοιχεί τη διαφορά ανάμεσα στην τιμή που προβλέπει η ευθεία παλινδρόμησης για το δείγμα i και την πραγματική τιμή που έχει το συγκεκριμένο δείγμα.

Οι συντελεστές παλινδρόμησης εκφράζουν την αναμενόμενη μεταβολή της μεταβλητής Y_i , όταν η X_i , μεταβληθεί κατά μία μονάδα και οι υπόλοιπες μεταβλητές X παραμένουν σταθερές. Δηλαδή οι συντελεστές παλινδρόμησης είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους.

Για να μετρήσουμε καλύτερα το βαθμό συσχέτισης των μεταβλητών X και Y χρησιμοποιούμε το συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient) ρ που ορίζεται ως

$$\rho = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \sigma_Y} \quad (4)$$

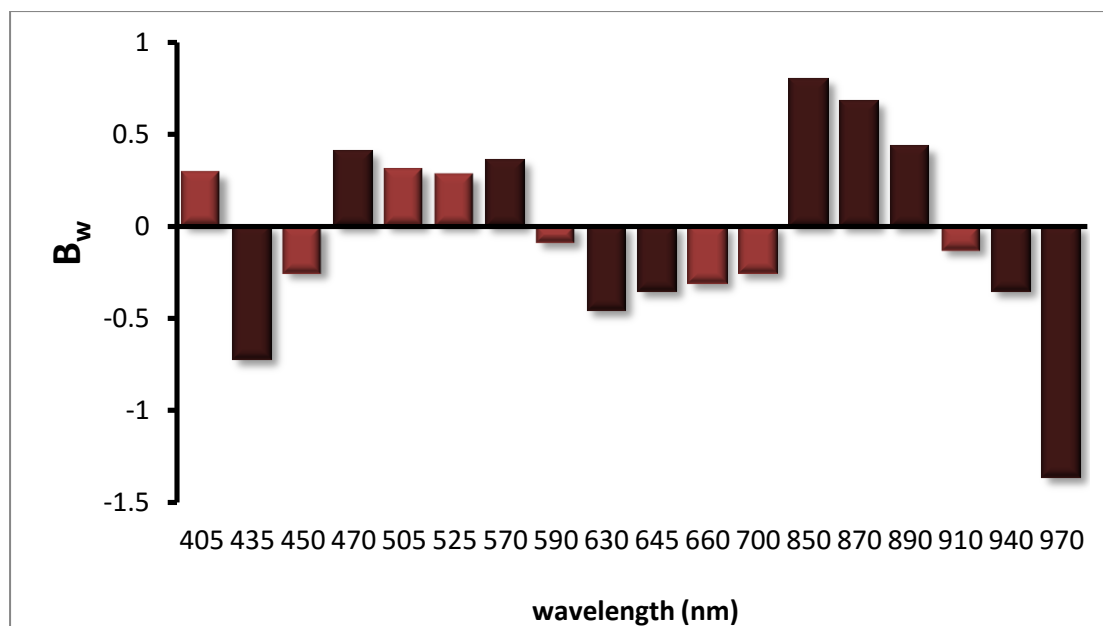
Όπου:

σ_X και σ_Y οι διασπορές X και Y και

σ_{XY} η συνδιασπορά τους.

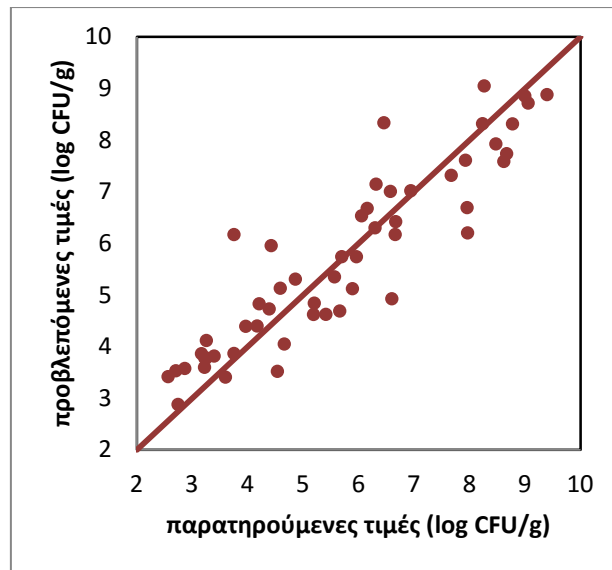
Όταν $\rho = \pm 1$ η σχέση είναι αιτιοκρατική και όχι πιθανοκρατική γιατί γνωρίζοντας την τιμή της μιας μεταβλητής γνωρίζουμε και την τιμή της άλλης ακριβώς. Όταν ο συντελεστής συσχέτισης είναι κοντά στο ± 1 τότε η γραμμική συσχέτιση των δύο μεταβλητών είναι ισχυρή ενώ όταν είναι κοντά στο 0 οι μεταβλητές είναι ασυσχέτιστες.

Χρησιμοποιώντας ως ανεξάρτητες μεταβλητές τους μέσους όρους ανάκλασης από κάθε φάσμα κατασκευάσαμε μοντέλα PLS για κάθε μικροοργανισμό. Μελετώντας τους συντελεστές συσχέτισης και το τυπικό σφάλμα συμπεράναμε ότι υπάρχει σχετικά καλή συσχέτιση μεταξύ των φασματικών δεδομένων και των μικροβιολογικών μετρήσεων. Παρατηρώντας τους συντελεστές παλινδρόμησης B_w μπορούμε να ερευνήσουμε ποια μήκη κύματος είναι αυτά που συνεισφέρουν περισσότερο στην εκτίμηση της πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού. Στα παρακάτω σχήματα με έντονο σκούρο χρώμα φαίνονται οι πιο σημαντικοί συντελεστές.

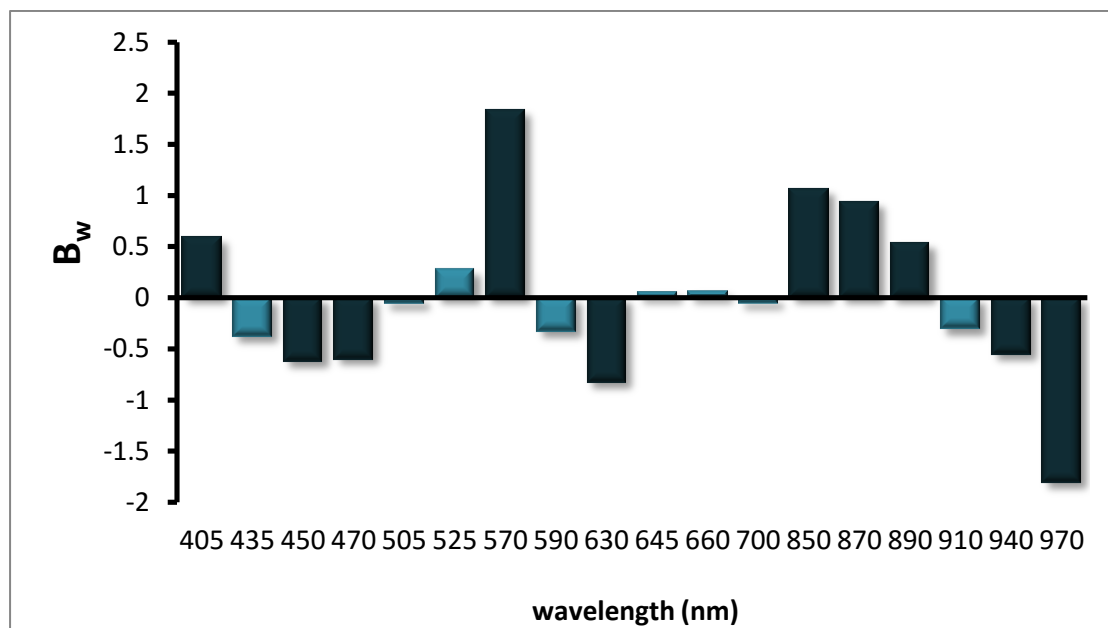


Σχήμα 7. Συντελεστές παλινδρόμησης για τη *S.liquefaciens*

Από τις τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης για κάθε μήκος κύματος εμείς κρατάμε τα μήκη κύματος που έχουν υψηλές θετικές ή αρνητικές τιμές καθώς αυτά συμβάλλουν στην καλύτερη επίδοση του μοντέλου και μεταφέρουν χρήσιμες πληροφορίες [9]. Για το μοντέλο της που αναπτύχθηκε για τη *Serratia*, οι πιο σημαντικοί συντελεστές παλινδρόμησης που επηρεάζουν την ανεξάρτητη μεταβλητή μας, δηλαδή το μικροβιακό πληθυσμό, είναι όπως φαίνεται τα μήκη κύματος 435nm, 470nm, 570nm, 630nm, 645nm, 850nm, 870nm, 890nm, 940nm και 970nm. Το μήκος κύματος 970nm έχει την υψηλότερη κατά απόλυτη τιμή συντελεστή παλινδρόμησης που δείχνει ότι συνεισφέρει περισσότερο στην εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Το συγκεκριμένο μήκος κύματος αντιστοιχεί στην ανάκλαση από το νερό. Η αρνητική τιμή του συντελεστή παλινδρόμησης δηλώνει ότι το δείγμα κατά την εξέλιξη της αλλοίωσης χάνει υγρασία σε μεγάλο ποσοστό. Οι υψηλές τιμές του συντελεστή παλινδρόμησης στα μήκη κύματος 850nm, 870nm και 890nm τα οποία αντιστοιχούν στην ανάκλαση από πρωτεΐνες, δηλώνουν την παρουσία ενζύμων που οδηγούν σε φυσικοχημικές αλλαγές της δομής του κρέατος, όπως οξειδωση και αμαύρωση. Επίσης, η διαφορά στην ανάκλαση στα 630nm και στα 570nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της οξυμογλοβίνης [10]. Η μέγιστη ανάκλαση της οξυμοσφαιρίνης συμβαίνει στα 630nm ενώ η ελάχιστη στα 570nm. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή η διαφορά τόσο πιο έντονο είναι το κόκκινο χρώμα του κρέατος λόγω της χρωστικής αυτής κάτι που συνδέεται με τη φρεσκότητα [11]. Οι τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης στα 435 και 470nm αντιστοιχούν στη μεταμυογλοβίνη η οποία προσδίδει ένα καφέ χρώμα στο κρέας αφού ο σίδηρος στο κέντρο της αίμης έχει οξειδωθεί.



Σχήμα 8. Ευθεία παλινδρόμησης για *S.liquefaciens*

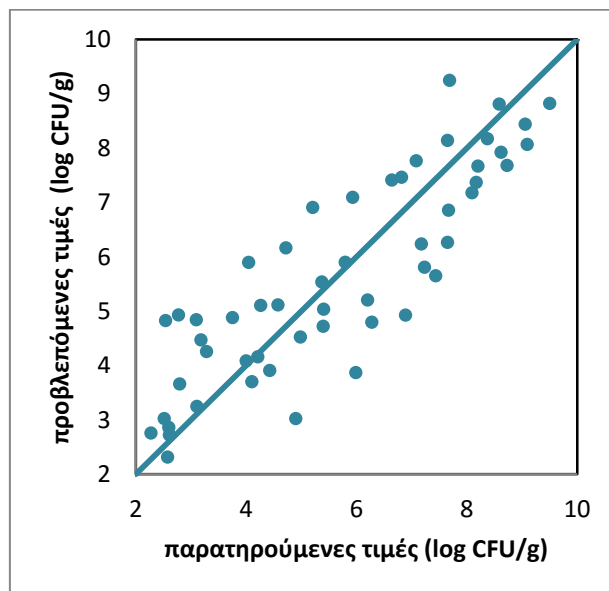


Σχήμα 9. Συντελεστές παλινδρόμησης για τη *Hafnia*

Τα μήκη κύματος που δίνουν τις σημαντικότερες πληροφορίες για το μεταβολικό προφίλ της *Hafnia Alvei* είναι τα 405nm, 450nm, 470nm, 570nm, 630nm, 850nm, 870nm, 890nm, 940nm και 970nm. Όπως βλέπουμε είναι σχεδόν παρόμοια με τα μήκη κύματος που βρέθηκαν σημαντικά και για τη *Serratia*, επομένως και οι αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που αντανακλούν τα συγκεκριμένα μήκη κύματος είναι παρόμοια με αυτά που αναφέρθηκαν για τη *Serratia*. Δηλαδή, τα δείγματα με τη

Hafnia εμφανίζουν απώλεια υγρασίας και το λαμπερό κόκκινο χρώμα μεταβάλλεται κατά την αλλοίωση των δειγμάτων.

Για να ταυτίσουμε τις βιοχημικές μεταβολές στα δείγματα κρέατος με τη δράση των μικροοργανισμών εφαρμόσαμε διακριτική ανάλυση παραγόντων (PLS-DA). Με τον τρόπο αυτό θέλαμε να δούμε τη διάκριση στείρων και εμβολιασμένων δειγμάτων με βάση τα φασματοσκοπικά δεδομένα. Αν η διάκριση είναι ακριβής τότε θα μπορούσαμε να αντιστοιχήσουμε επακριβώς τις βιοχημικές μεταβολές με την μικροβιακή ανάπτυξη. Αναπτύχθηκαν μοντέλα για τα στείρα και τα εμβολιασμένα δείγματα αφού πρώτα τα δείγματα κωδικοποιούνταν, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «ένα έναντι των πολλών»[12]. Δημιουργώντας έναν πίνακα με 3 στήλες με τιμές 1 και 0, κάθε δείγμα με τη *Serratia* έπαιρνε την τιμή 1-0-0, κάθε δείγμα με τη *Hafnia* έπαιρνε την τιμή 0-1-0 και κάθε στείρο δείγμα την τιμή 0-0-1. Όσο πιο κοντά στο 1 βρίσκονται οι προβλεπόμενες τιμές μιας στήλης και οι υπόλοιπες έτειναν στο 0, τότε το δείγμα κατατάσσεται στην κατηγορία αυτή. Η ακρίβεια της ταξινόμησης υπολογίζεται από το λόγο των σωστών ταξινομήσεων προς το σύνολο των δειγμάτων. Ειδικότερα παρατηρήσαμε πόσα εμβολιασμένα δείγματα ταξινομήθηκαν ως στείρα και το αντίστροφο. Το ποσοστό των σωστών ταξινομήσεων ήταν 75.3%. Υπάρχει επομένως μια σαφής διάκριση εμβολιασμένων και στείρων δειγμάτων. Βέβαια υπάρχει και ένα ποσοστό, το $\frac{1}{4}$ περίπου των δειγμάτων που δεν είναι σωστά ταξινομημένο οπότε κάποιες από τις οργανοληπτικές αλλαγές που εντοπίστηκαν στα δείγματα κατά την πάροδο του χρόνου οφείλονται σε φυσικοχημικά αίτια.



Σχήμα 10. Ευθεία παλινδρόμησης για τη *Hafnia*

Από τα μήκη κύματος που είναι πιο σημαντικά και τους συντελεστές παλινδρόμησης μπορούμε να δημιουργήσουμε μια ποσοτική εξίσωση για κάθε ένα από τα δύο είδη εντεροβακτηρίων που θα προβλέπει τον πληθυσμό τους:

$$\begin{aligned}
Y_{serratia} = & -0.725 \cdot X_{435nm} + 0.407 \cdot X_{470nm} + 0.358 \cdot X_{570nm} - 0.456 \cdot X_{630nm} \\
& - 0.354 \cdot X_{645nm} + 0.799 \cdot X_{850nm} + 0.678 \cdot X_{870nm} + 0.431 \\
& \cdot X_{890nm} - 0.355 \cdot X_{940nm} - 1.365 \cdot X_{970nm}
\end{aligned}
\tag{5}$$

$$\begin{aligned}
Y_{hafnia} = & 0.588 \cdot X_{405nm} - 0.626 \cdot X_{450nm} - 0.598 \cdot X_{470nm} + 1.831 \cdot X_{570nm} \\
& - 0.828 \cdot X_{630nm} + 1.06 \cdot X_{850nm} + 0.937 \cdot X_{870nm} + 0.531 \cdot X_{890nm} \\
& - 0.559 \cdot X_{940nm} - 1.80 \cdot X_{970nm}
\end{aligned}
\tag{6}$$

Η ευθεία παλινδρόμησης κάθε μοντέλου που κατασκευάστηκε για τους δύο μικροοργανισμούς ταίριαζε σε ικανοποιητικό βαθμό τις παρατηρούμενες και τις προβλεπόμενες τιμές. Ο συντελεστής συσχέτισης ήταν στην πρώτη περίπτωση 0.917 και στη δεύτερη 0.859 περίπου που σημαίνει ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ μικροβιολογικών και φασματοσκοπικών δεδομένων. Συντελεστής συσχέτισης από 0.7-0.9 χαρακτηρίζεται ως ισχυρός συντελεστής [13].

Για την εκτίμηση της αξιοπιστίας των μοντέλων υπολογίστηκαν κάποιοι δείκτες επίδοσης. Ο πρώτος δείκτης επίδοσης είναι ο δείκτης προκατάληψης (Bias Factor) ο οποίος χαρακτηρίζεται ως πολλαπλασιαστικός παράγοντας [14]. Ο αντιλογάριθμος του δείκτη προκατάληψης προβλέπει αν το μοντέλο υπερεκτιμά ή υποεκτιμά τον πληθυσμό των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Υπολογίζεται ως εξής:

$$B_f = 10^{(\sum_i^n \log(O_i - P_i)/n)}$$
(7)

Ο δεύτερος δείκτης επίδοσης είναι ο συντελεστής ακριβείας (Accuracy Factor) ο οποίος ορίζεται :

$$A_f = 10^{(\sum_i^n |\log(O_i - P_i)|/n)}$$
(8)

Οι τιμές του συντελεστή ακριβείας είναι ίσες ή μεγαλύτερες της μονάδας. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του τόσο μειώνεται η ακρίβεια του μοντέλου.

Επίσης υπολογίστηκε και η απόκλιση μέσης τετραγωνικής ρίζας (root mean square error) με την οποία εκτιμώνται οι διαφορές προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών. Όσο πιο κοντά στη μονάδα είναι η τιμή του τόσο ελαχιστοποιούνται οι διαφορές και άρα τόσο καλύτερη η προβλεψιμότητα του μοντέλου.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_i^n (O_i - P_i)^2}{n}}$$

(9)

Όπου:

O_i οι παρατηρούμενες τιμές

P_i οι προβλεπόμενες τιμές

n το πλήθος των παρατηρήσεων

Πίνακας 22. Λανθάνουσες μεταβλητές και δείκτες επίδοσης των δύο μοντέλων

Μικροοργανισμός	Λανθάνουσες μεταβλητές	B_f	A_f	RMSE	Correlation
S.liquefaciens	5	1.008	1.142	0.808	0.917
Hafnia Alvei	6	1.024	1.195	1.094	0.859

Ο κατάλληλος αριθμός λανθανουσών μεταβλητών που περιγράφουν τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων για τους δύο μικροοργανισμούς ήταν 5 για τη S.liquefaciens και 6 για τη Hafnia Alvei. Ο δείκτης προκατάληψης (Bias Factor) ήταν κοντά στην μονάδα που σημαίνει ότι δεν υπάρχει συστηματική υπερ- ή υπο- εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού. Οι τιμές συντελεστή ακριβείας (Accuracy Factor) δείχνουν ότι η μέση απόκλιση των τιμών που προβλέπει το μοντέλο σε σχέση με τις παρατηρούμενες τιμές είναι 14,2% για τη S.liquefaciens και 19,5% για τη Hafnia Alvei.

4.3.2 Ποιοτικός προσδιορισμός αλλοίωσης

Σκοπός μας είναι η δημιουργία ενός μοντέλου το οποίο να κατατάσσει τα δείγματα κρέατος σε κάποια από τις κατηγορίες που έχουμε ορίσει βάσει του οργανοληπτικού ελέγχου. Το πρώτο βήμα είναι ο διαχωρισμός σε κατηγορίες με βάση το μικροβιακό πληθυσμό. Η διαδικασία αυτή θεωρείται μία αντικειμενική προσέγγιση παρά το γεγονός ότι δεν υπάρχει συμφωνία στη βιβλιογραφία για τα όρια πάνω από τα οποία το κρέας προσδιορίζεται ως αλλοιωμένο [10,15]. Γενικά, κρέας αποθηκευμένο σε αερόβιες συνθήκες θεωρείται αλλοιωμένο όταν ο μικροβιακός πληθυσμός στην επιφάνειά του ξεπεράσει τους 7 λογαρίθμους, εκκρίνοντας έντονα σηπτικές οσμές. Επίσης, υπάρχει μια μεταβατική περίοδος προτού ένα φρέσκο δείγμα θεωρηθεί αλλοιωμένο, διάστημα στο οποίο μπορεί να έχουν αναπτυχθεί ελαφριές, κρεμώδεις οσμές αλλά το κρέας δεν θεωρείται ακατάλληλο για κατανάλωση[16]. Το διάστημα αυτό ορίστηκε όταν ο μικροβιακός πληθυσμός κυμαίνονταν μεταξύ 6-7 λογαρίθμων. Αξιολογώντας την ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων κρέατος κάναμε την παρακάτω κατηγοριοποίηση.

Πίνακας 23. Κατηγορίες διαχωρισμού του κρέατος βάσει του μικροβιακού πληθυσμού

Κατηγορία	log cfu/g
Φρέσκο	< 5
Ημιφρέσκο	5 -7
Αλλοιωμένο	> 7

4.3.2.1 Διαχωριστική Ανάλυση (discriminant function analysis)

Το δεύτερο βήμα για την ποιοτική διάκριση των δειγμάτων κρέατος ήταν η εφαρμογή της διαχωριστικής ανάλυσης. Η διαχωριστική ανάλυση χρησιμοποιείται για να καθορίσει ποιες συνεχείς μεταβλητές ταξινομούνται σε δύο ή περισσότερες ομάδες που έχουν προσδιορισθεί με φυσικό τρόπο, a priori [17]. Περιλαμβάνει τον καθορισμό μιας γραμμικής εξίσωσης η οποία θα προβλέπει σε ποια ομάδα ανήκει κάθε παρατήρηση. Η μορφή της εξίσωσης 10 είναι παρόμοια με αυτήν που μας δίνει η εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης.

$$D = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_iX_i \quad (10)$$

Όπου:

D = διαχωριστικός βαθμός (discriminant score)

b_0 =σταθερά

b_i =συντελεστές διαχωριστικής ανάλυσης

X_{1-i} =βαθμός κάθε μεταβλητής

Οι συντελεστές b μεγιστοποιούν την απόσταση μεταξύ των μέσων από την εξαρτημένη μεταβλητή. Ο διαχωριστικός βαθμός μιας συνάρτησης υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας κάθε μεταβλητή με το αντίστοιχο βάρος. Στη συνέχεια οι διαχωριστικοί βαθμοί χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό του μέσου διαχωριστικού βαθμού, του κεντροειδούς κάθε ομάδας. Όσο πιο κοντά είναι ο διαχωριστικός βαθμός στον κεντροειδή μιας συγκεκριμένης ομάδας τόσο πιο πιθανό είναι να ανήκει η παρατήρηση αυτή στην ομάδα αυτή. Ο σκοπός της διαχωριστικής συνάρτησης είναι να μεγιστοποιήσει την απόσταση μεταξύ των κατηγοριών ώστε να γίνεται όσο το δυνατόν πιο ξεκάθαρη η κατηγοριοποίηση των παρατηρήσεων. Η διαχωριστική ανάλυση παραγόντων μπορεί να χωριστεί σε δύο διαδοχικά βήματα. Το πρώτο είναι η δοκιμή σημαντικότητας των διαχωριστικών συναρτήσεων και το δεύτερο είναι η ταξινόμηση. Στο πρώτο βήμα συγκρίνεται η μήτρα των συνολικών διακυμάνσεων και συνδιασπορών με τη μήτρα των διακυμάνσεων και συνδιασπορών εντός της κάθε ομάδας. Η σύγκριση γίνεται με F-test ώστε να προσδιοριστούν εφόσον υπάρχουν σημαντικές διαφορές

μεταξύ των ομάδων. Αν βρεθούν σημαντικές διαφορές, προχωράμε στον προσδιορισμό των μεταβλητών που έχουν σημαντικά διαφορετικούς μέσους μέσα σε κάθε ομάδα. Ταυτοποιώντας τις στατιστικά σημαντικές μεταβλητές το επόμενο βήμα είναι η ταξινόμηση. Μια κανονική ανάλυση συσχέτισης ολοκληρώνεται με τον προσδιορισμό των διαδοχικών συναρτήσεων και των κανονικών ριζών. Οι παρατηρήσεις κατατάσσονται στην ομάδα στην οποία είχαν την υψηλότερη βαθμολογία ταξινόμησης. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μιας διαχωριστικής ανάλυσης εξαρτάται από την ερμηνεία των διαχωριστικών συναρτήσεων. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Statistica, Statsoft. Με το πρόγραμμα αυτό υπολογίσαμε τους τυποποιημένους συντελεστές οι οποίοι καθορίζουν τις σχέσεις των διαχωριστικών μεταβλητών στις συναρτήσεις. Εξετάζοντας την απόλυτη τιμή των τυποποιημένων συντελεστών μπορούμε να καταλάβουμε ποιες είναι οι μεταβλητές που είναι πιο σημαντικές στο διαχωρισμό των ομάδων. Το πρόσημο τους δείχνει την κατεύθυνση της σχέσης μεταξύ μεταβλητών και συνάρτησης. Στη συνέχεια διαχωρίζονται οι μεταβλητές που έχουν το υψηλότερο ή το χαμηλότερο βάρος στη συνάρτηση. Το μέγεθος των συντελεστών των διαχωριστικών μεταβλητών δείχνει το πόσο συνεισφέρουν στο διαχωρισμό των ομάδων ενώ το πρόσημό τους την κατεύθυνση της σχέσης αυτής [18].

Το Wilks's Lambda είναι το κλάσμα της μεταβλητότητας ανάμεσα στις ομάδες (within-groups variability) προς τη συνολική μεταβλητότητα (total variability) των διαχωριστικών μεταβλητών. Το κλάσμα αυτό περιγράφεται από τον τύπο:

$$\text{Wilks's Lambda} = \frac{SS_{\text{within-groups}}}{SS_{\text{total}}} \quad (11)$$

Ο παραπάνω τύπος είναι ένα αντίστροφο μέτρο της σημαντικότητας των συναρτήσεων. Όσο μικρότερη είναι η τιμή του Wilks's Lambda για μια μεταβλητή τόσο πιο σημαντική είναι η μεταβλητή αυτή. Τιμές κοντά στο 1 δηλώνουν ότι η μεταβλητότητα των μεταβλητών οφείλεται σχεδόν εξ ολοκλήρου στις διαφορές μέσα στις ομάδες, ενώ τιμές κοντά στο 0 δείχνουν ότι η μεταβλητότητα οφείλεται στις διαφορές ανάμεσα στις ομάδες. Το chi-square test δείχνει αν η μεταβλητότητα που οφείλεται στις διαφορές των ομάδων είναι στατιστικά σημαντική.

Οι ιδιοτιμές (eigenvalues) είναι το κλάσμα της μεταβλητότητας μεταξύ των ομάδων (between groups variability) προς τη μεταβλητότητα ανάμεσα στις ομάδες (within-groups variability).

$$\text{Eigenvalue} = \frac{SS_{\text{between-groups}}}{SS_{\text{within-groups}}} \quad (12)$$

Η ιδιοτιμή αποτελεί έναν δείκτη αποτελεσματικότητας της διαχωριστικής συνάρτησης. Συμβάλλει επίσης στην επιλογή του αριθμού των διαχωριστικών

συναρτήσεων. Όσο πιο υψηλή τιμή έχει η ιδιοτιμή τόσο πιο αποτελεσματική είναι η διαχωριστική συνάρτηση.

Διαχωριστική ανάλυση για τη *Serratia liquefaciens*.

Πίνακας 24. Σημαντικές μεταβλητές για το μοντέλο της *Serratia*

nm	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F-remove	p-level
660	0.122014	0.937799	1.359705	0.268069
645	0.128719	0.888944	2.561075	0.089521
405	0.137227	0.833830	4.085336	0.024104
970	0.160601	0.712476	8.272879	0.000959
850	0.139978	0.817447	4.578063	0.016048
505	0.156026	0.733368	7.453224	0.001734
940	0.148137	0.772423	6.039855	0.005024
590	0.141274	0.809947	4.810288	0.013285
450	0.168431	0.679352	9.675804	0.000361
570	0.153904	0.743478	7.073119	0.002296

Το πρώτο βήμα από την εφαρμογή της διαχωριστικής ανάλυσης στα δεδομένα για τη *Serratia* ήταν η δημιουργία του μοντέλου πρόβλεψης και ο εντοπισμός των στατιστικά σημαντικών μεταβλητών. Στον πίνακα 24 με έντονο σκούρο χρώμα παρουσιάζονται οι μεταβλητές που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές $p < 0.05$, ενώ στον πίνακα 25 βλέπουμε ποιες μεταβλητές δεν βρέθηκαν σημαντικές. Τα μήκη κύματος 660nm και 645nm παρότι δεν είναι στατιστικά σημαντικά εντούτοις συνεισφέρουν στην απόδοση του μοντέλου αυξάνοντας την ακρίβεια διαχωρισμού.

Πίνακας 25. Μη Σημαντικές μεταβλητές για το μοντέλο της *Serratia*

nm	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F remove	p-level
435	0.114184	0.997900	0.042085	0.958831
470	0.111422	0.973764	0.538860	0.587588
525	0.112967	0.987268	0.257925	0.773929
630	0.110840	0.968680	0.646660	0.529180
700	0.112567	0.983767	0.330009	0.720856
870	0.112664	0.984612	0.312566	0.733338
890	0.111957	0.978441	0.440672	0.646691
910	0.114143	0.997543	0.049256	0.951996

Πίνακας 26. Συντελεστές διαχωριστικής συνάρτησης

nm	Φρέσκο	Ημιφρέσκο	Αλλοιωμένο
660	-151.55	-145.54	-147.42
645	169.97	161.58	163.57
405	-6.38	6.18	9.42
970	314.15	298.35	302.60
850	285.62	276.42	281.46
505	-47.64	-41.68	-38.24
940	-551.13	-528.88	-538.27
590	-51.40	-47.03	-49.43
450	114.23	97.44	92.35
570	-20.70	-17.38	-14.57
Constant	-1408.12	-1341.57	-1378.60

Ο πίνακας 26 μας δείχνει τους συντελεστές κάθε μεταβλητής για κάθε κατηγορία που έχουμε χωρίσει. Με βάση αυτές τις τιμές θα μπορούσαμε να δημιουργήσουμε μία εξίσωση για κάθε κατηγορία κρέατος έτσι ώστε κάθε ένα νέο σύνολο δεδομένων να μπορεί να ταξινομηθεί σε μία από τις τρεις κατηγορίες ανάλογα ποια κατηγορία προσεγγίζει περισσότερο ο βαθμός του συνόλου.

$$\begin{aligned}
 D_{\text{ΦΡΕΣΚΟ}} = & -1408.12 - 6.38 \cdot X_{405\text{nm}} + 114.23 \cdot X_{450\text{nm}} - 47.64 \cdot X_{505\text{nm}} \\
 & - 20.70 \cdot X_{570\text{nm}} - 51.40 \cdot X_{590\text{nm}} + 169.97 \cdot X_{645\text{nm}} - 151.55 \\
 & \cdot X_{660\text{nm}} + 285.62 \cdot X_{850\text{nm}} - 551.13 \cdot X_{940\text{nm}} + 314.15 \cdot X_{970\text{nm}}
 \end{aligned}
 \tag{13}$$

$$\begin{aligned}
 D_{\text{ΗΜΙΦΡΕΣΚΟ}} = & -1341.57 + 6.18 \cdot X_{405\text{nm}} + 97.44 \cdot X_{450\text{nm}} - 41.68 \cdot X_{505\text{nm}} \\
 & - 17.3 \cdot X_{570\text{nm}} - 47.03 \cdot X_{590\text{nm}} + 161.58 \cdot X_{645\text{nm}} - 145.54 \\
 & \cdot X_{660\text{nm}} + 276.42 \cdot X_{850\text{nm}} - 528.88 \cdot X_{940\text{nm}} + 298.35 \cdot X_{970\text{nm}}
 \end{aligned}
 \tag{14}$$

$$\begin{aligned}
 D_{\text{ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ}} = & -1378.60 + 9.42 \cdot X_{405\text{nm}} + 92.35 \cdot X_{450\text{nm}} - 38.24 \cdot X_{505\text{nm}} \\
 & - 14.5 \cdot X_{570\text{nm}} - 49.43 \cdot X_{590\text{nm}} + 163.57 \cdot X_{645\text{nm}} - 147.42 \\
 & \cdot X_{660\text{nm}} + 281.46 \cdot X_{850\text{nm}} - 538.27 \cdot X_{940\text{nm}} + 302.60 \cdot X_{970\text{nm}}
 \end{aligned}
 \tag{15}$$

Πίνακας 27. Κανονική ανάλυση συσχέτισης

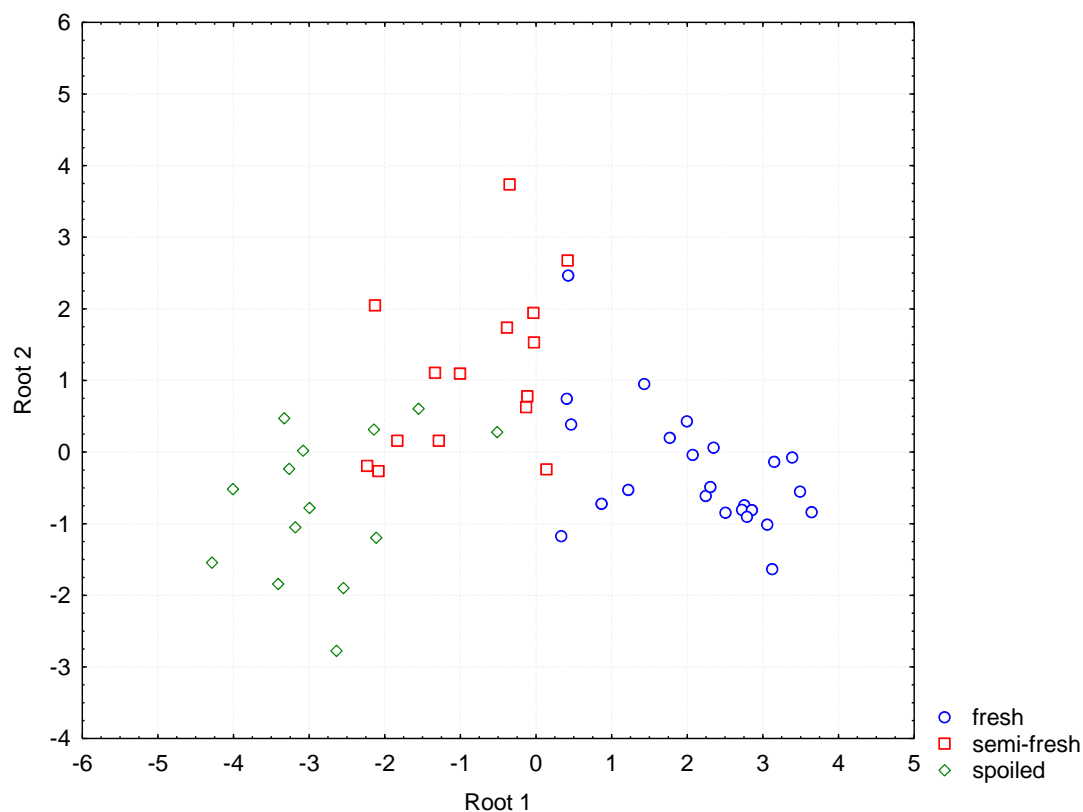
	ιδιοτιμή	Κανονικές ρίζες	Wilks' - Lambda	Chi-Sqr.	df	p-level
0	4.585188	0.906066	0.114424	98.63682	20	0.000000
1	0.564747	0.600765	0.639081	20.37144	9	0.015753

Στον πίνακα 27 παρουσιάζονται οι ιδιοτιμές και οι κανονικές ρίζες για κάθε διαχωριστική συνάρτηση.

Πίνακας 28. Τυποποιημένοι συντελεστές

nm	Root 1	Root 2
660	-6.0327	12.3865
645	9.1647	-16.1140
405	-1.7948	0.9729
970	12.6519	-23.7406
850	5.3129	-17.6834
505	-6.5607	0.6148
940	-15.5931	39.9075
590	-2.5490	8.4972
450	11.6142	-5.4340
570	-4.8641	-0.8677
ιδιοτιμή	4.5852	0.5647
Cum.Prop	0.8903	1.0000

Ο πίνακας 28 μας δίνει τους τυποποιημένους συντελεστές των οποίων η απόλυτη τιμή δείχνει πόσο συνεισφέρει η συγκεκριμένη μεταβλητή στη συνάρτηση και το πρόσημο τους δείχνει την κατεύθυνση της σχέσης αυτής όπως προαναφέρθηκε.



Σχήμα 11. Κατηγοριοποίηση δειγμάτων

Η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων που ήταν εμβολιασμένα με τη *Serratia* φαίνεται στο παραπάνω σχήμα. Υπολογίζοντας το ποσοστό των σωστών ταξινομήσεων μπορούμε να πούμε το μοντέλο της διαχωριστικής ανάλυσης για τη *Serratia* μπορεί να διακρίνει την ποιοτική κατηγορία του κρέατος σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό.

Πίνακας 29. Ακρίβεια πρόβλεψης για το μοντέλο της *Serratia*

	Ευαισθησία (%)	Φρέσκο	Ημιφρέσκο	Αλλοιωμένο
Φρέσκο	87.5	21	3	0
Ημιφρέσκο	80.0	0	12	3
Αλλοιωμένο	85.7	0	2	12
Συνολική ακρίβεια πρόβλεψης	85.2	21	17	15

Διαχωριστική ανάλυση για τη Hafnia Alvei.

Εφαρμόζοντας τη διαχωριστική ανάλυση και για τα δείγματα που ήταν εμβολιασμένα με τη Hafnia Alvei δημιουργήσαμε το μοντέλο που περιγράφεται από τις μεταβλητές που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 30. Σημαντικές μεταβλητές για το μοντέλο της Hafnia

nm	Wilks' - Lambda	Partial - Lambda	F-remove	p-level
700	0.208674	0.934493	1.437032	0.249349
405	0.206131	0.946025	1.169615	0.320630
970	0.232705	0.837993	3.963220	0.026695
570	0.243365	0.801284	5.083942	0.010657
435	0.246898	0.789818	5.455349	0.007931
470	0.279409	0.697919	8.873024	0.000628
450	0.267425	0.729194	7.613228	0.001543
940	0.210992	0.924228	1.680680	0.198824
630	0.217337	0.897246	2.347688	0.108315
910	0.204944	0.951501	1.044901	0.360904

Λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα μήκη κύματος που είναι στατιστικά σημαντικά και φαίνονται με σκούρο χρώμα ($p < 0.05$), όσο και τα μήκη κύματος 700nm, 405nm, 940nm, 630nm και 910nm κατασκευάζουμε τις εξισώσεις που δίνουν τη μέγιστη ακρίβεια πρόβλεψης.

Πίνακας 31. Συντελεστές διαχωριστικής συνάρτησης

nm	Φρέσκο	Ημιφρέσκο	Αλλοιωμένο
700	22.192	22.093	22.784
405	33.612	38.797	38.284
970	-11.478	-15.615	-14.146
570	-3.002	-2.188	0.606
435	164.526	143.502	197.203
470	19.692	8.224	37.810
450	-160.695	-133.071	-211.215
940	-155.465	-145.595	-156.299
630	-20.793	-20.921	-21.680
910	176.734	170.897	178.882
Constant	-766.229	-775.172	-800.727

Από τους συντελεστές της διαχωριστικής συνάρτησης δημιουργήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις για κάθε μία κατηγορία.

$$D_{\text{ΦΡΕΣΚΟ}} = -766.229 + 33.612 \cdot X_{405\text{nm}} + 164.526 \cdot X_{435\text{nm}} - 160.695 \cdot X_{450\text{nm}} \\ + 19.692 \cdot X_{470\text{nm}} - 3.002 \cdot X_{570\text{nm}} - 20.793 \cdot X_{630\text{nm}} + 22.192 \\ \cdot X_{700\text{nm}} + 176.734 \cdot X_{910\text{nm}} - 155.465 \cdot X_{940\text{nm}} - 11.478 \cdot X_{970\text{nm}}$$

(16)

(16)

$$D_{\text{ΗΜΙΦΡΕΣΚΟ}} = -775.172 + 38.797 \cdot X_{405\text{nm}} + 143.502 \cdot X_{435\text{nm}} - 133.071 \\ \cdot X_{450\text{nm}} + 8.224 \cdot X_{470\text{nm}} - 2.188 \cdot X_{570\text{nm}} - 20.921 \cdot X_{630\text{nm}} \\ + 22.093 \cdot X_{700\text{nm}} + 170.897 \cdot X_{910\text{nm}} - 145.595 \cdot X_{940\text{nm}} \\ - 15.615 \cdot X_{970\text{nm}}$$

(17)

$$D_{\text{ΑΛΛΟΙΩΜΕΝΟ}} = -800.727 + 38.284 \cdot X_{405\text{nm}} + 197.203 \cdot X_{435\text{nm}} - 211.215 \\ \cdot X_{450\text{nm}} + 37.810 \cdot X_{470\text{nm}} + 0.606 \cdot X_{570\text{nm}} - 21.680 \cdot X_{630\text{nm}} \\ + 22.784 \cdot X_{700\text{nm}} + 178.882 \cdot X_{910\text{nm}} - 156.299 \cdot X_{940\text{nm}} \\ - 14.146 \cdot X_{970\text{nm}}$$

(18)

Πίνακας 32. Κανονική ανάλυση συσχέτισης

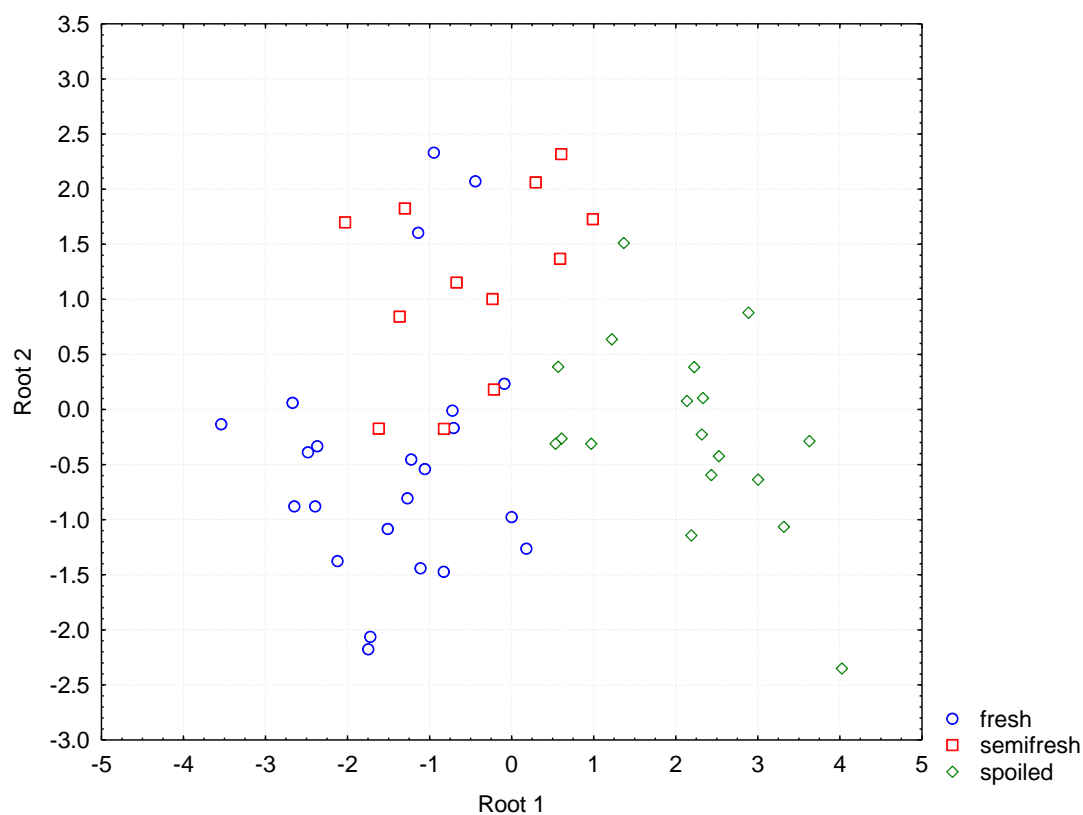
	ιδιοτιμή	Κανονικές ρίζες	Wilks' - Lambda	Chi-Sqr.	df	p-level
0	2.604214	0.850028	0.195005	74.38028	20	0.000000
1	0.422801	0.545125	0.702839	16.04457	9	0.065957

Πίνακας 33. Τυποποιημένοι συντελεστές

nm	Root 1	Root 2
700	0.8977	-0.8393
405	0.9414	2.1254
970	-3.6897	-13.7674
570	5.7619	-0.5006
435	28.0817	-51.5920
470	24.6033	-44.7466
450	-56.5934	94.1508
940	-4.1504	40.0914
630	-1.6023	0.4337
910	5.3171	-24.9911
Eigenval	2.6042	0.4228
Cum.Prop	0.8603	1.0000

Στους πίνακες 32 και 33 φαίνονται οι ιδιοτιμές και οι τυποποιημένοι συντελεστές όπως εκτιμήθηκαν από τη διαχωριστική ανάλυση που έγινε για τη Hafnia Alvei. Η πρώτη

κανονική ρίζα συμβάλλει κατά 86% στη διάκριση των κατηγοριών ενώ η δεύτερη κατά 14%.



Σχήμα 12. Κατηγοριοποίηση δειγμάτων

Στο σχήμα 12 φαίνεται ο διαχωρισμός των φρέσκων, των ημιφρέσκων και των αλλοιωμένων δειγμάτων.

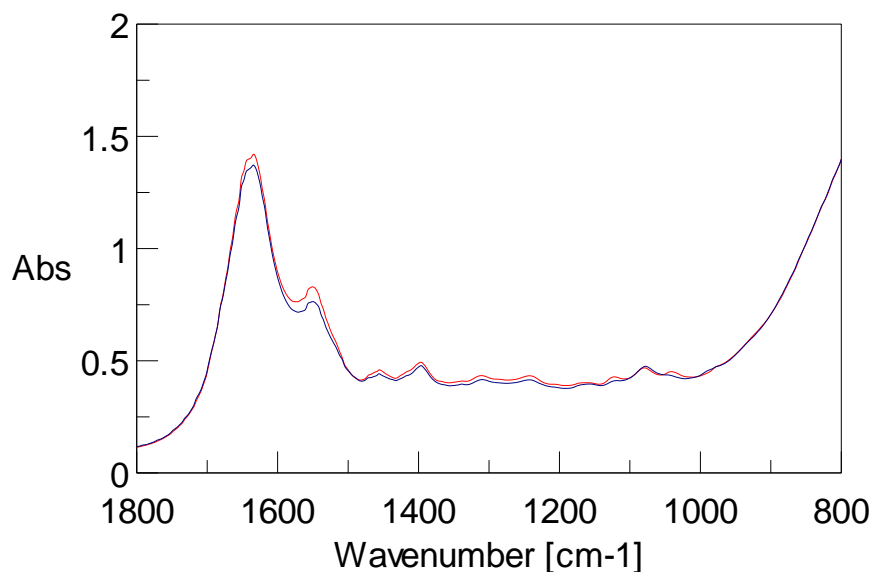
Πίνακας 34. Ακρίβεια πρόβλεψης για το μοντέλο της Hafnia

	Ευαισθησία (%)	Φρέσκο	Ημιφρέσκο	Αλλοιωμένο
Φρέσκο	78.3	18	5	0
Ημιφρέσκο	75.0	3	9	0
Αλλοιωμένο	83.3	0	3	15
Συνολική ακρίβεια πρόβλεψης	79.2	21	17	15

Υπολογίζοντας το ποσοστό των σωστών ταξινομήσεων για τα δείγματα με τη Hafnia μπορούμε να πούμε ότι το μοντέλο που δημιουργήσαμε δίνει σχετικά ακριβείς προβλέψεις για την ποιότητα των δειγμάτων.

4.4 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων από το FTIR

4.4.1 Πρωτογενής ανάλυση των δεδομένων



Σχήμα 13. Φάσματα απορρόφησης ενός φρέσκου (κόκκινο) και ενός αλλοιωμένου (μπλε) δείγματος

Από όλο το εύρος του φάσματος το κομμάτι που έχει σημασία για τα τρόφιμα είναι το διάστημα από 800-1800 κυματάριθμους, διάστημα που αποτελεί το αποτύπωμα του τροφίμου [19]. Συγκρίνοντας τα φάσματα από ένα φρέσκο και ένα αλλοιωμένο δείγμα όπως φαίνεται και στο σχήμα 13 δεν μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες για τις βιοχημικές μεταβολές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αλλοίωσης. Αρχικά, για τη μείωση των διαστάσεων των δεδομένων, τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν. Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο standard normal variate (SNV) έγινε ο πρώτος μετασχηματισμός των δεδομένων σύμφωνα με την εξίσωση

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (19)$$

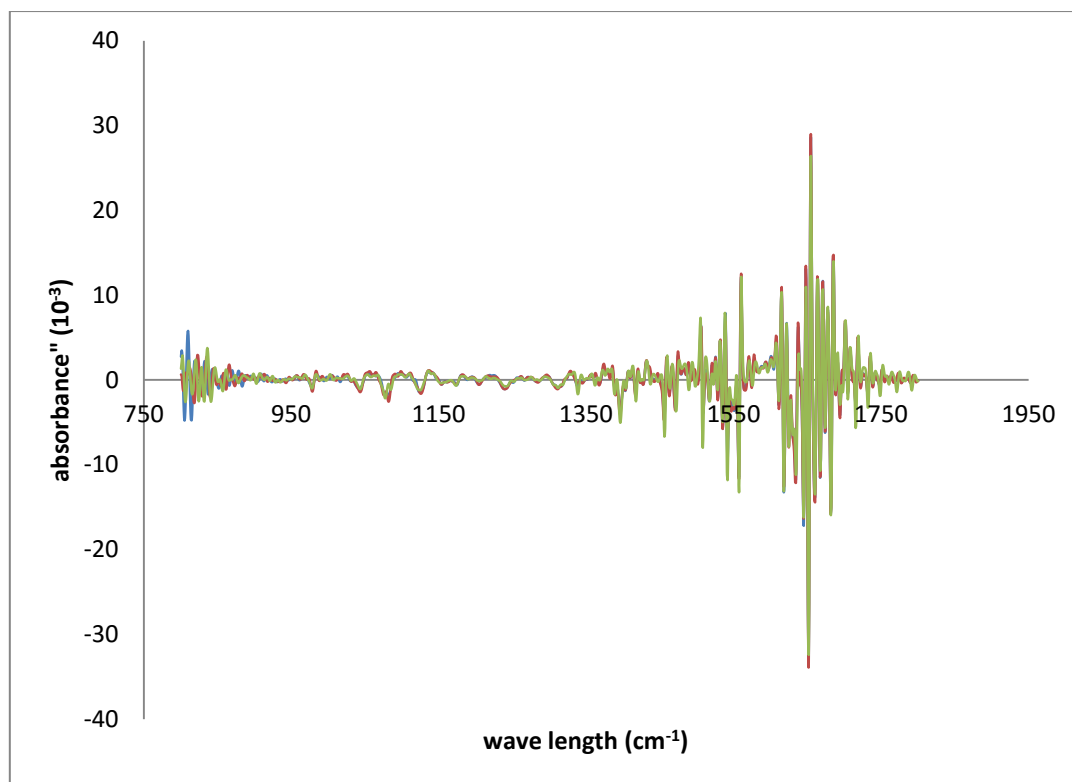
Όπου:

x = η τιμή που κανονικοποιείται

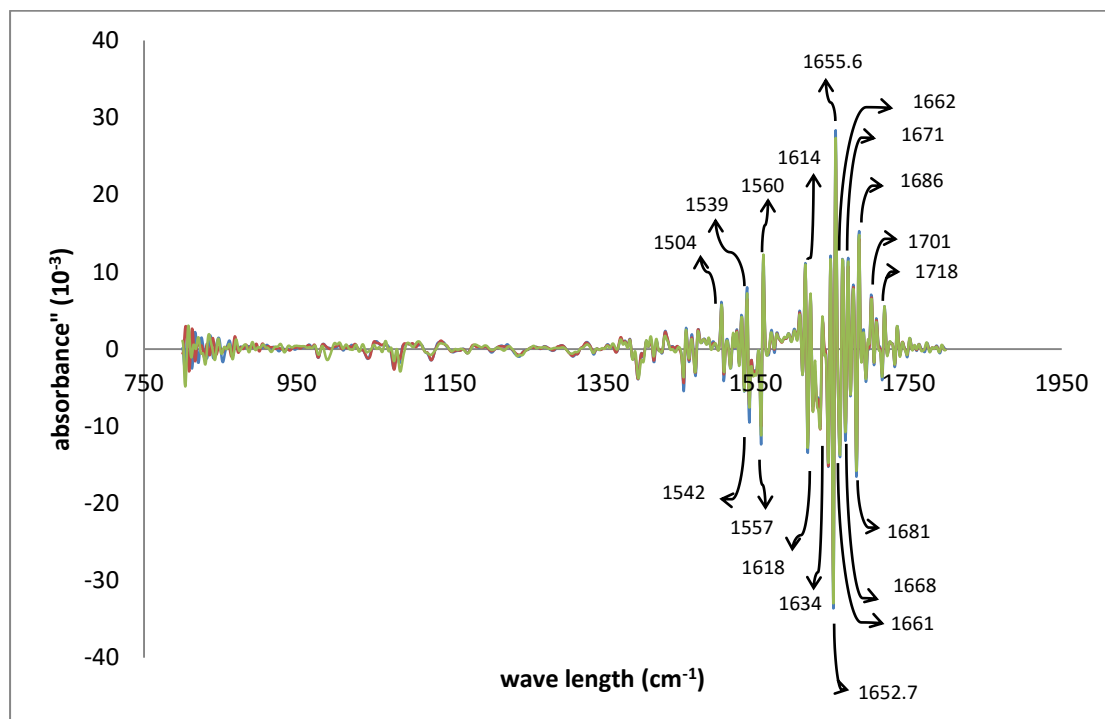
μ = μέσος όρος της κατανομής

σ = τυπική απόκλιση

Συνδυάζοντας τη μέθοδο αυτή με τη δεύτερη παράγωγο μπορούμε να απαλλαγούμε από την πολυσυγγραμμικότητα και την πολυπλοκότητα του αρχικού φάσματος.[20]

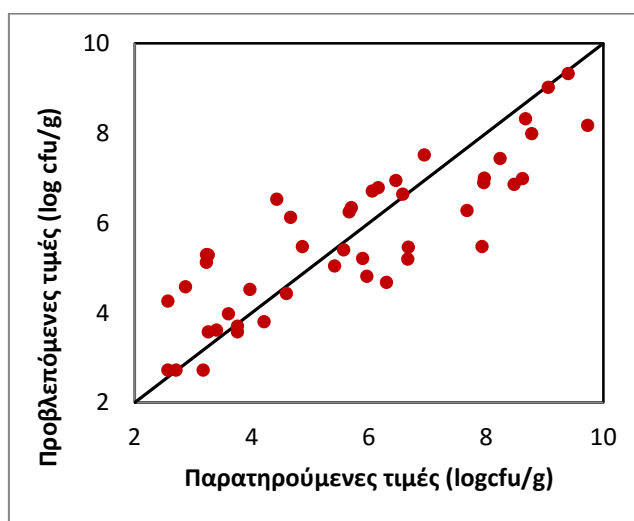


Σχήμα 14. Δεύτερη παράγωγος του φάσματος του FTIR για τη Serratia

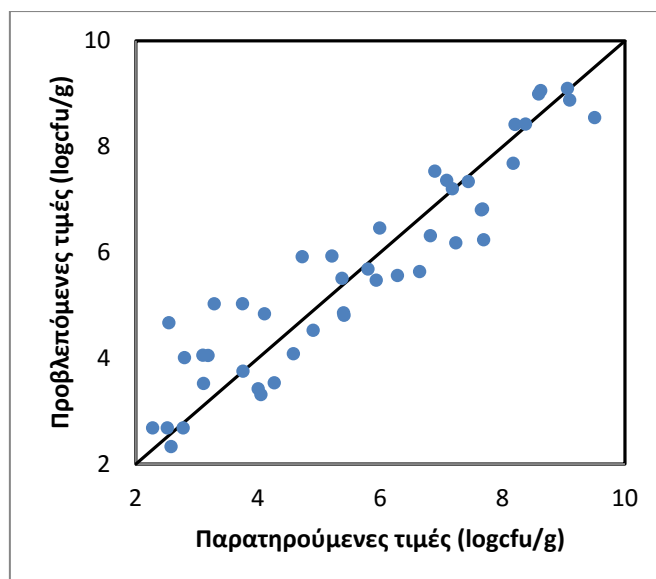


Σχήμα 15. Δεύτερη παράγωγος του φάσματος του FTIR για τη Hafnia

Από τα παραπάνω διαγράμματα μπορούμε να κάνουμε διαλογή των κορυφών που αντιστοιχούν σε παρόμοιους κυματάριθμους και για τα δύο φάσματα, οι οποίες αντιστοιχούν σε ακραίες τιμές της απορρόφησης και έτσι να δημιουργήσουμε ένα μοντέλο πρόβλεψης με βάση τις τιμές αυτές και τα μικροβιολογικά δεδομένα. Κάνοντας χρήση της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) χρησιμοποιώντας ως μεταβλητές εισόδου τα φασματοσκοπικά δεδομένα από τους επιλεγμένους κυματάριθμους και ως μεταβλητές εξόδου τις μικροβιακές μετρήσεις έγινε επιλογή των κατάλληλου αριθμού λανθανουσών μεταβλητών που εξηγούν το μεγαλύτερο μέρος της παραλλακτικότητας των δεδομένων. Με βάση τις προβλεπόμενες τιμές που δίνει το μοντέλο και τις παρατηρούμενες τιμές έγινε υπολογισμός των δεικτών επίδοσης του μοντέλου. Οι τιμές των δεικτών για τα μοντέλα ήταν κοντά στη μονάδα οπότε υπάρχει μια αρκετά καλή συσχέτιση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών και τα μοντέλα παρουσιάζουν μια αρκετά καλή προβλεψιμότητα. Πρέπει να προσθέσουμε ότι αυτές οι περιοχές που ορίζονται από τους επιλεγμένους κυματάριθμους σχετίζονται με την παρουσία νιτρικών ουσιών (δεσμός N-O) όπως η περιοχή από 1500-1550, στην εμφάνιση αμινών (δεσμός N-H) από 1580-1650 και στην εμφάνιση ακόρεστων αλδευδών και κετονών (δεσμός C=O) από 1665-1710 κυματάριθμους[21].



Σχήμα 16. Ευθεία παλινδρόμησης για τη *Serratia*



Σχήμα 17. Ευθεία παλινδρόμησης για τη Hafnia

Πίνακας 35. Λανθάνουσες μεταβλητές και δείκτες επίδοσης των μοντέλων

Μικροοργανισμός	Λανθάνουσες μεταβλητές	B_f	A_f	RMSE	Correlation
<i>S.liquefaciens</i>	4	1.021	1.179	1.108	0.855
<i>Hafnia Alvei</i>	5	1.006	1.152	0.787	0.930

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ποιοτική ανάλυση των δεδομένων ώστε τα δείγματα να ενταχθούν σε μία από τις προκαθορισμένες ομάδες. Εφαρμόζοντας τη μέθοδο PLS-DA, κάθε ομάδα κωδικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το 1 και το 0. Έτσι τα φρέσκα δείγματα είχαν ως κωδικό 1-0-0, τα ημιφρέσκα είχαν κωδικό 0-1-0 και τα αλλοιωμένα 0-0-1. Δημιουργώντας 3 στήλες με τους παραπάνω κωδικούς κατατάσσουμε τις τιμές που προέβλεψε το μοντέλο σε κάθε μία από τις παραπάνω στήλες. Όποια στήλη έχει τιμή πιο κοντά στη μονάδα αυτή κατατάσσει το δείγμα στην αντίστοιχη ομάδα. Η ακρίβεια ταξινόμησης για τη *Serratia liquefaciens* και τη *Hafnia Alvei* φαίνεται στους παρακάτω πίνακες. Η ακρίβεια είναι αρκετά υψηλή. Μόνο τα δείγματα που χαρακτηρίζονταν εκ των προτέρων ως ημιφρέσκα δεν είχαν καλή ταξινόμηση. Αυτό δείχνει ότι η αλλοίωση που επέρχεται όταν ο μικροβιακός πληθυσμός είναι μεταξύ 5 και 7 λογαρίθμων μπορεί να εκφραστεί διαφορετικά ανάλογα τις συνθήκες αποθήκευσης του κρέατος και ο χρόνος όπου αρχίζουν να αλλάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος να διαφέρει.

Πίνακας 36. Ακρίβεια πρόβλεψης για τη Serratia

	Ευαισθησία (%)	Φρέσκο	Ημιφρέσκο	Αλλοιωμένο
Φρέσκο	90.90	20	2	0
Ημιφρέσκο	62.50	1	5	2
Αλλοιωμένο	100	0	0	15
Συνολική ακρίβεια πρόβλεψης	88.88	21	17	15

Πίνακας 37 Ακρίβεια πρόβλεψης για τη Hafnia

	Ευαισθησία (%)	Φρέσκο	Ημιφρέσκο	Αλλοιωμένο
Φρέσκο	81.25	16	3	0
Ημιφρέσκο	54.55	1	6	4
Αλλοιωμένο	93.33	0	1	15
Συνολική ακρίβεια πρόβλεψης	80.43	21	17	15

4.4.2 Ιεραρχική ομαδοποίηση και ανάπτυξη μοντέλων για κάθε ομάδα

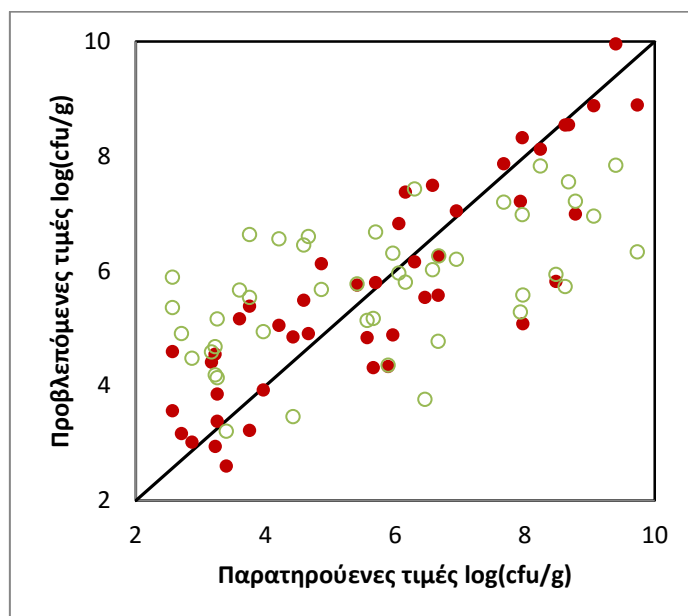
Στο εύρος των κυματάριθμων που μελετάμε μπορεί να γίνει μια ομαδοποίηση τους σε σχέση με την απορρόφηση. Για την ομαδοποίηση των μηκών κυμάτων χρησιμοποιήθηκε ιεραρχική ανάλυση κατά ομάδες (hierarchical cluster analysis). Ξεκινάμε με κάθε παρατήρηση να είναι από μόνη της μια ομάδα. Σε κάθε βήμα ενώνουμε τις 2 παρατηρήσεις που έχουν πιο μικρή απόσταση. Αν 2 παρατηρήσεις έχουν ενωθεί σε προηγούμενο βήμα ενώνουμε μια προϋπάρχουσα ομάδα με μια παρατήρηση μέχρι να φτιάξουμε μια ομάδα. Οι αποστάσεις των δεδομένων σε κάθε ομάδα ελαχιστοποιούνται ενώ οι αποστάσεις ανάμεσα στις συστάδες μεγιστοποιούνται βάσει της ευκλείδειας απόστασης. Κοιτώντας τα αποτελέσματα διαλέγουμε στις πόσες ομάδες θα σταματήσουμε.

Σύμφωνα με την ιεραρχική ανάλυση των δεδομένων κατά ομάδες, τα κύματα ομαδοποιούνται σε τέσσερα cluster (ομάδες). Στον Πίνακα 38 παρουσιάζονται οι ομάδες των κυμάτων καθώς και το μέγεθος της κάθε ομάδας. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει συνέχεια στα μήκη κύματος μέσα στην κάθε ομάδα. Μικρότερα μήκη κύματος δίνουν την ίδια απορρόφηση με μεγαλύτερα μήκη κύματος. Αυτό οφείλεται στο ότι τα μόρια των διαφορετικών ουσιών που εμφανίζονται κατά την αλλοίωση μπορεί να περιέχουν τους ίδιους δεσμούς (π.χ C=O) [22]. Η ομάδα με τα περισσότερα μήκη κύματος (N=689) είναι η τρίτη.

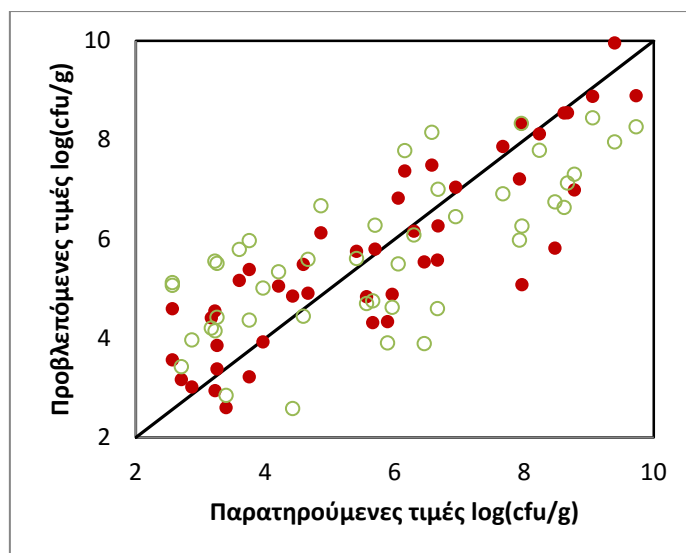
Πίνακας 38. Κατανομή των κυμάτων σε ομάδες

Μήκος Κυμάτων (ομάδες, clusters)	N
1: 800-857,1607-1667	123
2: 858-903,1534-1606,1668-1683	141
3: 904-1533,1684-1718	689
4: 1719-1799	84

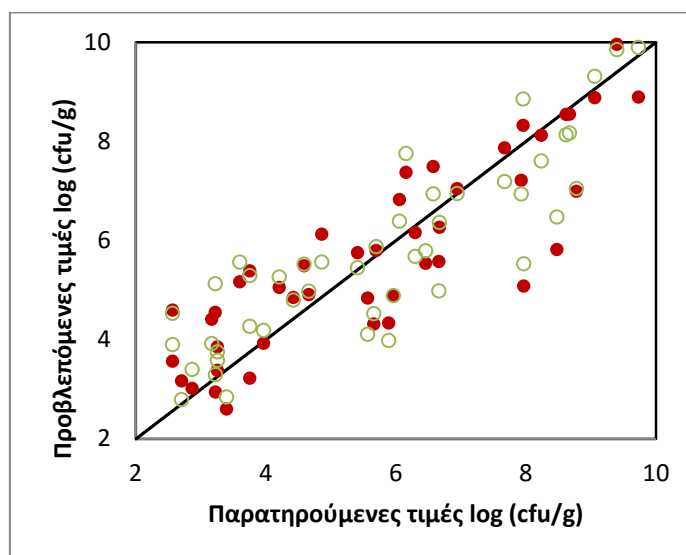
Με βάση την ομαδοποίηση των κυματάριθμων, δημιουργήθηκαν μοντέλα παλινδρόμησης για κάθε cluster και στη συνέχεια ερευνήσαμε κατά πόσο το καθένα από αυτά τα μοντέλα προσεγγίζει ένα μοντέλο που δημιουργήθηκε με βάση όλα τα φασματοσκοπικά δεδομένα από την περιοχή 800-1800 κυματάριθμων και τα αντίστοιχα μικροβιολογικά δεδομένα.



Σχήμα 18. Σχέση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών μεταξύ του γενικού μοντέλου και της 1^{ης} ομάδας για τη Serratia



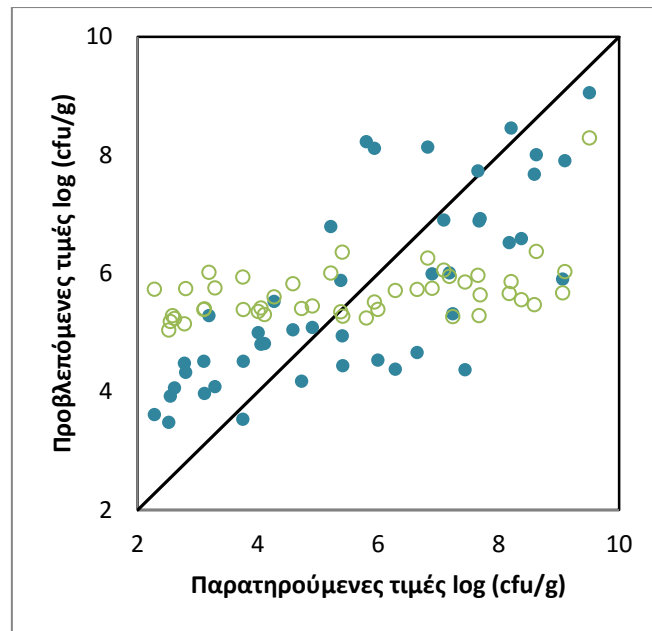
Σχήμα 19. Σχέση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών μεταξύ του γενικού μοντέλου και της 2^{ης} ομάδας για τη *Serratia*



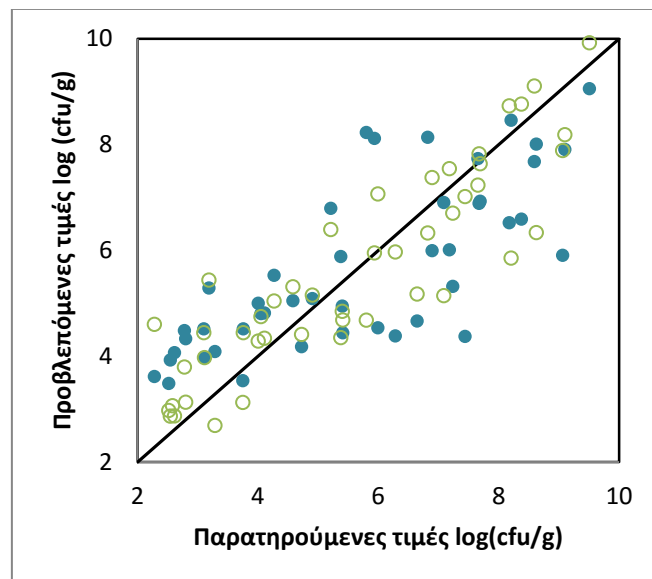
Σχήμα 20. Σχέση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών μεταξύ του γενικού μοντέλου και της 3^{ης} ομάδας για τη *Serratia*

Πίνακας 39. Λανθάνουσες μεταβλητές και δείκτες επίδοσης μοντέλων για κάθε ομάδα

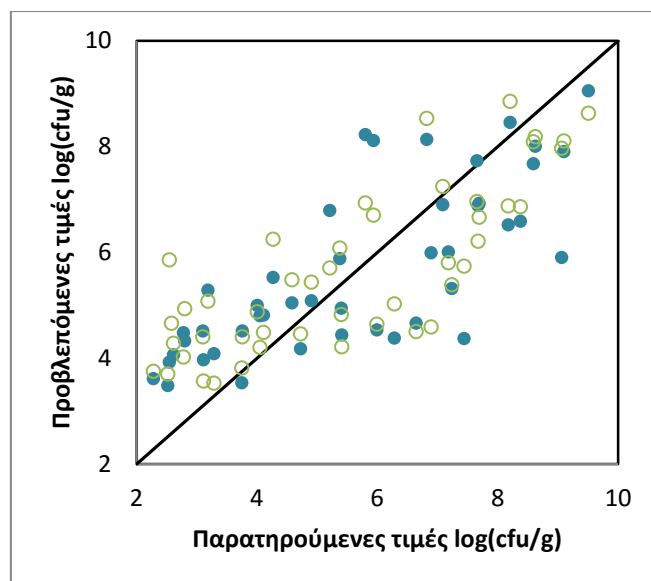
<i>S.liquefaciens</i>	Λανθάνουσες μεταβλητές	B_f	A_f	RMSE	Correlation
General	6	1.021	1.175	1.054	0.867
Cluster 1	2	1.061	1.324	1.732	0.575
Cluster 2	4	1.040	1.287	1.465	0.721
Cluster 3	5	1.027	1.179	1.064	0.864



Σχήμα 21. Σχέση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών μεταξύ του γενικού μοντέλου και της 1^{ης} ομάδας για τη Hafnia



Σχήμα 22. Σχέση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών μεταξύ του γενικού μοντέλου και της 2^{ης} ομάδας για τη Hafnia



Σχήμα 23. Σχέση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών μεταξύ του γενικού μοντέλου και της 3^{ης} ομάδας για τη Hafnia

Πίνακας 40. Λανθάνουσες μεταβλητές και δείκτες επίδοσης μοντέλων για κάθε ομάδα

Hafnia Alvei	Λανθάνουσες μεταβλητές	B_f	A_f	RMSE	Correlation
General	5	1.035	1.268	1.374	0.769
Cluster 1		1.103	1.404	1.969	0.462
Cluster 2	5	1.031	1.17	0.986	0.889
Cluster 3	4	1.068	1.256	1.316	0.797

Όπως βλέπουμε από τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν για τη Serratia και τη Hafnia, οι τιμές μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών στα cluster 2 και 3 έχουν μια πολύ καλή συσχέτιση και τα μοντέλα πρόβλεψης αρκετά καλή προβλεψιμότητα σε αντίθεση με το cluster 1. Οι ομάδες αυτές έχουν σχετισθεί με την ύπαρξη δεσμών C=O που αντιστοιχούν σε αμίδια αλλά και σε δεσμούς N-H που αντιστοιχούν σε αμίνες. Οι τιμές των ομάδων 2 και 3 προσεγγίζουν τις τιμές του γενικού μοντέλου κάτι που σημαίνει ότι τα μοντέλα των παραπάνω ομάδων θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ξεχωριστά το καθένα για την πρόβλεψη ενός συνόλου δεδομένων. Με αυτόν τρόπο, μειώνεται το εύρος των φασματοσκοπικών δεδομένων και κατ' επέκταση η πολυσυγγραμμικότητα. Επίσης, η μεταχείριση των δεδομένων γίνεται πιο απλή και εφαρμογή των στατιστικών μεθόδων πιο εύκολη.

Βιβλιογραφία 4^{ου} κεφαλαίου

1. Nychas, G. J. E., Drosinos, E. H. and R. G. Board. "**9 Chemical changes in stored meat.**" *Microbiology of meat and poultry* (1998): 288.
2. Degirmencioglu, Nurcan, et al. "**Effects of vacuum and modified atmosphere packaging on shelf life extension of minced meat chemical and microbiological changes.**" *Journal of Animal and Veterinary Advances* 11.7 (2012) 898-911.
3. Ridell, Jouko, and Hannu Korkeala. "**Minimum growth temperatures of *Hafnia alvei* and other Enterobacteriaceae isolated from refrigerated meat determined with a temperature gradient incubator.**" *International journal of food microbiology* 35.3 (1997): 287-292.
4. Baranyi, József, and Terry A. Roberts. "**A dynamic approach to predicting bacterial growth in food.**" *International journal of food microbiology* 23.3 (1994): 277-294.
5. Grijspeerdt, Koen, Peter Vanrolleghem, and Willy Verstraete. "**Selection of one-dimensional sedimentation: models for on-line use.**" *Water science and technology* 31.2 (1995): 193-204.
6. Trygg, Johan, and Svante Wold. "**Orthogonal projections to latent structures (O-PLS).**" *Journal of chemometrics* 16.3 (2002): 119-128.
7. Wold, Svante, Michael Sjöström, and Lennart Eriksson. "**PLS-regression: a basic tool of chemometrics.**" *Chemometrics and intelligent laboratory systems* 58.2 (2001): 109-130.
8. Arlot, Sylvain, and Alain Celisse. "**A survey of cross-validation procedures for model selection.**" *Statistics surveys* 4 (2010): 40-79.
9. Panagou, E. Z., et al. "**Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage.**" *International journal of food microbiology* 174 (2014): 1-11.
10. FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., et al. "**Characterization of the different states of myoglobin in pork using color parameters and reflectance ratios.**" *Journal of Muscle Foods* 11.3 (2000): 157-167.
11. Boylston, Terri, et al. "**Handbook of meat, poultry and seafood quality.**" Ed. Leo ML Nollet. John Wiley & Sons, 2012.
12. Berrueta, Luis A., Rosa M. Alonso-Salces, and Károly Héberger. "**Supervised pattern recognition in food analysis.**" *Journal of Chromatography A* 1158.1 (2007): 196-214.
13. Dancey, C., and John Reidy. "**Variables and research design.**" *Statistics without Maths for Psychology: Using SPSS for Windows Essex, England: Prentice Hall* (2004): 1-33.
14. Ross, T. "**Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology.**" *Journal of Applied Bacteriology* 81.5 (1996): 501-508.
15. El Barbri, Noureddine, et al. "**Electronic nose based on metal oxide semiconductor sensors as an alternative technique for the spoilage classification of red meat.**" *Sensors* 8.1 (2008): 142-156.

16. Panagou, Efstathios Z., et al. **"A comparison of artificial neural networks and partial least squares modelling for the rapid detection of the microbial spoilage of beef fillets based on Fourier transform infrared spectral fingerprints."** *Food microbiology* 28.4 (2011): 782-790.
17. Poulsen, John, and Aaron French. **"Discriminant function analysis."** *San Francisco State University: San Francisco, CA.* <http://userwww.sfsu.edu/~efc/classes/biol710/discrim/discrim.pdf> (2008).
18. Tinsley, Howard EA, and Steven D. Brown, eds. **"Handbook of applied multivariate statistics and mathematical modeling."** Academic Press, 2000.
19. Argyri, Anthoula A., et al. **"A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage."** *Food Control* 29.2 (2013): 461-470.
20. Ellis, David I., and Royston Goodacre. **"Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends."** *Trends in Food Science & Technology* 12.11 (2001): 414-424.
21. Papadopoulou, O., et al. **"Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage."** *Food Research International* 44.10 (2011): 3264-3271.
22. Barbin, Douglas F., et al. **"Non-destructive assessment of microbial contamination in porcine meat using NIR hyperspectral imaging."** *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 17 (2013): 180-191.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη συγκεκριμένη μελέτη έγινε προσπάθεια για μια ολιστική προσέγγιση της ποιότητας/ασφάλειας των τροφίμων. Επιλέχθηκε η μελέτη σε ένα ετερογενές τρόφιμο το οποίο λόγω της ποικιλίας των συστατικών και της μεγάλης ποσότητας νερού που περιέχει χαρακτηρίζεται ως ευαλλοίωτο. Η αλλοίωση του κρέατος είναι ένα κομμάτι στο οποίο τις τελευταίες δεκαετίες έχουν γίνει έρευνες για την γρήγορη εκτίμησή της, καθώς και την εκτίμηση του σταδίου στο οποίο έχει προχωρήσει. Έχουν αναπτυχθεί αναλυτικές, ταχείες μέθοδοι για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της αλλοίωσης. Εμείς μελετήσαμε και αξιολογήσαμε δύο από αυτές τις μεθόδους με αρκετά καλά αποτελέσματα.

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και η ανάλυση πολυφασματικής εικόνας είναι δύο καινοτόμες, μη επεμβατικές τεχνικές που δεν απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και μπορούν να δώσουν γρήγορες εκτιμήσεις για την αλλοίωση του κρέατος. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που λαμβάνονται από τα δύο όργανα συνδυάζονται με τα μικροβιολογικά δεδομένα με τη χρήση πολυμεταβλητής στατιστικής δημιουργώντας μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης. Μελετώντας ουσιαστικά την επίδραση της ακτινοβολίας στην επιφάνεια του κρέατος η οποία χαρακτηρίζεται από την μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών που επικρατούν σε αυτήν, εκτιμήθηκε σε πρώτη φάση ο πληθυσμός δύο μικροοργανισμών από την οικογένεια των *Enterobacteriaceae*, της *Serratia liquefaciens* και της *Hafnia Alvei* λαμβάνοντας φασματοσκοπικά δεδομένα στην περιοχή 400-900nm του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος με τη χρήση του VideometerLab. Η κατασκευή εξισώσεων που εκτιμάνε τον πληθυσμό του κάθε βακτηρίου γίνεται με βάση τα μήκη κύματος που έχουν την πιο σημαντική επίδραση όπως αυτά εκτιμούνται από τη εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης. Στη συνέχεια εφαρμόζοντας διαχωριστική ανάλυση παραγόντων τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν με αρκετά καλό ποσοστό στις τρεις κατηγορίες που είχαμε ορίσει για το κρέας. Σε δεύτερη φάση χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία στο εγγύς υπέρυθρο. Τα δεδομένα σε αυτή την περίπτωση υφίσταται μετασχηματισμό Fourier δίνοντας ένα φάσμα απορρόφησης. Συλλέγοντας τα δεδομένα του φάσματος που αποτελούν την ταυτότητα του τροφίμου κατασκευάστηκαν μοντέλα πρόβλεψης. Επειδή ο μεγάλος όγκος δεδομένων οδηγεί σε φαινόμενα πολυσυγγραμμικότητας και η διαχείρισή τους είναι αρκετά δύσκολη προσπαθήσαμε να συλλέξουμε αυτά που συνεισφέρουν περισσότερο στη διακύμανση του φάσματος και να δημιουργηθούν ομάδες με μικρότερο όγκο δεδομένων αλλά θα δίνουν παρόμοια αποτελέσματα με το σύνολο των δεδομένων. Και σε αυτήν την περίπτωση τα μοντέλα που κατασκευάστηκαν αξιολογήθηκαν ως αρκετά ακριβή.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να τονιστεί ο ρόλος της θερμοκρασίας στην αλλοίωση του κρέατος. Όπως παρατηρήσαμε η θερμοκρασία αποθήκευσης είχε σημαντική επίδραση στο χρόνο και το ρυθμό της αλλοίωσης. Τα μικροβιολογικά δεδομένα που

χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των μοντέλων πρόβλεψης συλλέχθηκαν από τις δειγματοληψίες στα δείγματα που είχαν αποθηκευτεί σε στατικές θερμοκρασίες 4°C και 10°C. Στην αλυσίδα όμως παραγωγής κρέατος δεν επικρατούν στατικές αλλά δυναμικές θερμοκρασίες. Γι αυτό το λόγο τα μοντέλα πρόβλεψης πρέπει να επικυρώνονται σε διαφορετικές θερμοκρασίες [1]. Συμπερασματικά, οι δύο αναλυτικές τεχνικές που μελετήθηκαν θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τις παραδοσιακές μικροβιολογικές μεθόδους και να ανταποκριθούν στις απαιτήσεις των βιομηχανιών τροφίμων για άμεσα και γρήγορα αποτελέσματα σχετικά με την ποιότητα των τροφίμων, εφόσον αρθούν κάποιες δυσκολίες μέσω της περαιτέρω έρευνας.[2]

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Τόσο στην ανάλυση πολυφασματικών εικόνων όσο και στη φασματοσκοπία υπερύθρου υπάρχουν κάποια εμπόδια που θα πρέπει να ξεπεραστούν.

Για παράδειγμα η φασματοσκοπία υπερύθρου μπορεί να δώσει επικαλυπτόμενα φάσματα που μπορεί να δώσουν μη έγκυρα αποτελέσματα αν στο τρόφιμο υπάρχει ένα κοκτέιλ μικροοργανισμών. Επίσης κάποια δείγματα που μπορεί να περιέχουν μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας μπορεί να προσδώσουν μια έντονη διακύμανση στο φάσμα απορρόφησης. Γι αυτό το λόγο θα πρέπει να γίνουν συνεχείς αναλύσεις σε δείγματα κρέατος εμβολιασμένα με έναν ή περισσότερους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς από κάθε τύπο βακτηρίων σε διαφορετικές θερμοκρασίες ώστε να δημιουργηθεί μια πλήρης βιβλιοθήκη φασμάτων και δεδομένων που θα διευκολύνει την άμεση εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος.

Από την άλλη πλευρά η ανάλυση πολυφασματικών εικόνων επειδή χρησιμοποιεί μια μπάνα μηκών κύματος περιέχει σε αρκετές περιπτώσεις άχρηστες πληροφορίες ενώ ταυτόχρονα η εξαγωγή των χρήσιμων πληροφοριών απαιτεί τη γνώση πολυμεταβλητής στατιστικής η οποία από τη μεριά της θέλει χρόνο. Η ανάπτυξη νέων αλγορίθμων ανάλυσης σήματος μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της απόδοσης της τεχνικής και στην εξοικονόμηση χρόνου. Επίσης είναι χρήσιμο να καταγραφούν οι αλλαγές στις εικόνες και στα φάσματα διάφορων αλλοιογόνων μικροοργανισμών προσδιορίζοντας αυτές τις αλλαγές ως αλλαγές λόγω της εξέλιξης της αλλοίωσης και όχι λόγω κάποιων φυσικοχημικών αιτιών.

Τέλος, είναι σημαντικό τα μοντέλα που έχουν δημιουργηθεί για την εκτίμηση των μικροβιακών πληθυσμών να επικυρώνονται με νέα, ανεξάρτητα δεδομένα που προέρχονται από δείγματα κρέατος ίδιου τύπου ζώου.

Βιβλιογραφία Συμπερασμάτων

1. Skandamis, Panagiotis N., and George-John E. Nychas. **"Development and evaluation of a model predicting the survival of Escherichia coli O157: H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations."** *Applied and Environmental Microbiology* 66.4 (2000): 1646-1653.
2. Xiong, Zhenjie, et al. **"Recent developments of hyperspectral imaging systems and their applications in detecting quality attributes of red meats: A review."** *Journal of food engineering* 132 (2014): 1-13.