



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ
ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΥ ΚΙΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΕ
ΙΣΟΘΕΡΜΕΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΑΕΡΟΒΙΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΣΩ ΤΑΧΕΩΝ ΚΑΙ
ΜΗ-ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ**



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Φακίρη Ε. Μαρία – Ιουλιέτα

Γεωπόνος

ΑΘΗΝΑ 2016

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΠΜΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ
ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ
ΜΟΣΧΑΡΙΣΙΟΥ ΚΙΜΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΕ
ΙΣΟΘΕΡΜΕΣ ΚΑΙ ΔΥΝΑΜΙΚΕΣ ΑΕΡΟΒΙΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΜΕΣΩ ΤΑΧΕΩΝ ΚΑΙ
ΜΗ-ΕΠΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΦΑΚΙΡΗ Ε. ΜΑΡΙΑ-ΙΟΥΛΙΕΤΑ

Γεωπόνος

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Πανάγου Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Δροσινός Ελευθέριος, Καθηγητής

Ταραντίλης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2016

*Success is the ability
to go from one failure to another
with no loss of enthusiasm*
W. Churchill

Αφιερώνεται στους γονείς μου,

Μανώλη και Χριστίνα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Κατ' αρχήν θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου και τις πιο θερμές μου ευχαριστίες προς τον επίκουρο καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου, ο οποίος με υποστήριξε σε όλες τις δύσκολες στιγμές κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης και με καθοδήγησε με τις πολύτιμες συμβουλές του. Ιδιαίτερα τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου τη παρούσα μελέτη και για την υποστήριξή του σε κάθε μου βήμα.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον καθηγητή κ. Ελευθέριο Δροσινό και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Πέτρο Ταραντίλη για το χρόνο που αφιέρωσαν στη μελέτη του παρόντος κειμένου.

Τις ευχαριστίες μου απευθύνω επίσης σε όλους τους μεταδιδακτορικούς, τους υποψήφιους διδάκτορες, του συμφοιτητές μου που πραγματοποίησαν την ίδια χρονική περίοδο την πτυχιακή τους μελέτη, με τους οποίους υπήρξε μια άψογη συνεργασία. Επίσης ευχαριστώ το εργαστήριο του ποιοτικού ελέγχου, της μηχανικής τροφίμων και της οιολογίας που κατά τη διάρκεια των οργανοληπτικών ελέγχων που γινόντουσαν με υποστήριξαν.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω ένα πρόσωπο που προτιμά να μείνει ανώνυμο αλλά ήταν καθοριστικός παράγοντας για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής εργασίας και με στήριξε στο μεταπτυχιακό. Δε μπορώ να μην ευχαριστήσω τις συμφοιτήτριες - φίλες μου για τη στήριξη και εμπύχωσή τους καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος αλλά και όλες τις φίλες μου που παρέμειναν δίπλα μου ακόμα και όταν δεν μπορούσα να είμαι μαζί τους λόγω υποχρεώσεων του μεταπτυχιακού.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους γονείς μου Εμμανουήλ Φακίρη και Χριστίνα Σπυροπούλου που μου έδωσαν την ευκαιρία να πραγματοποιήσω το όνειρό μου κάνοντας αυτό το μεταπτυχιακό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο γενικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής του βόειου κιμά με τη χρήση των εργαλείων της προρρητικής μικροβιολογίας καθώς επίσης και ο προσδιορισμός της αλλοίωσης με διαφορετικές ταχείες, μη καταστρεπτικές και μη επεμβατικές αναλυτικές τεχνικές όπως η πολυφασματική απεικόνιση και η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) .

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα, δείγματα βόειου κιμά συσκευάστηκαν σε αερόβιες συνθήκες και αποθηκεύτηκαν σε τρεις διαφορετικές ισόθερμες συνθήκες (2, 6 και 10°C). Κατά τη διάρκεια της συντήρησης καταγράφηκε η εξέλιξη της μικροχλωρίδας του κιμά και ειδικότερα η μεταβολή της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ), των οξυγαλακτικών βακτηρίων, *Pseudomonas sp.*, *B. thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε οργανοληπτική δοκιμή των δειγμάτων με βάση της οσμή, το χρώμα και την συνολική εμφάνιση για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής. Επιπρόσθετα, εφαρμόστηκαν δυο ταχείες αναλυτικές τεχνικές με σκοπό τη λήψη φασμάτων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης του κιμά. Στο δεύτερο πείραμα εφαρμόστηκαν οι ίδιες τεχνικές και μέθοδοι, με τη διαφορά ότι τα δείγματα συντηρήθηκαν σε δύο διαφορετικά μεταβαλλόμενα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ (2°Cγια8h-6°Cγια8h-10°Cγια8h και 4°Cγια12h-8°Cγια12h) και τα πειραματικά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση των μοντέλων που αναπτύχθηκαν με βάση το προηγούμενο πείραμα.

Αρχικά λοιπόν, από τα αποτελέσματα της μελέτης της αλλοίωσης του βόειου κιμά κατά την συντήρηση των δειγμάτων σε ισόθερμες συνθήκες προέκυψε ότι το pH δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή και κυμάνθηκε στην τιμή 6,0. Από τις μικροβιολογικές αναλύσεις προέκυψε η αρχική τιμή της ΟΜΧ των δειγμάτων ήταν 5,2 log cfu/g και παρουσίασε σταδιακή αύξηση μέχρι 9,0-9,5 log cfu/g κατά την αλλοίωση. Παρατηρήθηκε ότι ο ειδικός αλλοιωγόνος μικροοργανισμός είναι οι ψευδομονάδες που ακολουθούσαν το ίδιο προφίλ αύξησης με την ΟΜΧ.

Στη συνέχεια της μελέτης πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δεδομένων με στόχο τη μελέτη της κινητικής των μικροοργανισμών που σχετίζονται με την αλλοίωση του μοσχαρίσιου κιμά. Για το σκοπό αυτό, τα πειραματικά δεδομένα από την αύξηση της ΟΜΧ που προέκυψαν κατά τη συντήρηση των δειγμάτων του κιμά σε ισόθερμες συνθήκες, προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi και Roberts για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων και ειδικότερα του ειδικού ρυθμού αύξησης και της διάρκειας φάσης προσαρμογής. Η προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο εν λόγω μοντέλο έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, δεδομένου ότι ο συντελεστής συσχέτισης κυμάνθηκε από 0,80 έως 0,99. Στη συνέχεια, ο ειδικός ρυθμός αύξησης συσχετίστηκε με τη θερμοκρασία συντήρησης χρησιμοποιώντας το

δευτερογενές μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας. Με βάση το συντελεστή συσχέτισης ($R^2 = 0,999$) καθώς επίσης και τη στατιστική σημαντικότητα των παραμέτρων, το μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά την επίδραση της θερμοκρασίας στην αύξηση της ΟΜΧ.

Για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής, έγινε οργανοληπτική δοκιμή των δειγμάτων από 20 δοκιμαστές, στους οποίους δόθηκε ένα ερωτηματολόγιο με ερωτήσεις κλειστού τύπου (Ναι, Όχι) με κριτήριο την όψη, οσμή και τη γενική εικόνα των δειγμάτων. Η επεξεργασία των ερωτηματολογίων πραγματοποιήθηκε με βάση την ανάλυση επιβίωσης (survival analysis) χρησιμοποιώντας την κατανομή Weibull και η διάρκεια ζωής προσδιορίστηκε ως ο χρόνος όπου το 50% των δοκιμαστών απέρριπταν το δείγμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διάρκεια ζωής του βόειου κιμά ήταν , 141, 71 και 47 ώρες για τις θερμοκρασίες 2, 6 και 10°C αντίστοιχα. Από τα τρία κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των δειγμάτων (οσμή, χρώμα, συνολική εμφάνιση), το περισσότερο αντιπροσωπευτικό ήταν η οσμή, ενώ τα υπόλοιπα δύο υποεκτίμησαν τη διάρκεια ζωής. Παράλληλα, με τη χρήση της εξίσωσης του Dalgaard δημιουργήθηκε ένα μαθηματικό μοντέλο που περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στη διάρκεια ζωής του μοσχαρίσιου κιμά. Για τον προσδιορισμό του ελάχιστου επιπέδου αλλοίωσης (N_s) σε κάθε θερμοκρασία εφαρμόστηκε επίσης ανάλυση επιβίωσης με κριτήριο το ποσοστό 50%. Με βάση την εξίσωση του Dalgaard η προβλεπόμενη διάρκεια ζωής ήταν 131, 72, και 45 ώρες για τις θερμοκρασίες 2, 6 και 10°C αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε ικανοποιητική συμφωνία με την παρατηρούμενη διάρκεια ζωής που προέκυψε από την οργανοληπτική δοκιμή.

Τέλος, έγινε επικύρωση των μοντέλων που αναπτύχθηκαν στις ισόθερμες συνθήκες με τη χρήση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το δεύτερο πείραμα με τα δυναμικά μεταβαλλόμενα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ (Α.:2°Cγια8h-6°Cγια8h-10°Cγια8h και Β:4°Cγια12h-8°Cγια12h). Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των μοντέλων υπολογίστηκαν η τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος, με τιμές 0,27 και 0,33 αντίστοιχα, καθώς επίσης και ο δείκτης μεροληψίας (B_f) για την ΟΜΧ που υπολογίστηκε κοντά στην τιμή 1,0. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακριβείας (A_f) προέκυψε ότι η μέση απόκλιση μεταξύ των εκτιμήσεων και των παρατηρήσεων ήταν 2,6% και 3,4% για τα δύο θερμοκρασιακά προφίλ αντίστοιχα. Παράλληλα, το ποσοστό σφάλματος εντός της περιοχής αποδεκτής πρόβλεψης (acceptable prediction zone) είναι 91,67% για το πρώτο και 100% για το δεύτερο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ. Τα ποσοστά αυτά επιβεβαιώνουν την ικανοποιητική επίδοση του μοντέλου.

Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση των δειγμάτων βόειου κιμά με πολυφασματική απεικόνιση χρησιμοποιώντας το όργανο VideometerLab, προκειμένου να συσχετιστούν τα φάσματα του εν λόγω οργάνου με την ποιότητα των δειγμάτων, όπως προέκυψε από την οργανοληπτική δοκιμή.

Αρχικά με τα δείγματα του πρώτου πειράματος πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός κλάσεων (Cluster Analysis) με τη χρήση δένδρογράμματος. Τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά δεδομένου ότι υπήρξε διαχωρισμός μεταξύ των δύο κλάσεων (φρέσκα-αλλοιωμένα) για όλα τα δείγματα, με εξαίρεση τρία φρέσκα δείγματα που οριακά κατηγοριοποιήθηκαν ως αλλοιωμένα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δειγμάτων με τη μέθοδο της Διακριτικής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA), προκειμένου να είναι εφικτή η πρόβλεψη της ποιοτικής κλάσης του μοσχαρίσιου κιμά απευθείας μέσω του φάσματος. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ των αλλοιωμένων και φρέσκων δειγμάτων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ορθής πρόβλεψης και για τις δύο κατηγορίες δειγμάτων ήταν 95,38%, ενώ τα μήκη κύματος που σχετίστηκαν με τα φρέσκα δείγματα βόειου κιμά ήταν 630, 645 και 660 nm τα οποία αντιστοιχούν σε διαφορετικές καταστάσεις της αιμοσφαιρίνης. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε επικύρωση του μοντέλου PLS-DA με τα φάσματα που ελήφθησαν από τα δείγματα του δεύτερου πειράματος που συντηρήθηκαν σε μεταβαλλόμενα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ. Στην περίπτωση αυτή, το ποσοστό ορθής πρόβλεψης για τις δύο κατηγορίες ποιότητας ανήλθε σε 100%.

Επιπλέον, έγινε ανάλυση των ίδιων δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά με τη τεχνική φασματοσκοπίας υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε εύρος κυματιδίων από 1800-800 cm^{-1} , που αποτελεί τη περιοχή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση των δεδομένων προκειμένου να ταξινομηθούν τα δείγματα μοσχαρίσιου κιμά κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε κλάσεις ποιότητας σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης με την εφαρμογή Διακριτικής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση ήταν πολύ ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου έδωσαν ακρίβεια πρόβλεψης 100% και 91,23% κατά την ανάπτυξη και επικύρωση (cross validation) του μοντέλου αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, έγινε εξωτερική επικύρωση του μοντέλου με τη χρήση των φασμάτων από το δεύτερο πείραμα παρουσιάζοντας 86,27% σωστές προβλέψεις για τον προσδιορισμό της ποιότητας του μοσχαρίσιου κιμά.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the shelf life of minced beef using predictive modeling as well as monitoring spoilage using non-invasive and non-destructive rapid methods such as multi-spectral imaging and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy.

For this purpose, two different experiments were designed. In the first, fresh minced beef was stored under aerobic conditions at three different isothermal conditions (2, 6, and 10°C). Total viable counts (TVC), lactic acid bacteria, *Pseudomonas spp.*, *B. thermosphacta*, and *Enterobacteriaceae* were measured throughout storage in combination with sensory assessment (odor, color and overall appearance) for the determination of shelf life. Additionally, two analytical rapid methods were implemented, namely multispectral imaging and FTIR, in order to obtain the spectral fingerprints of meat during storage. Subsequently, the spectra were used to develop mathematical models for the determination of minced beef spoilage. The developed models were validated with two independent experiments undertaken in dynamic temperature conditions, based on two fluctuating temperature scenarios with periodic changes (2°C for 8h-6°C for 8h-10°C for 8h and 4°C for 12h-8°C for 12h).

The main conclusions of the study are:

Firstly, pH did not change during the storage under isothermal conditions, instead it remained in the same level, ranging around 6. The microbiological analysis revealed that the minimum level of TVC was 5.2 log cfu/g at the beginning of storage and presented a gradual increase up to 9.0-9.5 log cfu/g at the spoilage level. It was observed that the specific spoilage organism (SSO) were *Pseudomonas spp.* that followed similar growth profile with TVC.

Additionally, the growth data of TVC of minced meat samples during storage under isothermal conditions were fitted with the primary model of Barany and Roberts, to estimate the kinetic parameters of specific growth rate (μ_{max}) and lag phase duration (λ). The fitting of the experimental data to this model gave satisfactory results, since the correlation coefficient ranged from 0.80 to 0.99. Also, the specific growth rate was correlated with the storage temperature using the square root type model. Based on the correlation coefficient ($R^2 = 0,999$) as well as the significance of the parameters, the model adequately described the effect of temperature on the growth of TVC.

For the determination of shelf life, sensory analysis was undertaken by 20 panelists giving them a questionnaire with closed-ended questions (Yes, No) based on samples color, odor and overall appearance. The questionnaires were processed by survival analysis using the Weibull distribution and the shelf life was determined as the time where 50% of the panelists rejected the sample. The results showed that the minced beef's shelf life was 141, 71 and 47 hours at 2, 6 and 10 °C, respectively. Of the three sensory criteria used to evaluate

the samples, odor was the most representative, while the remaining two underestimated shelf life. Moreover, a mathematical model was developed describing the effect of storage temperature on shelf life using the equation of Dalgaard. The estimated shelf life was 131, 72, and 45 hours for 2, 6 and 10 ° C, respectively which is in good agreement with the observed shelf life from sensory analysis.

Finally, the models developed under isothermal conditions were validated with independent data from two experiments undertaken in two fluctuating temperature profiles with periodic changes (2°C for 8h-6°C for 8h-10°C for 8h and 4°C for 12h-8°C for 12h). The accuracy of the models was assessed by calculating the root mean squared error (RMSE), which was found to be 0.27 and 0.33 for the two temperature profiles, respectively. Additionally, the bias factor (B_f) for the TVC was found to be near one in both cases. Furthermore, based on the values of the Accuracy factor (A_f) the average deviation between predictions and observations was 2.6% and 3.4% for the two temperature profiles, respectively. Also, the percentage of predicted TVC values in the acceptable prediction zone (APZ) was 91.67% for the first and 100% for the second temperature profile. These rates confirmed the satisfactory performance of the model.

Moreover, the minced beef samples were analyzed by multispectral image analysis using the instrument VideometrLab to correlate the collected spectra with the quality of the samples as defined by sensory analysis. Initially, the samples from the first experiment were classified by cluster analysis using a dendrogram. The results were satisfactory, as there was complete separation between of two classes (fresh and spoiled) for all samples, with the exception of three fresh samples which were classified as marginally spoiled. Further on, the samples were analyzed by Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA) in order to predict the quality class of minced beef through the spectrum. The results showed a good separation between the fresh and spoil samples. Specifically, the overall correct classification of meat samples was 95.38%, while the wavelengths that were related with freshness of the samples were 630, 645 and 600 nm, corresponding to the different states of hemoglobin. The developed model was further validated with the spectra collected from the dynamic temperature profiles using the samples from the second experiment. In this case, the overall correct classification rate was 100%

Additionally, the same samples were analyzed by Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. The selected wavenumbers for analysis were in the range of 1800-800 cm^{-1} , which is the area of meat fingerprints. Initially, a quantitative analysis took place for the classification of the samples stored under isothermal conditions into classes according to the results of sensory analysis using Partial Least Square Discriminant Analysis (PLS-DA). The results of the analysis were very satisfactory. Specifically, the variables used as input data to the model gave overall correct classification of 100% and

91.23% in the development and cross validation of the model, respectively. Last but not least, the model was validated with spectra obtained from the second experiment giving 86.27% correct prediction for the quality of minced beef.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT.....	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1. Κρέας	15
1.2. Διατροφική Αξία Κρέατος.....	15
1.3. Μικροβιακή Χλωρίδα Κρέατος.....	16
1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή αύξηση στα τρόφιμα και στο κρέας	17
1.5 Αερόβια Αλλοίωση Κρέατος – Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (E.A.M.)	18
1.6 Συσκευασία Κρέατος	20
1.7 Θερμοκρασία	21
1.8 Χημικές αλλαγές στο κρέας	22
1.9 Το χρώμα του κρέατος και οι μεταβολές του κατά τη διάρκεια συντήρησης 24	
1.10 Ποσοτική Μικροβιολογία-Μικροβιολογία Πρόρρησης	25
1.10.1. Εισαγωγή	25
1.10.2 Κατηγορίες Μοντέλων Πρόβλεψης.....	27
1.10.3. Πρωτογενή Μοντέλα	28
1.10.3.1. Καμπύλη Μικροβιακής Αύξησης.....	28
1.10.3.2. Παρουσίαση Πρωτογενών Μοντέλων	29
1.10.3.3. Σύγκριση των Κυριότερων Πρωτογενών Μοντέλων	30
1.10.3.4 Μοντέλο Baranyi	32
1.10.4. Δευτερογενή Μοντέλα	33
1.10.4.1.Εισαγωγή και Παρουσίαση	33
1.10.4.2. Μοντέλο τετραγωνικής ρίζας	35
1.10.5. Τριτογενή Μοντέλα.....	35
1.10.6 Αξιολόγηση των Μοντέλων.....	36
1.10.6.1 Εισαγωγή.....	36

1.10.6.2 Δείκτες και κτίρια αξιολόγησης	36
1.10.6.3 Αξιολόγηση εντός των τροφίμων	38
1.10.7 Η πρόβλεψη της διάρκειας ζωής	39
1.10.7.1 Εισαγωγή.....	39
1.10.7.2 Παρουσίαση μοντέλων που περιγράφουν την εξάρτηση της διάρκειας ζωής από τη θερμοκρασία.....	41
1.11 Ταχείες Μέθοδοι	43
1.11.1 Εισαγωγή	43
1.11.2. Εξέλιξη Φασματοσκοπίας.....	43
1.11.3. Ανάλυση εικόνας –VideometerLab (Multispectral Analysis).....	47
1.11.3.1. Εισαγωγή.....	47
1.11.3.2. Multispectral/ Hyperspectral απεικόνιση	48
1.11.3.3. Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Analysis)	48
1.11.3.4. Videometer.....	50
1.11.4. Φασματοσκοπία Υπερύθρου-FTIR	52
1.11.4.1. Εισαγωγή.....	52
1.11.4.2. Βασικές Αρχές.....	53
1.11.4.3 Τρόποι Δόνησης	54
1.11.4.4 Οργανολογία Φασματοφωτόμετρου FT-IR	55
1.11.4.5 Λειτουργία φασματοφωτομέτρου FT-IR	56
1.11.4.6. Μετασχηματισμός Fourier.....	57
1.12 Σκοπός Μελέτης.....	59
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	60
2.1. Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	60
2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων, συσκευασμένων σε αερόβιες συνθήκες	60
2.1.2. Δειγματοληψία.....	62
2.2. Φυσικοχημικές Αναλύσεις	63
2.2.1. Προσδιορισμός pH.....	63
2.2.2. Πολυφασματική Απεικόνιση	63
2.2.2.1.Προετοιμασία δειγμάτων.....	63
2.2.2.2.Συλλογή φασματικών δεδομένων με το VideoMeterLab	63

2.2.2.3. Ανάλυση φασματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα.	65
2.2.3. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	66
2.2.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων.....	66
2.2.3.2. Συλλογή φασματικών δεδομένων με το φασματόμετρο FTIR/ATR	66
2.2.3.3. Ανάλυση φασματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα.	67
2.2.4. Στατιστική Ανάλυση: Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS).....	68
2.3. Οργανοληπτική Αξιολόγηση.....	68
2.4. Ανάλυση Δεδομένων.....	69
2.4.1 Ανάπτυξη μοντέλων και επικύρωση.....	69
2.4.2. Προσδιορισμός διάρκειας ζωής.....	71
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	72
3.1. Μελέτη της αλλοίωσης του μοσχαρίσιου κιμά σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε ισόθερμες συνθήκες.....	72
3.1.1. Φυσικοχημικές Αναλύσεις.....	72
3.1.2. Μικροβιακές Αναλύσεις.....	72
3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της αλλοίωσης του νωπού βόειου κιμά	74
3.2.1. Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της ενδογενούς μικροχλωρίδας.....	74
3.2.2. Μαθηματική περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης με τη χρήση του μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας. 76	
3.2.3. Διάρκειας ζωής μοσχαρίσιου κιμά.....	77
3.2.3.1.Υπολογισμός διάρκειας ζωής δειγμάτων.....	77
3.2.3.2.Ανάπτυξη μοντέλου για τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής του κρέατος.....	80
3.2.4. Επικύρωση των μοντέλων που αναπτύχθηκαν.....	81
3.2.4.1. Μοντέλα Ανάπτυξης.....	81
3.2.4.2. Υπολογισμός της ισοδύναμης θερμοκρασίας (T_{eff}) των δυναμικά μεταβαλλόμενων χρονοθερμοκρασιακών προφίλ.....	84
3.2.4.3. Υπολογισμός διάρκειας ζωής κρέατος σε ενδιάμεση θερμοκρασία.....	84

3.3. Ανάλυση δειγμάτων κρέατος με πολυφασματική ανάλυση εικόνας με τη χρήση του οργάνου VideometerLab	86
3.3.1. Εισαγωγή	86
3.3.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων	87
3.4. Ανάλυση δειγμάτων κρέατος με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR).....	90
3.4.1. Εισαγωγή	90
3.4.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων	92
3.5. Συμπεράσματα	95
3.6. Μελλοντική έρευνα.....	98
Βιβλιογραφία	99
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	107
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	108

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Κρέας

Νωπό κρέας όπως ορίζει ο Κώδικας Τροφίμων και Ποτών νοούνται τα τμήματα των σφαγίων των θερμόαιμων ζώων και πτηνών που είναι κατάλληλα για τη διατροφή του ανθρώπου, σύμφωνα με τις εκάστοτε ισχύουσες διατάξεις και τα οποία διατίθενται στην κατανάλωση όπως είναι χωρίς επεξεργασία εκτός από το τεμαχισμό και τη ψύξη

1.2. Διατροφική Αξία Κρέατος

Το κρέας αποτελεί ένα αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι καθίσταται τρόφιμο με υψηλή διατροφική αξία καθότι περιέχει απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για τον άνθρωπο. Η θρεπτική αξία του κρέατος επηρεάζεται αρχικά από τη χημική του σύσταση η οποία επηρεάζει με τη σειρά της τα φυσικοχημικά και οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά.

Η χημική του σύσταση αφορά κυρίως το νερό, τις πρωτεΐνες και το λίπος και δευτερευόντως τους υδατάνθρακες, τα ιχνοστοιχεία και τις βιταμίνες Πίνακας 1.2.1.2.1 (Nychas et al., 2008) Επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων όπως το είδος του ζώου, τη φυλή, το φύλο, την ηλικία, το επίπεδο διατροφής, τη μεταχείριση του ζώου πριν και κατά τη σφαγή καθώς επίσης και από τη διάρκεια ,θερμοκρασία ωρίμανσης και συντήρησης του κρέατος (Drosinos et al., 1995). Στο άπαχο κρέας, η περιεκτικότητα αυτών των συστατικών είναι σχετικά σταθερή για το μεγαλύτερο αριθμό ζώων, με τη μεγαλύτερη διακύμανση να παρουσιάζεται στη σύσταση του λίπους όπως φαίνεται και στο Πίνακας 1.2.21.2.2(Sutherland et al., 1999)

Πίνακας 1.2.1: Χημική Σύσταση Κρέατος (Nychas et al., 2008)

Συστατικό	%βάρους
Νερό	75
Πρωτεΐνη	19
Λίπος	2,5
Υδατάνθρακες	1,2
Διαλυτά μη πρωτεϊνούχα συστατικά:	
Αζωτο	1,65
Ανόργανα	0,65
Βιταμίνες	Ίχνη

Πίνακας 1.2.2: Σύσταση άπαχου μυϊκού ιστού (% βάρος) (Sutherland, et al., 1999)

Είδος Κρέατος	Νερό	Πρωτεΐνες	Λιπίδια
Βοδινό	70-73	20-22	4.8
Ορνίθιο	73-76	20-23	4.7
Πρόβατο	73-76	20	5-6
Χοιρινό	68-70	19-20	9-11

Συγκεκριμένα στο άπαχο κρέας το νερό περιέχεται σε ποσοστό 75% του βάρους του και η κατακράτησή του είναι σημαντική γιατί συσχετίζεται με τη δομή του καθώς και η απώλεια του φέρει οικονομικές ζημιές. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι χάνοντας το νερό αυτόματα μειώνεται και το βάρος του καθώς επίσης αποτελεί ένα μη ελκυστικό προϊόν για τον καταναλωτή. Επιπρόσθετα κατά τη διαδικασία αποβολής του νερού από το κρέας χάνονται ταυτόχρονα υδατοδιαλυτές βιταμίνες, και κυρίως βιταμίνες που το κρέας είναι πλούσιο όπως αυτές του συμπλέγματος Β. (Τσακαλίδου 2001)

Κατά συνέπεια, είναι ένα τρόφιμο υψηλής βιολογικής αξίας και μεγάλης οικονομικής σημασίας, αλλά ταυτόχρονα, είναι και ένα προϊόν ιδιαίτερα ευπαθές και ευάλωτο.

1.3. Μικροβιακή Χλωρίδα Κρέατος

Στο εσωτερικό του ακέραιου κρέατος που προέρχεται από τους μυϊκούς ιστούς υγιών ζώων καθώς και από υγιείς συνθήκες σφαγής οι μικροοργανισμοί είναι είτε απόντες (στείρο), ή μη ανιχνεύσιμοι ή γενικά κυμαίνονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (Nychas et al., 2007). Οι προστατευτικοί μηχανισμοί που διαθέτει το ζώο οι οποίοι παρεμποδίζουν την είσοδο των μικροοργανισμών στο εσωτερικό του (δέρμα, τρίχωμα, φυσικοί αντιμικροβιακοί μηχανισμοί όπως η λυσοζύμη) κατά τη σφαγή καταστρέφονται με αποτέλεσμα το κρέας να εκτίθεται σε πιθανούς παράγοντες επιμόλυνσης κάτι το οποίο συμβαίνει και κατά τη διάρκεια των μετέπειτα χειρισμών. Συγκεκριμένα παράγοντες όπως η μέθοδος επεξεργασίας, η συσκευασία ακόμα και η θερμοκρασία, ή η φυσική κατάσταση του ζώου κατά τη σφαγή σε συνδυασμό με τη μικροβιακή εξάπλωση στους χώρους σφαγής μολύνουν το κρέας, με διάφορους μικροοργανισμούς (βακτήρια, ζύμες και μύκητες) είτε με αλλοιογόνους, οι οποίοι συνεισφέρουν στη ταχύτερη μικροβιακή αλλοίωση, είτε με παθογόνους μικροοργανισμούς εάν η διαδικασία σφαγής δεν ελέγχεται αποτελεσματικά. (Nychas et al., 2005), (Nychas et al., 2008)

Οι Ingram και Dainty (1971) διέκριναν την «εξωγενή» και «ενδογενή» χλωρίδα του κρέατος. Με αυτούς τους όρους οι ερευνητές αναφέρουν ότι η μόλυνση του νωπού κρέατος μπορεί να οφείλεται είτε από εσωτερικούς είτε από εξωτερικούς παράγοντες.

Έτσι η αρχική μικροχλωρίδα του κρέατος αποτελεί την ενδογενή χλωρίδα, τα βακτήρια που αναπτύσσονται στο βάθος των ιστών του κρέατος και την εξωτερική μόλυνση που έχει προκληθεί από τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα οι εξωτερικές πηγές μόλυνσης αναφέρονται σε όλες σχεδόν τις διαδικασίες κατά τη διάρκεια της σφαγής του ζώου όπως αφαίμαξη, εκδορά, εκσπλαχνισμός, τεμαχισμός.(Nychas et al., 2005). Όμως μόνο ένα μικρό μέρος της αρχικής μικροχλωρίδας είναι ικανό να αναπτυχθεί και να φτάσει σε μεγάλους πληθυσμούς. Σύμφωνα με τον Hood (1971), η επιφάνεια σε σφάγιο από μοσχάρι μπορεί να φέρει μέχρι και 10^4 μ.ο./cm²

1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή αύξηση στα τρόφιμα και στο κρέας

Στα τρόφιμα γενικά αλλά και στο κρέας ειδικά υπάρχουν πέντε βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αύξηση, την επιβίωση και τη θανάτωση των μικροοργανισμών που βρίσκονται σε αυτά.(Nychas et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα είναι:

- Ενδογενείς παράγοντες
- Εξωγενείς παράγοντες
- Παράγοντες κατά την επεξεργασία
- Ενδογενείς βιοτικοί παράγοντες
- Συνδυασμός αυτών

Αναλυτικότερα οι ενδογενείς παράγοντες αφορούν τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του τροφίμου και τη βιολογική του δομή. Συγκεκριμένα το pH, την ενεργότητα νερού (a_w), το δυναμικό οξειδοαναγωγής (eh), η ρυθμιστική ικανότητα, η σύσταση και η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (γλυκόζη) καθώς και η παρουσία φυσικών ή προστιθέμενων αντιμικροβιακών συστατικών (Borch et al., 1996). Οι εξωγενείς παράγοντες έχουν να κάνουν με τη θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία και γενικότερα τις ατμοσφαιρικές συνθήκες που επικρατούν στο χώρο αποθήκευσης. Τέλος η φυσικοχημική επεξεργασία που έχει υποστεί το τρόφιμο επιδρά στα χαρακτηριστικά του και σίγουρα επηρεάζει και τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αυτό. Σε συνδυασμό οι παράγοντες αυτοί με τις ιδιότητες των ίδιων των μικροοργανισμών αλλά και οι αλληλεπιδράσεις που υπάρχουν μεταξύ τους, δρώντας ανταγωνιστικά ή συνεργατικά για την ανάπτυξή τους καθορίζουν την αύξηση και κατά επέκταση την επικράτηση των αλλοιογόνων μικροοργανισμών. (Borch et al., 1996) (Huis in't Veld et al., 1996) (Nychas et al., 2005).

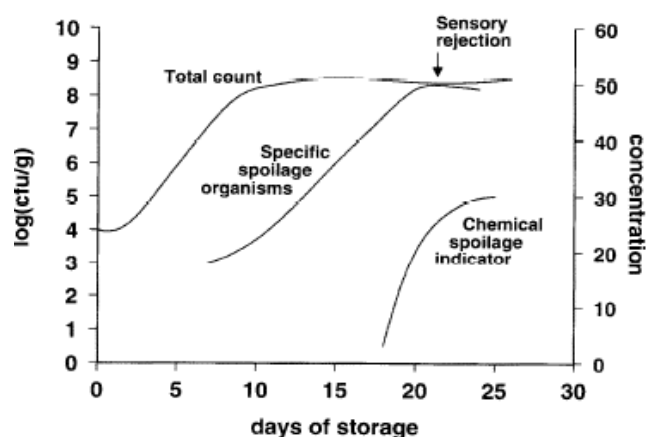
Η τροποποίηση ή και ο έλεγχος ενός ή περισσότερων από τους παραπάνω παράγοντες οδηγεί σε διαφορετική επιλογή ή και εξέλιξη των μικροοργανισμών χαρακτηριστικό που μπορεί να έχει εφαρμογή στη δημιουργία προϊόντων με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (Nychas et al., 2005).

1.5 Αερόβια Αλλοίωση Κρέατος – Ειδικοί Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί (E.A.M.)

Ως μικροβιακή αλλοίωση στα τρόφιμα αλλά και στο κρέας ειδικότερα σύμφωνα και με τα προηγούμενα μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα μια σειράς αλλαγών στα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά του κρέατος λόγω της επικράτησης των μικροοργανισμών (Nychas et al., 2008). Όταν ο πληθυσμός τους γίνει αρκετά μεγάλος προκαλούν μεταβολές στη φυσικοχημική σύσταση του κρέατος με αποτέλεσμα να επηρεάζονται τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά και έτσι το κρέας γίνεται μη αποδεκτό από το καταναλωτικό κοινό και ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση (Fung, 2010). Οι αλλαγές αυτές οφείλονται στους μεταβολίτες των μικροοργανισμών και γίνονται αντιληπτές όπως προαναφέρθηκε με τις μεταβολές που παρατηρούνται στην οσμή, το άρωμα και τη γενικότερη εμφάνιση του κρέατος (Nychas et al., 2008)

Αυτοί οι μικροοργανισμοί που φτάνουν σε μεγάλους πληθυσμούς και είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση είναι γνωστοί ως ειδικοί αλλοιωγόνοι οργανισμοί (specific spoilage organisms, SSO) (Ercolini et al., 2006). (Nychas et al., 2008) (Nychas et al., 2005) (Huis in't Veld et al., 1996). Η επικράτηση αυτών εξαρτάται από τους παράγοντες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Ο πληθυσμός των Ειδικών Αλλοιογόνων Μικροοργανισμών μπορεί αρχικά να βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα, αποτελώντας ένα μικρό κομμάτι της ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Όμως λόγω των ευνοϊκότερων συνθηκών οι μικροοργανισμοί αυτοί αναπτύσσονται με μεγαλύτερους ρυθμούς απ' ό,τι η υπόλοιπη χλωρίδα και στο τέλος με τους μηχανισμούς που διαθέτουν καταφέρνουν να επικρατήσουν, παράγοντας τους μεταβολίτες που είναι υπεύθυνοι για την αλλοίωση. Το επίπεδο από το οποίο ξεκινάει η αύξηση των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών μπορεί να χαρακτηριστεί ως το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης, ενώ η συγκέντρωση του μεταβολίτη που χαρακτηρίζει την αλλοίωση να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης αλλοίωσης όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.0.1 (Gram et al., 1996)



Σχήμα 1.0.1: Προσδιορισμός σημείου αλλοίωσης (Sensory rejection) (Gram et al., 1996)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και νωρίτερα το εσωτερικό του κρέατος που προέρχεται από υγιή ζώα και υγιεινές συνθήκες σφαγής, είναι στείρο ή σχεδόν στείρο. Η επιφάνεια του όμως μολύεται κατά τη διάρκεια της σφαγής ή στη διάρκεια των μετέπειτα χειρισμών με διάφορους μικροοργανισμούς.

Οι αλλοιγόνοι μικροοργανισμοί του φρέσκου κρέατος είναι κυρίως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως τα αερόβια ψυχρότροφα είδη *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* και *Aeromonas* και το προαιρετικά αναερόβιο είδος *Shewanella putrefaciens*. Επίσης σε υψηλούς πληθυσμούς απαντώνται και θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως *Lactobacillus* και *Brochothrix Thermosphacta*. Στα βακτήρια με σημασία για τη δημόσια υγεία περιλαμβάνονται τα γένη *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolita*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter*, *Aeromonas hydrophila* και *Listeria monocytogenes*. Στο Πίνακα 1.5.1 αναφέρονται τα είδη των μικροοργανισμών που ανευρίσκονται συχνότερα στο φρέσκο, επεξεργασμένο ή συσκευασμένο κρέας (Nychas et al., 2007) (Adams et al., 1995) (Drosinos et al., 1995) (Lambert et al., 1991).

Τα αερόβια Gram αρνητικά βακτήρια των γενών *Pseudomonas*, *Moraxella* και *Acinetobacter* αποτελούν τη κυριώτερη αλλοιογόνο μικροβιακή χλωρίδα κατά την αερόβια συντήρηση του κρέατος. Πολλά στελέχη των *Moraxella* και *Acinetobacter* αναστέλλονται από τη χαμηλή τιμή του pH του κρέατος κι έτσι δεν αποτελούν μεγάλη σημασία για την αλλοίωσή του. Αντίθετα οι *Pseudomonas* θεωρούνται ως οι πλέον ειδικοί αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί κατά την αερόβια συντήρηση του κρέατος. Από το γένος των *Pseudomonas* τα είδη *Pseudomonas fragi*, *Ps. Ludensis* και *Ps. Flurensces* αποτελούν τα συνηθέστερα είδη του αλλοιωμένου κρέατος. Τα βακτήρια αυτά αναπτύσσονται ταχύτατα και γρήγορα εμποδίζοντας τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν. Η αύξηση των ψευδομονάδων σε επίπεδα των 10^7 - 10^8 έχει συνδεθεί με την εμφάνιση βακτηριακή γλίτσας (slime) και δυσσομίας (off-odour). Τα χαρακτηριστικά αυτά γίνονται αντιληπτά μετά την κατανάλωση της γλυκόζης και του γαλακτικού οξέος (Nychas et al., 2008)

Εκτός από τους παραπάνω μικροοργανισμούς, ψυχρότροφα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (π.χ. *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*) αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας κρέατος που συντηρείται αερόβια σε θερμοκρασίες ψύξης. (Nychas et al., 2005). Τα βακτήρια αυτά, αν και δε συμμετέχουν ιδιαίτερα στην αλλοίωση του κρέατος αποτελούν δείκτες υγιεινής του προϊόντος όπως αναφέρεται και στο Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της Επιτροπής.

Πίνακας 1.5.1.: Γένη βακτηρίων που απαντώνται στο κρέας (Nychas et al., 2007)

Γένη	Χρώση Gram	Φρέσκο κρέας	Επεξεργασμένο κρέας	Κρέας συσκευασμένο σε κενό
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	X	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX		X
<i>Alcaligenes</i>	-	X		
<i>Bacillus</i>	+	X		
<i>Brochothrix</i>	+	X	X	XX
<i>Carnobacterium</i>	+	X	X	XX
<i>Citter</i>	-	X		
<i>Clostridium</i>	+	X		
<i>Corynebacterium</i>	+	X	X	X
<i>Enteter</i>	-	X	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	X	XX
<i>Escherichia</i>	-	X		
<i>Flavobacterium</i>	-	X		
<i>Hafnia</i>	-	X		X
<i>Kurthia</i>	+	X		X
<i>Lactococcus</i>	+	X	X	
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX	XX
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X	X
<i>Listeria</i>	+	X	X	
<i>Micterium</i>	+	X	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X	X
<i>Moraxella</i>	-	XX		
<i>Pantoea</i>	-	X		
<i>Pediococcus</i>	+	X	X	X
<i>Proteus</i>	-	X		X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX		X
<i>Psychter</i>	-	XX		
<i>Salmonella</i>	-	X	X	X
<i>Serratia</i>	-	X	X	X
<i>Shewanella</i>	-	X		
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X	X
<i>Yersinia</i>	-	X		X

X= είναι γενικά γνωστό ότι υπάρχει. XX= υπάρχει πιο συχνά

1.6 Συσσκευασία Κρέατος

Η συσκευασία των τροφίμων είναι αναγκαία για τη προστασία τους αφού του παρέχεται προστασία από διάφορους παράγοντες που μπορούν να επιταχύνουν την αλλοίωση του τόσο μικροβιολογικά – χημικά αλλά και να υποβαθμίσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του. Επιπρόσθετα λειτουργεί και ως εργαλείο διαφήμισης στο καταναλωτή και παρέχει εύκολη και άνετη χρήση.

Η τοποθέτηση του κρέατος σε διαφανή πλαστικά υλικά συσκευασίας επιτρέπει την αξιολόγηση του προϊόντος από τους καταναλωτές και ταυτόχρονα δημιουργεί ένα προϊόν ελκυστικό, υγιεινό και βολικό στη χρήση. (W. 2008)

Παράλληλα, η συσκευασία εκτός από τις ιδιότητες προστασίας που προσφέρει, παρέχει πολλές λειτουργίες στο περιεχόμενο προϊόν, προστατεύοντας το από την απώλεια υγρασίας, την απώλεια θρεπτικών συστατικών από αλλαγές στην υφή του καθώς και από πιθανή επιμόλυνση με μικροοργανισμούς όπως προαναφέρθηκε, τέλος βοηθά στο καλύτερο χειρισμό του κρέατος(Doulgeraki et al. 2010b).

1.7 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την αλλοίωση και την ασφάλεια του κρέατος (Lambert et al., 1991). Μικροβιακή αύξηση έχει παρατηρηθεί σε εύρος θερμοκρασιών από -5 έως 90°C σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, εφόσον το νερό είναι απαραίτητο για την αύξηση των μικροοργανισμών και είναι σε υγρή μορφή - διαθέσιμο (Adams et al., 1995)

Στη μικροβιολογία τροφίμων σημασία έχουν κυρίως οι μεσόφιλοι και οι ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί. Ο ρυθμός αύξησης των ψυχρότροφων μικροοργανισμών επηρεάζεται από τη θερμοκρασία και γίνεται χαμηλότερος καθώς η θερμοκρασία μειώνεται (Abd El-Rhman et al., 1998). Η συντήρηση ευπαθών προϊόντων σε θερμοκρασία ψύξης μπορούν να αλλάξουν το ρυθμό και το είδος αλλοίωσης. Έτσι είναι δυνατόν να υπάρξουν ποιοτικές αλλαγές στα χαρακτηριστικά της αλλοίωσης, αφού οι χαμηλές θερμοκρασίες ασκούν επιλεκτική δράση, εμποδίζοντας τους μεσόφιλους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν και οδηγούν στη κυριαρχία των ψυχρότροφων μικροοργανισμών. Συγκεκριμένα για τους ψυχρότροφους μικροοργανισμούς ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες, παρόλο που έχουν την ικανότητα, η διαδικασία αύξησης τους καθυστερεί με αποτέλεσμα τον αργό ρυθμό αλλοίωσης του προϊόντος (Ercolini et al., 2006)

Οι απαιτήσεις των καταναλωτών όσον αφορά το φρέσκο κρέας αυξήθηκαν τις τελευταίες δεκαετίες με αποτέλεσμα την επιτακτική ανάγκη του συστηματικού ελέγχου και καταγραφή της θερμοκρασίας του νωπού κρέατος σε όλη τη διαδρομή του στη ψυκτική αλυσίδα από τη παραγωγή μέχρι την τελική κατανάλωση (Nychas et al., 2008) (Koutsoumanis et al., 2006).

Οι τρόποι μείωσης της θερμοκρασίας ξεκινούν κατά τη σφαγή του ζώου. Σε πρώτο στάδιο πρέπει να φτάσει η θερμοκρασία του σφαγίου στους 7°C όπως ορίζεται στο κανονισμό της Ε.Ε., σε αυτή τη φάση μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση μικροοργανισμών. Στη συνέχεια όποια περαιτέρω διαδικασία ακολουθηθεί (τεμαχισμός) θα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας οπότε απαιτείται παραπάνω ψύξη. Τέλος ακολουθεί η διανομή του κρέατος σε υπεραγορές, κρεοπωλεία και γενικότερα σε σημεία λιανικής

πώλησης και στο τέλος στο καταναλωτή κατά τη διάρκεια αυτών των διαδικασιών το κρέας αποθηκεύεται σε φορηγά, αποθήκες, ψυγεία υπεραγορών και στο τέλος στο οικιακό ψυγείο. Όλα τα παραπάνω αποτελούν κρίσιμα σημεία για την ασφάλεια, τη ποιότητα και την εμπορική διάρκεια ζωής του κρέατος (Nychas et al., 2008) (Koutsoumanis et al., 2004). Είναι φανερό ότι οι αλλαγές στη θερμοκρασία έχουν επιπτώσεις στο προϊόν. Η έκταση του σοκ που υφίστανται οι μικροοργανισμοί λόγω της έκθεσης τους σε θερμοκρασίες ψύξης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως το είδος το είδος των μικροοργανισμών, τη φάση αύξησης των κυττάρων, τη διαφορά θερμοκρασίας και το ρυθμό ψύξης (Adams et al., 1995).

1.8 Χημικές αλλαγές στο κρέας

Η συμβολή των ενζύμων στην αλλοίωση του κρέατος είναι πολύ μικρή σε σχέση με τη δράση της μικροβιακής χλωρίδας (Nychas et al., 1997) (Tsigarida et al., 2001). Η μεταθανάτια γλυκόλυση, η οποία προκαλείται από τα ένζυμα που βρίσκονται στο κρέας, σταματάει μετά το θάνατο του ζώου, καθώς το pH από 7 φτάνει τη τιμή 5,4-5,5 οπότε η αλλοίωση του κρέατος οφείλεται στη μικροβιακή δραστηριότητα και στη συσσώρευση των μεταβολικών τους προϊόντων παρά στη δραστηριότητα των ενζύμων (Nychas et al., 1998).

Όπως έχει αναφερθεί το κρέας έχοντας υψηλή ενεργότητα ύδατος και πολλά θρεπτικά συστατικά αποτελεί ένα ιδανικό περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς (Nychas et al., 1998). Στην υδαρική φάση του κρέατος βρίσκονται ουσίες όπως η γλυκόζη, γαλακτικό οξύ, αμινοξέα, νουκλεοτίδια, ουρία και υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες οι οποίες καταβολίζονται από σχεδόν όλα τα βακτήρια του κρέατος (Nychas et al., 1998) (Nychas et al., 2007) (Gill, 1976).

Η σειρά με την οποία καταβολίζονται οι ουσίες αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 1.8.1. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ουσίες αυτές είναι πρόδρομες ενώσεις των μικροβιακών μεταβολιτών που γίνονται αντιληπτές ως αλλοίωση (Nychas et al., 1998) (Nychas et al., 2008). Εκτεταμένη δε πρωτεόλυση συμβαίνει στα προχωρημένα στάδια αλλοίωσης και αφού το κρέας έχει απορριφτεί από οργανοληπτική σκοπιά (Adams et al., 1995).

Πίνακας 1.8.1. Κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών του κρέατος (1= πρώτο, 12= τελευταίο) κατά την αύξηση την εφήμερης αλλοιωγόνου χλωρίδας σε μυϊκό ιστό

Υπόστρωμα	Αερόβια				
	A	B	Γ	Δ	E
Γλυκόζη	1	1	1	1	1
Φωσφορική δ γλυκόζη	2			2	
Γαλακτικό οξύ	3	2		3	
Πυροσταφυλικό οξύ	4	3			
Γλυκονικό οξύ	5	4			
Φωσφορικό δ γλυκογόνο	6				
Προπιονικό οξύ		5			
Μυρμηκικό οξύ					
Αιθανόλη		6			
Οξικό οξύ		7			
Αμινοξέα	7	8	2	4	
Σερίνη και κυστεΐνη					
Κρεατίνη	8				
Κρεατινίνη	9				
Κιτρικό οξύ	10				
Ασπαρτικό οξύ	11				
Γλουταμινικό οξύ	12				
Ριβόζη			3		
Γλυκερόλη			4		
Λιπίδια					

A: *Pseudomonas* spp. B: *Shewanella putrefaciens*, Γ: *Brochothrix Thermosphacta*, Δ: *Enterobacter* spp., E: Γαλακτικά Βακτήρια (Nychas et al., 2007)

Όταν βέβαια οι ψευδομονάδες φτάσουν σε πληθυσμό 7-8 λογαρίθμους ξεκινάει ο σχηματισμός της βακτηριακής γίτσας στην επιφάνεια του κρέατος ενώ παράλληλα παράγονται δύσοσμα πτητικά προϊόντα (Nychas et al., 2005). Η *P. fragi* είναι η κύρια υπεύθυνη για τη παραγωγή αιθυλεστέρων στο κρέας που αποθηκεύεται – συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες. Επιπρόσθετα η μεγάλη ποσότητα αμμωνίας και αμινών που απελευθερώνονται κατά την αποικοδόμηση αμινοξέων και πρωτεϊνών συμβάλλει στην ανάπτυξη των οσμών αλλοίωσης (Koutsoumanis et al., 2008) (Nychas et al., 2007). Οι Stutz et al. (1991) παρατήρησαν πως οι πτητικές ενώσεις ακετόνη, μεθυλαιθυλκετόνη, διμεθυλσουλφίδιο και διμεθυλδισουλφίδιο, αυξάνονται συνεχώς κατά την αερόβια αλλοίωση βοδινού κρέατος, καθώς συνδέονται με τη χρωστική των μυών και δημιουργεί τη σουλφομογλοβίνη (sulphyoglobin). Οι αμίνες πουτρεσκίνη, καθαβερίνη, ισταμίνη, τυραμίνη, σπερμίνη και σπερμιδίνη βρέθηκαν σε χοιρινό και βοδινό κρέας, πουλερικά και ψάρια σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης και σε κενό (Nychas et al., 2007). Τα

ψυχρότροφα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae* (π.χ. *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*) εμφανίζονται επίσης στο κρέας που συντηρείται υπό ψύξη σε αερόβιες συνθήκες, αλλά ο πληθυσμός τους δε συμβάλλει σημαντικά στη μικροχλωρίδα της αλλοίωσης, ενώ περισσότερο αποτελούν δείκτες ασφάλειας τροφίμων (Nychas et al., 1998). Από τα θετικά κατά Gram βακτήρια, ο *Brochothrix thermosphacta* και τα γαλακτικά βακτήρια έχουν ανιχνευθεί σε κρέας που συντηρείται σε αερόβιες συνθήκες υπο ψύξη, παρ' όλ' αυτά μόνο ο *B. thermosphacta* είναι σημαντικός για την αλλοίωση του κρέατος. Ο *B. thermosphacta* συγκεκριμένα καταβολίζει τη γλυκόζη και το γλουταμινικό οξύ παράγοντας ένα μείγμα τελικών προϊόντων, όπως η ακετοΐνη, οξικό, ίσο-βουτυρικό, ισοβαλερικό οξύ, 2,3-βουτανοδιόλη, διακετύλιο, 3-μεθυλοβουτανάλη, 2-μεθυλοπροπάνιο και 3-μεθυλοβουτανόλη, κατά τον αερόβιο μεταβολισμό του σε υποστρώματα που περιέχουν γλυκόζη, ριβόζη ή γλυκερόλη ως την κύρια πηγή άνθρακα (Nychas et al., 2005). Γενικά τα θετικά κατά Gram βακτήρια δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος σε αερόβιες συνθήκες (Nychas et al., 2007).

1.9 Το χρώμα του κρέατος και οι μεταβολές του κατά τη διάρκεια συντήρησης

Το χρώμα του κρέατος παίζει καθοριστικό ρόλο στη προτίμηση του καταναλωτή καθώς είναι το στοιχείο που μπορεί να αξιολογήσει κατά την αγορά του προϊόντος. Η κυριότερη χρωστική του κρέατος είναι η μυογλοβίνη (Mb). Η μυογλοβίνη έχει χρώμα πορφυρό κόκκινο (purple-red) και σε αυτή οφείλεται το χρώμα του κρέατος αμέσως μετά τη σφαγή του ζώου. Οι μεταβολές στο χρώμα που παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της συντήρησης του κρέατος οφείλονται στις μετατροπές της μυογλοβίνης σε οξυμυογλοβίνη (MbO₂) και μεταμυογλοβίνη (Mb⁺) μετατροπές οι οποίες εξαρτώνται από τη συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κρέατος. Στην οξυμυογλοβίνη οφείλεται για το φωτεινό κόκκινο ελκυστικό χρώμα του κρέατος και σχηματίζεται από την οξυγόνωση της μυογλοβίνης, δηλαδή στην πρόσδεση ενός μορίου οξυγόνου στο μόριο της μυογλοβίνης. Αντίθετα στη μεταμυογλοβίνη οφείλεται το καστανο-κόκκινο χρώμα του κρέατος. Ο σχηματισμός της οφείλεται στην οξειδωση της μυογλοβίνης, δηλαδή στην αλλαγή του σθένους του αιμικού σιδήρου από την ανοιγμένη (+2) στην οξειδωμένη του μορφή (+3) (Ahn, 1998) (MacDougall et al., 1982)

Οι αντιδράσεις αυτές στο φρέσκο κρέας βρίσκονται σε ισορροπία και οι μεταβολές του χρώματος εξαρτώνται από την αναλογία των τριών μορφών στην επιφάνεια του κρέατος. Συγκεκριμένα όταν η συγκέντρωση του οξυγόνου στο περιβάλλον του κρέατος είναι υψηλή, η μυογλοβίνη οξειδώνεται προς τη φωτεινή κόκκινη οξυμυογλοβίνη. Αντίθετα, χαμηλή σχετική πίεση του οξυγόνου ευνοεί την οξειδωση της μυογλοβίνης και το σχηματισμό της καφέ-κόκκινης μεταμυογλοβίνης. Σε φρέσκο κρέας, όπου το οξυγόνο βρίσκεται σε περίσσεια, η διεύθυνση του στο εσωτερικό του κρέατος είναι ελάχιστη και έτσι οι

αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια του κρέατος. Με τη πάροδο όμως του χρόνου συντήρησης η συνεχής κατανάλωση του οξυγόνου από τη μικροβιακή χλωρίδα οδηγεί στη μείωση της σχετικής πίεσης και στη διείσδυση του αερίου αυτού στο εσωτερικό του κρέατος. Στο όριο της περιοχής διείσδυσης του οξυγόνου (όπου η σχετική πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλή, περίπου 4 mm Hg) οι συνθήκες ευνοούν το σχηματισμό της μεταμυογλοβίνης. Στη περιοχή πάνω από το όριο διείσδυσης του οξυγόνου επικρατεί η μορφή της πορφυρής μυογλοβίνης (Chan et al., 1995) (MacDougall et al., 1982).

Ο σχηματισμός της οξυμυογλοβίνης είναι γρήγορος και λαμβάνει χώρα περίπου σε μισή ώρα στους 5°C. Παρ' όλ' αυτά ο μετασχηματισμός της μεταμυογλοβίνης είναι αργός και αρχικά εμφανίζεται στο όριο της διείσδυσης του οξυγόνου ως μια λεπτή καφετί στρώση η οποία σταδιακά εκτείνεται προς την επιφάνεια, με αποτέλεσμα το κρέας βαθμιαία να σκουραίνει με το πέρασ των ημερών συντήρησης. Ο ρυθμός διάχυσης του οξυγόνου μειώνεται με τη μείωση της θερμοκρασίας με αποτέλεσμα στις μικρότερες θερμοκρασίες ο ρυθμός σχηματισμού της μεταμυογλοβίνης να είναι χαμηλότερος και η επιφάνεια του κρέατος να διατηρεί το φωτεινό-κόκκινο χρώμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Viana et al., 2005) (MacDougall et al., 1982).

1.10 Ποσοτική Μικροβιολογία-Μικροβιολογία Πρόρρησης

1.10.1. Εισαγωγή

Οι συνεχόμενες αυξανόμενες απαιτήσεις των καταναλωτών σχετικά με τη ποιότητα και την ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί αναγκαίο την εισαγωγή σύγχρονων μεθόδων τόσο στις βιομηχανίες όσο και στον επιστημονικό χώρο. Οι νέες μέθοδοι εξασφαλίζουν μικροβιακή ποιότητα και προσδιορίζουν τη διάρκεια ζωής νεοεισαχθέντων προϊόντων σε σύντομο χρονικό διάστημα μιας και σύμφωνα με τη κοινή γνώμη «ο χρόνος είναι χρήμα» (McMeekin et al., 1993)

Η μικροβιολογία πρόρρησης είναι η εναλλακτική μέθοδος με την οποία δίνονται πιο γρήγορες μικροβιολογικές αναλύσεις και λιγότερο δαπανηρές. Οι McMeekin *et al* (1993) προσδιόρισαν τη μικροβιολογία πρόρρησης ως μια ποσοτική επιστήμη, οποία δίνει τη δυνατότητα στους επιστήμονες να εκτιμούν αντικειμενικά την επίδραση των διεργασιών επεξεργασίας, διανομής και αποθήκευσης στην ασφάλεια και στην ποιότητα των τροφίμων. Αργότερα οι ίδιοι χρησιμοποίησαν τον όρο «Ποσοτική Μικροβιακή Οικολογία των Τροφίμων» (Quantitative Microbial Ecology of Food), που αποτελεί έναν πιο γενικευμένο ορισμό. Στο βιβλίο των McKellar and Lu (2004) δίδεται περισσότερη έμφαση στην ανάγκη να επιγραφούν οι μικροβιακές αποκρίσεις στο περιβάλλον του τροφίμου από μαθηματικά μοντέλα. Με τη τελευταία αυτή θεώρηση η προρρητική μικροβιολογία ορίζεται ως *η έκφραση της επίδρασης των συνθηκών του περιβάλλοντος (π.χ. pH, T, aw) στη συμπεριφορά των μικροοργανισμών με ποσοτικούς όρους (μαθηματικά μοντέλα)*

Η ποσοτική μικροβιολογία περιλαμβάνει την περιγραφή της αύξησης/ θανάτου των μικροοργανισμών υπό συγκεκριμένες και ελεγχόμενες συνθήκες και τη συγκέντρωση αποτελεσμάτων υπό τη μορφή μαθηματικών εξισώσεων και πρόβλεψης της αύξησης/ θανάτου σε συνθήκες που δεν έχουν καταγραφεί, ενώ διέπεται από την αρχή της απλοποιημένης προσέγγισης.

Η μελέτη της επίδρασης στη μικροβιακή αύξηση σε κάθε ελεγχόμενο παράγοντα καθορίζει τα όρια αύξηση των μικροβίων στους υπο μελέτη παράγοντες. Όμως επειδή οι παράγοντες που επηρεάζουν την μικροβιακή αύξηση στο σύνθετο περιβάλλον του τροφίμου ενδέχεται να είναι πολλοί καθιστώντας τη μελέτη δύσκολη, επιλέγονται κάθε φορά οι σπουδαιότεροι παράγοντες, μοντελοποιούνται και αξιολογούνται έτσι η συνεισφορά τους στη μικροβιακή αύξηση. Συγκρίσει προβλεπόμενων ρυθμών αύξησης, οι οποίοι αξιολογήθηκαν από σχετικά απλά μοντέλα για ελεγχόμενες συνθήκες με αυτούς από τη βιβλιογραφία ήταν αρκετά κοντά, γεγονός πολύ ενθαρρυντικό. Βαθμιαία η χρήση μοντέλων που έχουν αξιολογηθεί και επικυρωθεί από ανεξάρτητα δεδομένα χαρακτηρίζεται το ίδιο αξιόπιστη όπως και οι κλασικές μικροβιολογικές μέθοδοι. Είναι αναγκαίο, και ιδιαίτερα στις μέρες μας που οι καταναλωτές έχουν μεγαλύτερες απαιτήσεις, η απόκτηση γρήγορων και αρκετά καλών εκτιμήσεων της διάρκειας ζωής τροφίμων στην ανάπτυξη νέων προϊόντων και στην εκτίμηση κινδύνου για τους διάφορους μικροοργανισμούς.

Παρ' όλ' αυτά, οι μικροβιολόγοι τροφίμων δεν έχουν υιοθετήσει με μεγάλη προθυμία αυτές τις νέες σύγχρονες μεθόδους. Πολλοί από αυτούς χρησιμοποιούν τη κλασική μικροβιολογία για τη καταμέτρηση των μικροβίων σε διαφορετικά στάδια της συντήρησης- αποθήκευσης των τροφίμων, αναγνωρίζοντας τους κύριους μικροοργανισμούς της μικροχλωρίδας από τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους και σταδιακά προχωρούν στον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής και της ασφάλειας των τροφίμων. Μια τέτοια προσέγγιση απαιτεί χρόνο και χρήμα ενώ δε καταλήγει σε μια συγκεντρωτική δομημένη εύχρηστη βάση δεδομένων.

Η χρήση μοντέλων πρόβλεψης στην επιστήμη της μικροβιολογίας αλλά και στο τομέα της βιομηχανίας τροφίμων ενέχει μεγάλη δυναμική καθώς οι εφαρμογές τους είναι πολλές, οι κυριότερες από τις οποίες είναι:

- *Πρόβλεψη της μικροβιολογικής αλλοίωσης των τροφίμων.* Η ποσοτική μικροβιολογία βοηθά στην πρόβλεψη της αύξησης των ειδικών αλλοιογόνων μικροοργανισμών από τον αρχικό τους πληθυσμό στο επίπεδο αλλοίωσης και συμβάλλει καθοριστικά στην πρόβλεψη της διάρκειας ζωής ενός προϊόντος (Shelf-Life)
- *Εκτίμηση επικινδυνότητας (Risk Assessment).* Μια από τις μεγαλύτερες δυσκολίες στα συστήματα εκτίμησης επικινδυνότητας είναι ο προσδιορισμός του πληθυσμού των παθογόνων στο τρόφιμο τη στιγμή της κατανάλωσης δηλαδή στο στάδιο προσδιορισμού της έκθεσης.

- *Ανάλυση Επικινδυνότητας των Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP)*. Η χρήση των μοντέλων πρόβλεψης βοηθά στην ανάλυση της επικινδυνότητας, την αναγνώριση και τον καθορισμό των κρίσιμων σημείων καθώς και την επιλογή διορθωτικών αλλαγών.
- *Έρευνα και ανάπτυξη νέων προϊόντων*. Ο συνδυασμός της ποσοτικής μικροβιολογίας με συστήματα HACCP στο αρχικό στάδιο της ανάπτυξης προϊόντων επιτρέπει τον προσδιορισμό των κινδύνων που σχετίζονται με τη πρώτη ύλη, την επεξεργασία, τη διανομή ή την κατανάλωση.
- *Εκπαίδευση*. Συμβάλλει στη κατανόηση της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών στα τρόφιμα σε σχέση με τις μεταβολές των ενδογενών και εξωγενών παραγόντων χωρίς να είναι απαραίτητο να γίνουν δαπανηρά και χρονοβόρα πειράματα στο εργαστήριο.

1.10.2 Κατηγορίες Μοντέλων Πρόβλεψης

Τα μοντέλα πρόβλεψης στη μικροβιολογία τροφίμων αποτελούν μαθηματικές εκφράσεις που περιγράφουν την αύξηση, την επιβίωση, την αδρανοποίηση, το θάνατο των μικροοργανισμών ή τη βιομηχανική εξέλιξη του μικροοργανισμού που απαντάται στα τρόφιμα. Ένα μαθηματικό μοντέλο στη πιο απλή του μορφή είναι μια απλή μαθηματική περιγραφή της διαδικασίας. Τα μοντέλα χρησιμοποιούνται ευρέως σε όλους τους επιστημονικούς τομείς. Στη μικροβιολογία τροφίμων χρησιμοποιήθηκαν πρώτη φορά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα για τη περιγραφή της κινητικής αδρανοποίησης των παθογόνων που γεννιούνται στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια της θερμικής επεξεργασίας των τροφίμων. Από τότε, με την επέλαση των Η/Υ και με τη βοήθεια στατιστικών λογισμικών πακέτων, η χρήση των μαθηματικών μοντέλων στη μικροβιολογία έχει αναπτυχθεί σε σημείο να θεωρείται ένας ξεχωριστός κλάδος.

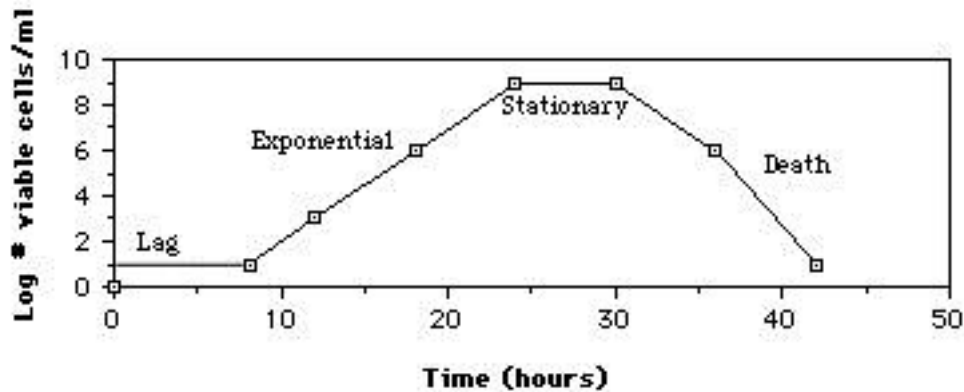
Σύμφωνα με τους Whiting και Buchanan (1993), τα μοντέλα διακρίνονται στις εξής κατηγορίες

- *Πρωτογενή (primary models)* όπου περιγράφουν τη μεταβολή της μικροβιακής βιομάζας σε σχέση με το χρόνο και χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων αύξησης (μ_{max} , λ , γ_{max} , χρόνος γενεάς)
- *Δευτερογενή (secondary models)* είναι αυτά που περιγράφουν το πώς οι παράμετροι των πρωτογενών μοντέλων εξαρτώνται από την 'ιστορία' των κυττάρων και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Χρησιμοποιούνται για τη ποσοτικοποίηση της επίδρασης των διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων (T, aw, pH, κ.α.) σε μια από τις κινητικές παραμέτρους αύξησης.
- *Τριτογενή μοντέλα* τα οποία συνδυάζουν πρωτογενή και δευτερογενή μοντέλα σε φιλικά προς το χρήστη πακέτα λογισμικών, με αποτέλεσμα οι τελικοί χρήστες τέτοιων συστημάτων να μην απαιτείται να έχουν γνώσεις των τεχνικών στη ποσοτική μικροβιολογία.

1.10.3. Πρωτογενή Μοντέλα

1.10.3.1. Καμπύλη Μικροβιακής Αύξησης

Είναι γνωστό ότι σε ένα περιβάλλον στο οποίο τα θρεπτικά συστατικά δεν αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για τη μικροβιακή αύξηση, ο μικροβιακός πληθυσμός θα αρχίσει να πολλαπλασιάζεται και η μεταβολή του δεκαδικού λογαρίθμου της πυκνότητας του σε σχέση με το χρόνο δίνει τη χαρακτηριστική καμπύλη του σχήματος



Σχήμα 1.2.:Τυπική καμπύλη μικροβιακής αύξησης (www.textbookofbacteriology.net n.d.)

Το μικροβιακό φορτίο μπορεί να μετρηθεί είτε άμεσα με την κλασσική μέθοδο των τρυβλίων, είτε έμμεσα με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας, αγωγιμότητας κ.α. Κυρίως τα μοντέλα πρόβλεψης έχουν βασιστεί σε άμεσες μετρήσεις της μικροβιακής αύξησης. Όταν η μικροβιακή καμπύλη αύξησης περιγράφει τη μεταβολή του πληθυσμού των κυττάρων συναρτήσει του χρόνου, τα δεδομένα αυτά μπορούν να επεξεργαστούν με τη βοήθεια ενός πρωτογενούς μοντέλου όπου και τελικά προκύπτουν πληροφορίες σχετικά με τις κινητικές παραμέτρους αύξησης των βακτηρίων.

Όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.2. μετά από ένα χρονικό διάστημα κατά το οποίο ο λογάριθμος του πληθυσμού παραμένει σταθερός, εμφανίζεται ένας αρχικά αργός ρυθμός αύξησης. Στη συνέχεια ο ρυθμός μειώνεται τείνοντας στο μηδέν και τελικά γίνεται αρνητικός. Όταν η αύξηση της πληθυσμιακής πυκνότητας σχεδιάζεται ως προς το χρόνο η καμπύλη που προκύπτει περιλαμβάνει τέσσερις φάσεις. Συγκεκριμένα:

- *Φάση προσαρμογής (lag phase)*, κατά την οποία τα κύτταρα προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον
- *Εκθετική φάση (exponential phase)*, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά
- *Στατική φάση (stationary phase)*, όπου σημειώνεται η μέγιστη πληθυσμιακή πυκνότητα
- *Φάση θανάτωσης ή παρακμής (death or decline phase)*

Αναλυτικά η στασιμότητα των μικροοργανισμών στη φάση προσαρμογής οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη περίοδο αυτή τα κύτταρα πραγματοποιούν ορισμένες βιοχημικές διεργασίες που σχετίζονται με τη φυσιολογία του προκειμένου, για τη προσαρμογή του στο νέο περιβάλλον. Μόλις τα κύτταρα πραγματοποιήσουν τις απαραίτητες αυτές διεργασίες παρατηρείται η κατάσταση ισορροπίας αύξησης. Τα κύτταρα δηλαδή πολλαπλασιάζονται με τον ταχύτερο δυνατό ρυθμό και με τέτοιο τρόπο ώστε ο ρυθμός σύνθεσης των συστατικών του κυττάρου (ένζυμα, δομικά μόρια, DNA κ.α.) είναι τέτοιος ώστε να μη γίνεται μεγαλύτερη σύνθεση από αυτή που απαιτείται για τη παραγωγή νέων κυττάρων, αλλά η μεταβολική δράση των μικροοργανισμών να κατευθύνεται εξολοκλήρου προς τη διαίρεση. Στη φάση αυτή, τα κυτταρικά συστατικά βρίσκονται σε σταθερές αναλογίες για ολόκληρο το πληθυσμό. Κατά τη διάρκεια της αύξησης και λόγω της μεταβολικής δραστηριότητας των μικροοργανισμών, λαμβάνει χώρα η παραγωγή και συσσώρευση μεταβολικών παραπροϊόντων τα οποία εμφανίζουν παρεμποδιστική δράση, με συνέπεια τη μείωση του ρυθμού αύξησης των κυττάρων και την εισαγωγή τους στη στατική φάση. Παρ' όλο που η διάρκεια της φάσης αυτής ποικίλει ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού καθώς και του μέσου αύξησης, τελικά η αύξηση της συγκέντρωσης των παρεμποδιστικών μεταβολικών προϊόντων αλλά και ο περιορισμός του θρεπτικού υποστρώματος οδηγεί στη καταστροφή των κυττάρων δηλαδή οδηγούνται στη φάση θανάτωσης.

1.10.3.2. Παρουσίαση Πρωτογενών Μοντέλων

Η βασική εξίσωση που περιγράφει την εκθετική αύξηση είναι η εξής εξίσωση 1.1.:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu_{max}N(t) \quad (1.1)$$

Όπου:

dN/dt : η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων στη μεταβολή του χρόνου

$N(t)$ [cfu/ml]: είναι η συγκέντρωση των μικροοργανισμών τη χρονική στιγμή t

μ_{max} : ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης.

Στις μη ιδανικές συνθήκες όμως, το περιβάλλον δεν είναι απεριόριστο και ο ειδικός ρυθμός αύξησης δεν είναι σταθερό αλλά, μεταβάλλεται σε συνάρτηση με τη πυκνότητα του πληθυσμού (εξίσωση 1.2.). Στις περιπτώσεις αυτές χρησιμοποιείται το μοντέλο λογιστικού τύπου που είναι διαδεδομένο και περιλαμβάνει έναν παράγοντα παρεμπόδισης (inhibition function) για να περιγράψει τη στατική φάση

$$\frac{dN(t)}{dt} = \mu \max \left(1 - \frac{N(t)}{N_{max}} \right) N(t) \quad (1.2)$$

Όπου:

N_{max} [cfu/ml]: είναι η μέγιστη συγκέντρωση μικροβιακών κυττάρων.

Ο παράγοντας παρεμπόδισης είναι ένας μειούμενος παράγοντας με τιμές μεταξύ 0 και 1. Όσο ο πληθυσμός πλησιάζει προς τη στατική φάση ο παράγοντας $\mu_{max} (1-N(t)/N_{max})$ πλησιάζει προς το 0

Ο McMeekin *et al.* (1993) αναφέρουν σε μια ανασκόπηση και συζήτηση των λειτουργιών της κλασσικής σιγμοειδούς καμπύλης, ειδικά των τροποποιημένων λογιστικών μοντέλων και εξισώσεων Gompertz και σημείωσαν ότι αυτές είναι εμπειρικές εφαρμογές των αυθεντικών συναρτήσεων και ότι στερούνται μηχανιστικής ερμηνείας. Μια νέα γενιά μοντέλων βακτηριακής αύξησης έχει αναπτυχθεί, τα οποία εμφανίζονται να έχουν μια μηχανιστική βάση. Για παράδειγμα τα μοντέλα

- ✓ Monod
- ✓ Baranyi (εμπειρικό) (Baranyi *et al.*, 1993)
- ✓ Hills (εμπειρικό)(Hills *et al.*, 1994)
- ✓ Γραμμικό τριών φάσεων-Buchanan (στοχαστικό) (Buchanan *et al.*, 1997)
- ✓ McKellar-Ετερογενούς πληθυσμού (στοχαστικό) (McKellar *et al.*, 1997)

1.10.3.3. Σύγκριση των Κυριότερων Πρωτογενών Μοντέλων

Στατιστική σύγκριση πολλών διαφορετικών τροποποιημένων σιγμοειδών συναρτήσεων έγινε (Λογιστική, Gompertz, Richards, Schnute και Stannard) με χρήση του t-test και του F-test (Zwietering *et al.*, 1990). Στις περισσότερες των περιπτώσεων η τροποποιημένη έκφραση Gompertz αναγνωρίστηκε ως το καλύτερο μοντέλο για τη περιγραφή των δεδομένων αύξησης τόσο σε επίπεδο στατιστικής ακρίβειας αλλά και λόγω ευκολίας του χρήστη.

Οι Baranyi *et al.*,(1993) σύγκριναν τα αποτελέσματα του μοντέλου τους με αυτό του Gompertz και κατέληξαν ότι η καταλληλότητα ήταν τουλάχιστον η ίδια. Έδειξαν επίσης ότι το μοντέλο Baranyi δίνει εκτιμήσεις για τους ρυθμούς προσαρμογής και αύξησης οι οποίοι είναι ελαφρώς χαμηλότεροι από αυτούς στην περίπτωση του μοντέλου Gompertz. Σύγκριναν επίσης το μοντέλο τους με αυτό των Hills (Baranyi *et al.*, 1995) και Buchanan (Baranyi *et al.*, 1997) και δήλωσαν ότι τα συγκεκριμένα μοντέλα είναι εξειδικευμένες περιπτώσεις του μοντέλου Baranyi. Συμφώνησαν ωστόσο, ότι το μοντέλο Buchanan είναι πολύτιμο για την απλότητά του, αλλά χάνει στην ικανότητα να προσομοιώνει δυναμικές συμπεριφορές. (Baranyi *et al.*, 1997)

Οι Buchanan *et al.*, υποστήριξαν (1997a) ότι το μοντέλο τους τριών φάσεων είναι συγκρίσιμο και πιο εύρωστο από τα μοντέλα Baranyi και Gompertz, ειδικά όταν τα πειραματικά δεδομένα είναι περιορισμένα. Το γραμμικό μοντέλο τριών φάσεων και το μοντέλο Baranyi προέβλεψαν ίδιες

μέγιστες πληθυσμιακές πυκνότητες. Αυτές οι τιμές ήταν χαρακτηριστικά μικρότερες από αυτές που εξασφαλίστηκαν με το μοντέλο Gompertz. Ο Garthright (1997) υποστήριξε με θέρμη το μοντέλο των τριών φάσεων και σημείωσε την ανωτερότητά του στην περιγραφή των φάσεων προσαρμογής και εκθετικής αύξησης σε σύγκριση με το Gompertz. Τα μοντέλα Baranyi και Mckellar μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχει έλλειψη πληροφοριών για τη στατική φάση.

Μια σύγκριση των μοντέλων Baranyi, Gompertz και του λογιστικού για την αλλοίωση των ψαριών έδειξε ότι η λειτουργικότητα του λογιστικού ήταν ίδια με του Baranyi αλλά ευκολότερη στη προσαρμογή (Dalgaard et al., 1995). Μια σύγκριση μεταξύ των μοντέλων Baranyi και Gompertz έδειξε καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου Baranyi και υψηλότερο ρυθμό αύξησης στο Gompertz, ενώ μια άλλη μελέτη κατέληξε ότι ο Baranyi δίνει καλύτερη εκτίμηση των παραμέτρων (Membre et al., 1996). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν οι Baty και Delignette-Muller (2004) χαρακτηρίζοντας το μοντέλο Baranyi ως πιο σταθερό, προσαρμόζοντας με ικανοποιητικότερο τρόπο την πλειοψηφία των δεδομένων και δίνοντας ακριβέστερες εκτιμήσεις.

Έλαβε χώρα επίσης μια προσπάθεια σύγκρισης τιμών του μέγιστου ρυθμού αύξησης (μ_{max}), όπως αυτοί λαμβάνονται με την εφαρμογή των μοντέλων Gompertz, του λογιστικού και του Baranyi σε πειραματικά δεδομένα της αύξησης της *Listeria monocytogenes* και *Listeria innocua*. Βρέθηκε πως και τα τρία μοντέλα προσαρμόζουν τα πειραματικά δεδομένα ικανοποιητικά, ωστόσο οι τιμές μ_{max} που έδωσαν το λογιστικό και το μοντέλο Gompertz ήταν ίδιες μεταξύ τους αλλά και σημαντικά διαφορετικές (μικρότερες συγκεκριμένα) από αυτές που δίνει το μοντέλο του Baranyi (Penri et al., 2005). Τόσο το λογιστικό όσο και το μοντέλο Gompertz έχουν το ίδιο σιγμοειδές σχήμα με ένα ξεκάθαρο σημείο κλίσης ενώ το μοντέλο Baranyi. Είναι γεωμετρικά διαφορετικό αφού δίνει ένα μερικά γραμμικό τμήμα κατά την εκθετική φάση.

Δεν είναι εφικτό να επιλεγεί κάποιο μοντέλο ως καλύτερο για τη πρόβλεψη της βακτηριακής αύξησης. Με βάση την αρχή της απλουστευμένης προσέγγισης στη μοντελοποίηση, το μοντέλο των τριών φάσεων είναι επαρκές για να αναπαραστήσει τις βασικές παραμέτρους αύξησης με ακρίβεια (Buchanan et al., 1997a) (Garthright et al., 1997). Όμως έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει ταύτιση στη συσχέτιση των βασικών αρχών και θα πρέπει να δοθεί έμφαση στην αύξηση και τη χρήση μοντέλων και παραμέτρων που μπορούν εύκολα να γίνουν κατανοητά από τους μικροβιολόγους τροφίμων (Buchanan et al., 1997a). Ωστόσο, παρά τη βεβαιότητα του Garthright (1997) ότι η απλότητα της ευθείας προσέγγισης είναι επαρκής για να μοντελοποιήσει της αύξησης των βακτηρίων, η ανάπτυξη πιο σύνθετων μοντέλων (και κατά συνέπεια πιο μηχανιστικών) θα βασίζεται πάνω σε μια βελτιωμένη αντίληψη της συμπεριφοράς των κυττάρων σε φυσιολογικό επίπεδο.

1.10.3.4 Μοντέλο Baranyi

Για τους παραπάνω λόγους που αναφέρθηκαν και κάνουν ξεχωριστό το μοντέλο του Baranyi στη παρούσα εργασία θα χρησιμοποιήσουμε το μοντέλο αυτό.

Πια αναλυτικά, σε μια σειρά δημοσιεύσεων (Baranyi et al., 1993) (Baranyi et al., 1994) αναφέρεται ένα μηχανιστικό μοντέλο για τη βακτηριακή αύξηση. Με λίγα λόγια, μοντέλο Baranyi αποδίδεται στην ανάγκη για σύνθεση ενός άγνωστου υποστρώματος q , το οποίο θεωρείται κρίσιμο για την αύξηση. Όταν τα κύτταρα προσαρμοστούν στο νέο περιβάλλον, αναπτύσσονται εκθετικά μέχρι να περιοριστούν από τους παράγοντες του μέσου αύξησης, οπότε:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{q(t)}{q(t) + 1} * \mu_{max} * \left(1 - \left(\frac{x(t)}{x_{max}}\right)^m\right) x(t) \quad (1.3)$$

Όπου:

x : ο αριθμός των κυττάρων σε χρόνο t

x_{max} : η μέγιστη πυκνότητα των κυττάρων

$q(t)$: η συγκέντρωση του περιοριστικού υποστρώματος, το οποίο μεταβάλλεται με το t :

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{max} * q(t) \quad (1.4)$$

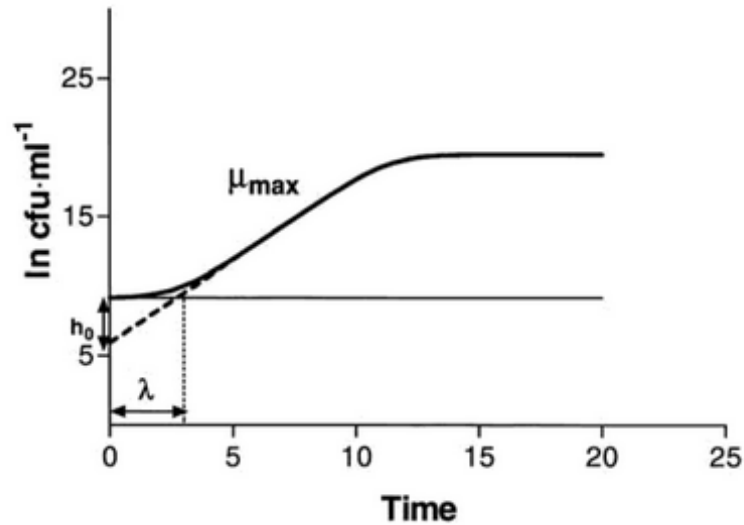
Η αρχική τιμή της q (q_0) είναι η μέτρηση της αρχικής φυσιολογικής κατάστασης των κυττάρων. Το q_0 μπορεί να οριστεί και ως εξής:

$$h_0 = \ln\left(1 + \frac{1}{q_0}\right) = \mu_{max} * \lambda \quad (1.5)$$

Η παράμετρος m χαρακτηρίζει τη καμπυλότητα πριν από τη φάση σταθεροποίησης. Όταν $m=1$, η συνάρτηση μετατρέπεται σε μια λογιστική καμπύλη, μια απλούστευση του μοντέλου, που συχνά θεωρείται δεδομένη. Συνεπώς η τελική μορφή του μοντέλου έχει τέσσερις παραμέτρους:

- ✓ το x_0 που είναι ο αρχικός αριθμός των κυττάρων
- ✓ το h_0 που είναι η μεταβαλλόμενη παράμετρος της φυσιολογικής κατάστασης
- ✓ το x_{max} που συμβολίζει τη μέγιστη κυτταρική πυκνότητα
- ✓ και το μ_{max} που είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (h^{-1})

Η απόδοση του μοντέλου και η σχέση μεταξύ h_0 , λ και μ_{max} δίνεται στο σχήμα 1.3. (McKellar et al., 2004) (Baranyi et al., 2002)



Σχήμα 1.3.: Παράδειγμα καμπύλης αύξησης όπως προκύπτει από το μοντέλο Baranyi (McKellar et al., 2004)

Έχει επίσης δοθεί μια σαφή ερμηνεία του μοντέλου Baranyi:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{e^{m\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{m(y_{max}-y_0)}}\right)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{v} \ln\left(\frac{e^{-vt} + q_0}{1 + q_0}\right)$$

(1.6)

Όπου:

v είναι ο ρυθμός αύξησης του περιοριστικού υποστρώματος το οποίο θεωρείται ότι είναι ισοδύναμο με το μ_{max} .

η τιμή της συνάρτησης $A(t)$, σε συνδυασμό με τις συνθήκες που επικρατούν πριν τον ενοφθαλμισμό, χρησιμεύουν για τη πρόβλεψη της διάρκειας της φάσης προσαρμογής των μικροοργανισμών.

1.10.4. Δευτερογενή Μοντέλα

1.10.4.1. Εισαγωγή και Παρουσίαση

Οι αλλαγές που υφίστανται οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών στα τρόφιμα με το χρόνο κατευθύνονται από τις συνθήκες συντήρησης (εξωγενείς παράγοντες, “extrinsic” και τα χαρακτηριστικά του προϊόντος (ενδογενείς παράγοντες “intrinsic”), παράγοντες που στο σύνολο τους είναι γνωστοί ως περιβαλλοντικοί. Αυτοί μπορεί να αντιπροσωπεύουν απλές καταστάσεις (π.χ. όταν η θερμοκρασία συντήρησης θεωρείται ως ο μοναδικός παράγοντας που επηρεάζει τη κινητική των βακτηρίων), αλλά και πιο σύνθετες, όπως συμβαίνει στο περιβάλλον του τροφίμου. Σε ένα τέτοιο περίπλοκο οικοσύστημα η επίδραση από εξωγενείς παράγοντες (όπως η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα αποθήκευσης) από ενδογενείς παράγοντες (όπως η ενεργότητα νερού, το pH,

φυσικά οργανικά οξέα, πρόσθετα συντηρητικά), καθώς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών, καθιστά τη μοντελοποίηση σε ένα τρόφιμο μια δύσκολη διαδικασία.

Όπως έχει αναφερθεί, τα μοντέλα που περιγράφουν την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως για παράδειγμα φυσικών, χημικών και βιολογικών γνωρισμάτων πάνω στις τιμές των παραμέτρων ενός πρωτογενούς μοντέλου ορίζονται ως “δευτερογενή μοντέλα” (Dvey et al., 1993).

Η γνώση των περιβαλλοντικών παραμέτρων, που επηρεάζουν την αύξηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα αποτελεί προϋπόθεση για την αύξηση και τη χρησιμοποίηση των μοντέλων πρόβλεψης. Τα δευτερογενή μοντέλα που δε περιλαμβάνουν όλες τις περιβαλλοντικές παραμέτρους που είναι σημαντικές σε ένα τρόφιμο έχουν χαρακτηριστεί ως ‘ατελή’ (Ross et al., 1999/2000). Ωστόσο, περιβαλλοντικοί παράμετροι που είναι σημαντικοί για κάθε τρόφιμο ξεχωριστά δεν είναι εύκολο να προσδιοριστούν. Σε αυτές τις η συστηματική προσέγγιση της ποσοτικής μικροβιολογίας μπορεί να βοηθήσει στη διασαφήνιση της μικροβιακής οικολογίας του προϊόντος.

Προκειμένου για την αξιοπιστία των δευτερογενών μοντέλων είναι αναγκαίο να συμπεριληφθούν στο σχεδιασμό των πειραμάτων: η κατανόηση της μικροβιακής φυσιολογίας, η αντίδρασή της με τις συνθήκες περιβάλλοντος, αποθήκευσης και επεξεργασίας, η προετοιμασία των καλλιεργειών και η ερμηνεία των μετρήσεων των πληθυσμιακών αλλαγών.

Όσον αφορά την επιλογή των μοντέλων θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν τα εξής:

- ✓ *Οι ιδιότητες των παραμέτρων:* Τα μοντέλα θα πρέπει να περιέχουν ανεξάρτητες παραμέτρους, με ομοιόμορφη κατανομή.
- ✓ *Η ερμηνεία παραμέτρων:* Θα πρέπει να έχουν βιολογική, χημική, φυσική σημασία ώστε να σχετίζονται απευθείας με τις ανεξάρτητες και εξαρτημένες μεταβλητές.
- ✓ *Ο αριθμός των παραμέτρων:* θα πρέπει να χαρακτηρίζονται από επαρκή αριθμό παραμέτρων (parsimony). Μοντέλα με μεγάλο αριθμό παραμέτρων έχουν τη τάση να κάνουν προσαρμογή (fitting) στο σφάλμα των δεδομένων. Δηλαδή, δημιουργούν ένα μοντέλο που περιγράφει μόνο το συγκεκριμένο σετ δεδομένων και δεν έχει γενικότερη χρήση.
- ✓ *Η περιοχή πρόβλεψης:* Βρίσκεται πάντα μεταξύ αρχικά καθορισμένων τιμών των ανεξάρτητων μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου.
- ✓ *Η στοχαστική προσέγγιση:* η μορφή του μοντέλου και η επιλογή των μεταβλητών θα πρέπει να είναι τέτοια ώστε η διαφορά μεταξύ πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών να ακολουθεί κανονική κατανομή.

Η συντριπτική πλειοψηφία των μοντέλων που χρησιμοποιούνται πλέον είναι κινητικής φύσεως, με ποιο σημαντικά

- ✓ το μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας
- ✓ το μοντέλο Arrhenius με τις τροποποιημένες του μορφές και
- ✓ το πολυωνυμικό μοντέλο.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, εκτός από τα κινητικά μοντέλα χρησιμοποιούνται κατά τα μοντέλα πιθανοτήτων.

1.10.4.2. Μοντέλο τετραγωνικής ρίζας

Είναι μια γραμμική συσχέτιση μεταξύ της τετραγωνικής ρίζας του ρυθμού αύξησης και της απόλυτης θερμοκρασίας σε βαθμούς Κέλβιν όπως φαίνεται και στη εξίσωση 1.7 (Baranyi et al., 1994):

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \quad (1.7)$$

Όπου:

b είναι ο συντελεστής παλινδρόμησης

T είναι η θερμοκρασία συντήρησης

T_{min} είναι η θεωρητική ελάχιστη θερμοκρασία αύξησης

1.10.5. Τριτογενή Μοντέλα

Τα τριτογενή μοντέλα αποτελούν την ολοκληρωμένη μορφή της ποσοτικής μικροβιολογίας. Στην ουσία πρόκειται για εφαρμογή ενός ή περισσότερων πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων που ενσωματώνονται σε ένα λογισμικό πακέτο, το οποίο προσφέρει ευκολία στην εφαρμογή ακόμα και σε μη εξειδικευμένους χρήστες.

Ο τελικός χρήστης επομένως αυτών των προγραμμάτων δεν είναι απαραίτητο να είναι γνώστης των τεχνικών μοντελοποίησης ή των μαθηματικών εξισώσεων, στις οποίες στηρίχθηκε η ανάπτυξη των τριτογενών μοντέλων. Το γεγονός αυτό καθιστά τη ποσοτική μικροβιολογία ένα δυναμικό και εύχρηστο εργαλείο που μπορεί να αξιοποιηθεί όχι μόνο στο χώρο της έρευνας αλλά και στη βιομηχανία τροφίμων, προκειμένου να προβλεφθεί η μικροβιακή αύξηση και να προληφθεί η αλλοίωση των τροφίμων.

Αυτή τη στιγμή υπάρχουν αρκετά λογισμικά πακέτα διαθέσιμα ανα τον κόσμο. Το Υπουργείο Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USDA), έχει αναπτύξει το Pathogen Modeling Program (PMP, USDA) το οποίο χρησιμοποιεί την εξίσωση του Gompertz, σε συνδυασμό με πολυωνυμικά μοντέλα. Τα δεδομένα για την ανάπτυξη αυτού του προγράμματος προέκυψαν από εκτεταμένα πειράματα στα οποία μελετήθηκε η συμπεριφορά των μικροοργανισμών σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα. Άλλα λογισμικά πακέτα είναι η βάση δεδομένων Combase, το Growth Predictor (McClure et al., 1993), το Seafood Spoilage Predictor (Dalgaard et al., 2002)

1.10.6 Αξιολόγηση των Μοντέλων.

1.10.6.1 Εισαγωγή

Στη διαδικασία της μοντελοποίησης, η αξιολόγηση και επικύρωση του μοντέλου αποτελεί σημαντικό στάδιο, καθώς μέσω αυτής είναι εφικτή ή όχι η εφαρμογή του μοντέλου σε ρεαλιστικές συνθήκες. Ο όρος «επικύρωση» έχει δεχτεί κριτική σχετικά με τη δυσκολία ποσοτικοποίησης της καταλληλότητας των προγνωστικών μοντέλων, καθώς οι πηγές των πιθανών σφαλμάτων είναι πολλές. Αυτές είναι η ετερογένεια που παρουσιάζουν τα τρόφιμα, η πληρότητα των περιβαλλοντικών παραμέτρων που επιλέγονται να μελετηθούν και η μετατροπή των εμπειρικών αποτελεσμάτων σε μαθηματικές εξισώσεις

Τα μαθηματικά μοντέλα επίσης χρησιμοποιούν χαρακτηριστικά μεγάλα (περίπου 10^5 cfu/ml) μεγέθη εμβολίου. Τα πραγματικά συστήματα τροφίμων περιέχουν συνήθως χαμηλά μικροβιακά φορτία (1-10 cfu/ml) εισάγοντας έτσι μια πρόσθετη αβεβαιότητα η οποία λαμβάνεται υπόψιν στην πρόβλεψη του μοντέλου.

Η αξιολόγηση των μοντέλων διακρίνεται σε εσωτερική αξιολόγηση (Internal Validation), η οποία γίνεται με τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου και εξωτερική, όπου η επαλήθευση του μοντέλου γίνεται είτε με δεδομένα από τη βιβλιογραφία είτε με ανεξάρτητα πειράματα. Στις περιπτώσεις που η ανάπτυξη του μοντέλου γίνεται σε «τρόφιμα μοντέλα» και όχι σε πραγματικά τρόφιμα. Είναι απαραίτητη η μελέτη και σύγκριση της συμπεριφοράς των μικροοργανισμών μεταξύ των εργαστηριακών μέσων καλλιέργειας και των πραγματικών τροφίμων.

1.10.6.2 Δείκτες και κτίρια αξιολόγησης

Ο Ross (1996) εισήγαγε τους συντελεστές μεροληψίας (Bias Factor) και ακριβείας (Accuracy Factor) για την αξιολόγηση των μοντέλων πρόβλεψης.

Συγκεκριμένα ο *Συντελεστής Μεροληψίας (Bias Factor)* (εξίσωση 1.8) δείχνει κατά πόσο το μοντέλο υπερεκτιμά ή υποεκτιμά τις πειραματικές μετρήσεις (τάση) και παίρνει τιμές μεγαλύτερες ή μικρότερες της μονάδας.

$$Bias\ factor = 10^{(\sum \log(\frac{\mu_{observed}}{\mu_{predicted}})/n)} \quad (1.8)$$

Όταν ο συντελεστής μεροληψίας είναι μεγαλύτερος της μονάδας σημαίνει ότι το μοντέλο υπερεκτιμά τη πραγματικότητα (fail dangerous) ενώ όταν είναι μικρότερος της μονάδας υποεκτιμά τη πραγματικότητα (fail safe). Αποτελεί αδήριτη ανάγκη να σημειωθεί ότι ένα επικυρωμένο μοντέλο θα πρέπει να είναι fail safe.

Ο *Συντελεστής Ακριβείας (Accuracy Factor)* (εξίσωση 1.9) δείχνει κατά πόσο οι προβλεπόμενες τιμές διαφέρουν από τις πειραματικές (ποσοτικά) και παίρνει τιμές μεγαλύτερες της μονάδας.

$$Accuracy\ factor = 10^{\sum |\log(\frac{\mu_{observed}}{\mu_{predicted}})|/n} \quad (1.9)$$

Ο συντελεστής συσχέτισης R^2 , αποτελεί μαθηματικό κριτήριο που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στη σύγκριση των μοντέλων και δείχνει το ποσοστό της παραλλακτικότητας που εξηγείται από το μοντέλο.

Εκτός από το R^2 και το Προσαρμοσμένο R^2 (*Adjusted R^2*) (εξίσωση 1.10) χρησιμοποιείται ως κριτήριο καταλληλότητας του μοντέλου.

$$r_{adj}^2 = 1 - \left(\frac{(n - i) * (1 - r^2)}{(n - p)} \right) \quad (1.10)$$

Όπου,

$i=1$, όταν το μοντέλο περιλαμβάνει intercept

$i=0$, όταν το μοντέλο δεν περιλαμβάνει intercept

Πολύ σημαντικά στατιστικά κριτήρια αποτελούν επίσης η *Ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (RMSE)* (εξίσωση 1.11) και το *Μέσο τετράγωνο σφάλματος (MSE)* (εξίσωση 1.12)

$$RMSE = \sqrt{\frac{RSS}{df}} = \sqrt{\frac{\sum(\mu_{observed} - \mu_{predicted})^2}{df}} \quad (1.11)$$

$$MSE = \frac{\sum(predicted - observed)^2}{n - p} \quad (1.12)$$

Όπου:

n , είναι ο αριθμός παρατηρήσεων και

p , είναι ο αριθμός των παραμέτρων

Επίσης ένας άλλος τρόπος αξιολόγησης είναι και ο προσδιορισμός των *ορίων αποδοχής του μοντέλου (Acceptable Predicted Zone)*. Πιο συγκεκριμένα για να επιβεβαιώσει το μοντέλο του υπολόγισε αρχικά το σφάλμα πρόγνωσης (Prediction Error)

$$PE = O - P \quad (1.13)$$

Όπου:

O , είναι η τιμή παρατήρησης σε log

P είναι η τιμή πρόβλεψης σε log

PE, είναι το σφάλμα πρόγνωσης

Όταν η τιμή του Prediction Error είναι $<0 \log$ είμαστε στη περιοχή fail safe (ασφαλείας) ενώ όταν η τιμή του είναι $>0 \log$ είμαστε στη περιοχή fail dangerous (κινδύνου) για τη πρόβλεψη

Όσον αφορά τον προσδιορισμό αν τα σφάλματα του μοντέλου και κατ'επέκταση το ίδιο το μοντέλο είναι αποδεκτό ή όχι ορίζεται μια περιοχή- ζώνη αποδοχής- ασφαλείας (Acceptable Predicted Zone: APZ) (Oscar et al., 2009)

$-1.0 \log < \text{acceptable PE} < 0.5 \log$.

Όπως φαίνεται το APZ έχει διπλάσιο πλάτος από την ασφαλή μεριά αστοχίας γιατί ένα σφάλμα ακόμα και μεγάλο όταν βρίσκεται σε αυτή τη πλευρά μπορεί να γίνει ανεκτό ειδικά όταν πρόκειται για μοντέλο που αφορά την ασφαλεία του τροφίμου. (Ross et al., 2000)

Τέλος το ποσοστό του σφάλματος πρόγνωσης (%PE) στη ζώνη αποδοχής (APZ) όπως φαίνεται στην εξίσωση 1.14 υπολογίζεται και χρησιμοποιείται ως ένα συνολικό μέτρο απόδοσης του μοντέλου.

$$\%PE = \left(\frac{PE_{in}}{PE_{total}} \right) * 100 \quad (1.14)$$

Όπου:

PE_{in} , είναι ο αριθμός των PE που βρίσκονται μέσα στη ζώνη αποδοχής (APZ)

PE_{total} , είναι ο συνολικός αριθμός των PE.

Ένα ποσοστό $\%PE > 70\%$ υποδεικνύει ότι το μοντέλο παρέχει αποδεκτές προβλέψεις για το σύνολο των δεδομένων (Oscar et al., 2005)

1.10.6.3 Αξιολόγηση εντός των τροφίμων

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος για την αξιολόγηση μοντέλων που χρησιμοποιούν νέα δεδομένα είναι η εκτέλεση μέσα στα τρόφιμα που ενδιαφέρου. Τα πειράματα αξιολόγησης δείχνουν αν οι μικροοργανισμοί συμπεριφέρονται με παρόμοιο τρόπο στο τρόφιμο που μας ενδιαφέρει με τον τρόπο που αναπτύσσονται στο μέσο αύξησης που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία του μοντέλου και στο πραγματικό τρόφιμο. Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν εργαστηριακά μέσα ανάπτυξης τόσο για τη δημιουργία όσο και για την αξιολόγηση των μοντέλων. Ωστόσο λόγω της πολυπλοκότητας που εμφανίζουν τα τρόφιμα ως συστήματα αύξησης των μικροοργανισμών, έχει εκφραστεί η ανάγκη για αξιολόγηση των μοντέλων με τη χρήση δεδομένων από πραγματικά τρόφιμα.

Στη περίπτωση ανάπτυξης μοντέλου που είναι άμεσα συνδεδεμένο με τη μεταβολή της θερμοκρασίας, για να γίνει η επικύρωση του συχνά

χρησιμοποιούνται νέα πειράματα με το ίδιο προϊόν εκτεθημένο σε μεταβαλλόμενα θερμοκρασιακά προφίλ (Koutsoumanis et al., 2006) όπως πρόκειται και για το πείραμα της προκειμένης εργασίας.

1.10.7 Η πρόβλεψη της διάρκειας ζωής

1.10.7.1 Εισαγωγή

Τα μοντέλα πρόβλεψης που προκύπτουν από τη ποσοτική μικροβιολογία μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου καλά και για τα αλλοιωγόνα βακτήρια, προκειμένου να γίνει πρόβλεψη της αύξησης τους και κατά συνέπεια της διάρκειας ζωής του προϊόντος που αλλοιώνουν (McKeen et al 2002). Σύμφωνα με τον Codex Alimentarius, η *διάρκεια ζωής (shelf-life) των τροφίμων ορίζεται ως η περίοδος κατά τη διάρκεια της οποίας τα τρόφιμα διατηρούν τη μικροβιολογική τους ασφάλεια και την καταλληλότητά τους. Στην ενδεδειγμένη θερμοκρασία αποθήκευσης, και όπου απαιτούνται στις καθημερινές συνθήκες χειρισμών.*

Από την άποψη της βιομηχανίας τροφίμων, η διάρκεια ζωής βασίζεται στην έκταση της ποιοτικής απώλειας σε τρόφιμα που η επιχείρηση τροφίμων θα επιτρέψει πριν από τη κατανάλωση προϊόντος. Σε εκείνο το σημείο, τα τρόφιμα μπορούν ακόμα να είναι οργανοληπτικά αποδεκτά. Για τους καταναλωτές, το τέλος της διάρκειας διατήρησης είναι ο χρόνος, όπου τα τρόφιμα δεν είναι πλέον οργανοληπτικά αποδεκτά.

Συνειδητοποιώντας ότι κάποιος δε μπορεί συνεχώς να ικανοποιεί όλους τους καταναλωτές και ότι τα συστήματα των τροφίμων, μαζί με τους μηχανισμούς αλλοίωσης τους, είναι εγγενώς σύνθετα, ένας καθολικός καθορισμός της διάρκειας ζωής είναι ουσιαστικά αδύνατο να καθιερωθεί. Παρά το γεγονός αυτό, η διάρκεια ζωής μπορεί να προσδιοριστεί και να προβλεφθεί από μεμονωμένα προϊόντα που βασίζονται σε κάποιο κύριο μηχανισμό αλλοίωσης

Η μικροβιακή αποσύνθεση είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες αλλοίωσης των τροφίμων, κυρίως για τα φρέσκα ή ελάχιστα επεξεργασμένα προϊόντα. Οι μικροοργανισμοί μπορούν να προκαλέσουν αλλοίωση των τροφίμων ή να οδηγήσουν σε τροφοδηλητηριάσεις. Η βιομηχανία τροφίμων οφείλει να προβεί σε δοκιμές προσδιορισμού της διάρκειας ζωής που καθορίζουν τότε εντοπίζεται η αλλοίωση, ενώ υποχρεούνται να ελέγχει την αποτελεσματικότητα των εμποδίων στην αύξηση των παθογόνων, χρησιμοποιώντας κατάλληλες επιστημονικές μελέτες για να αξιολογηθεί ο πιθανός κίνδυνος των προϊόντων τους. (NFPA, 1988).

Συνεπώς, για τη πρόβλεψη της διάρκειας ζωής ενός τροφίμου, υποκείμενου στην αλλοίωση, που οφείλεται σε κάποιον μικροοργανισμό αλλοίωσης μπορεί να προβλεφθεί από το χρόνο προσαρμογής και το χρόνο γενεάς. Η αύξηση των μικροοργανισμών μελετάται αρχικά κάτω από σταθερές αλλά και διαφορετικές συνθήκες (Ratkowsky et al., 2004). Ένα κατάλληλο

πρωτογενές μοντέλο εφαρμόζεται στα δεδομένα, από το οποίο προσαρμόζονται οι παράμετροι αύξησης. Κατόπιν ένα άλλο δευτερογενές μοντέλο εφαρμόζεται ώστε να καθορίσει την επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στην αύξηση των μικροοργανισμών. Ο συνδυασμός των δύο παραπάνω σταδίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει το μικροβιακό επίπεδο και κατά συνέπεια τη διάρκεια ζωής αλλά και την ασφάλεια των τροφίμων κάτω από τις εμπορικές συνθήκες διανομής.

Χρησιμοποιώντας τα πρωτογενή μοντέλα (π.χ. Baranyi) που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση του χρόνου προσαρμογής και του ρυθμού αύξησης, η διάρκεια ζωής ενός τροφίμου, δύναται να προσδιοριστεί προσδιορίζοντας πρώτα με οργανοληπτική εξέταση το επίπεδο στο οποίο αλλοιώνεται το τρόφιμο.

Υπό ιδανικές συνθήκες η διάρκεια ζωής ενός τροφίμου μπορεί να υπολογιστεί και από την εξίσωση του Mondo¹ (στην οποία γίνεται αναφορά στην παράγραφο 1.10.3.2.) όπου N , τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση του μικροοργανισμού τη στιγμή που το τρόφιμο θεωρείται αλλοιωμένο προκύπτει η διάρκεια ζωής του προϊόντος. Συμβολίζοντας με t_L , το μέσο χρόνο προσαρμογής, με t_G , το μέσο χρόνο προσαρμογής και με μ_{max} τη διάρκεια ζωής το t_s προσδιορίζεται από την έκφραση $t_s = t_L + t_G \ln(N_s/N_0)/\ln 2$ (1.13) όπου αντίστοιχα N_0 είναι η αρχική βακτηριακή συγκέντρωση και N_s η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (π.χ. σε cfu/g) τη στιγμή που το τρόφιμο θεωρείται αλλοιωμένο.

Ο πρώτος όρος της παραπάνω έκφρασης είναι ο χρόνος προσαρμογής και είναι σαφές ότι όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του t_L τόσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια ζωής του προϊόντος. Ο δεύτερος όρος υπολογίζει τον αριθμό των γενεών, μέσων των οποίων οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται από την αρχική τους στην τελική συγκέντρωση. Όλα τα παραπάνω ισχύουν εφόσον θεωρηθεί ότι ο χρόνος γενεάς είναι ανεξάρτητος από τον αριθμό των βακτηρίων που είναι παρόν.

Στη πραγματικότητα όμως και ιδιαίτερα στη βιομηχανία τροφίμων, οι ιδανικές συνθήκες σπάνια απαντώνται. Η διάρκεια ζωής εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το αρχικό επίπεδο μόλυνσης του προϊόντος, κάτι που όμως δεν είναι καθόλου εύκολο να ελεγχθεί και να σταθεροποιηθεί στα πραγματικά τρόφιμα. Το γεγονός αυτό αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τη πρόβλεψη της διάρκειας ζωής των προϊόντων, αλλά μπορεί να ξεπεραστεί με τον ορισμό ενός μέγιστου αρχικού επιπέδου μόλυνσης των υπεύθυνων για την αλλοίωση μικροοργανισμών. Ένας σχετικά σταθερός μικροβιακός πληθυσμός μπορεί να εδραιωθεί με τη βοήθεια του συστήματος HACCP και των αρχών καλής βιομηχανικής πρακτικής (GMP)

¹ Η ολοκληρωμένη μορφή του μοντέλου του Mondo είναι η εξής: $N = N_0 * \exp[k * (t - t_1)]$
Όπου: N = ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t (cfu), N_0 = ο αρχικός αριθμός των μικροοργανισμών (cfu) K = ο ειδικός ρυθμός αύξησης (h^{-1}) t = ο χρόνος (h)

Η ποσοτική μικροβιολογία έχει ως στόχο να συνοψίσει την πιθανή συμπεριφορά συγκεκριμένων μικροοργανισμών αλλοίωσης και την πρόοδο των διαδικασιών αλλοίωσης στα τρόφιμα. Για να προβλέψει τη διάρκεια ζωής του προϊόντος σωστά είναι απαραίτητο, να εξεταστεί η μικροβιακή οικολογία του συστήματος του τροφίμου. Όταν χρησιμοποιούνται σωστά τα προγνωστικά μοντέλα μπορούν να επιτρέψουν την ακριβή πρόβλεψη της διάρκειας ζωής του προϊόντος από τη γνώση των μικροβιακών αποκρίσεων στους ενδογενείς και εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες που επικρατούν στα τρόφιμα.

1.10.7.2 Παρουσίαση μοντέλων που περιγράφουν την εξάρτηση της διάρκειας ζωής από τη θερμοκρασία.

Μόλις ένα προϊόν υπό ψύξη κατασκευαστεί, συσκευαστεί και αρχίσει το «ταξίδι» του, από τις βιομηχανικές εγκαταστάσεις, στην αποθήκη εμπορευμάτων, στο κέντρο διανομής, στη λιανική αγορά και τελικά στο ψυγείο του καταναλωτή, το ποσοστό της ποιοτικής του απώλειας που παρουσιάζεται είναι πρωτίστως θερμοκρασιακά εξαρτώμενο. Γι αυτό το λόγο ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής προϊόντων υπό ψύξη συντελείται κατά κύριο λόγο από τη θερμοκρασία.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα, για τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής συναρτήσει της θερμοκρασίας

Τροποποιημένη Μορφή του Μοντέλου Arrhenius

Η εξίσωση Arrhenius που αναφέρθηκε και στη παράγραφο 1.10.4.1 χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει τη θερμοκρασιακή εξάρτηση του ρυθμού αύξησης του μικροοργανισμού.

Η εμπειρική σχέση (σε τροποποιημένη μορφή) του Arrhenius (εξίσωση 1.14b) μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής για οποιαδήποτε σταθερή θερμοκρασία και στη συνέχεια να υπολογιστεί η αποτελεσματική θερμοκρασία (T_{eff}). Ως αποτελεσματική θερμοκρασία νοείται η θεωρητική εκείνη θερμοκρασία που η παραμονή του προϊόντος σε αυτή προκαλεί την ίδια ποιοτική υποβάθμιση στο προϊόν όπως ένα μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ, στο οποίο έχει εκτεθεί το τρόφιμο στη πραγματικότητα (εξίσωση 1.15).

$$\ln(SL) = \ln(SL_{ref}) - \frac{E_a}{R} * \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \quad (1.14b)$$

$$T_{eff}(t) = \exp \left[\frac{-E_a}{R} * \left(\frac{1}{T_{ref} + T} \right) \right] * dt \quad (1.15)$$

Όπου:

SL, η διάρκεια ζωής του προϊόντος.

SL_{ref} , η διάρκεια ζωής στη θερμοκρασία αναφοράς ($T_{ref}=273K$) όπως προσδιορίζεται από τη γραμμική παληνδρόμηση

R , η παγκόσμια σταθερά αερίων ($R=8.314 J/kg/mol$)

E_a , η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης

T , η θερμοκρασία σε Kelvin

Η εξίσωση 1.14b είναι μια γραμμική εξίσωση της μορφής $\psi=\alpha\chi+\beta$ με κλίση $\alpha=E_a/R$ και $\beta=\ln(SL_{ref})$.

Πιο απότομη κλίση σημαίνει ότι η αντίδραση είναι περισσότερο θερμοκρασιακά ευαίσθητη, δηλαδή, μια μικρή αλλαγή στη θερμοκρασία προσδίδει μεγάλη μεταβολή στη διάρκεια ζωής του προϊόντος. (Dermesonluoglu 2014) Κατά συνέπεια από αυτή τη γραμμική εξίσωση, προκύπτει ότι μελετώντας ένα προϊόν σε 2,3 ή περισσότερες θερμοκρασίες (διαφορετικές από τη θερμοκρασία αποθήκευσης) είναι εφικτός ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής, με extrapolation στη επιθυμητή θερμοκρασία αποθήκευσης. Η διαδικασία αυτή αποτελεί τη βάση για την επιταχυνόμενη δοκιμή της διάρκειας ζωής του προϊόντος. Ωστόσο θα πρέπει να σημειωθεί σε μερικές περιπτώσεις η συσχέτιση δεν είναι γραμμική, για ποικίλους λόγους ειδικά εάν μια αλλαγή φάσης εμφανιστεί. (Labuza et al., 1982_

Μοντέλο Dalgaard

Ο Dalgaard (1995) πρότεινε για το προσδιορισμό της διάρκειας ζωής του τροφίμου την εξίσωση 1.16 όπως παρουσιάζεται.

$$SL = t_{lag} + (\ln 10) * \frac{\log(N_s) - \log(N_0)}{\mu_{max}} \quad (1.16)$$

Όπου:

SL , η αναμενόμενη διάρκεια ζωής του προϊόντος,

t_{lag} , ο απαιτούμενος χρόνος προσαρμογής

N_s , ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων της συνολικής μικροβιακής χλωρίδας που καθορίζουν ότι ένα προϊόν είναι αλλοιωμένο – απορριπτό από τους καταναλωτές

N_0 , ο αρχικός πληθυσμός που βρισκόταν στο προϊόν

μ_{max} , ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης

Στο συγκεκριμένο μοντέλο είναι σημαντικό να έχει προσδιοριστεί πότε ορίζεται ότι ένα προϊόν είναι αλλοιωμένο. Συνήθως είναι προκαθορισμένο από τη νομοθεσία (Κανονισμός 2073/2005) σύμφωνα με τον πληθυσμό των κυττάρων της συνολικής μικροβιακής χλωρίδας αν και πολλές φορές συγκεκριμενοποιείται και στους ειδικούς αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς και ακόμα περισσότερο όσον αφορά τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Ένας

άλλος τρόπος αξιολόγησης αν είναι ένα τρόφιμο αλλοιωμένο ή όχι είναι μέσω οργανοληπτικής αξιολόγησης από εκπαιδευμένο ή μη καταναλωτικό κοινό.

1.11 Ταχείες Μέθοδοι

1.11.1 Εισαγωγή

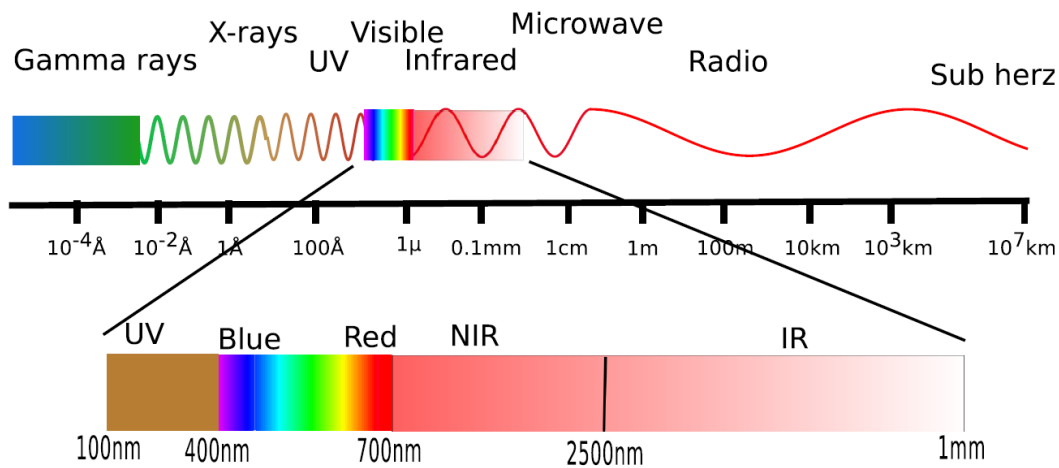
Μέχρι σήμερα περισσότερες από 50 χημικές, φυσικές και μικροβιολογικές μέθοδοι έχουν προταθεί για το προσδιορισμό και τη καταμέτρηση για την ασφάλεια και την αλλοίωση του κρέατος (Ellis et al., 2002) (Nychas et al., 2008). Παρ' όλ' αυτά, οι περισσότερες από αυτές τις μεθόδους είναι χρονοβόρες και παρέχουν αναδρομικές πληροφορίες οπότε δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν πάνω στη γραμμή παραγωγής ή να έχουν άμεσα αποτελέσματα (Ellis et al., 2002) (Ellis et al., 2004). Επιπλέον, η ανάπτυξη στον τομέα των τεχνολογιών επεξεργασίας και συντήρησης των τροφίμων (π.χ., τη συσκευασία κενού, συσκευασία σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες κλπ) καθώς και η θερμοκρασία αποθήκευσης είτε καταχρηστικά είτε λόγω κακής μεταχείρισης στη γραμμή παραγωγής του κρέατος καθιστούν σημαντικό και επείγον τον άμεσο προσδιορισμό των δεικτών ασφαλείας και της αλλοίωσης. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η βιομηχανία κρέατος χρειάζεται ταχείες αναλυτικές μεθόδους ή εργαλεία για τη ποσοτικοποίηση των δεικτών που προαναφέρθηκαν προκειμένου να προσδιοριστούν και να επιλεγθούν κατάλληλες διαδικασίες επεξεργασίας των πρώτων υλών και να γίνεται σωστή πρόβλεψη της διάρκειας ζωής των προϊόντων.

Η χρήση των μεταβολιτών των μικροοργανισμών όπως και η ποσοτικοποίηση των αποτυπωμάτων π.χ. η φασματοσκοπία δονήσεων στο κρέας έχει συνεχή αναγνώριση ως ένα δυναμικό μέσο για την εκτίμηση της ποιότητας του κρέατος. (Nychas et al., 2008)

1.11.2. Εξέλιξη Φασματοσκοπίας

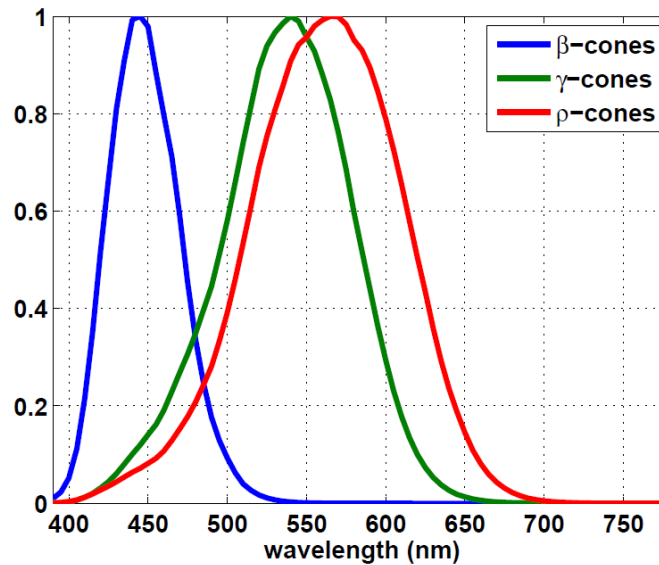
Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα (electromagnetic spectrum-EMS) (Σχήμα 1.11.2.1.) αποτελείται από όλες τις δυνατές συχνότητες της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία προσπίπτει πάνω σε ένα μόριο ορισμένες συχνότητες απορροφώνται ενώ άλλες ανακλώνται. Η ανάκλαση αυτή εξαρτάται από τη χημική σύσταση του μορίου με το οποίο αλληλεπιδρά.

Το ανθρώπινο μάτι είναι ικανό να ανιχνεύσει την EM ακτινοβολία όπου στον εγκέφαλο μεταφράζεται σε χρώματα και εικόνες.



Σχήμα 1.11.2.1.: Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα απεικονίζεται από το 1\AA έως 10^7km . Οι UV, NIR, IR και η ορατή ακτινοβολία είναι ενισχυμένες. Αυτές οι περιοχές είναι που χρησιμοποιούνται σε διάφορες φασματοσκοπικές εφαρμογές. (Skovlund, 2011)

Ωστόσο, η EMS αποτελείται από απεριόριστε συχνότητες από τις οποίες το ανθρώπινο μάτι είναι σε θέση να απορροφά και να αναγνωρίζει την ακτινοβολία η οποία βρίσκεται στη περιοχή των 400 έως 700 nm όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.11.2.1. Συγκεκριμένα υπάρχουν τέσσερις τύποι φωτοευαίσθητων κυττάρων στο ανθρώπινο μάτι. Οι τρεις από αυτούς ονομάζονται κώνοι και έχουν την ικανότητα της απορρόφησης σε διάφορα σημεία του EMS. Οι τρεις αυτοί κώνοι ονομάζονται S, M και L ή β, γ και ρ κώνοι και οι απορροφήσεις τους (spectral sensitivities) παρουσιάζονται στο σχήμα 1.11.2.2. οι βασικές ιδιότητες απορρόφησης τους λειτουργούν σαν φίλτρα, φιλτράροντας οτιδήποτε βρίσκεται μέσα σε αυτή τη στενή ζώνη απορρόφησης της EM ακτινοβολίας. Συνδυάζοντας τη πληροφορία που προκύπτει από τους τρεις αυτούς κώνους το ανθρώπινο μάτι είναι ικανό να δημιουργήσει την αίσθηση των χρωμάτων. Ο β-κώνος είναι ευαίσθητος στη περιοχή του μπλε, ο γ-κώνος στη περιοχή του πράσινου και ο ρ-κώνος σε αυτή του κόκκινου.



Σχήμα 1.11.2.2.: Η ευαισθησία- απορρόφηση των τριών ειδών κώνων του ανθρώπινου ματιού (Skovlund, 2011)

Μιμούμενοι αυτό το σύστημα «φιλτραρίσματος» και έχοντας υλικά τα οποία απορροφούν την EM ακτινοβολία, μία κάμερα είναι σε θέση να καταγράψει εικόνες. Η πρώτη κάμερα εμφανίστηκε το 1817 και από τότε η τεχνολογία έχει προχωρήσει με ραγδαίες ταχύτητες. Το 1951, η πρώτη συσκευή εγγραφής video πήρε εικόνες από τις τηλεοπτικές κάμερες και τις μετέτρεψε σε πληροφορία ηλεκτρικών παλμών και έγινε αποθήκευση αυτής της πληροφορίας σε μαγνητική ταινία- η πρώτη εμπορική πλέον ψηφιακή κάμερα διατέθηκε το 1981. Η «καρδιά» της ψηφιακής κάμερας είναι ένα τσιπ, το *charge-coupled device* (CCD) ο οποίος επινοήθηκε το 1969 στο AT & T Bell Labs και έχει εξελιχθεί από τότε δραματικά. Το CCD μπορεί και απορροφά φωτόνια στην ορατή περιοχή του EMS τα οποία απεικονίζονται στο σχήμα 1.11.2.1. και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικούς παλμούς έτσι ώστε να ερμηνεύονται σε αριθμητικές τιμές. Ένα κοινό τσιπ CCD ουσιαστικά ενσωματώνει όλο το εισερχόμενο φως στην ορατή περιοχή αποδίδοντας μονοχρωματικές εικόνες. Για τη δημιουργία έγχρωμων εικόνων μια σειρά από φίλτρα με χαρακτηριστικά παρόμοια με εκείνα που φαίνονται στο σχήμα 1.11.2.2 είναι τοποθετημένα μπροστά από το CCD. Κάνοντας αυτό, οι τρεις απορροφήσεις της εικόνας καταγράφονται, μια για το κάθε φίλτρο, οι οποίες όταν συνδυαστούν θα δώσουν μια έγχρωμη εικόνα. Έτσι, από τη διάσπαση του εισερχόμενου φωτός σε τρεις περιοχές με τη χρήση φίλτρων και το συνδυασμό τους κατά την έξοδο, τα χρώματα μπορούν να αναδημιουργηθούν.

Μετά την ολοκλήρωση της μέτρησης είναι μια μη ανατρέψιμη διαδικασία. Είναι αδύνατο να αναδημιουργηθεί το φωτεινό φάσμα όταν έχει πρώτα μετατραπεί σε «χρωματικές συντεταγμένες». Ωστόσο η πληροφορία σχετικά με το σχήμα του πραγματικού φάσματος είναι αυτό που χρειαζόμαστε για να αποφύγουμε μεταμερή (*metameric failure*) προβλήματα. Τα μεταμερή προβλήματα μπορούν να περιγραφούν ως, η περίπτωση κατά την οποία δύο αντικείμενα ταιριάζουν χρωματικά κάτω από ένα φωτισμό αλλά κάτω από έναν

άλλο διαφέρουν (Stiles et al 2000) .Για έναν ερασιτέχνη φωτογράφο αυτό θα μπορούσε να μην είναι μεγάλο πρόβλημα, όταν όμως πρόκειται για κάμερες στη βιομηχανία όπου η επαναληψιμότητα είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες, αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα σοβαρό πρόβλημα. Αυξάνοντας των αριθμών των φίλτρων και με συχνές δειγματοληψίες με την ακτινοβολία EM, παίρνουμε περισσότερες πληροφορίες σχετικά με το υπό μελέτη αντικείμενο. Με την αύξηση των δειγματοληψιών και την ανάλυση των αποτελεσμάτων που προκύπτουν υπάρχει αυξημένη ικανότητα να διακριθούν οι διαφορετικοί τύποι των υλικών και της χημικής σύστασης στην επιφάνεια του. Παρ' όλ' αυτά, αυτό το προτέρημα μπορεί να αποτελέσει και την αδυναμία του συστήματος αυτού μια και οι μεγάλες αυτές ποσότητες πληροφορίας που παρέχεται από την ακτινοβολία EM δημιουργεί μεγάλο όγκο δεδομένων που πρέπει να αποθηκευτούν και να επεξεργαστούν.

Ευτυχώς, η καινοτομία αυτή αναπτύσσεται παράλληλα σε διάφορους τομείς, έτσι η τεχνολογία ανίχνευσης και απεικόνισης βελτιώνεται και δημιουργεί όλο και μεγαλύτερες βάσεις δεδομένων καθώς επίσης συμβαίνει το ίδιο και με την ανάπτυξη της τεχνολογίας των υπολογιστών. Μέχρι τώρα, τόσο η επεξεργασία όσο και η δυνατότητα αποθήκευσης της πληροφορίας σε υπολογιστές έχει καταστεί δυνατό για ένα ευρύτερο κοινό που πλέον μπορεί να χρησιμοποιεί τη φασματική απεικόνιση. Τόσο οι βιομηχανίες όσο και οι ερευνητικές ομάδες που χρησιμοποιούν και αναπτύσσουν τη φασματική απεικόνιση μεταξύ άλλων είναι η βιομηχανίες που χρησιμοποιούν εικόνες από δορυφόρους, η ιατρική βιομηχανία και η βιομηχανία τροφίμων.

Οι φασματικές κάμερες σήμερα χρησιμοποιούν συστοιχίες αισθητήρων είτε 1D ή 2D και συνήθως επικεντρώνονται στη περιοχή του ορατού ή υπέρυθρου (NIR) που βρίσκεται μεταξύ 400 και 2500 nm. Μερικά όμως συστήματα επικεντρώνονται στην υπεριώδη ακτινοβολία (UV) (βλ. σχήμα 1.11.2.2.1.). Ανάλογα με τη περιοχή EM που θέλουμε να μετρήσουμε το δείγμα χρησιμοποιούνται και διαφορετικοί τύποι ανιχνευτών Για 1D array κάμερες χρησιμοποιείται γραμμική σάρωση και ονομάζεται μέθοδος *push broom*. Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιούνται μια σειρά από αισθητήρες διατεταγμένοι κάθετα προς τη κατεύθυνση με την οποία γίνεται η σάρωση. Σε αυτή τη περίπτωση είτε η σειρά αισθητήρων κινείται είτε το δείγμα με αποτέλεσμα τη σάρωση και καταγραφής πληροφοριών για ολόκληρη την επιφάνεια.

Υπάρχει μια εναλλακτική προσέγγιση η οποία χρησιμοποιεί ένα μόνο ανιχνευτή και ονομάζεται *whisk broom*. Σε αυτή τη περίπτωση ένα κάτοπτρο σαρώνει την επιφάνεια και αντανakλάται το φως μέσα στο στοιχείο του ανιχνευτή το οποίο και συλλέγει μια σειρά δεδομένων για κάθε ένα ρίξει τη φορά. Με αυτή τη μέθοδο υπάρχει η δυνατότητα ο ανιχνευτής να εστιάσει σε ένα συγκεκριμένο σημείο και έτσι συνήθως συλλέγει περισσότερη πληροφορία για την εκάστοτε περιοχή. Όμως τα κινούμενα μέρη της μεθόδου αυτής την καθιστούν ακριβή και επιρρεπή στη φθορά. Οι 2D συστοιχίες είναι ικανές να

αποκτήσουν ένα στιγμιότυπο των εισερχόμενων φωτονίων και έτσι να έχουν μια πολύ γρήγορη προσέγγιση περί τίνος πρόκειται.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα το εισερχόμενο φως μπορεί να χωριστεί σε μια σειρά μετρήσεων με τη χρήση φίλτρων. Υπάρχει ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών ειδών φίλτρων όπως οπτικο-ακουστικό (Gat et al., 2000) ή φίλτρο υγρού κρυστάλλου (Hardeberg et al., 2002). Προφανώς για όλους τους αισθητήρες μια πηγή φωτός είναι απαραίτητη για την καταγραφή κάθε είδους εικόνας. Μια εναλλακτική λύση για τα φίλτρα είναι εστιάζοντας φως μέσω ενός οπτικού στοιχείου διασποράς όπως είναι ένα πρίσμα ή πλέγμα διαχωρισμού του φωτός σε διάφορες στενές ζώνες σε παρακείμενα μήκη κύματος και η ένταση της κάθε ζώνης στη συνέχεια μετρείται με ένα ξεχωριστό ανιχνευτή.

Ανεξάρτητα από τη μέθοδο που χρησιμοποιείται η πηγή φωτός είναι απαραίτητη. Ανάλογα τη μέθοδο υπάρχουν και ευρείας κλίμακας πηγές φωτός, όπως το φως της ημέρας που χρησιμοποιείται συνήθως. Άλλες πηγές φωτός είναι το βολφράμιο νήμα που εκπέμπει φως μεταξύ 300 και 2500nm, λυχνίες δευτερίου (190-400nm) και λάμπες Xenon (160-2000nm) (Stanley et al., 2006).

Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η χρήση LED ως πηγές φωτός οι οποίες κοστίζουν λιγότερο και είναι καλύτερες. Τα LED είναι σε θέση να εκπέμπουν φως στενής ζώνης, κάτι το οποίο εξαλείφει την ανάγκη της χρήσης φίλτρων. Αυτή τη προσέγγιση ακολουθεί και το VideometerLab (Yamamoto et al., 2007)

1.11.3. Ανάλυση εικόνας –VideometerLab (Multispectral Analysis)

1.11.3.1. Εισαγωγή

Πρόσφατα, η δυνατότητα της χρήσης ανάλυσης ψηφιακής έγχρωμης εικόνας- φωτογραφίας έχει εφαρμοστεί για την αξιολόγηση της ποσοτικής κατανομής των διαφορετικών ιστών (tissues) στην επιφάνεια του ζαμπόν πριν από το αλάτισμα καθώς και για το ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε λιπαρές ουσίες σε φιλέτα σολομού (Sánchez et al., 2008) (Stien et al., 2007). Παρ' όλ' αυτά εξακολουθεί να είναι δύσκολο με τις περισσότερες τεχνολογίες εικόνας να διακρίνει κάποιος αξιόπιστα μικρές διαφορές στην εμφάνιση των τροφίμων, διότι η διαφοροποίηση είναι εντός των αποχρώσεων του κόκκινου, του πράσινου, του κίτρινου ή και στη περίπτωση του τηγανισμένου κρέατος εντός των αποχρώσεων του γκρι- καφέ.

Ένας τρόπος για να συνδυαστούν τα πλεονεκτήματα της οπτικής τεχνολογίας και της φασματοσκοπίας είναι η χρήση της πολυφασματικής απεικόνισης στο ορατό και εγγύς υπέρυθρων μηκών κύματος. Αυτό γίνεται με το videometer, ένα όργανο που είναι σε θέση να καταγράψει τις φασματικές ιδιότητες ανάκλασης σε στενές ζώνες (Chevallier et al., 2006). Εν ολίγοις, η πολυφασματική απεικόνιση μπορεί να προσφέρει όχι μόνο κλασσικές εικόνες απεικόνισης αλλά και φασματικές πληροφορίες για κάθε pixel της εικόνας.

Έτσι χρησιμοποιώντας πολυφασματικές εικόνες, είναι δυνατό να εκτιμηθούν τα φυσικά αλλά και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά όπως το χρώμα το μέγεθος, το σχήμα και την υφή. Έχουν γίνει αρκετές δημοσιεύσεις για το θέμα της χρήσης της πολυφασματικής απεικόνισης για τον έλεγχο των τροφίμων. Συγκεκριμένα η μέθοδος αυτή παράγει δεδομένα μεγάλα σε όγκο που χαρακτηρίζονται από μεγάλη διαστασιμότητα και τα οποία μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας ειδικές τεχνικές (Daugaard et al., 2010) (Gowen et al 2007).

1.11.3.2. Multispectral/ Hyperspectral απεικόνιση

Οποιαδήποτε συνεχόμενη δειγματοληψία στο EMS σε αρκετές στενές ζώνες ονομάζεται πολυφασματική (multispectral) ή υπερφασματική (hyperspectral) απεικόνιση. Ο αριθμός των ζωνών που παράγονται από τους αισθητήρες κυμαίνονται από πολύ λίγες έως αρκετές εκατοντάδες. Ωστόσο, δεν έχει συμφωνηθεί καθολικά ένας ελάχιστος αριθμός ζωνών ή ένα εύρος ζώνης διάστασης που απαιτείται για ένα σύνολο δεδομένων ώστε να χαρακτηριστούν είτε υπερφασματικές εικόνες είτε πολυφασματικές, αν και η υπερφασματική απεικόνιση περιέχει περισσότερες ζώνες από τη πολυφασματική απεικόνιση. Μια πρόταση είναι οι εικόνες με πάνω από 20 ζώνες συχνότητας ονομάζονται υπερφασματικές ενώ αυτές με λιγότερες πολυφασματικές. (Geladi et al., 2004)

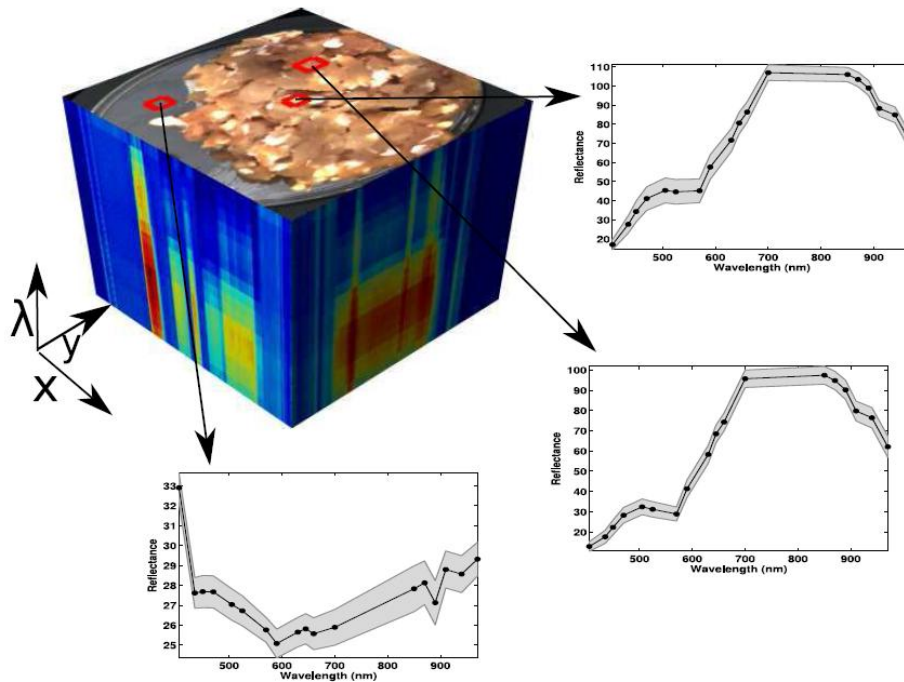
1.11.3.3. Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Analysis)

Η πολυφασματική απεικόνιση είναι μια αναδυόμενη μη επεμβατική τεχνολογία που ενσωματώνει τη συμβατική απεικόνιση με τη φασματοσκοπία για να αποκτήσει χωρική και φασματική πληροφορία (spatial and spectra information) από το υπό μελέτη προϊόν ταυτόχρονα, όπως αναφέρθηκε στη προηγούμενη παράγραφο. (Gowen et al., 2007).

Συγκεκριμένα αυτή η τεχνική είναι μια μη επεμβατική ταχεία μέθοδος, απλή στην εφαρμογή της και δεν απαιτεί καμία προ επεξεργασία του δείγματος κάτι το οποίο τη καθιστά ιδανική για χρήση on-line παρακολούθησης και ελέγχου της ποιότητας των προϊόντων. (Feng et al., 2012).

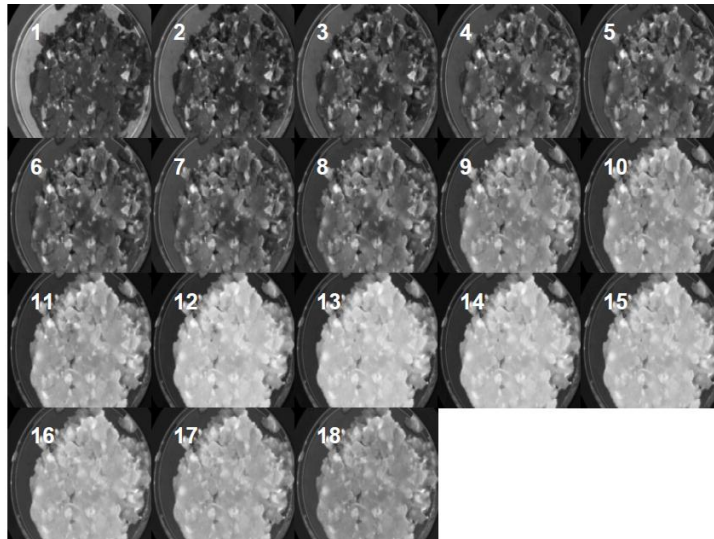
Το πιο σημαντικό σε αυτή τη τεχνική είναι ότι έχει μεγάλο δυναμικό για τη μέτρηση πολλών συστατικών ταυτόχρονα και έτσι διασφαλίζει τη ποιότητα. Πρόσφατα άλλωστε, αυτή η τεχνολογία έχει εφαρμοστεί ως εργαλείο ταχείας, μη επεμβατικής ανάλυσης για την επιθεώρηση ακόμα και των εσωτερικών και εξωτερικών χαρακτηριστικών σε διάφορα λαχανικά και φρούτα (Lleó et al., 2009)

Παρ' όλ' αυτά οι πολυφασματικές εικόνες είναι δύσκολο να απεικονιστούν σε χαμηλές διαστάσεις, δεδομένου ότι κάθε pixel αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο αριθμό πληροφοριών. Μια κοινή προσέγγιση για την απεικόνιση των δεδομένων είναι η τρισδιάστατη πολυφασματική σε μορφή κύβου όπως φαίνεται στην εικόνα 1.11.3.3.1.



Εικόνα 1.11.3.3.1.: Μια πολυφασματική εικόνα χοιρινού κιμά. Η εικόνα αποτελείται από 18 μήκη κύματος στο ορατό και εγγύς υπέρυθρο φάσμα (405-970nm). Στις πλευρές του κύβου οι φασματικές τιμές που απεικονίζονται είναι για τα ακριανά ρίxel. Επιπλέον η εικόνα είχε ληφθεί για δειγματοληψία σε τρεις διαφορετικές τοποθεσίες όπου οι φασματικές τιμές φαίνονται διαφορετικές. Οι γκριζες σκιασμένες περιοχές αντιπροσωπεύουν τη τυπική απόκλιση. Το σχήμα απεικονίζει το πώς κάθε ρίxel στον x, y άξονα στη πραγματικότητα είναι ένα φάσμα. (B. 2011)

Τα φάσματα από διαφορετικά σημεία της εικόνας μπορεί να είναι πολύ διαφορετικά. Ακόμα και μέσα σε μια μικρή περιοχή τα δεδομένα φαίνεται να ποικίλουν όπως φαίνεται από από τις γκριζες περιοχές. Ένας άλλος τρόπος απεικόνισης μιας πολυφασματικής εικόνας του κιμά είναι αυτή όπως φαίνεται στην εικόνα 1.11.3.3.2. Κάθε κουτάκι αναπαριστά ένα μόνο μήκος κύματος. Φυσικά τέτοιου είδους απεικόνιση είναι δυνατή μόνο με τη χρήση πολυφασματικών εικόνων με σχετικά χαμηλή φασματική ανάλυση (σχετικά λίγα μήκη κύματος) όπως εικόνες που προέρχονται από το VideometerLab.



Εικόνα 1.11.3.3.2.: Απεικόνιση μιας πολυφασματικής εικόνας ενός κομματιού ωμού χοιρινού μέσα σε τρυβλίο. Η εικόνα αποτελείται από 18 κανάλια (405-970nm). Ο αριθμός του κάθε μήκους κύματος είναι τυπωμένο στη γωνία του αντίστοιχου πλακιδίου. (Skovlund et al., 2011_

1.11.3.4. Videometer.

Το VideometerLab κάνει χρήση της προσέγγισης LED όπως αναφέρθηκε και στη παράγραφο 1.11.2 και μαζί με τη σφαίρα που διαθέτει επικαλυμμένη με ένα χρώμα ματ ώστε να ληφθεί διάχυτο φως (εικόνα 1.11.3.4.1) εξασφαλίζεται η αναπαραγωγή εικόνων με καλό δυναμικό εύρος, χωρίς σκίαση (Yamamoto et al., 2007).

Συνήθως το VideometerLab έχει τοποθετημένα περίπου 20 διαφορετικά LEDs τα οποία εκπέμπουν φως στο ορατό και εγγύς υπέρυθρο (NIR). Η ανάλυση του είναι 1280x960 και ο χρόνος απόκτησης και για τις 20 διόδους είναι περίπου 8 δευτερόλεπτα. Αξίζει να σημειωθεί ότι το σύστημα είναι γεωμετρικά και ραδιομετρικά (radiometrically) βαθμονομημένο (Hansen et al., 1999).

Το Videometer. παίρνει πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος που κυμαίνονται 405-970nm. Η φασματική ακτινοβολία των 18 μηκών κύματος δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένα σε όλη τη περιοχή του δείγματος αλλά στα μήκη κύματος 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970nm. όπως παρουσιάζονται και στον πίνακα 1.11.3.3.1. με παραδείγματα εφαρμογών όπου φαίνεται ότι η πλειοψηφία των μηκών κύματος βρίσκονται στο ορατό φως (400-800nm) (A/S n.d.).

Επίσης στην εικόνα 1.11.3.4.1. φαίνεται η οργανολογία του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης υψηλής απόδοσης που έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένου απεικόνισης της χημικής σύνθεσης, χρώμα και δομές της επιφάνειας. Η μονάδα είναι ένα εύκολο στη χρήση σύστημα το οποίο ενσωματώνει φωτισμό, φωτογραφική μηχανή και software για τον υπολογιστή με προηγμένη ψηφιακή και στατιστική ανάλυση. Η συγκεκριμένη τεχνολογία είναι επίσης ιδιαίτερα χρήσιμη για το ποσοτικό και

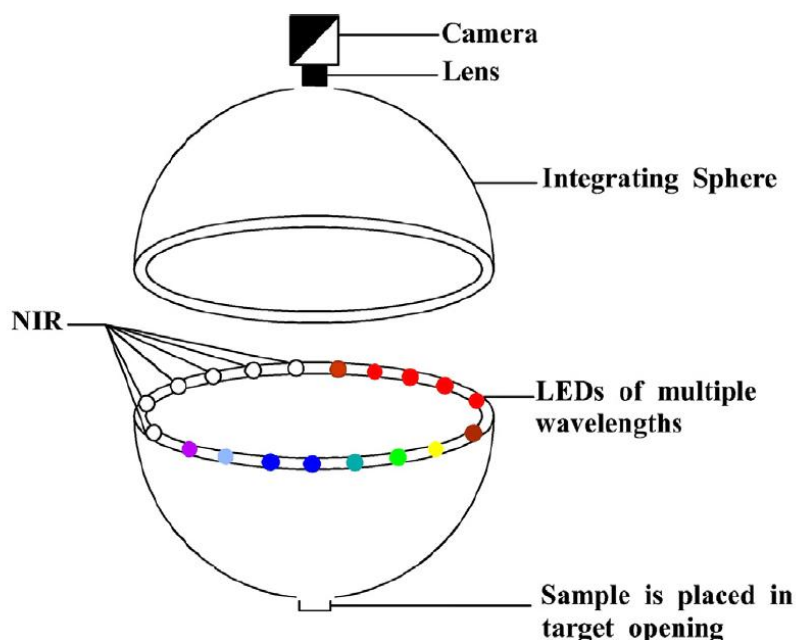
ποιοτικό προσδιορισμό των βιοχημικών συστατικών όπου βοηθά στην αξιολόγηση της ποιότητας του προϊόντος (Liu et al., 2015)

Χρησιμοποιώντας τη τεχνολογία LED (Light Emitting Diode) όπως αναφέρθηκε συνδυάζονται μετρήσεις με πάνω από 19 με διαφορετικά μήκη κύματος σε μια ενιαία υψηλής ανάλυσης ψηφιακής-φασματικής εικόνας. Κάθε pixel περιέχει τη δική του πληροφορία, και το σύστημα παίρνει ένα πλήθος φωτογραφιών στα μήκη κύματος με εύρος από 405 έως 970nm και το φάσμα που δίνεται τελικά βασίζεται σε μια μέση τιμή υπολογισμού. Έτσι η κάθε εικόνα συνεισφέρει στο τελικό φάσμα (Liu et al., 2015).

Πίνακας 1.11.3.4.1.: Μήκη κύματος Videometer και παραδείγματα εφαρμογής (Manual VideometerLab)

Band	Wavelength	Color	Compound/application example
1	395 (option)	Violet	Fluorescence
2	435	Ultra blue	Chlorophyll A
3	450	Blue	Riboflavin, Chlorophyll B, Beta-carotene
4	470	Blue	RGB Blue
5	505	Green	RGB green, Metmyoglobin
6	525	Green	RGB green
7	570	Green	Myoglobin
8	590	Amber	Oxymyoglobin
9	630	Red	RGB red, Metmyoglobin (weak)
10	645	Red	Chlorophyll B
11	660	Red	Oxidation, Chlorophyll A
12	700	Red	Oxidation
13	850	NIR	Baseline
14	870	NIR	Baseline
15	890	NIR	Fat shoulder (instauration)
16	910	NIR	Protein (C-H)
17	940	NIR	Fat
18	950	NIR	Valley (carbohydrate, protein)
19	970	NIR	Water
20	N/A	-	-

Αξίζει να σημειωθεί ότι η διαδικασία αυτή μπορεί να εφαρμοστεί πάνω στη γραμμή παραγωγής μιας και διαρκεί περίπου 8 δευτερόλεπτα και δίνει άμεσα αποτελέσματα.



Εικόνα 1.11.3.4.1.: Κύρια εγκατάσταση του συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης. Μια σφαίρα ολόκληρη επικαλυμμένη με μια ματ λευκή επικάλυψη η οποία εξασφαλίζει βέλτιστες συνθήκες φωτισμού. Οι δίοδοι εκπομπής φωτός βρίσκονται στο χείλος της σφαίρας. Η απόκτηση της εικόνας γίνεται με μια κάμερα CCD τοποθετημένη στη κορυφή της σφαίρας (Liu et al., 2016)

1.11.4. Φασματοσκοπία Υπερύθρου-FTIR²

1.11.4.1. Εισαγωγή

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Infra-Red, IR) είναι μια από τις καλύτερες τεχνικές με πολλές εφαρμογές. Τα φάσματα λαμβάνονται σχετικά εύκολα και στη συνέχεια συγκρίνονται, ολόκληρα ή ορισμένες ταινίες απορρόφησης τους, με άλλα γνωστά. Έτσι γίνεται δυνατή η διερεύνηση της μοριακής σύνταξης και της ταυτοποίησης αγνώστων οργανικών ενώσεων, αλλά και η πιστοποίηση της καθαρότητάς τους, γι' αυτό και η τεχνική έχει ευρεία εφαρμογή στην οργανική και φαρμακευτική χημεία, στη φαρμακογνωσία και στην ανάλυση φυσικών προϊόντων, φαρμάκων, τροφίμων, πετρελαιοειδών, πολυμερών κ.α.

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού τμήματος και των ραδιοσυχνοτήτων (0,75-1000 μm) και χωρίζεται σε τρεις βασικές περιοχές: Εγγύς υπέρυθη (Near IR, NIR)(0,75-2,5 μm ή 13.300-4.000 cm^{-1}), μέσω υπέρυθη (Mid IR, MIR) (2,5-50 μm ή 4.000-400 cm^{-1}) και άπω υπέρυθη (Far IR, FIR) (50-1000 μm ή 4.000-400 cm^{-1}). Συνήθως στο IR αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας

² (Ταραντίλης 2013)

χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού, ο οποίος ορίζεται σαν το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός όπως φαίνεται στην εξίσωση 1.17

$$\bar{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (1.17)$$

Έτσι με βάση τα παραπάνω, η συνήθης περιοχή MIR, καλύπτει την περιοχή 4000-400cm⁻¹. Το πιο χρήσιμο κομμάτι της υπέρυθρης περιοχής για τη φασματοσκοπία είναι αυτό μεταξύ 4000 και 600 cm⁻¹. Όλες σχεδόν οι οργανικές και ανόργανες ενώσεις είναι σε θέση να απορροφήσουν ακτινοβολία σε ορισμένες συχνότητες στην παραπάνω περιοχή. Γι' αυτό η φασματοσκοπία IR θεωρείται η πλέον απαραίτητη φασματοσκοπική τεχνική.

1.11.4.2. Βασικές Αρχές

Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα μόριο στην υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος προκαλεί διεγέρσεις στις δονήσεις των ατόμων ομοσθενών δεσμών σε υψηλότερες στάθμες που είναι κβαντισμένες.

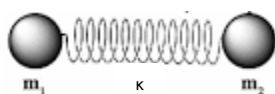
Προϋπόθεση για να απορροφηθεί ακτινοβολία από ένα μόριο στην περιοχή αυτή (4000-600cm⁻¹) είναι:

1. η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να είναι ίση με τη συχνότητα δόνησης ή περιστροφής των ατόμων του μορίου και
2. να δονείται το μόριο κατά τέτοιο τρόπο ώστε η διπολική ροπή του να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της δόνησης, διαφορετικά η δόνηση θεωρείται ανενεργός στο υπέρυθρο.

Όσο αυξάνεται η μεταβολή της διπολικής ροπής τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση. Αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο δεν παρατηρείται και απορρόφηση ακτινοβολίας από τα πολύ συμμετρικά μόρια.

Τα μήκη των δεσμών, μεταξύ συνδεδεμένων πυρήνων στα διάφορα μόρια εκφράζουν στη πραγματικότητα τη μέση απόσταση μεταξύ των πυρήνων, η οποία αυξομειώνεται περιοδικά λόγω ταλαντώσεων των πυρήνων. Σε διατομικά μόρια η ταλάντωση γίνεται κατά μήκος του δεσμού και μπορεί να παρομοιασθεί με την αρμονική κίνηση (ταλάντωση) δυο σφαιρών που συνδέονται με ελατήριο.

Η ακαμψία του ελατηρίου περιγράφει τη σταθερά δύναμης του δεσμού. Αν ένα τέτοιο απλό σύστημα τεθεί σε παλμική κίνηση οι δονήσεις που δημιουργούνται αντιστοιχούν σε αυτές του αρμονικού ταλαντωτή.



Εικόνα 1.11.4.2.1.: Σχηματική παράσταση ατόμων μορίων που δονούνται κατά μήκος του δεσμού (δόνηση τάσης)

Η συχνότητα της κίνησης δίνεται από την εξίσωση 1.18:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}} \quad (1.18)$$

Όπου:

κ , είναι η σταθερά δύναμης του δεσμού και

μ , είναι η ανηγμένη μάζα, δηλαδή ο αρμονικός μέσος όρος των ατομικών μαζών που δίνεται από την εξίσωση 1.19:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2} \rightarrow \mu = \frac{m_1 * m_2}{m_1 + m_2} \quad (1.19)$$

1.11.4.3 Τρόποι Δόνησης

Σε ένα πολυατομικό μόριο οι ομοιοπολικοί δεσμοί ή τα άτομα δεν είναι ενωμένα σταθερά μεταξύ τους και μπορούν να δονούνται γύρω από τις καταστάσεις ηρεμίας τους. Επιπλέον υπάρχουν οι γωνίες δεσμών που σχηματίζονται από τους διάφορους διατομικούς δεσμούς και αποτελούν μια ισχυρή ποιοτική μέθοδο περιγραφής των δονήσεων των ατομικών μορίων.

Η αύξηση του αριθμού των ατόμων σε ένα μόριο προκαλεί μεγάλο αριθμό θεμελιωδών απορροφήσεων. Έτσι αν περάσουν από το δείγμα διαφορετικές συχνότητες υπέρυθρη ακτινοβολίας, θα εμφανισθεί μια σειρά από ζώνες απορρόφησης που αντιστοιχούν στους θεμελιώδεις τρόπους δόνησης. Οι απορροφήσεις στο IR προέρχονται από δυο βασικές τάξεις δονήσεων:

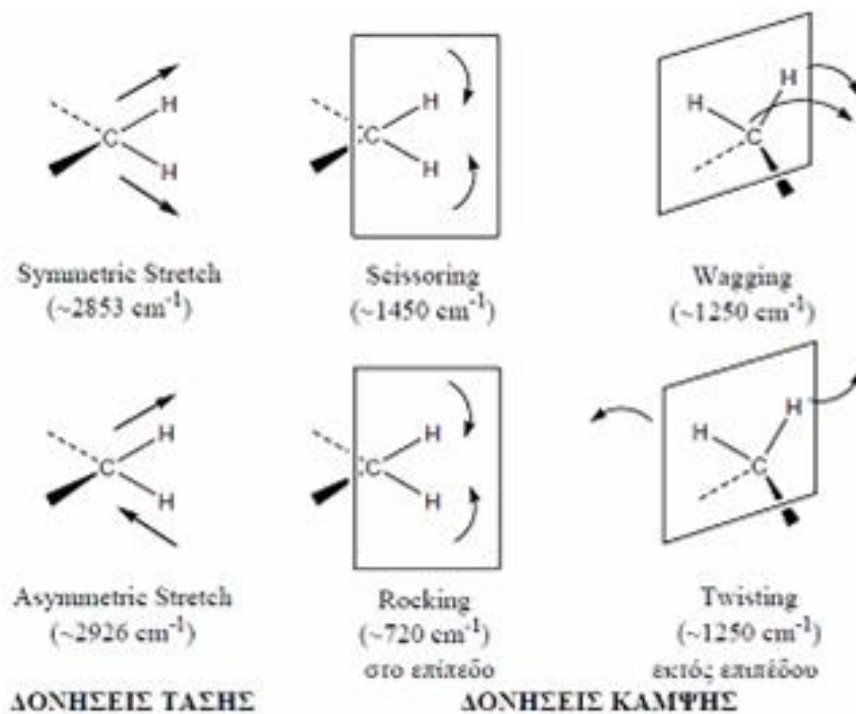
1. Δονήσεις τάσης (stretching vibrations)
2. Δονήσεις κάμψης (bending vibrations)

Γενικά σε ένα πολυατομικό μόριο με n άτομα, θεωρητικά οι δυνατές δονήσεις είναι $3n-6$, από τις οποίες $1-n$ είναι δονήσεις τάσης και οι $2n-5$ είναι δονήσεις κάμψης.

Δονήσεις τάσης: Τα άτομα του δεσμού διαδοχικά πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κινούμενα κατά μήκος του δεσμού.

Δονήσεις κάμψης: Τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται έτσι ώστε να αλλάζει η γωνία των δεσμών.

Εκτός από τις παραπάνω λαμβάνουν χώρα και συνδυασμένες δονήσεις. Υπάρχουν δηλαδή και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), όπως φαίνονται στην εικόνα 1.11.4.3.1.



Εικόνα 1.11.4.3.1.: Συζευγμένες δονήσεις τάσης και κάμψης του μεθυλενίου

Η υπέρυθη ακτινοβολία έχει τη δυνατότητα να ξεχωρίζει τους συνδυασμούς δύο όμοιων ατόμων που συνδέονται διαφορετικά. Αυτό στηρίζεται στο γεγονός ότι όσο αυξάνεται η σταθερά δύναμης ενός δεσμού άλλο τόσο αυξάνεται και η συχνότητα δόνησης των ατόμων του. Επομένως η υπέρυθη φασματοσκοπία διερευνά τις μοριακές δονήσεις και μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δομή της ουσίας.

1.11.4.4 Οργανολογία Φασματοφωτόμετρου FT-IR

Τα φασματοφωτόμετρα IR είναι διπλής δέσμης – μηδενισμού και αποτελούνται από τις ίδιες λειτουργικές μονάδες με τα UV-Vis. Η βασική διαφορά τους είναι η θέση του δείγματος, που το IR είναι πριν το μονοχρωμάτορα, για να ελαχιστοποιηθεί η παρασιτική ακτινοβολία.

Σε ένα τυπικό φάσμα υπέρυθρης φασματοσκοπίας διακρίνουμε δυο κυρίως περιοχές. Την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων (O-H, NH₂, C≡N, C=O κλπ) και αυτή των δακτυλικών αποτυπωμάτων. Η μεν πρώτη εκτείνεται στη περιοχή 4000-1400cm⁻¹ και οι κύριες ζώνες απορρόφησης οφείλονται στη δόνηση των ομάδων, η δε δεύτερη περιοχή 1400-600cm⁻¹ στην οποία οι απορροφήσεις σχετίζονται με τις δονήσεις ολόκληρου του μορίου, όπου κάθε άτομο ασκεί επίδραση στα υπόλοιπα και αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα κάθε ένωσης.

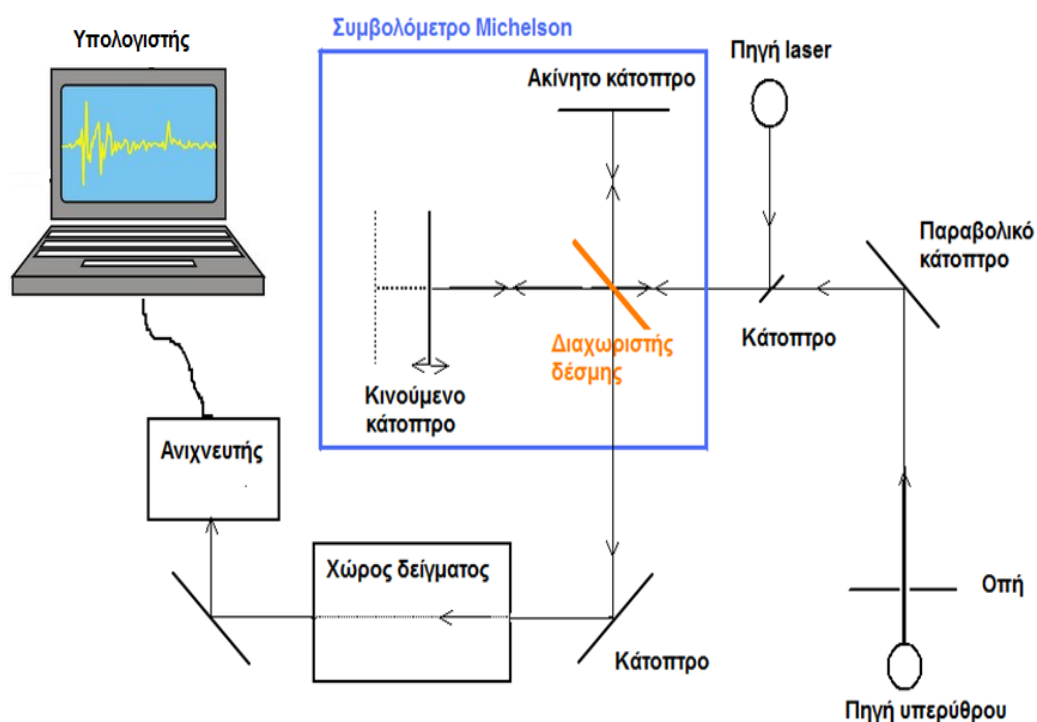
Στη παραπάνω περιοχή (από 1400-600cm⁻¹) που συνήθως χρησιμοποιείται το IR η ευαισθησία του φασματοφωτόμετρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων είναι πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο “θόρυβος” να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Η αδυναμία αυτή των κοινών φασματοφωτόμετρων υπερνικήθηκε με τη φασματοσκοπία IR

με το μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR)

Ένα τυπικό φασματοφωτόμετρο IR μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) αποτελείται από τα εξής κύρια τμήματα:

- Την πηγή υπέρυθρης ακτινοβολίας
- Την πηγή λέιζερ
- Το συμβολόμετρο Michelson
- Την υποδοχή του δείγματος
- Τον ανιχνευτή
- Τον υπολογιστή – καταγραφικό
- Τα κάτοπτρα

Στο σχήμα 1.11.4.4.1 φαίνεται το τυπικό σχηματικό διάγραμμα του φασματοφωτομέτρου FT-IR.



Σχήμα 1.11.4.4.1.: Σχηματικό διάγραμμα φασματοφωτομέτρου FT-IR

1.11.4.5 Λειτουργία φασματοφωτομέτρου FT-IR

Η πηγή εκπέμπει υπέρυθρη ακτινοβολία η οποία μέσω ενός παραβολικού κατόπτρου προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης. Εκεί διαχωρίζεται σε δύο δέσμες εκ των οποίων η μια τον διαπερνά και προσπίπτει στο κινούμενο κάτοπτρο και η άλλη κατευθύνεται στο ακίνητο. Οι δύο δέσμες επιστρέφουν στο διαχωριστή δέσμης όπου λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της συμβολής και προκύπτει μια συνελιγμένη δέσμη.

Το διπλάσιο της διαφοράς των αποστάσεων των δύο κατόπτρων, άρα των διαδρομών των δυο δεσμών, ονομάζεται καθυστέρηση και συμβολίζεται με το ελληνικό γράμμα δ . Όταν $\delta = k\lambda$ (όπου $k=0,1,2,\dots$ και λ το μήκος κύματος της ακτινοβολίας) τότε το σήμα παίρνει τη μέγιστη τιμή ενώ όταν $\delta = (2k+1)\lambda/2$ τότε το σήμα μηδενίζεται. Σε κάθε άλλη περίπτωση το σήμα λαμβάνει ενδιάμεση τιμή.

Η πηγή εκπέμπει μια σειρά από συχνότητες μονοχρωματικής ακτινοβολίας (ν_1, ν_2, \dots), οι οποίες ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία δημιουργούν ένα περίπλοκο σήμα, τη συνολική συνελιγμένη δέσμη, που στη πραγματικότητα αποτελείται από ένα μείγμα ακτινοβολιών.

Η συνολική συνελιγμένη δέσμη ακτινοβολίας μέσω του κατόπτρου εισέρχεται στο χώρο του δείγματος. Από το δείγμα απορροφώνται ολικά ή μερικά ορισμένες συχνότητες και ακολούθως η δέσμη εξέρχεται, εστιάζεται σε ειδικό κάτοπτρο και κατευθύνεται προς τον ανιχνευτή. Στον ανιχνευτή προκαλείται μεταβολή στη θερμοκρασία του με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαφοράς δυναμικού. Η μεταβολή της τάσης μετατρέπεται από το αναλογικό σε ψηφιακό σήμα για να γίνει αντιληπτό από τον υπολογιστή και με τη βοήθεια του κατάλληλου λογισμικού λαμβάνεται το συμβολόγραμμα. Το συμβολόγραμμα υπόκειται σε μετασχηματισμό Fourier και τελικά εμφανίζεται σαν τυπικό FT-IR φάσμα.

Τα φασματόμετρα FT-IR μπορούν χάρις στο συμβολόμετρο να εξετάζουν ταυτόχρονα πολλά σημεία του φάσματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε 10-20 δευτερόλεπτα και επαναλαμβάνεται συνήθως 20-100 φορές. Το τελικό φάσμα προκύπτει από το μέσο όρο των επαναλήψεων «σαρώσεων» που έχουν εκτελεστεί. Με αυτό τον τρόπο όταν αυξάνεται ο αριθμός των επαναλήψεων ο «θόρυβος» μειώνεται και οι εντάσεις των απορροφήσεων βελτιώνονται σημαντικά. Η εξασφάλιση ότι το συμβολόγραμμα εξετάζει κάθε φορά τα ίδια σημεία του φάσματος γίνεται με τη βοήθεια μονοχρωματικής ακτινοβολίας λέιζερ. Η εξέταση πολλών ταυτόχρονα σημείων προσδίδει σε αυτού του τύπου φασματοφωτόμετρα πολύ μεγάλη ταχύτητα. Σε αντίθεση με τα συμβατικά φασματοφωτόμετρα IR, όπου κάθε σημείο εξετάζεται διαδοχικά και μια φορά.

Επειδή στο χώρο των οργάνων υπάρχει ατμοσφαιρικός αέρας, το φάσμα που καταγράφεται «λαμβάνει υπόψη» του και εκείνα τα αέρια συστατικά που απορροφούν στο υπέρυθρο (κυρίως υδρατμοί και διοξείδιο του άνθρακα). Για το λόγο αυτό πρίν από τη λήψη του φάσματος του δείγματος καταγράφεται το φάσμα αναφοράς. Το φάσμα αναφοράς στη συνέχεια αφαιρείται αυτόματα με τη βοήθεια του λογισμικού από το συνολικό φάσμα.

1.11.4.6. Μετασχηματισμός Fourier

Το σήμα που στέλνει η πηγή υπερθύρου είναι συνάρτηση συχνοτήτων και συνεπώς κυματαριθμών. Όταν το σήμα εισέλθει στο συμβολόμετρο υπόκειται σε συμβολή με τη διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Ο τύπος

όμως της συμβολής εξαρτάται από την καθυστέρηση του κινούμενου κατόπτρου και επομένως το συμβολόγραμμα, είναι συνάρτηση της καθυστέρησης και ως τέτοια φθάνει στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Ο μετασχηματισμός Fourier είναι ένα μαθηματικό εργαλείο με τη βοήθεια του οποίου το συμβολόγραμμα μετασχηματίζεται ξανά σε συνάρτηση κυματαριθμών με βάση την εξίσωση 1.20

$$B(\bar{\nu}) = \int_{+\infty}^{-\infty} I(\delta) e^{-i2\pi\bar{\nu}\delta} d\delta \quad (1.20)$$

Όπου,

$B(\bar{\nu})$ η συνάρτηση των κυματαριθμών, όπως αυτοί εκπέμπονται από την πηγή $I(\delta)$, η συνάρτηση καθυστέρησης.

Ο παραπάνω τύπος αποτελεί το γρήγορο μετασχηματισμό Fourier (Fast Fourier Transform, FFT) όπως αυτός διαμορφώθηκε από τους Clooney και Tukey και με τη βοήθεια του οποίου ο αριθμός των σημείων που εξετάζονται και υπόκεινται το μετασχηματισμό είναι μειωμένος και επομένως η όλη διαδικασία γίνεται ταχύτερα.

Ουσιαστικά με το μετασχηματισμό Fourier προκύπτουν όλες οι συχνότητες της περιοχής του υπερύθρου φάσματος που μελετάται. Δηλαδή τα κενά των συχνοτήτων που απορροφήθηκαν από το δείγμα (μερικά ή ολικά μετασχηματίζονται μαζί με τις συχνότητες που δεν απορροφήθηκαν, σε τυπικό IR φάσμα.

1.12 Σκοπός Μελέτης

Ο γενικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και ο προσδιορισμός της αλλοίωσης του κρέατος (βόειου κιμά) τόσο μέσω της κλασσικής μικροβιολογίας και του οργανοληπτικού ελέγχου, αλλά και την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης, με την εφαρμογή ταχέων μη επεμβατικών και μη καταστρεπτικών μεθόδων που σχετίζονται με την πολυφασματική ανάλυση και με τη φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δυο διαφορετικά πειράματα. Το πρώτο πείραμα αφορούσε την αλλοίωση του βόειου κιμά σε τρεις διαφορετικές ισόθερμες θερμοκρασίες και χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μοντέλων τόσο της ποσοτικής μικροβιολογίας αλλά και για τις ταχείες μεθόδους. Ενώ στο δεύτερο πείραμα βόειος κιμάς συντηρήθηκε σε δύο διαφορετικά δυναμικά μεταβαλλόμενα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ και χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση των μοντέλων ανάπτυξης.

Αναλυτικότερα, δείγματα μοσχαρίσιου κιμά (από τοπικό κρεοπωλείο) αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες και κάτω από αερόβιες συνθήκες μέχρι την έντονη αλλοίωσή τους όπου έγινε οργανοληπτικός έλεγχος καθώς επίσης μικροβιολογικές αναλύσεις και για τα δύο πειράματα που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

Εν συνεχεία επιδιώχθηκε η δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου που να περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας στην αύξηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και κατ' επέκταση στη διάρκεια ζωής του κρέατος. Ενώ στο τέλος ακολούθησε εξωτερική επικύρωση του μοντέλου με τη χρήση των δεδομένων του δεύτερου πειράματος των χρονοθερμοκρασιακών μεταβαλλόμενων προφίλ.

Παράλληλα τα δείγματα κρέατος χρησιμοποιήθηκαν σε μια προσπάθεια να αξιολογηθούν οι δυνατότητες τόσο του FTIR όσο και της πολυφασματικής ανάλυσης αλλά και την ανάπτυξη μοντέλων για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης του μοσχαρίσιου κιμά ως γρήγορες και μη καταστρεπτικές, μη επεμβατικές τεχνικές. Έτσι τα φασματικά δεδομένα που λήφθηκαν και με τα δύο όργανα συγκρίθηκαν με τις μικροβιολογικές και οργανοληπτικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας διαφορετικές μαθηματικές προσεγγίσεις, όπως η μέθοδος της Διακριτής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων.

Συνοπτικά η μελέτη επικεντρώθηκε στους εξής στόχους:

1. Παρακολούθηση μικροβιακής αλλοίωσης σε δείγματα βόειου κιμά.
2. Οργανοληπτική αξιολόγηση.
3. Ανάπτυξη μαθηματικών μοντέλων για το ποσοτικό προσδιορισμό της αλλοίωσης και της διάρκειας ζωής του κρέατος και επικύρωση αυτών.
4. Εφαρμογή ταχέων μη επεμβατικών τεχνικών για το προσδιορισμό της αλλοίωσης του μοσχαρίσιου κιμά και επικύρωση αυτών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Μικροβιολογικές Αναλύσεις

2.1.1. Προετοιμασία δειγμάτων, συσκευασμένων σε αερόβιες συνθήκες *Συντήρηση σε σταθερό θερμοκρασιακό προφίλ*

Φρέσκος Ελληνικής προέλευσης μοσχαρίσιος κιμάς από διαφορετικά σφάγια στο κάθε πείραμα λήφθηκε αμέσως μετά την άλεση του από τοπικό κρεοπωλείο της Αθήνας και μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο εργαστήριο εντός 20 λεπτών. Μετά την παραλαβή του, ο κιμάς χωρίστηκε σε μπιφτέκια 80 γραμμαρίων και συσκευάστηκε σε αερόβιες συνθήκες.

Συγκεκριμένα ανά 2 δείγμα (2 μπιφτέκια) τοποθετήθηκαν σε δίσκους από πολυστυρένιο που προορίζονταν για τις αναλύσεις και μόνο του κάθε δείγμα που προοριζόταν για οργανοληπτικό έλεγχο και περιτυλίχθηκαν με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου οικιακής χρήσης στο οξυγόνο όπως φαίνονται στην εικόνα 2.1.



Εικόνα 2.1: Συσκευασία μοσχαρίσιου κιμά σε αερόβιες συνθήκες. Το αριστερό δισκίο προοριζόταν για αναλύσεις ενώ το δεξί για οργανοληπτικό έλεγχο.

Κατόπιν, τα δείγματα τοποθετήθηκαν και συντηρήθηκαν σε επωαστικούς θαλάμους (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan) στο πρώτο πείραμα σε σταθερής θερμοκρασίας ($\pm 0,5$) σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες (2, 6 και 10°C) μέχρι την έντονη αλλοίωση του προϊόντος, όπως φαίνονται στην εικόνα 2.2 καθώς έγινε παρακολούθηση τα θερμοκρασίας με τη χρήση data logger που είχε τοποθετηθεί στο εσωτερικό του θαλάμου με συχνότητα δειγματοληψίας ανά 15 min καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.



Εικόνα 2.2.: Τοποθετημένα δείγματα τα οποία συντηρούνται

Συντήρηση σε χρονοθερμοκρασιακό μεταβαλλόμενο προφίλ.

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως παρουσιάζεται παραπάνω μόνο που τα δείγματα συντηρήθηκαν στους επωαστικούς θαλάμους η θερμοκρασία των οποίων μεταβαλλόταν ανάλογα με το πρόγραμμα στο οποίο τους είχαμε ρυθμίσει.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν 2 θάλαμοι εν των οποίων ο ένας ήταν ρυθμισμένος στο πρόγραμμα των 2,6, 10°C και ο άλλος στους 4, 8°C όπου σε κάθε θερμοκρασία παρέμεναν για 8 ώρες και 12 ώρες αντίστοιχα. Και σε αυτή τη περίπτωση τα δείγματα συντηρήθηκαν μέχρι την έντονη αλλοίωσή τους.

Η μικροβιακή ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων. Από κάθε δείγμα ζυγίζονται ασηπτικά 25g σε σακούλα Stomacher, προθέτονταν σε 225ml ορού Ringer (LAB100Z, LAB M, UK) και ομογενοποιούνταν για 60sec, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London). Ακολουθούσε Παρασκευή των διαδοχικών αραιώσεων με μεταφορά 1ml δείγματος προηγούμενης αραιώσης σε 9ml ορού Ringer. Η απαρίθμηση των μικροοργανισμών γινόταν για Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX), *Pseudomonas spp*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae* και γαλακτικά βακτήρια ενώ παράλληλα γινόταν και καταγραφή του pH. Συγχρόνως, δείγματα από όλες τις περιπτώσεις αναλύθηκαν με τη τεχνική Φασματοσκοπία Μάζας με

μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Infra-Red, FT-IR) και πριν από τη διαδικασία ομογενοποίησης γινόταν λήψη φωτογραφίας με το VideoMeter Lab.

2.1.2. Δειγματοληψία

Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος παρασκευάστηκαν διαδοχικές αραιώσεις 0,1 και 1 ml και δείγμα από την κατάλληλη διαδοχική αραιώση ενοφθαλμίστηκε με τη μέθοδο της επίστρωσης ή ενσωμάτωσης για την απαρίθμηση των ακόλουθων μικροοργανισμών:

Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX): σε μη επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptic Glucose Yeast Agar (TGYA; Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) το οποίο επωάστηκε σε θερμοκρασία 30°C για 2 έως 3 ημέρες.

Pseudomonas spp. στο εκλεκτικό υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base (Oxoid, Basingstoke, UK), με την προσθήκη αντιβιοτικών Ceftrimid-Fusidin-Cephaloridine (C.F.C., Oxoid, Basingstoke, UK) το οποίο επωάστηκε σε θερμοκρασία 25°C για 2 έως 3 ημέρες.

Brochothix thermosphacta: στο επιλεκτικό υπόστρωμα Streptomycin Acetate-Actione Agar Base (STAA; Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) με τη προσθήκη αντιβιοτικού (4240052, Biolife, Milan, Italy) το οποίο επωάστηκε σε θερμοκρασία 25°C για 2 έως 3 ημέρες.

Enterobacteriaceae: στο επιλεκτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) το οποίο επωάστηκε σε θερμοκρασία 37°C για 18 έως 24 ώρες

Γαλακτικά βακτήρια: στο επιλεκτικό υπόστρωμα de Man, Rogosa και Sharpe's (Biolife, Italiana S.r.l., Milano, Italy) με ρύθμιση του pH στο 5,7 το οποίο επωάστηκε σε θερμοκρασία 25°C για 3 έως 5 μέρες

Δύο επαναλήψεις από τουλάχιστον τρεις αραιώσεις καταμετρήθηκαν σε κάθε περίπτωση. Όλα τα τρυβλία εξετάστηκαν οπτικά για τυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των αποικιών για κάθε υπόστρωμα.

Συχνότητα Δειγματοληψιών

Για τη περίπτωση του σταθερού θερμοκρασιακού προφίλ, τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους

- 2°C γινόταν δειγματοληψία περίπου ανά 24 ώρες ενώ
- 6,10°C γινόταν δειγματοληψία περίπου ανά 12 ώρες

Για τη περίπτωση των δυο μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακών προφίλ γινόταν δειγματοληψία αν 12 ώρες και για τις δυο περιπτώσεις

2.2. Φυσικοχημικές Αναλύσεις

2.2.1. Προσδιορισμός pH

Σε κάθε δείγμα τροφίμου μετρήθηκε η τιμή του pH (Metrohm 691 pH meter) με εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο ομογενοποιημένο δείγμα μετά το τέλος της μικροβιολογικής ανάλυσης.

2.2.2. Πολυφασματική Απεικόνιση

2.2.2.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Με τη πολυφασματική ανάλυση έγινε εκ νέου ανάλυση των δειγμάτων του μοσχαρίσιου κιμά. Συνολικά 108 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες αναλύθηκαν για τις σταθερές θερμοκρασίες 2,6,10°C και τα χρονοθερμοκρασιακά μεταβαλλόμενα προφίλ 2,6,10°C όπου ο κάθε κύκλος διαρκούσε 8 ώρες καθώς και το προφίλ των 4,8°C όπου ο κάθε κύκλος διαρκούσε για 12 ώρες και συσκευασία από τα ίδια χρονικά σημεία με τις μικροβιακές αναλύσεις. Το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε μέσα σε τρυβλίο πριν από κάθε μικροβιολογική ανάλυση.

2.2.2.2. Συλλογή φασματικών δεδομένων με το VideometerLab

Η ανάλυση της εικόνας πραγματοποιήθηκε με το όργανο VideometerLab που αποτελείται από μια σφαιρική επιφάνεια τύπου Ulbricht μέσα στη οποία τοποθετείται το δείγμα (μοσχαρίσιος κιμάς), το οποίο φωτίζεται από διόδους φωτεινής εκπομπής (LED) (Εικόνα 2.2.2.2.1.). Οι διόδοι φωτεινής εκπομπής είναι ομοιόμορφα κατανομημένοι στην περιφέρεια της σφαίρας και εκπέμπουν αναλαμπές (pulses) ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος.



Εικόνα 2.2.2.2.1.: Συσκευή πολυφασματικής ανάλυσης εικόνας VideometerLab.

Το σύστημα συνοδεύεται από μια φωτογραφική μηχανή υψηλής ανάλυσης. Η αντιστοίχιση των μηκών κύματος του οργάνου με το αντίστοιχο φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.2.2.2.1. Κύριο πλεονέκτημα του οργάνου είναι ότι εκτός από τη δυνατότητα λήψης φάσματος για κάθε εικονοστοιχείο που λαμβάνεται, με αποτέλεσμα την άμεση συσχέτιση της οπτικής πληροφορίας με τις χημικές μεταβολές στην επιφάνεια του τροφίμου, αλλά το γεγονός ότι η κάθε μέτρηση διαρκούσε 8 δευτερόλεπτα.

Πίνακας 2.2.2.2.1.: Αντιστοίχιση των μηκών κύματος των δίοδων φωτεινής εκπομπής του οργάνου VideometerLab με το αντίστοιχο φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας.

Ζώνη	Μήκος κύματος (nm)
1	405
2	435
3	450
4	470
5	505
6	525
7	570
8	590
9	630
10	645
11	660
12	700
13	850
14	870
15	890
16	910
17	940
18	970

2.2.2.3. Ανάλυση φασματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα.

Η επεξεργασία των εικόνων μετά τη λήψη τους είναι και το σημαντικότερο ίσως στάδιο της επεξεργασίας, ο *κατακερματισμός* (segmentation), όπου πραγματοποιείται, ο διαχωρισμός δηλαδή της χρήσιμης πληροφορίας που περιλαμβάνει η εικόνα (μυϊκός ιστός) από την μη χρήσιμη πληροφορία (θόρυβος) όπως π.χ. η παρουσία λιπώδους η/και συνδετικού ιστού στο δείγμα, κλπ.

Η ανάλυση των δεδομένων από το όργανο έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Unscrambler (version 9.7, CAMO, Norway). Αρχικά, από τα φασματογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν με το VideoMeterLab έγινε εξερεύνηση (exploratory) με ένα απλό δενδρόγραμμα για να ελέγξουμε αν διαχωρίζονται τα δείγματα αλλοιωμένα- φρέσκα σύμφωνα με τα φάσματα χωρίς καμία προ επεξεργασία στη συνέχεια έγινε μετασχηματισμός των φασμάτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο standard variate (SNV), η οποία εφαρμόζεται για να μειώσει την επίδραση του θορύβου ή της μετατόπισης της γραμμής βάση του μηχανήματος ή όποιες άλλες παρεμβολές οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την πολυμεταβλητή ανάλυση και auto scale.

Για τη ποιοτική ανάλυση των δεδομένων (δηλαδή, την κατάταξη των δειγμάτων κρέατος σε κατηγορίες ποιότητας) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Διακριτής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) ώστε να αναπτυχθούν μοντέλα που να επιτρέπουν την ανάλυση των δειγμάτων του κρέατος μεταξύ των δύο ποιοτικών κατηγοριών (φρέσκο και αλλοιωμένο) που είχαν ήδη προκαθοριστεί κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση στηριζόμενη στην οσμή σύμφωνα με το Danish meat research institute όπου αναφέρει ότι η οσμή είναι αυτή που χαρακτηρίζει την αλλοίωση. Για τη κωδικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο συμβολισμός 1 για το αλλοιωμένο και 2 για το φρέσκο.

Η αξιολόγηση του μοντέλου για τη πρόβλεψη της ποιοτικής κατάταξης των δειγμάτων κρέατος έγινε με την εξωτερική χρήση δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες και πέρασαν από το ίδιο οργανοληπτικό τεστ και έτσι στο τέλος, μπήκαν στο μοντέλο και μετρήθηκε ο αριθμός των δειγμάτων που το μοντέλο προέβλεψε σωστά και πόσα «έχασε» αντίστοιχα σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσε ο οργανοληπτικός έλεγχος. Έτσι η ακρίβεια της ταξινόμησης (ευαισθησία) καθορίστηκε από τον αριθμό των σωστών ταξινομήσεων και στις 2 κλάσεις προς το συνολικό αριθμό των δειγμάτων.

2.2.3. Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

2.2.3.1. Προετοιμασία δειγμάτων

Με τη Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (FTIR/ATR) έγινε ακόμα μία ανάλυση των δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά. Συνολικά 108 δείγματα μοσχαρίσιου κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες αναλύθηκαν για τις σταθερές θερμοκρασίες 2,6,10°C και τα χρονοθερμοκρασιακά μεταβαλλόμενα προφίλ 2,6,10°C όπου ο κάθε κύκλος διαρκούσε 8 ώρες καθώς και το προφίλ των 4,8°C όπου ο κάθε κύκλος διαρκούσε για 12 ώρες και συσκευασία από τα ίδια χρονικά σημεία με τις μικροβιακές αναλύσεις. Το μέγεθος του κάθε δείγματος ήταν 8cm μήκος x 1cm πλάτος x 0,5cm πάχος

2.2.3.2. Συλλογή φασματικών δεδομένων με το φασματόμετρο FTIR/ATR

Οι αναλύσεις έγιναν σε φασματόμετρο τύπου Nicolet 6200 FTIR Spectrometer (Εικόνα 2.2.3.2.1.) , το οποίο ήταν εφοδιασμένο με κρύσταλλο ZnSe 45° ATR (Smart ARK Base, ATR) με ανιχνευτή DLaTGS Detectro με παράθυρο KBr. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον κρύσταλλο και κατόπιν πιέστηκαν με την ειδική λαβή του μηχανήματος ώστε να υπάρξει η καλύτερη δυνατή επαφή με το κρύσταλλο (Εικόνα 2.2.3.2.2.). Το φασματόφωτόμετρο ήταν προγραμματισμένο να λειτουργεί με το λογισμικό Omnic Software- έκδοση 7,3 μεταξύ των κυματαριθμών 4000-650cm⁻¹, ενώ ο αριθμός των σαρώσεων ανά μέτρηση ήταν 100 και η κάθε μέτρηση διαρκούσε 2 λεπτά.



Εικόνα 2.2.3.2.1.Συσκευή Nicolet 6200 FTIR Spectrometer



Εικόνα 2.2.3.2.2.: Τοποθέτηση δείγματος στη συσκευή FTIR

Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις διπλούν, ενώ η λήψη του φάσματος αναφοράς (background spectra) γινόταν με τη λήψη γάσματος δείγματος. Στο τέλος κάθε μέτρησης γινόταν καθαρισμός της επιφάνειας του κρυστάλλου με απορρυπαντικό, ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και ακετόνη και στέγνωμα με απορροφητικό χαρτί.

Οι μετρήσεις με το όργανο έγιναν στο τέλος των μικροβιολογικών αναλύσεων αφού είχε κρατηθεί φρέσκο δείγμα από κάθε δειγματοληψία στην κατάψυξη (-18°C).

2.2.3.3. Ανάλυση φασματογραφικών δεδομένων με μαθηματικά μοντέλα.

Η ανάλυση των δεδομένων από τα φασματογραφήματα έγινε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα Unscrambler (version 9.7, CAMO, Norway). Αρχικά, από τα φασματογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν με το FTIR χρησιμοποιήθηκαν οι κυματαριθμοί μεταξύ 1800 και 800 cm^{-1} . Στα δεδομένα έγινε ο πρώτος μετασχηματισμός χρησιμοποιώντας τη μέθοδο standard variate (SNV), η οποία εφαρμόζεται για να μειώσει την επίδραση του θορύβου ή της μετατόπισης της γραμμής βάση του μηχανήματος ή όποιες άλλες παρεμβολές οι οποίες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την πολυμεταβλητή ανάλυση. Τα δεδομένα αυτά στη συνέχεια για τη ποιοτική ανάλυση των δεδομένων (δηλαδή, την κατάταξη των δειγμάτων κρέατος σε κατηγορίες ποιότητας) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Διακριτής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) ώστε να αναπτυχθούν μοντέλα που να επιτρέπουν την ανάλυση των δειγμάτων του κρέατος μεταξύ των δύο ποιοτικών κατηγοριών (φρέσκο και αλλοιωμένο) που είχαν ήδη προκαθοριστεί κατά την οργανοληπτική αξιολόγηση στηριζόμενη στην οσμή σύμφωνα με το Danish meat research institute όπου αναφέρει ότι η οσμή είναι αυτή που χαρακτηρίζει την αλλοίωση. Για τη κωδικοποίηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ο συμβολισμός F (1) για το αλλοιωμένο και S (2) για το φρέσκο.

Η αξιολόγηση του μοντέλου για τη πρόβλεψη της ποιοτικής κατάταξης των δειγμάτων κρέατος έγινε με την εξωτερική χρήση δειγμάτων που συντηρήθηκαν σε μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες και πέρασαν από το ίδιο οργανοληπτικό τεστ και έτσι στο τέλος, μπήκαν στο μοντέλο και μετρήθηκε ο αριθμός των δειγμάτων που το μοντέλο προέβλεψε σωστά και πόσα «έχασε» αντίστοιχα σύμφωνα με τα αποτελέσματα που έδωσε ο οργανοληπτικός έλεγχος. Έτσι η ακρίβεια της ταξινόμησης (ευαισθησία) καθορίστηκε από τον αριθμό των σωστών ταξινομήσεων και στις 2 κλάσεις προς το συνολικό αριθμό των δειγμάτων.

2.2.4. Στατιστική Ανάλυση: Μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Square, PLS)

Η μέθοδος των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη στατιστική μέθοδος με μεγάλο φάσμα εφαρμογών σε πολλές επιστήμες. Η PLS είναι μια πολυπαραγοντική τεχνική μάθησης με εποπτεία που έχει ως στόχο να καθορίσει τη σχέση ανάμεσα σε ένα σύνολο δεδομένων X (ανεξάρτητες μεταβλητές, στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν κυματαριθμοί τόσο από το Videometer όσο και από το FTIR) και σε ένα σύνολο αποκρίσεων Y (εξαρτημένες μεταβλητές, στη συγκεκριμένη μελέτη κατηγορίες της ποιότητας κρέατος). Η PLS προβάλλει τα αρχικά δεδομένα εισόδου-εξόδου σε έναν λανθάνον (latent) χώρο, εξαγωγώντας έναν αριθμό κύριων συνιστωσών, γνωστών σε αυτή την περίπτωση ως λανθάνουσες συνιστώσες (latent variable) με ορθογώνια διάταξη, καθώς και εμπερικλείει την μεγαλύτερη διακύμανση των αρχικών δεδομένων. Η πρώτη λανθάνουσα συνιστώσα καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των δεδομένων, η δεύτερη καλύπτει περισσότερο από το υπόλοιπο της διακύμανσης, και ούτω καθεξής (Berrueta 2007) (Nielsen 2002) (Xia 2009)

2.3. Οργανοληπτική Αξιολόγηση

Η οργανοληπτική αξιολόγηση των δειγμάτων κρέατος έγινε από μια ομάδα 19 ατόμων για το πρώτο πείραμα των σταθερών θερμοκρασιών και 16 ατόμων για το δεύτερο πείραμα των μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακών προφίλ. Τα άτομα αυτά είναι απλοί καταναλωτές μη εκπαιδευμένοι από το εργαστήριο, το εργαστήριο του ποιοτικού ελέγχου, το εργαστήριο της οινολογίας και το εργαστήριο της μηχανικής τροφίμων. Ο οργανοληπτικός έλεγχος έγινε με την ολοκλήρωση του πειράματος. Από κάθε σημείο δειγματοληψίας παίρναμε ένα μπιφτέκι το τοποθετούσαμε μέσα σε ένα τρυβλίο και το διατηρούσαμε φρέσκο στη κατάψυξη (-18°C).

Όταν έγινε ο οργανοληπτικός έλεγχος έγινε παράλληλα για όλες τις θερμοκρασίες με το πέρας του κάθε πειράματος. Στα δείγματα δόθηκαν εκ νέου τυχαίοι κωδικοί ώστε ο κάθε αξιολογητής να μην επηρεάζεται από το προηγούμενο δείγμα που θα είχε δοκιμάσει. Τα δείγματα είχαν ξεπαγώσει ομαλά σε θερμοκρασία δωματίου (21° με 25°C) και τοποθετήθηκαν

ανακατεμένα σε λευκούς εργαστηριακούς πάγκους όπως φαίνεται στην εικόνα 2.3.1.



Εικόνα 2.3.1.: Τοποθέτηση δειγμάτων για τον οργανοληπτικό έλεγχο

Κατά τη διάρκεια του οργανοληπτικού ελέγχου ο κάθε αξιολογητής ήταν μόνος του σε κάθε πάγκο.

Συνολικά εκτιμήθηκε το χρώμα, η οσμή και η γενική εικόνα του δείγματος. Λόγω του ότι οι αξιολογητές ήταν απλοί καταναλωτές χωρίς κάποια εκπαίδευση για οργανοληπτική αξιολόγηση τα ερωτηματολόγια είχαν τη μορφή «ΝΑΙ ή ΟΧΙ». Απαντούσαν «ναι» αν τους άρεσε/ ήταν αποδεκτό / φρέσκο ξεχωριστά το χρώμα, η οσμή και η γενική εικόνα και αντίστοιχα απαντούσαν «όχι» να δε τους άρεσε/ ήταν απορριπτέο/ αλλοιωμένο για το χρώμα, την οσμή και τη γενική εικόνα ξεχωριστά. Στο παράρτημα I, φαίνεται πως τέθηκε το ερωτηματολόγιο στους αξιολογητές.

Ο χρόνος για τον οποίο οι δοκιμαστές χαρακτήρισαν την ποιότητα των δειγμάτων σύμφωνα με την οσμή αποδεκτή, ορίστηκε ως ο χρόνος ζωής του δείγματος υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες συντήρησης. Επιπλέον, για πιο αντικειμενική εκτίμηση της αλλοίωσης, ο χρόνος ζωής οριζόταν ως η χρονική στιγμή κατά την οποία το 50% των δοκιμαστών απέρριπταν το δείγμα. (M. B. Richards 2016)

Για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε script στο στατιστικό πρόγραμμα της R

2.4. Ανάλυση Δεδομένων

2.4.1 Ανάπτυξη μοντέλων και επικύρωση

Τα δεδομένα αύξησης από τη καταμέτρηση των διαφόρων ομάδων βακτηρίων μετασχηματίστηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους και προσαρμόστηκαν (με γραμμική παλινδρόμηση) στο πρωτογενές σιγμοειδές μοντέλο των Baranyi και Roberts (Baranyi et al., 1994) για το προσδιορισμό

των κινητικών παραμέτρων (του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης (μ_{max} [h^{-1}]) και της διάρκειας προσαρμογής (λ [h]). Η μη γραμμική παλινδρόμηση αυτού του μοντέλου έγινε με το πρόγραμμα DMFit (Institute of Food Research, Reading, UK; το οποίο είναι διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση www.combase.cc) σε περιβάλλον Excel (Microsoft Office 2007). Οι τιμές του μ_{max} αναλύθηκαν-μοντελοποιήθηκαν περαιτέρω συναρτήσει της θερμοκρασίας αποθήκευσης χρησιμοποιώντας το μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας ($\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min})$) όπως φαίνεται και στην εξίσωση 1.7 στη παράγραφο 1.10.4.2.) Οι παράμετροι του μοντέλου υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το πρόσθετο «επίλυση» στο περιβάλλον Excel (Microsoft Office 2007)

Το μοντέλο αναπτύχθηκε κάτω από ισόθερμες συνθήκες και ελέγχθηκε με δυναμικό μεταβαλλόμενο προφίλ χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά σενάρια με περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασίες. Η πρόβλεψη του μοντέλου αύξησης της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας βασίστηκε στο συνδιασμό του πρωτογενούς μοντέλου, του μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας και το χρονοθερμοκρασιακό προφίλ που το οποίο είχε υπολογιστή σύμφωνα με το πληθυσμό και το χρόνο σύμφωνα με την εξίσωση 2.1

$$\frac{dy}{dt} = \{b[T(t) - T_{min}]\}^2 \left(\frac{q}{q+1}\right) \left(1 - \frac{y}{y_{max}}\right) y \quad (2.1)$$

Όπου,

t, είναι ο χρόνος

y, είναι η ολική μεσόφιλη χλωρίδα

y_{max} , είναι ο μέγιστος αριθμός της ΟΜΧ

(Baranyi et al., 1995)

Συγκεκριμένα, επιπλέον δείγμα μοσχαρίσιου κιμά όπως έχει ήδη αναφερθεί αποθηκεύτηκε σε ίδιους θαλάμους επώασης με το προηγούμενα πείραμα σε δυναμικά (κυμαινόμενο) μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ. Συγκεκριμένα (Α) 8 ώρες στους 2°C, 8 ώρες στους 6°C και 8 ώρες στους 10°C και (Β) 12 ώρες στους 4°C και 12 ώρες στους 8°C. Τα δύο αυτά σενάρια για την επαλήθευση των μοντέλων επιλέχθηκαν γιατί προσομοιάζουν τις αποκλείσεις των θερμοκρασιών που παρατηρούνται κατά την μεταφορά, την αποθήκευση και τη μεταχείριση τόσο από τη βιομηχανία μέχρι το προϊόν να φτάσει στο ράφι όσο και κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης του από τον καταναλωτή. Η διακύμανση της θερμοκρασίας καταγραφόταν ανά 15 λεπτά μέσω καταγραφείς δεδομένων (Cox Tracer, Belmont, N.C.) που είχαν τοποθετηθεί στους θαλάμους. Δύο επαναλήψεις για το κάθε σημείο δειγματοληψίας που γινόταν ανά 12 ώρες για το προσδιορισμό των ίδιων μικροοργανισμών με το πρώτο πείραμα και στη συνέχεια η ολική μεσόφιλη χλωρίδα συγκρίθηκε με τις αναμενόμενες τιμές που είχαν προκύψει από την εξίσωση 2.1.

Για την αξιολόγηση της απόδοσης των μοντέλων υπολογίστηκαν οι δείκτες μεροληψίας (Bf) και ακριβείας (Af), η ρίζα μέσου τετραγωνικού σφάλματος (RMSE) καθώς επίσης και τα όρια αποδοχής του μοντέλου όπως παρουσιάζονται στην ενότητα 1.10.6.2. (Ross et al., 1996) (Gonzalez et al., 1996).

2.4.2. Προσδιορισμός διάρκειας ζωής

Για το ποσοτικό προσδιορισμό της διάρκειας ζωής του μοσχαρίσιου κιμά χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση που προτάθηκε από τον Dalgaard (1995) (εξίσωση 1.16) όπως περιγράφεται αναλυτικά στη παράγραφο 1.10.7.2.

$$SL = t_{lag} + (\ln 10) * \frac{\log(N_s) - \log(N_0)}{\mu_{max}}$$

Η διάρκεια ζωής του προϊόντος συσχετίστηκε γραμμικά με τη θερμοκρασία χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Arrhenius:

$$\ln(SL) = \ln(SL_{ref}) - \frac{E_a}{R} * \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right)$$

Η οποία αναλύεται στη παράγραφο 1.10.7.2. (εξίσωση 1.14b) με θερμοκρασία αναφοράς τους 277 K όπου είναι και η θερμοκρασία συντήρησης του κρέατος σύμφωνα με τις «οδηγίες» που δίνει η βιομηχανία κρέατος. Πρέπει να σημειωθεί ότι η διάρκεια ζωής που ορίζεται από την εξίσωση 1.16 ονομάζεται $SL_{equation}$, ενώ η διάρκεια ζωής που ορίζεται από τον οργανοληπτικό έλεγχο ορίζεται ως $SL_{sensorial}$.

Επιπλέον, οι εκτιμώμενες παράμετροι που υπολογίστηκαν από το μοντέλο του Arrhenius χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για το προσδιορισμό της ισοδύναμης θερμοκρασίας (T_{eff}) χρησιμοποιώντας την εξίσωση 1.15 όπως παρουσιάζεται και αυτή αναλυτικά στην παράγραφο 1.10.7.2 (Dermesonluoglu et al., 2014)

$$T_{eff}(t) = \exp \left[\frac{-E_a}{R} * \left(\frac{1}{T_{ref} + T} \right) \right] * dt$$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

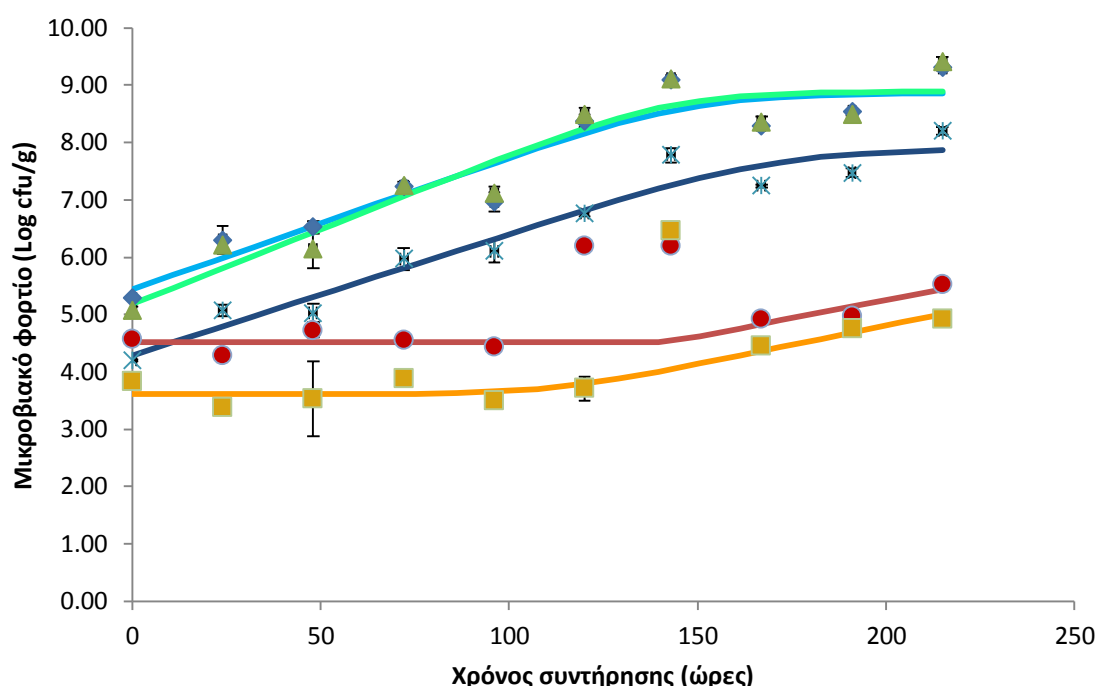
3.1. Μελέτη της αλλοίωσης του μοσχαρίσιου κιμά σε δείγματα που αποθηκεύτηκαν σε ισόθερμες συνθήκες

3.1.1. Φυσικοχημικές Αναλύσεις

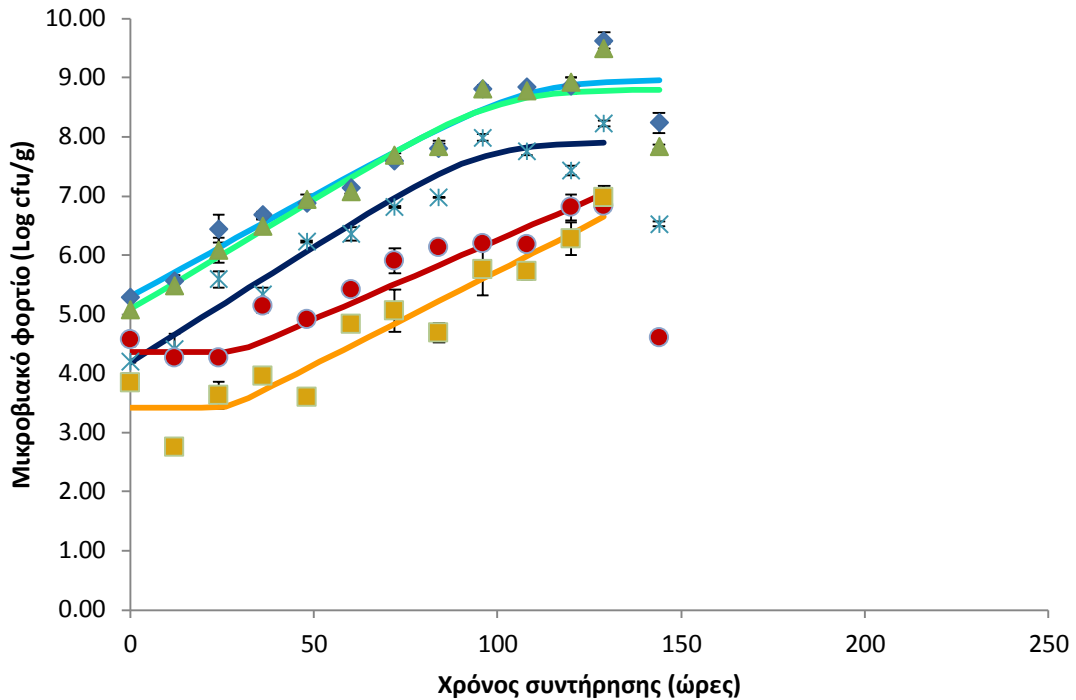
Το αρχικό pH του προϊόντος μετρήθηκε 5,62 ενώ στο τέλος της συντήρησης κυμάνθηκε από 5,75 (10°C) έως 6,19 (2°C). Όπως παρατηρήθηκε δεν υπήρξε ιδιαίτερη μεταβολή του pH

3.1.2. Μικροβιακές Αναλύσεις

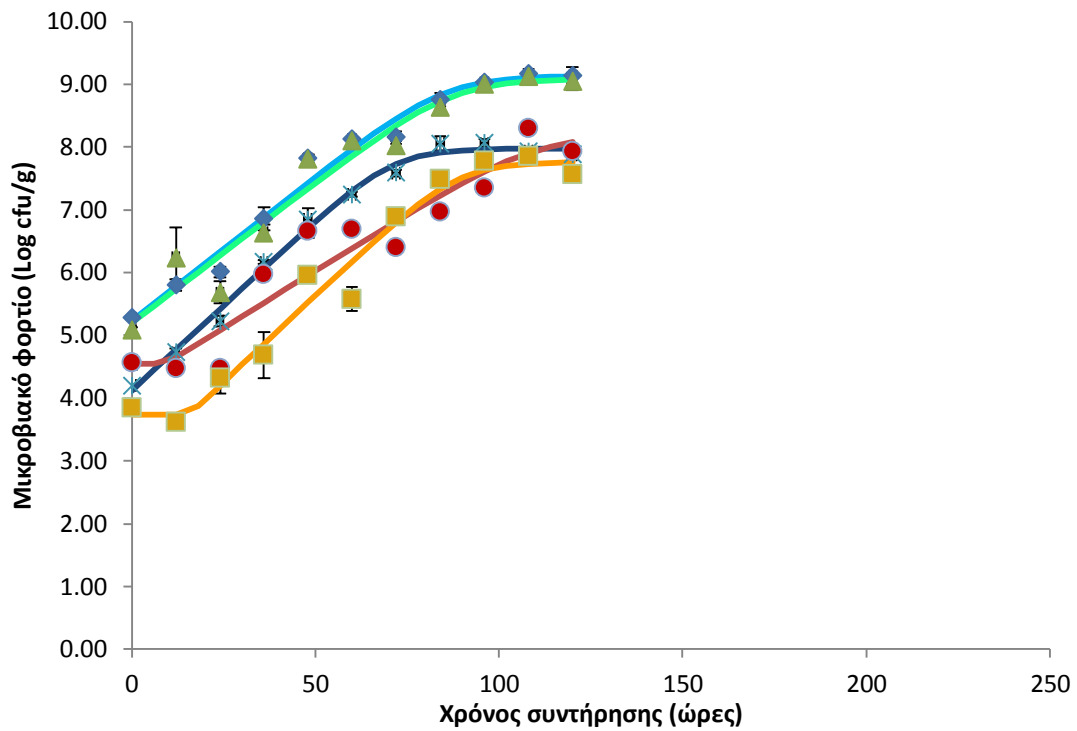
Κατά την αερόβια συντήρηση όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασίες 2, 6 και 10°C. Σε κάθε ένα από τα διαγράμματα 3.1.2.1,2 και 3 φαίνεται η αύξηση όλων των μικροοργανισμών που παίζουν ρόλο στην αλλοίωση του κρέατος (*Pseudomonas spp.*, *Brochothrix thermosphacta* και γαλακτικά βακτήρια) αλλά και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (Ο.Μ.Χ.) για κάθε θερμοκρασία ξεχωριστά. Από τη μικροβιακή χλωρίδα του κρέατος εστιάζουμε στην μεταβολή της Ο.Μ.Χ..



Σχήμα 3.1.2.1.: Μεταβολή της Ο.Μ.Χ. (♦), των ψευδομονάδων (▲), *B. thermosphacta* (×), των οξυγαλακτικών βακτηρίων (●) καθώς και των εντεροβακτηρίων (■) κατά τη συντήρηση βόειου κιμά σε θερμοκρασία 2°C. Οι καμπύλες προκύπτουν από τη προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi and Roberts.



Σχήμα 3.1.2.2.: Μεταβολή της Ο.Μ.Χ. (♦), των ψευδομονάδων (▲), του *Brochothrix Themosphacta* (*), των Γαλακτικών βακτηρίων (●) καθώς και των εντεροβακτηρίων (■) κατά τη συντήρηση βόειου κιμά στους 6 °C. Οι καμπύλες αντίστοιχα προκύπτουν από τη προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi and Roberts 1994.



Σχήμα 3.1.2.3.: Μεταβολή της Ο.Μ.Χ. (♦), των ψευδομονάδων (▲), του *Brochothrix Themosphacta* (*), των Γαλακτικών βακτηρίων (●) καθώς και των εντεροβακτηρίων (■) κατά τη συντήρηση βόειου κιμά στους 6 °C. Οι καμπύλες αντίστοιχα προκύπτουν από τη προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi and Roberts 1994.

Ο αρχικός πληθυσμός της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας ξεκινά περίπου από τους 5,2 log cfu/g. Από τα διαγράμματα των σχημάτων 3.1.2.1,2 και 3 καθώς και από τον πίνακα 3.2.1.1 φαίνεται πως δεν υπάρχει χρόνος προσαρμογής και πως υπάρχει άμεση αύξηση σε γενικές γραμμές με εξαίρεση τα γαλακτικά βακτήρια και τα εντεροβακτήρια που χρειάζονται χρόνο για τη προσαρμογή τους. Για τα δυο τελευταία φαίνεται ότι όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο λιγότερο ευνοείται η αύξηση αυτών.

Παρατηρείται ότι όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Nychas et al., 2008) ότι ο ειδικός αλλοιωγόνος μικροοργανισμός είναι οι ψευδομονάδες οι οποίες κινούνται στα ίδια επίπεδα και με το ίδιο «μοτίβο» με την ολική μεσόφιλη χλωρίδα. Ο πληθυσμός των οποίων κυμαίνεται στα υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τους υπόλοιπους φτάνοντας τους 9 λογαρίθμους για όλες τις θερμοκρασίες. Ο *B. thermosphacta* ακολουθεί με διαφορά της τάξεως του ενός λογαρίθμου ενώ οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί (γαλακτικά βακτήρια και εντεροβακτήρια) στη θερμοκρασία των 10°C είναι ένα με δυο λογαρίθμους λιγότερους από τις ψευδομονάδες και κατ' επέκταση από την Ο.Μ.Χ. ενώ στις θερμοκρασίες 2°C και 6°C δεν φτάσανε στο τελικό τους πληθυσμό ακόμα και όταν ο βόειος κιμάς είχε υπεραλλοιωθεί όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα.

Οι παρατηρήσεις αυτές αντανakλούν τη σημαντικότητα του παράγοντα θερμοκρασία ως εμπόδιο στη μικροβιακή αύξηση καθώς επιδρά στην επιμήκυνση ή όχι του χρόνου προσαρμογής (lag phase) των μικροοργανισμών της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας. Χαρακτηριστικό είναι άλλωστε και το γεγονός ότι τα εντεροβακτήρια για παράδειγμα στους 2°C χρειάζονται περίπου 111,81 ώρες (5 μέρες) συντήρησης για να περάσουν στην εκθετική αύξηση ενώ στους 10°C μόλις 15,53 ώρες. Παρ' όλ' αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι τόσο για τις ψευδομονάδες όσο και για τον *Brochothrix Thermosphacta* και κατ' επέκταση για την ολική μεσόφιλη χλωρίδα δε παρατηρείται χρόνος υστέρησης για καμία από τις θερμοκρασίες αντίθετα υπήρχε άμεση αύξηση αυτών.

3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της αλλοίωσης του νωπού βόειου κιμά

3.2.1. Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της ενδογενούς μικροχλωρίδας

Στη συνέχεια της μελέτης πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δεδομένων με στόχο τη μελέτη της κινητικής των μικροοργανισμών που σχετίζονται με την αλλοίωση του κρέατος και κατ' επέκταση την ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης επίδρασης της θερμοκρασίας συντήρησης στην αύξηση των αλλοιωγόνων στο μοσχαρίσιο κιμά. Τα πειραματικά δεδομένα αύξησης της αυτόχθονος χλωρίδας του κιμά, δείγματα του οποίου συντηρήθηκαν σε διαφορετικές ισόθερμες θερμοκρασίες όπως έχει αναφερθεί, προσαρμόστηκαν στο πρωτογενές μοντέλο Baranyi και Roberts (1994) για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων. Η γραφική απεικόνιση της προσαρμογής των

δεδομένων παρουσιάζεται στα σχήματα 3.1.2.1,2 και 3 και στο πίνακα 3.2.1.1. όπου παρουσιάζεται ο αρχικός πληθυσμός (Y_0), ο τελικός πληθυσμός (N_{max}), η φάση προσαρμογής (λ), ο μέγιστος ειδικός ρυθμός της αύξησης (μ_{max} (h^{-1})), η τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος (RMSE) και ο συντελεστής συσχέτισης (R^2)

Πίνακας 3.1.2.1.: Παράμετροι και στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο Baranyi

Temp (°C)	μ_{max} (h^{-1})	λ (Hours)	Y_0 (log cfu/g)	Y_{max} (log cfu/g)	RMSE	R^2
2°C						
TVC	0.023±0.006		5.43	8.86	0.49	0.86
<i>Pseudomonas</i> spp	0.026±0.006		5.18	8.89	0.50	0.88
B.Termosphacta	0.021±0.003		4.29	7.88	0.35	0.93
LAB	0.013±0.005	141.87±22.16	4.51		0.17	0.80
Enterobactriaceae	0.014±0.004	111.81±27.63	3.61		0.20	0.88
6°C						
TVC	0.034±0.005		5.31	8.97	0.38	0.92
<i>Pseudomonas</i> spp	0.037±0.005		5.08	8.81	0.42	0.91
B. Termosphacta	0.039±0.004		4.19	7.91	0.31	0.95
LAB	0.027±0.003	29.74±10.11	4.37		0.30	0.91
Enterobactriaceae	0.032±0.005	27.26±12.23	3.42		0.41	0.89
10°C						
TVC	0.046±0.004		5.23	9.13	0.23	0.97
<i>Pseudomonas</i> spp	0.044±0.006		5.21	9.08	0.36	0.94
B. Termosphacta	0.054±0.003		4.12	7.98	0.13	0.99
LAB	0.036±0.007	9.17±17.26	4.55	8.19	0.49	0.87
Enterobactriaceae	0.055±0.008	15.53±6.81	3.73	7.76	0.33	0.96

Σύμφωνα με τους Taoukis et al., 1999, η χρήση του μοντέλου Baranyi για το προσδιορισμό του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης μ_{max} αποτρέπει την υπερεκτίμηση του καθώς και το γεγονός ότι δίνει αυτό το μοντέλο καλούς στατιστικούς δείκτες στη προσαρμογή (R^2 : 0,80 έως 0,99) το εν λόγω μοντέλο κρίνεται ως κατάλληλο για τη περιγραφή της κινητικής της Ο.Μ.Χ.. η οποία όπως αποδείχτηκε στο προηγούμενο παράγραφο συσχετίζεται με τη μεταβολή των ψευδομονάδων και ενώ οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί δε παίζουν σημαντικό ρόλο.

3.2.2. Μαθηματική περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης με τη χρήση του μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας.

Μετά τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων στις ισόθερμες συνθήκες ο μέγιστος ρυθμός αύξησης μοντελοποιήθηκε συναρτήσει της θερμοκρασίας συντήρησης χρησιμοποιώντας το δευτερογενές μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας (Ratkowsky et al., 1983) (σχήμα 3.2.2.1). Η θερμοκρασία είναι ο κύριος παράγοντας που ευθύνεται για τη μικροβιακή αλλοίωση. Τόσο ο ρυθμός αύξησης όσο και η φάση υστέρησης εξαρτώνται υψηλά από τη θερμοκρασία και για το λόγο αυτό, η επίδραση της θερμοκρασίας στη μικροβιακή σταθερότητα έχει ευρέως μελετηθεί (Ratkowsky et al., 1982) (Zwietering et al., 1991) (McMeekin et al., 1993). Το μοντέλο της τετραγωνικής ρίζας αποτελεί ένα από τα κύρια δευτερογενή μοντέλα που χρησιμοποιούνται προκειμένου να περιγράψουν το αποτέλεσμα της θερμοκρασίας στη μικροβιακή αύξηση (Cayer et al., 2003)

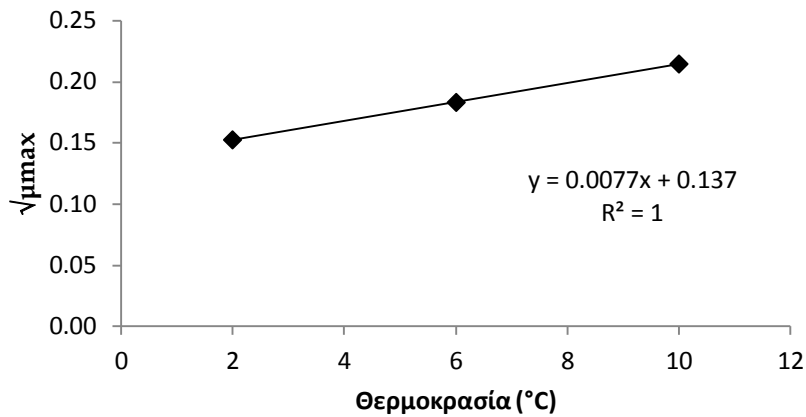
Οι παράμετροι της εξίσωσης της τετραγωνικής ρίζας για την επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στο μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας και οι στατιστικοί δείκτες του παρουσιάζονται στο πίνακα 3.2.2.1.. Κρίνοντας από το συντελεστή συσχέτισης ($R^2=1$), καταλαβαίνουμε ότι έχει περιγράψει το μοντέλο πολύ ικανοποιητικά την επίδραση της θερμοκρασίας στην αύξηση των μικροοργανισμών. Επίσης βλέποντας ότι στα όρια εμπιστοσύνης δεν περιέχεται το 0 κάτι που καθιστά το παρόν μοντέλο στατιστικά σημαντικό.

Πίνακας 3.2.2.1.: Τιμές παραμέτρων και στατιστικά στοιχεία του μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας

Παράμετρος	Τιμή	Τυπική απόκλιση	Lower CL	Upper CL
b	0.007746	0.00022428	0.004896	0.010596
Tmin	-17.6851	0.6923075	-31.554	-11.2322

Οι συντελεστές του μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας:

$(\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}))$ όπου, μ_{max} , ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης όπως υπολογίστηκε από το μοντέλο του Barany&Roberts (1994), με το T_{min} , να υποδηλώνει την ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία που παρατηρείται αύξηση των μικροοργανισμών, ενώ το b , είναι μια σταθερά του μοντέλου.



Σχήμα 3.2.2.1: Μαθηματική περιγραφή της επίδρασης της θερμοκρασίας στο μ_{\max} (μέγιστο ειδικό ρυθμό αύξησης) της OMX σε βόειο κιμά με χρήση του μοντέλου της τετραγωνικής ρίζας.

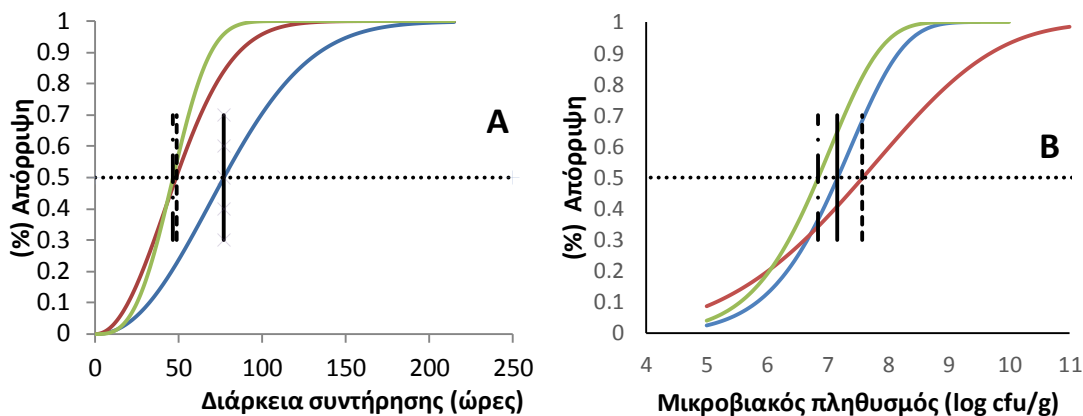
3.2.3. Διάρκειας ζωής μοσχαρίσιου κιμά

3.2.3.1. Υπολογισμός διάρκειας ζωής δειγμάτων

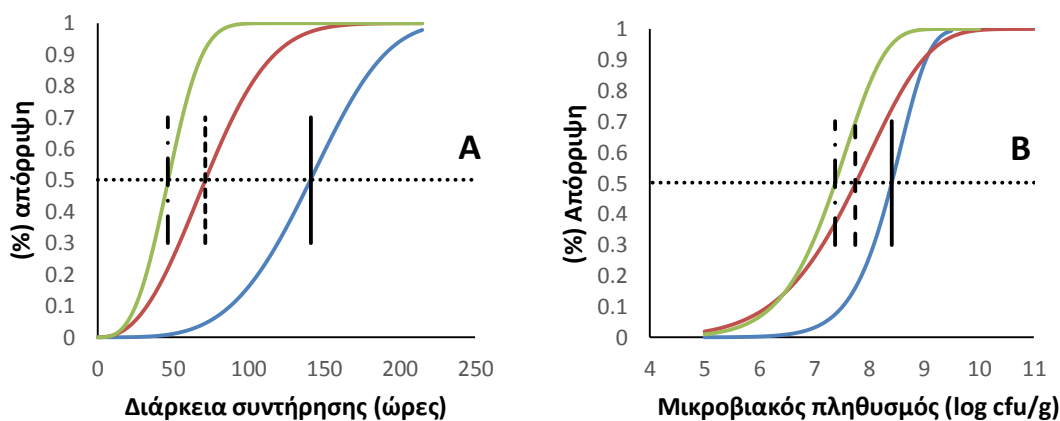
Για τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής αρχικά έγινε οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων από 20 δοκιμαστές ώστε να προσδιορίσουν το χρόνο απόρριψης των δειγμάτων. Έτσι εκλήθησαν να απαντήσουν ένα ερωτηματολόγιο με ερωτήσεις κλειστού τύπου (Ναι, Όχι). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για τη διάρκεια ζωής των δειγμάτων παρουσιάζονται στο πίνακα 3.2.3.1.1. και γραφικά στο σχήμα 3.2.3.1.1,2,3 με κριτήριο την όψη, οσμή και τη γενική εικόνα των δειγμάτων. Η επεξεργασία των ερωτηματολογίων πραγματοποιήθηκε με βάση την ανάλυση επιβίωσης (survival analysis) χρησιμοποιώντας τη κατανομή Weibull. Όπως προέκυψε από την ανάλυση στη γλώσσα προγραμματισμού R, προσδιορίστηκε ως ο χρόνος όπου το 50% των δοκιμαστών, που απέρριψαν τα δείγματα (Richards et al., 2016)

Πίνακας 3.2.3.1.1: σύμφωνα με το πρόγραμμα που αναπτύχθηκε στο R παρουσιάζεται ο χρόνος απόρριψης των δειγμάτων για το 50% του πληθυσμού.

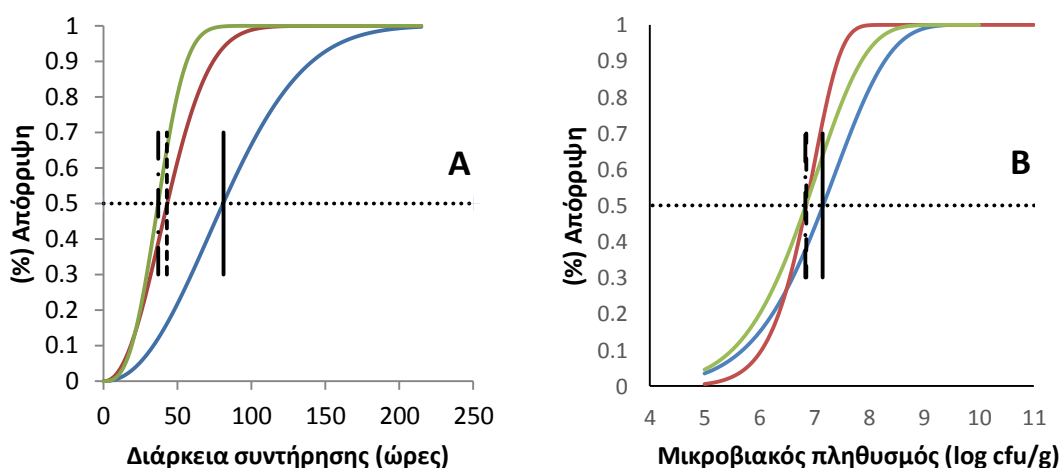
	μ	σ	50%	Lower ci	Upper ci	SE
ΟΨΗ						
2°C	4.513994	0.459914	77.12516	57.13387	104.1115	11.80615
6°C	4.057187	0.476535	48.54693	36.17911	65.14268	7.283253
10°C	3.964399	0.32981	46.6895	37.99187	57.3783	4.910661
ΟΣΜΗ						
2°C	5.042538	0.252085	141.1955	119.4113	166.9539	12.07163
6°C	4.4185	0.414533	71.27658	55.79962	91.04632	8.902323
10°C	3.964399	0.32981	46.6895	37.99187	57.3783	4.910661
ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ						
2°C	4.564973	0.464189	81.03179	59.89058	109.6358	12.49883
6°C	3.930653	0.452187	43.16029	32.99243	56.46175	5.915659
10°C	3.738888	0.351649	36.96621	29.65262	46.08365	4.157829



Σχήμα 3.2.3.1.1: Στη τομή των μαύρων γραμμών γίνεται η απόρριψη των δειγμάτων σύμφωνα με την αξιολόγηση της εμφάνισης αυτών συναρτήσει A: του χρόνου αποθήκευσης και B: τη OMX των δειγμάτων. Τα δείγματα ήταν συντηρημένα στους 2°C(—), 6°C(—), 10°C(—).



Σχήμα 3.2.3.1.2.: Στη τομή των μαύρων γραμμών γίνεται η απόρριψη των δειγμάτων σύμφωνα με την αξιολόγηση της οσμής συναρτήσει A: του χρόνου αποθήκευσης και B: τη OMX των δειγμάτων. Τα δείγματα ήταν συντηρημένα στους 2°C(—), 6°C(—), 10°C(—).



Σχήμα 3.2.3.1.3: Στη τομή των μαύρων γραμμών γίνεται η απόρριψη των δειγμάτων σύμφωνα με την αξιολόγηση της γενικής εικόνας που παρουσιάζουν συναρτήσει A: του χρόνου αποθήκευσης και B: τη OMX των δειγμάτων. Τα δείγματα ήταν συντηρημένα στους 2°C(—), 6°C(—), 10°C(—).

Επιπρόσθετα η ανάλυση συνεχίστηκε με τον ίδιο τρόπο για τη αλλοίωση των δειγμάτων αλλά συναρτήσε της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας αντί για τη χρόνο συντήρησης, προκειμένου να προσδιορίσουμε το ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης (N_s) για κάθε θερμοκρασία συντήρησης. (πίνακας 3.2.3.1.2.)

Πίνακας 3.2.3.1.2.: σύμφωνα με το πρόγραμμα που αναπτύχθηκε στο R παρουσιάζεται ο μικροβιακός πληθυσμός απόρριψης των δειγμάτων για το 50% του πληθυσμού.

	μ	σ	50%	Lower ci	Upper ci	SE
ΟΨΗ						
2	2.008887	0.109204	7.162527	6.652592	7.711549	0.269897
6	2.100071	0.203892	7.578701	6.76581	8.489258	0.438713
10	1.964271	0.110415	6.846947	6.374546	7.354357	0.249739
ΟΣΜΗ						
2	2.15148	0.059537	8.411994	8.094963	8.741442	0.164877
6	2.093164	0.122043	7.755744	7.232363	8.316999	0.276468
10	2.031203	0.089191	7.378081	6.978068	7.801024	0.209829
ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ						
2	2.013497	0.12186	7.162321	6.619748	7.749365	0.28787
6	1.948905	0.067872	6.848496	6.57382	7.13465	0.143029
10	1.965611	0.115075	6.844425	6.379575	7.343148	0.245607

Από τα παραπάνω γραφήματα του ποσοστού απόρριψης των δειγμάτων και από τον αντίστοιχο πίνακα παρατηρούμε ότι σύμφωνα με την όψη που παρουσιάζουν τα δείγματα δεν υπάρχει εμφανής διαχωρισμός μεταξύ των θερμοκρασιών και αυτό οφείλεται στη γρήγορη χρωματική μεταβολή που παρουσιαζόταν τόσο στους 6 όσο και στους 10 βαθμούς. Επίσης, είναι εμφανές ότι η αξιολόγηση από τους γευσιγνώστες για την γενική εικόνα είναι επηρεασμένη από την όψη μιας και οι ώρες που αποδέχονται είναι κοντινές μεταξύ τους. Ακόμα παρατηρούμε από τα Σχήματα 3.2.3.1.1.B και 3B ότι και στις δύο αυτές περιπτώσεις της όψης και της γενικής εικόνας η απόρριψη είναι σύντομη σε σχέση με την OMX. Αντίθετα πιο αντιπροσωπευτική εικόνα φαίνεται να υπάρχει από τα αποτελέσματα που δίνει η αξιολόγηση της οσμής. Συγκεκριμένα φαίνεται να υπάρχει αφής διαχωρισμός ανάλογα με τη θερμοκρασία. Δηλαδή όπως θα περιμέναμε ο μοσχαρίσιος κιμάς που συντηρήθηκε στους 10 βαθμούς αλλοιώνεται γρηγορότερα από τους 6 βαθμούς κελσίου και στη συνέχεια ακολουθούν οι 2 βαθμοί. Το γεγονός αυτό συμφωνεί απόλυτα με τη βιβλιογραφία (Danish Meat Research Institute) όπου αναφέρει ότι η οσμή δίνει πιο συντηρητικά αποτελέσματα. Επιπρόσθετα σύμφωνα με τα μικροβιολογικά κριτήρια σε σχέση με την οσμή επιβεβαιώνεται πάλι ότι η αλλοίωση σύμφωνα με τους αξιολογητές επέρχεται και με τη μικροβιολογική αλλοίωση δηλαδή όταν το δείγμα έχει επτά λογαρίθμους και παραπάνω. Αξιοσημείωτο είναι ότι στους 2 βαθμούς η αλλοίωση επέρχεται όταν ο βόειος κιμάς έχει σχεδόν 8,5 λογαρίθμους και αυτό μπορεί μάλλον σε χαμηλή θερμοκρασία τα πτητικά να μην απελευθερώνονται.

3.2.3.2. Ανάπτυξη μοντέλου για τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής του κρέατος

Στη συνέχεια από την εξίσωση 1.16 (Dalgaard et al., 1995)

$$SL = t_{lag} + (\ln 10) * \frac{\log(N_s) - \log(N_0)}{\mu_{max}}$$

υπολογίστηκε η διάρκεια ζωής των δειγμάτων με βάση τη μεταβολή της ΟΜΧ. Όπου το N_s είναι το επίπεδο αλλοίωσης, ο ελάχιστος αριθμός κυττάρων της συνολικής μικροβιακής χλωρίδας που καθορίζουν ότι ένα προϊόν είναι αλλοιωμένο – απορριπτό από τους καταναλωτές, όπως προέκυψε από την οσμή στο σημείο αλλοίωσης (πίνακας 3.2.3.1.2.). Έτσι προκύπτει ο παρακάτω πίνακας 3.2.3.2.3.

Πίνακας 3.2.3.2.3.: Διάρκεια ζωής του κρέατος σύμφωνα με το μοντέλο του Dalgaard (1995)

	N_s (log cfu/g)	N_0 (log cfu/g)	μ_{max} (h ⁻¹)	SLmodel (h)	SLsensory (h)
2°C	8.41	5.38	0.023091	131.2196	141.19
6°C	7.75	5.299	0.034038	72.0075	71.27
10°C	7.37	5.293	0.045763	45.38584	46.68

SLmodel: Διάρκεια ζωής όπως υπολογίζεται από το μοντέλο

SLsensory: Διάρκεια ζωής σύμφωνα με τους αξιολογητές

Όπως παρατηρούμε οι προβλέψεις του μοντέλου είναι πολύ κοντινές με την αλλοίωση που έδωσαν οι αξιολογητές με απόκλιση το πολύ δέκα ωρών. Επίσης επιβεβαιώνεται και πάλι το γεγονός ότι η οσμή είναι το κριτήριο που δίνει καλύτερα αποτελέσματα για την αλλοίωση του κρέατος. Στη συνέχεια, προκειμένου να προσδιορίσουμε τη διάρκεια ζωής των δειγμάτων σε ενδιαμέσες θερμοκρασίες, τα δεδομένα (SL_{model}) συσχετίστηκαν με το μοντέλο του Arrhenius όπως προσδιορίζεται στην εξίσωση 1.14b και προέκυψαν τα αποτελέσματα όπως παρουσιάζονται στο πίνακα 3.2.3.2.4

$$\ln(SL) = \ln(SL_{ref}) - \frac{E_a}{R} * \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right)$$

Πίνακας 3.2.3.2.4.: Παράμετροι για τη διάρκεια ζωής των δειγμάτων στη θερμοκρασία αναφοράς (4°C, 277°K)

Παράμετρος	Τιμή	SE	p-value
ln(Slref)	4.5853	0.0340	0.0047
Ea	85915.31	5757.72	0.04
Slref	98.03249		

3.2.4. Επικύρωση των μοντέλων που αναπτύχθηκαν

3.2.4.1. Μοντέλα Ανάπτυξης

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που λαμβάνουν χώρα κατά την ανάπτυξη ενός μοντέλου είναι η αξιολόγηση αυτού, που διασφαλίζει ότι οι προβλέψεις του μοντέλου ισχύουν σε πραγματικές συνθήκες τις οποίες προσμοιάσαμε με το δυναμικά μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ όπου συντηρήθηκαν εκ νέου καινούρια δείγματα βόειου κιμά.

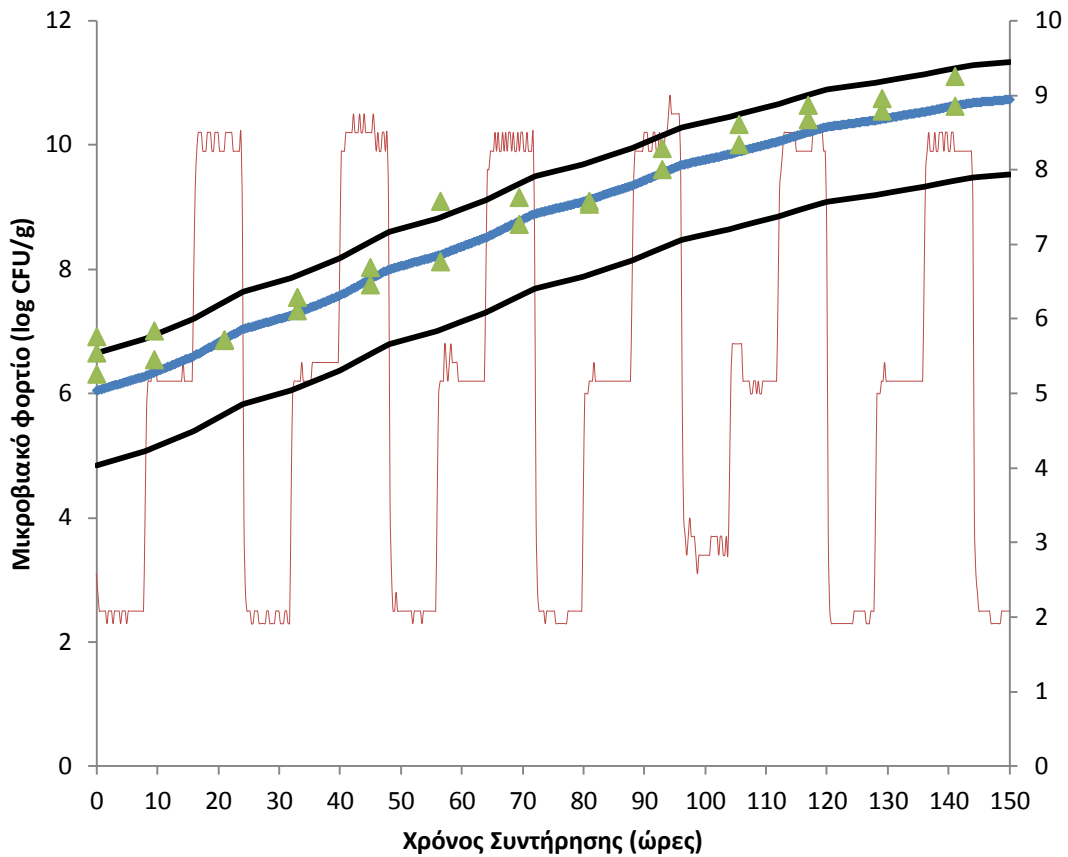
Ειδικότερα η σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας παρουσιάζονται στο σχήμα 3.2.4.1.1 και 3.2.4.1.2 για το θερμοκρασιακό προφίλ των 2°C-6°C-10°C για οκτώ ώρες η κάθε μια και του 4°C - 8°C για δώδεκα ώρες αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα για τον έλεγχο της αξιοπιστίας των μοντέλων υπολογίστηκαν η τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος (RMSE), ο συντελεστής ακριβείας (Af) (Accuracy factor) και ο συντελεστής μεροληψίας (Bf) (Bias factor) (T. Ross 1996) όπως παρουσιάζονται στο πίνακα 3.2.4.1.1.

Πίνακας 3.2.4.1.1: Στατιστικοί συντελεστές αξιολόγησης των μοντέλων όπου, D1:2,6,10°C για 8h και D2:4,8°C για 12h

	Bf	Af	RMSE
D1	0.97783	1.026489	0.265927
D2	0.966477	1.034898	0.333074

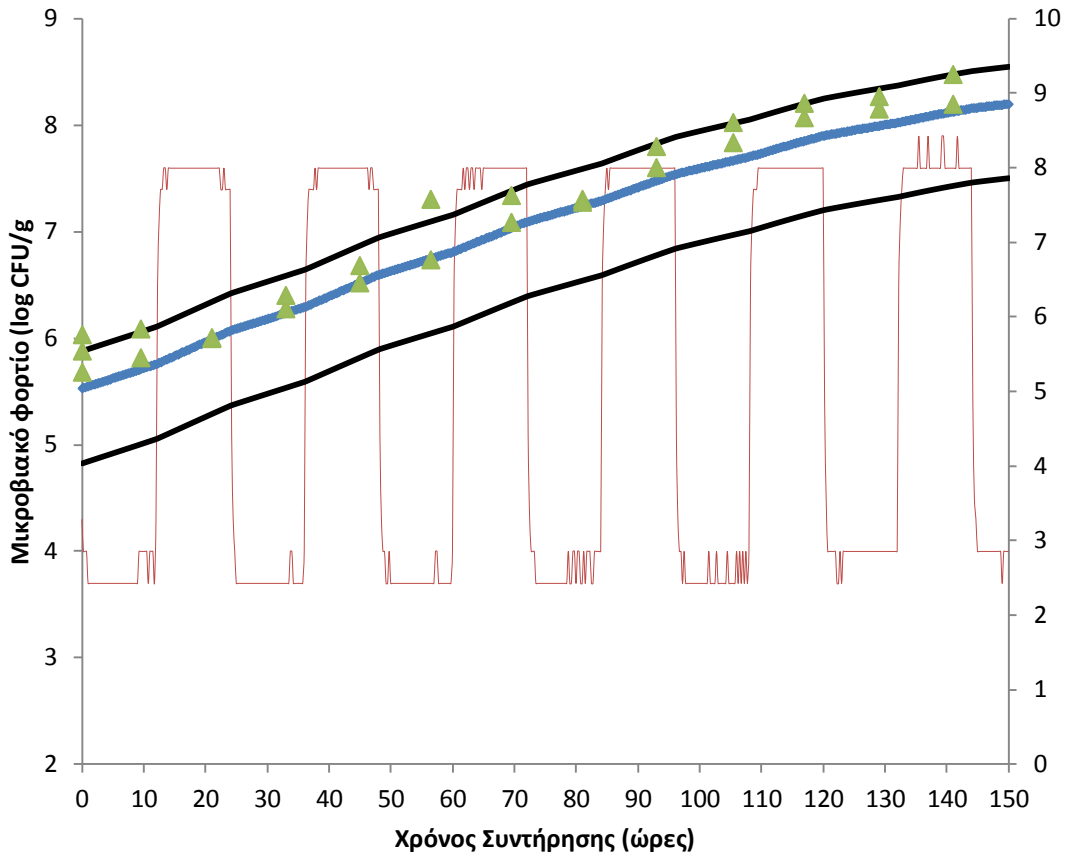
Από τον παραπάνω πίνακα είναι φανερό ότι η τετραγωνική ρίζα του μέσου σφάλματος είναι πολύ μικρή με τιμές 0,27 και 0,33 αντίστοιχα ενώ, ο δείκτης μεροληψίας (Bf) για την OMX όπου και εξετάστηκε ήταν κοντά στη μονάδα, αποδεικνύοντας ότι δεν υπήρξε κάποια συστηματική απόκλιση (υπέρ ή υπο-εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού) από το μοντέλο. Επιπλέον, με βάση τις τιμές του συντελεστή ακριβείας (Af) φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των εκτιμήσεων και των παρατηρήσεων ήταν 2,6% και 3,4% για το πρώτο και το δεύτερο θερμοκρασιακό προφίλ αντίστοιχα.



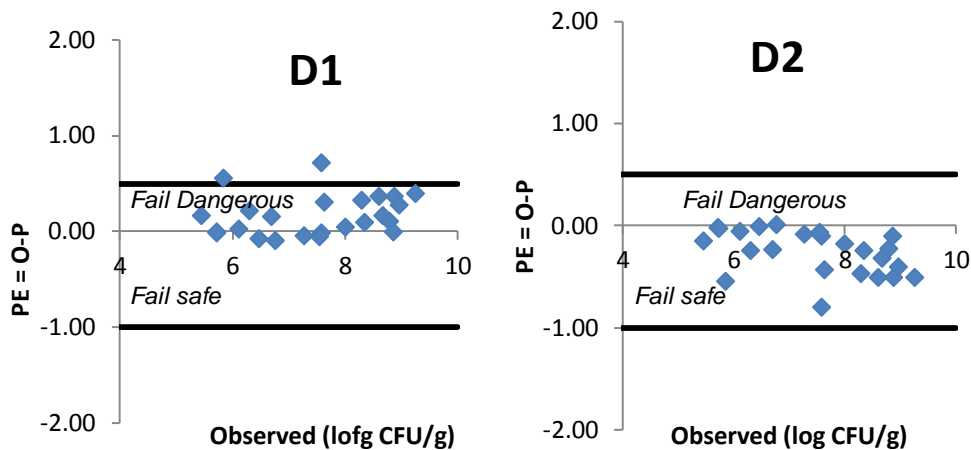
Σχήμα 3.2.4.1.1.: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών για το περιοδικά μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ στους 2°C-6°C-10°C για οκτώ ώρες καθώς και εξωτερική επικύρωση του μοντέλου με τη μέθοδο του Oscar (2005) (▲: παρατηρούμενες τιμές της OMX, — : πρόβλεψη του μοντέλου για την αύξηση της OMX, — : APZ (Oscar et al., 2005))

Όμως για το αν βρισκόμαστε στα όρια εμπιστοσύνης το υπολογίσαμε με τη μέθοδο του Oscar (2005) μιας και δεν είχαμε πολλούς βαθμούς ελευθερίας για να υπολογίσουμε το 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης.

Η μέθοδος του Oscar όπως παρουσιάζεται και στη παράγραφο 1.10.6.2. προσδιορίζει τα όρια αποδοχής του μοντέλου (APZ). Αρχικά υπολογίσαμε τα σφάλματα πρόβλεψης (PE: prediction errors) με την εξίσωση 1.13 και στη συνέχεια είδαμε ποιο είναι το ποσοστό το οποίο βρίσκεται εντός των ορίων της ζώνης αποδοχής ασφαλείας (APZ) όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση 1.14 και παρουσιάζονται στο σχήμα 3.2.4.1.3



Σχήμα 3.2.4.1.2.: Σύγκριση μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών για το περιοδικά μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ στους 4°C-8°C για δώδεκα ώρες καθώς και εξωτερική επικύρωση του μοντέλου με τη μέθοδο του Oscar (2005) (▲: παρατηρούμενες τιμές της OMX, —: πρόβλεψη του μοντέλου για την αύξηση της OMX, —: APZ (Oscar et al., 2005))



Σχήμα 3.2.4.1.3. Σύγκριση του σφάλματος πρόβλεψης (PE: ◆) και των παρατηρούμενων τιμών σε σχέση με τη ζώνη αποδοχής (—) όπου D1 το μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ στους 2°C-6°C-10°C για οκτώ ώρες ενώ D2 το προφίλ στους 4°C-8°C για δώδεκα ώρες.

Όπως παρατηρούμε από το σχήμα 3.2.4.1.3. αλλά και όπως προκύπτει και από την εξίσωση 1.14 τα μοντέλα μας για το σύνολο των δεδομένων που έχουμε, παρέχουν αποδεκτές προβλέψεις μιας και το ποσοστό σφάλματος

εντός της ζώνης αποδοχής ασφαλείας είναι 91,67% για το D1 χρονοθερμοκρασιακό προφίλ και 100% για το D2. Ποσοστά τα οποία είναι αποδεκτά και επιβεβαιώνουν την εγκυρότητα και ασφάλεια του μοντέλου μιας και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Oscar et al., 2005) το ποσοστό αυτό θα πρέπει να υπερβαίνει το 70% κάτι που ισχύει και με το παραπάνω στη δική μας περίπτωση.

3.2.4.2. Υπολογισμός της ισοδύναμης θερμοκρασίας (T_{eff}) των δυναμικά μεταβαλλόμενων χρονοθερμοκρασιακών προφίλ

Για τον υπολογισμό της ισοδύναμης θερμοκρασίας από την εξίσωση 1.15 (Dermesonluoglu et al., 2014)

$$T_{eff}(t) = \exp \left[\frac{-E_a}{R} * \left(\frac{1}{T_{ref} + T} \right) \right] * dt$$

Όπου $E_a=55356.21$ (J/mol) και $R=8,314$ (J/ K mol)

Με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος στο excel προέκυψε ότι για το προφίλ (D1) των 2,6,10°C με διάρκεια 8 ωρών στη κάθε θερμοκρασία η ισοδύναμη θερμοκρασία είναι $T_{eff}(D1)= 6.57367^\circ\text{C}$ ενώ για το προφίλ (D2) 4, 8°C με διάρκεια 12 ωρών σε κάθε θερμοκρασία η ισοδύναμη θερμοκρασία που προέκυψε είναι $T_{eff}(D2)= 5.780354^\circ\text{C}$.

Παρατηρούμε ότι οι ισοδύναμες θερμοκρασίες που προέκυψαν από τα δύο προφίλ δεν διαφέρουν μεταξύ τους και το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός η μέγιστη θερμοκρασία του ενός προφίλ είναι 10°C ενώ στο άλλο προφίλ είναι μόλις κατά 2°C χαμηλότερη.

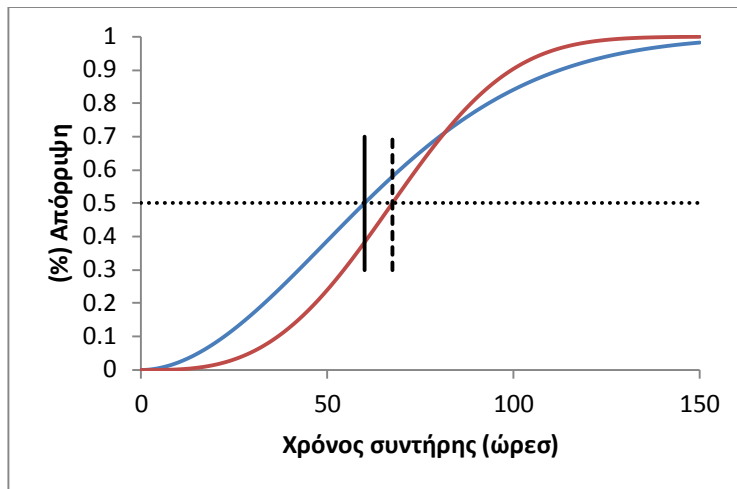
3.2.4.3. Υπολογισμός διάρκειας ζωής κρέατος σε ενδιάμεση θερμοκρασία

Αρχικά έγινε εκ νέου οργανοληπτικός έλεγχος για το πείραμα με το δυναμικά μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ με τον ίδιο τρόπο που είχε γίνει και στο προηγούμενο πείραμα με τις σταθερές συνθήκες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο σχήμα 3.2.4.3.1 και αναλυτικότερα στο πίνακα 3.2.4.3.1.

Επιλέχτηκε μόνο η οσμή για ανάλυση μιας και όπως έχει προαναφερθεί αυτή είναι που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα, τα πιο ρεαλιστικά. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα υπήρχε εμφανής διαχωρισμός ανάμεσα στα δύο θερμοκρασιακά προφίλ.

Πίνακας 3.2.4.3.1.: σύμφωνα με το πρόγραμμα που αναπτύχθηκε στο R παρουσιάζεται ο χρόνος απόρριψης των δειγμάτων για το 50% του πληθυσμού για το μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ όπου D1: 2,6,10°C για 8h και D2: 4,8°C για 12h

	μ	σ	50%	Lower ci	Upper ci	SE
ΟΣΜΗ						
D1	4.287796	0.525184	60.05792	43.23338	83.42983	10.07185
D1	4.330455	0.323431	67.48555	54.33285	83.82221	7.464193



Σχήμα 3.2.4.3.1.: Στη τομή των μαύρων γραμμών γίνεται η απόρριψη των δειγμάτων σύμφωνα με την αξιολόγηση της οσμής συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης. 2,6,10°C για 8h(—), και 4,8°C για 12h(—)

Στη συνέχεια για τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής του κρέατος κατά τη συντήρηση στα δύο χρονομεταβαλλόμενα θερμοκρασιακά προφίλ (D1 και D2) χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση του Arrhenius όπως παρουσιάζεται στη παράγραφο 1.10.7.2. (εξίσωση 1.14b). Όπου T είναι η ισοδύναμη θερμοκρασία για κάθε χρονοθερμοκρασιακό προφίλ, όπως υπολογίστηκε από την εξίσωση 1.15.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν και παρουσιάζονται στο πίνακα 3.2.4.3.2. παρατηρούμε ότι το μοντέλο λειτουργεί ικανοποιητικά. Άλλωστε αυτή η απόκλιση των δέκα ωρών που φαίνεται είναι μηδενική μιας και μιλάμε για ώρες. Ο καταναλωτής ως μέτρο σύγκρισης τις μέρες και σε αυτό το μέγεθος μιλάμε για την ίδια διάρκεια. Δηλαδή [69.29,60,05] είναι περίπου 2,5 ημέρες ενώ [77.05,67.48] είναι περίπου 3 μέρες. Άρα καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα μοντέλα λειτουργούν με μια μικρή υπερεκτίμηση.

Πίνακας 3.2.4.3.2.: Διάρκεια ζωής του κρέατος σύμφωνα με το τροποποιημένο μοντέλο του Dalgaard (1995)

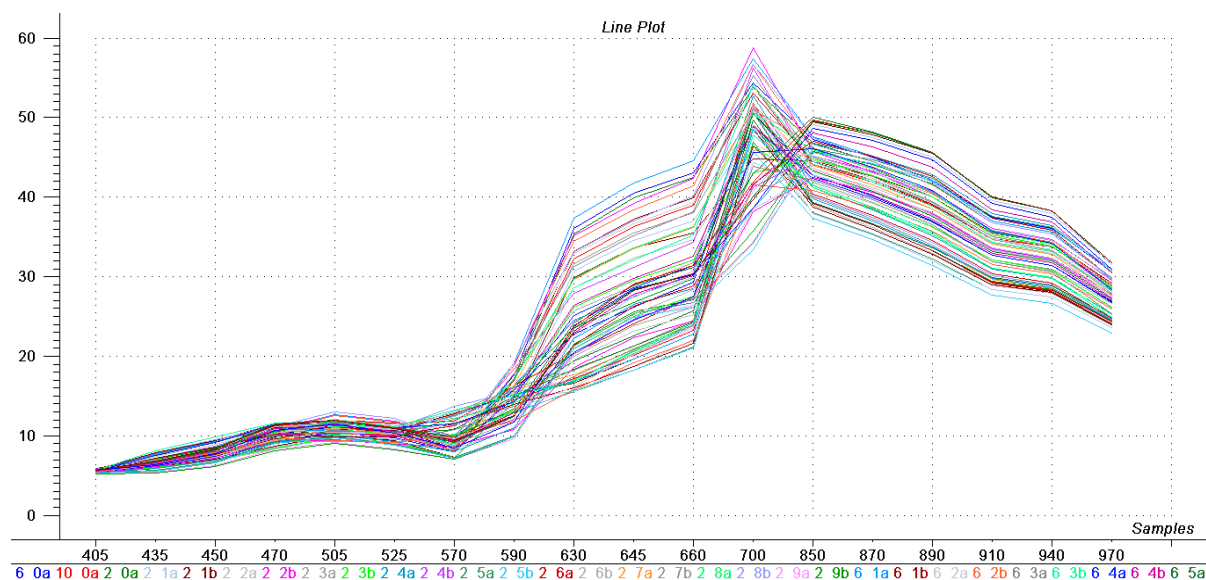
	SLmodel	SLsensory
6.6°C	69.29611	60.05
5.8°C	77.04897	67.48

3.3. Ανάλυση δειγμάτων κρέατος με πολυφασματική ανάλυση εικόνας με τη χρήση του οργάνου VideometerLab

3.3.1. Εισαγωγή

Κάθε δείγμα κιμά υποβλήθηκε σε λήψεις πολυφασματικών εικόνων με το VideometerLab από τις οποίες βγήκε ο μέσος όρος τους και όλες οι αναλύσεις έγιναν σύμφωνα με αυτή. Όπως έχει προαναφερθεί το πλεονέκτημα αυτού του μέσου είναι ότι δεν χρησιμοποιεί μόνο τις πληροφορίες της ορατής και της υπεριώδους φασματικής περιοχής, αλλά το ένα κάθε ριχελ εμπεριέχει πληροφορία. Η προκύπτουσα εικόνα περιλαμβάνει όμως και περιττή πληροφορία, όπως το τρυβλίο καθώς επίσης και το λίπος του δείγματος. Για το λόγο αυτό η επεξεργασία της εικόνας είναι αναγκαία και το αποτέλεσμα αυτής της επεξεργασίας είναι μια τμηματική εικόνα για κάθε δείγμα με βάση το κρέας που χρησιμοποιήθηκε. Χαρακτηριστικά παραδείγματα εμφανίζονται στο παράρτημα II.

Για κάθε εικόνα προκύπτει μια μήτρα δεδομένων με τις στήλες να αντιπροσωπεύουν τα δεκαοκτώ μήκη κύματος όπως παρουσιάζονται και στον πίνακα 1.11.3.4.1. και τις γραμμές, τις ανακλάσεις για κάθε μήκος κύματος κάθε δείγματος. Στο σχήμα 3.3.1.1. απεικονίζεται ένα τυπικό γράφημα των μέσων όρων που προκύπτει από τις δεκαοκτώ ανακλάσεις των μηκών κύματος. Συγκεκριμένα στο σχήμα 3.3.1.1 απεικονίζονται όλα τα φάσματα που πήραμε από τα δείγματα που συντηρήθηκαν στις σταθερές θερμοκρασίες.

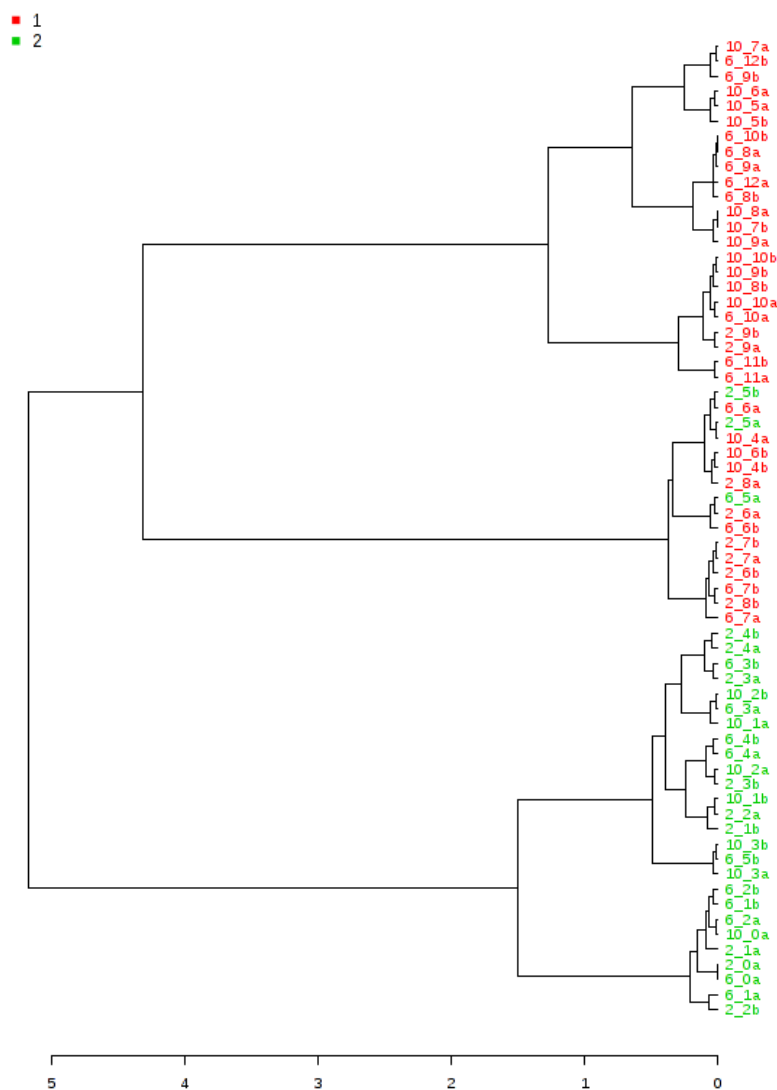


Σχήμα 3.3.1.1:Γράφημα μέσων όρων που προκύπτει από τις δεκαοκτώ ανακλάσεις των μηκών κύματος του Videometer. Όπου στον άξονα X παρουσιάζονται τα μήκη κύματος και στον άξονα Y είναι οι απορροφήσεις. Κάθε γραμμή ξεχωριστά αποτελεί το μέσο όρο διαφορετικού δείγματος.

Στη φασματοσκοπία είναι σύνηθες να επιλέγονται συγκεκριμένα μήκη κύματος ώστε το μοντέλο να είναι το βέλτιστο δυνατό, δηλαδή να περιέχει το μικρότερο αριθμό μεταβλητών χωρίς αυτό να αποβαίνει σε βάρος της επίδοσης του μοντέλου (Paradourouli et al., 2013). Παρ' όλ' αυτά στη παρούσα ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν όλα τα μήκη κύματος.

3.3.2 Ανάλυση αποτελεσμάτων

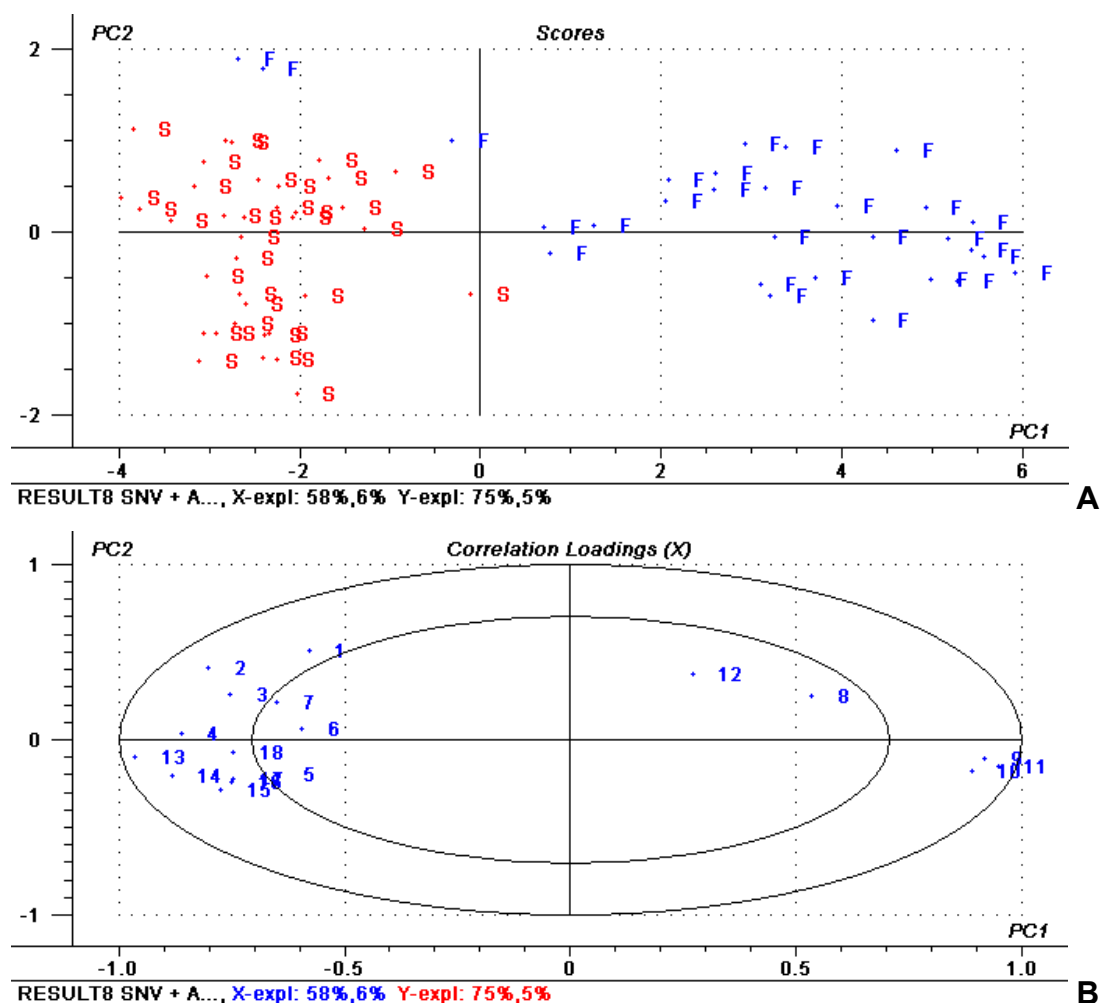
Αρχικά χωρίσαμε τα δείγματα μας σύμφωνα με τον οργανοληπτικό έλεγχο που είχε γίνει. Στη συνέχεια, κάναμε ανάλυση διαχωρισμού κλάσεων (Cluster Analysis) με ένα δενδρόγραμμα χωρίς καμία προ επεξεργασία των φασμάτων όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 3.3.2.1. για να δούμε αν τα δείγματα μας διαχωρίζονται. Τα αποτελέσματα ήταν όπως φαίνονται πολύ ικανοποιητικά μιας και φαίνεται πως υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ των δύο κλάσεων των δειγμάτων (φρέσκα- αλλοιωμένα) όπως φαίνεται και από το σχήμα. Τα τρία φρέσκα δείγματα που παρατηρούνται να βρίσκονται μέσα στα αλλοιωμένα είναι δικαιολογημένο μιας και σύμφωνα με σχόλια των αξιολογητών κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο γινόντουσαν οριακά αποδεκτά ως φρέσκα.



Σχήμα 3.3.2.1: Δενδρόγραμμα διερεύνησης διαχωρισμού αλλοιωμένων (Κατηγορία 1:κόκκινα) από τα φρέσκα (Κατηγορία 2: πράσινα)

Με αυτή την ανάλυση όμως δεν παρουσιάζεται ποια είναι η συσχέτιση μεταξύ δειγμάτων και μεταβλητών. Πριν όμως γίνει κάποια περεταίρω ανάλυση έγινε προ επεξεργασία των φασμάτων με τη μέθοδο SNV και Auto scale και

στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση με τη μέθοδο Διακριτών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA) όπου ορίσαμε τις κλάσεις σε φρέσκα ως 2 και αλλοιωμένα ως 1 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.3.2.2.



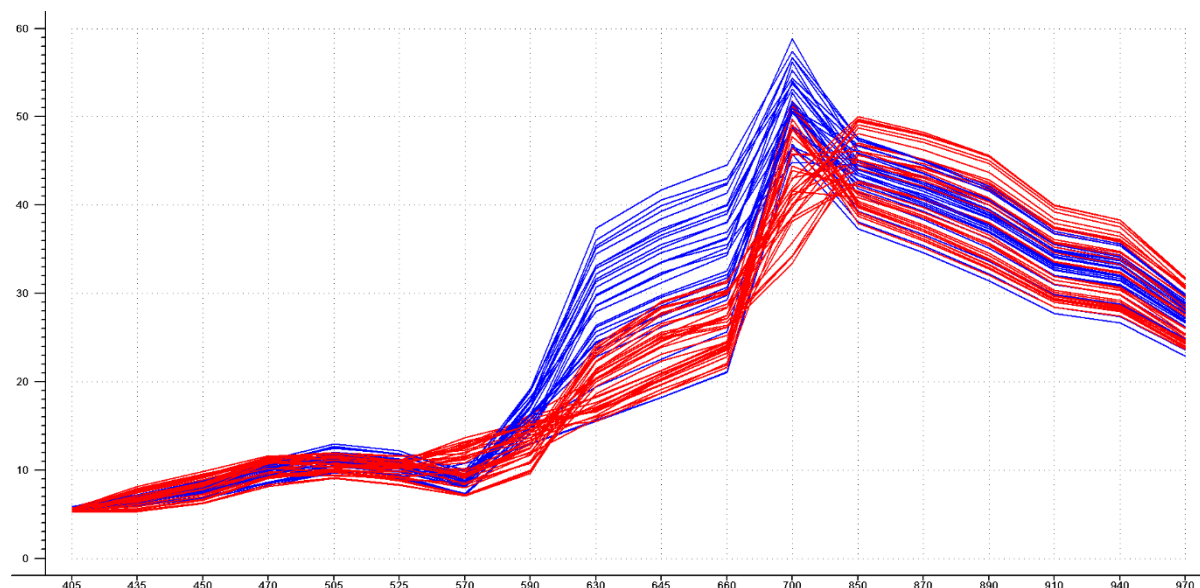
Σχήμα 3.3.2.2.: Α:Γράφημα διαχωρισμού κλάσεων δειγμάτων με τη μέθοδο PLS-DA όπου S είναι τα αλλοιωμένα και F τα φρέσκα. Β: παρουσίαση συσχέτισης δειγμάτων με τα μήκη κύματος

Αναλυτικά στο σχήμα 3.3.2.2. Α, φαίνεται ότι υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός μεταξύ των αλλοιωμένων δειγμάτων και των φρέσκων. Το γεγονός ότι τρία φρέσκα δείγματα εισέρχονται στη περιοχή των αλλοιωμένων αν και, πάλι ξεχωρίζουν, δεν είναι τόσο τυχαίο μίας και σύμφωνα με σχόλια που είχαν γίνει από τους δοκιμαστές αυτά τα τρία δείγματα ήταν οριακά αποδεκτά ως φρέσκα από το καταναλωτικό κοινό. Επιπρόσθετα έγινε επιλογή των κύριων συνιστωσών (principal components: PC) 1 και 2 γιατί περιγράφουν καλύτερα τη παραλλακτικότητα. Συγκεκριμένα η PC1 το 80% ενώ η PC2 το 64%.

Στη συνέχεια του σχήματος 3.3.2.2.Β παρουσιάζονται ποια είναι τα μήκη κύματος που συσχετίζονται με τα δείγματα μας. Συγκεκριμένα ποσοστό συσχέτισης μεγαλύτερο από 70% είναι αυτά που βρίσκονται ανάμεσα και από τις δύο ελλείψεις. Συγκεκριμένα αυτά που βρίσκονται στην αριστερή πλευρά συσχετίζονται περισσότερο με τα αλλοιωμένα δείγματα ενώ αυτά που

βρίσκονται δεξιά με τα φρέσκα δείγματα. Στο πίνακα 2.2.2.2.. παρουσιάζονται οι αντιστοιχίες των μηκών κύματος αναλυτικά

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι φρέσκα δείγματα συγκεκριμένα χαρακτηρίζονται από τα μήκη κύματος 630, 645 και 660 κάτι που ήταν αναμενόμενο μίας και σε αυτά τα κύματος αντιστοιχεί η μυοσφαιρίνη (Liu et al., 2004) (Prieto et al., 2009). Άλλωστε και από τα φάσματα που φαίνονται στο σχήμα 3.3.2.3. φαίνεται ότι τα φρέσκα δείγματα κυρίως στα μήκη κύματος που προαναφέρθηκαν ανακλούν περισσότερο. Έτσι καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι όσο αλλοιώνεται το κρέας-ο μοσχαρίσιος κιμάς μειώνεται και η ανάκλαση.



Σχήμα 3.3.2.3.: Φάσματα κιμά από τις σταθερές θερμοκρασίες όπως παίρνονται από το VideometerLab. Όπου τα κόκκινα είναι τα αλλοιωμένα και τα μπλε είναι τα φρέσκα.

Στη συνέχεια έγινε η ανάπτυξη και η εκπαίδευση μοντέλου για τη πρόβλεψη της αλλοίωσης του μοσχαρίσιου κιμά με τη χρήση του VideometerLab σύμφωνα με PC1 όπου εξηγεί το μεγαλύτερο ποσοστό της παραλλακτικότητας, απ' όπου και προέκυψε η εξίσωση 3.1.

$$\begin{aligned} \text{Κλάση (φρέσκο/αλλοιωμένο)} = & -0,018*\lambda_{405} + 0,032*\lambda_{435} - 0,032*\lambda_{450} - 0,038*\lambda_{470} - \\ & 0,028*\lambda_{505} - 0,026*\lambda_{525} - 0,029*\lambda_{570} + 0,024*\lambda_{590} + 0,038*\lambda_{630} + 0,036*\lambda_{645} + \\ & 0,038*\lambda_{660} + 0,014*\lambda_{700} - 0,04*\lambda_{850} - 0,038*\lambda_{870} - 0,034*\lambda_{890} - 0,033*\lambda_{910} - 0,032*\lambda_{940} - \\ & 0,03*\lambda_{970} \end{aligned}$$

(3.1)

Αν η (3.1) είναι μεγαλύτερη από 1,5 τότε ο μοσχαρίσιος κιμάς είναι φρέσκο ενώ αν είναι μικρότερο από 1,5 είναι αλλοιωμένο.

Μέσω της ανάπτυξης και εκπαίδευσης του μοντέλου, ορίζοντας ποιες είναι οι κλάσεις αρχικά τα αποτελέσματα που πάρθηκαν ήταν πολύ ικανοποιητικά μιας και στο σύνολο των 65 δειγμάτων μόλις 3 ταξινομήθηκαν λάθος. Όπως παρουσιάζονται και στο πίνακα 3.3.2.2.

Πίνακας 3.3.2.2.: Αποτελέσματα εκπαίδευσης ανάπτυξης μοντέλου για τη πρόβλεψη της αλλοίωσης μοσχαρίσιου κιμά με τη χρήση του οργάνου VideometerLab

Από/σε	Φρέσκο	Αλλοιωμένο	%
Φρέσκο	27	2	93.10345
Αλλοιωμένο	1	35	97.22222
Συνολικά			95.38462

Στη συνέχεια έγινε επικύρωση του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Αυτό έγινε με τη χρήση των δεδομένων από το πείραμα με τις μεταβαλλόμενες χρονοθερμοκρασιακές συνθήκες. Συγκεκριμένα δώσαμε στο μοντέλο τα δεδομένα του πειράματος αφού πρώτα τα είχαμε μετασχηματίσει με το ίδιο τρόπο όπως και τα προηγούμενα φάσματα δηλαδή με SNV και Auto Scale. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα που μας έδωσε το μοντέλο τα συγκρίναμε με αυτά που μας είχαν δώσει οι αξιολογητές από τον οργανοληπτικό έλεγχο και το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν εξαιρετικό όπως φαίνεται και στο πίνακα 3.3.2.3 μιας και δεν υπήρχε καμία αστοχία του μοντέλου στο σύνολο των 51 δειγμάτων που έπρεπε να προβλέψει αν είναι φρέσκα ή αλλοιωμένα

Πίνακας 3.3.2.3.: Αποτελέσματα επικύρωσης του μοντέλου για τη πρόβλεψη της αλλοίωσης μοσχαρίσιου κιμά με τη χρήση του οργάνου VideometerLab

Από/σε	Φρέσκο	Αλλοιωμένο	%
Φρέσκο	23	0	100
Αλλοιωμένο	0	28	100
Συνολικά			100

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι το μοντέλο που αναπτύχθηκε (εξίσωση 3.1) είναι πολύ ικανοποιητικό. Καθώς και αν χρειάζεται στη βιομηχανία παραγωγής μοσχαρίσιου κρέατος (κιμά) να εγκαταστήσουμε το VideometerLab δε χρειάζεται να παίρνει φάσματα σε όλα τα μήκη κύματος παρά μόνο στα 630, 645 και 660 και η διάκριση του φρέσκου από το αλλοιωμένο μοσχαρίσιο κιμά θα γίνεται πολύ εύκολα.

3.4. Ανάλυση δειγμάτων κρέατος με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR)

3.4.1. Εισαγωγή

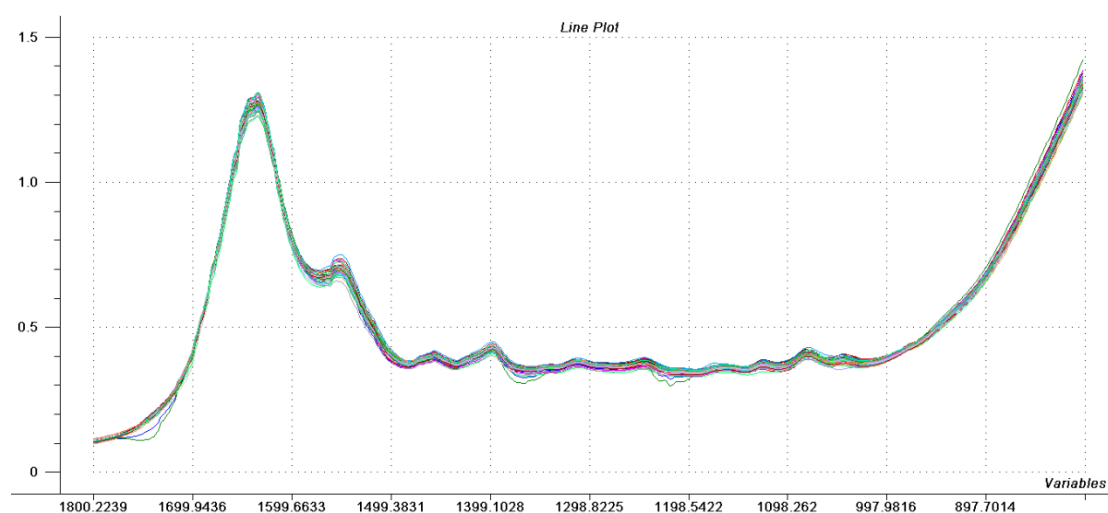
Κάθε δείγμα βόειου κιμά συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες αναλύθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier. Για κάθε δείγμα πάρθηκαν 2 φάσματα για τη κάθε επανάληψη, έτσι υπολογίστηκε ο μέσος όρος και εν συνεχεία έγινε η ανάλυση. Τα φασματικά δεδομένα

μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δακτυλικά αποτυπώματα (fingerprints) για το προσδιορισμό των βιοχημικών αλλαγών που συμβαίνουν κατά την αλλοίωση του μοσχαρίσιου κιμά.

Στο σχήμα 3.4.1.1. απεικονίζεται ένα τυπικό γράφημα FTIR στην περιοχή $1800-800\text{ cm}^{-1}$ (δακτυλικό αποτύπωμα κρέατος). Όπως φαίνεται και στο σχήμα, εμφανίζεται μια κορυφή στον κυματαριθμό 1640 cm^{-1} , η οποία οφείλεται στο νερό (O-H) και στη συνεισφορά του Αμιδίου I (πρωρεΐνη). Μια ακόμη κορυφή παρατηρείται στην περιοχή 1550 cm^{-1} εξαιτίας της απορρόφησης του Αμιδίου II (C-N δονήσεις τάσης), ενώ μια Τρίτη κορυφή εμφανίζεται στον κυματαριθμό 1745 cm^{-1} που οφείλεται στο λίπος (C=O δονήσεις τάσεις του καρβονυλίου των τριγλυκεριδίων.). Άλλες κορυφές μικρότερης έντασης παρατηρούνται στο φασματογράφημα οι οποίες εμφανίζονται στους παρακάτω κυματαριθμούς: 1458 cm^{-1} (λίπος, CH_2 , σκελετική δόνηση), 1398 cm^{-1} (αμίδια, C-N δονήσεις τάσης), 1311 cm^{-1} και 1264 cm^{-1} (αμίνες, C-N δονήσεις τάσης) (Ellis et al., 2002) (Ammor et al., 2009)

Αξίζει να σημειωθεί ότι στα φασματογραφήματα δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στις κορυφές οι οποίες αντικατοπτρίζουν τη διαφορά στη ποιότητα ενός φρέσκου και ενός αλλοιωμένου δείγματος κρέατος. Γι' αυτό το λόγο, οι αναλύσεις των φασματογραφημάτων έγιναν με τη βοήθεια πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης (multivariate analysis), ώστε να προσδιοριστεί η συσχέτιση μεταξύ της ποιοτικής αλλοίωσης του κρέατος με τα φασματικά δεδομένα που προέκυψαν από το FTIR.

Για την εκτίμηση και τη πρόβλεψη της ποιότητας του κρέατος συντηρημένου σε αερόβιες συνθήκες σε τρεις θερμοκρασίες (2°C , 6°C και 10°C), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Διακριτής Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA). Στη συνέχεια έγινε επικύρωση των μοντέλων με τη χρήση των δεδομένων των χρονοθερμοκρασιακά μεταβαλλόμενων προφίλ.

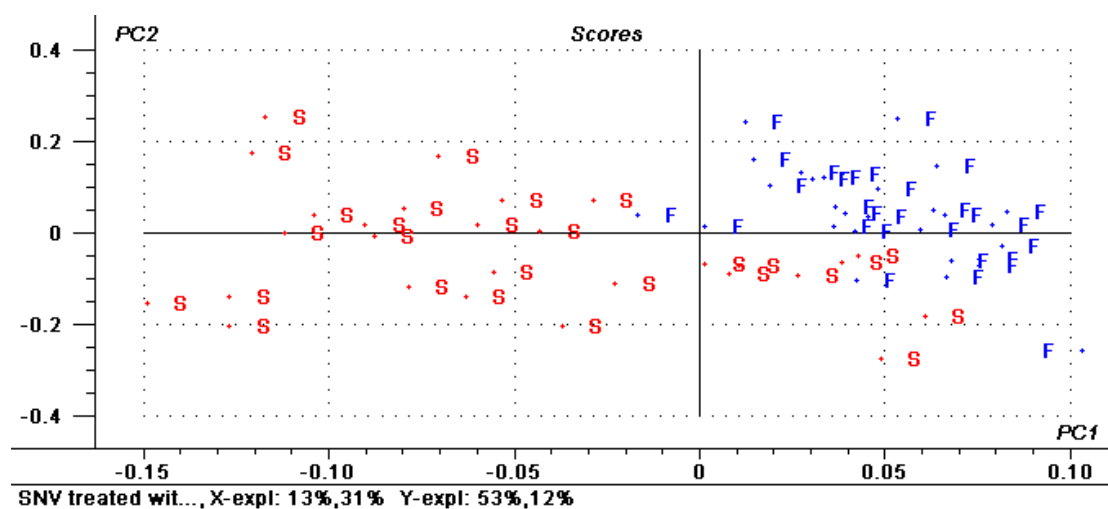


Σχήμα 3.4.1.1: Τυπικό «αποτύπωμα» κατά την ανάλυση δειγμάτων μοσχαρίσιου κιμά με φασματοσκοπία υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier.

Τέλος στη φασματοσκοπία είναι σύνηθες να επιλέγονται συγκεκριμένοι κυματαριθμοί ώστε το μοντέλο να είναι το βέλτιστο δυνατό, δηλαδή να περιέχει το μικρότερο αριθμό μεταβλητών χωρίς αυτό να αποβαίνει σε βάρος της επίδοσης του μοντέλου. Έτσι στη συγκεκριμένη περίπτωση επιλέχθηκαν οι πιο σημαντικοί κυματαριθμοί με τη βοήθεια των συντελεστών παλινδρόμησης (b-coefficients). Για την ανάλυση των φασμάτων FTIR επιλέχθηκαν οι κυματαριθμοί 800-1800 cm^{-1} , καθώς αυτοί αποτελούν το δακτυλικό αποτύπωμα του κρέατος (Argyri et al., 2013)

3.4.2. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Πριν από οποιαδήποτε ανάλυση όλα τα φάσματα προ επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο SNV (Standard Normal Variate) στους κυματαριθμούς 1800-800 cm^{-1} . Αρχικά πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση των δεδομένων προκειμένου να ταξινομηθούν τα δείγματα κρέατος κατά τη διάρκεια συντήρησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε κλάσεις ποιότητας σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης με τη μέθοδο Διακριτών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA). Όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 3.4.2.1. ο διαχωρισμός ήταν ικανοποιητικός. Τα φρέσκα τα οποία φαίνεται να «μπαίνουν» στη περιοχή των αλλοιωμένων αφενός είναι αυτά που σύμφωνα με τους αξιολογητές ήταν οριακά αποδεκτά ως φρέσκα και αφετέρου μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι στη fail safe περιοχή οπότε το σφάλμα δεν είναι τόσο μεγάλο.

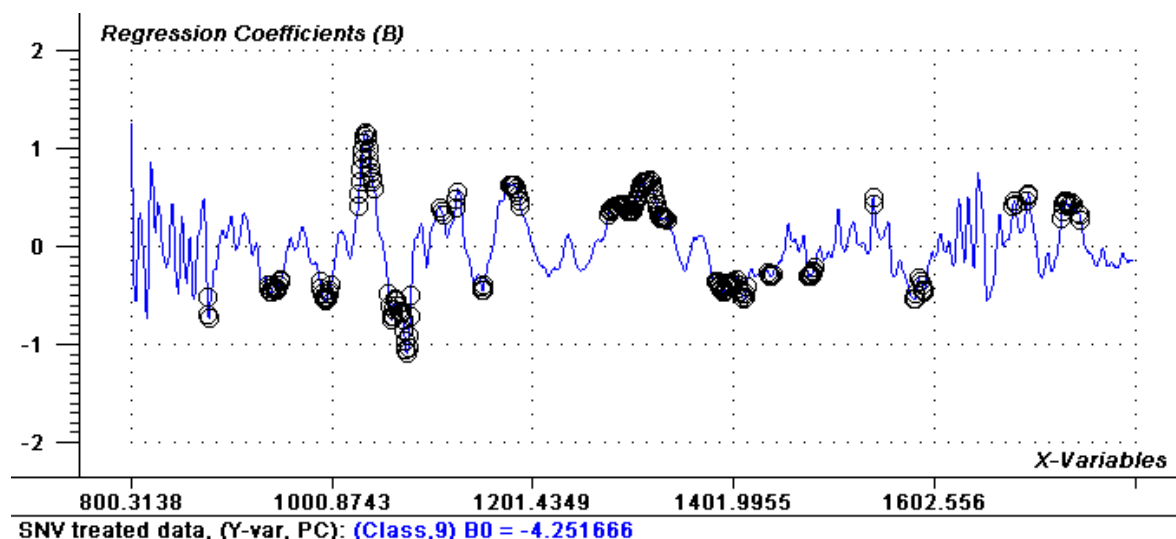


Σχήμα 3.4.2.1: Γράφημα διαχωρισμού κλάσεων δειγμάτων με τη μέθοδο PLS-DA όπου S είναι τα αλλοιωμένα και F τα φρέσκα

Στη συνέχεια προέκυψαν οι σημαντικότεροι συντελεστές παλινδρόμησης (b-coefficients), όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 3.4.2.2. με τους οποίους έγινε η επιλογή των σημαντικότερων κυματαριθμών. για την ανάπτυξη του μοντέλου

Με την επιλογή των στατιστικά σημαντικών κυματαριθμών, (πίνακας 3.4.2.1) δημιουργήθηκε μοντέλο για τον προσδιορισμό της ποιότητας του

κρέατος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτό ήταν πολύ ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα οι μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου του μοντέλου έδωσαν ακρίβεια πρόβλεψης στα δεδομένα εκπαίδευσης 100% και κατά την επικύρωση του μοντέλου (cross validation) με τα ίδια δεδομένα η ακρίβεια ήταν 91,23% όπως παρουσιάζονται και στο πίνακα 3.4.2.2.



Σχήμα 3.4.2.2.: Διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης στο εύρος 1800-800cm⁻¹. Οι επιλεγμένες περιοχές συμβολίζονται με μαύρο (○)

Πίνακας 3.4.2.1.: Στατιστικά σημαντικές απορροφήσεις-κυματαριθμοί για τη πρόβλεψη της ποιότητας του κρέατος (μέσα στις παρενθέσεις βρίσκονται οι στατιστικά σημαντικές απορροφήσεις στη πρώτη στήλη ενώ εκτός είναι η ολόκληρη η περιοχή που αντιστοιχούν οι απορροφούμενες ουσίες της δεύτερης στήλης)

Συχνότητες	Απορροφούμενη ουσία	Πηγή
1720-1580 (1697-1695, 1683-1681, 1592-1588, 1584-1581)	Νερό και Αμίδιο I (80% C=O και 10% N-H δονήσεις τάσης, 60% NH δονήσεις κάμψης)	(Socrates et al., 2001) (Wu et al 2006)
1580-1520 (1542-1541)	Αμίδιο II (συνδιασμός C-N δ. τάσης και N-H δ. κάμψης)	(Böcker et al., 2007)
1480-1461 (1482-1477)	Λιπίδια ή Αμίνες (CH ₃ ασυμμετρική τάση, CH ₂ ψαλιδισμός, C-H δονήσεις κάμψης)	(Socrates et al., 2001) (Böcker et al., 2007)
1460-1432 (1436-1441)	CH ₂ δονήσεις κάμψης	(Böcker et al., 2007)
1430-1413 (1405-1415)	Αμίνη (C-N δόνηση τάσης) ή Λιπίδια (RCOO-, COO-, -CH ₂ -COOR συμμετρική τάση)	(Ellis et al 2004) (Socrates et al., 2001)
1401-1383	Άγνωστο	

1344-1331 (1335-1331)	CH ₂ δονήσεις πλευρικής αλυσίδας, ελεύθερα αμινοξέα / μεγάλη αλυσίδα αλληλατικίων καρβοξυλίων, CH/ CH ₂ δονήσεις τάσης)	(Böcker et al., 2007) (Socrates et al., 2001)
1330-1294 (1330-1294)	Αμίδιο III δομή α-έλικας (30% C-N δόνησης τάσης, 30% N-H, 10% C=O-N δονήσεις κάμψης, 20% άλλα)	(Böcker et al., 2007)
1293-1275 (1293-1277)	αμίδιο III δευτεροταγή δομή (30% C-N δόνηση τάσης, 30% N-H δόνηση κάμψης, 10% C=O-N δόνηση κάμψης, 20% άλλο)	(Böcker et al., 2007)
1185-1143 (1153-1150, 1188-1178)	λίπος (C-O δόνηση τάσης), εστέρες (C-O-C) υδατάνθρακες (C-O δόνηση τάσης), -NH ₂	(Chen et al., 1998) (Böcker et al., 2007) (Pappas et al., 2008)
1140-1110 (1111-1108, 1126-1124)	ριβόζη (C-O δονήσεις τάσης), αμίνη (NH ₂ δονήσης στρέψης)	(Böcker et al., 2007) (Socrates et al., 2001)
1036-1020 (1042-1026)	πολυσακχαρίτες (C-O δονήσεις τάσης), αμίνη (CN, δονήσεις τάσης)	(Böcker et al., 2007) (Socrates et al., 2001)
999-989, 949-944, 942-937, 878-876	Άγνωστο	

Πίνακας 3.4.2.2.: Αποτελέσματα εκπαίδευσης και εσωτερικής επικύρωσης του μοντέλου για τη πρόβλεψη της αλλοίωσης μοσχάρισιου κιμά με τη χρήση του FTIR

Από/σε	Εκπαίδευση			Εσωτερική Επικύρωση		
	Φρέσκο	Αλλοιωμένο	%	Φρέσκα	Αλλοιωμένα	%
Φρέσκ	29	0	100.00	29	0	100.00
Αλλοιωμένο	0	28	100.00	5	23	82.14
	Συνολικά		100.00	Συνολικά		91.23

Στη συνέχεια έγινε επικύρωση του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Αυτό έγινε με τη χρήση των δεδομένων από το πείραμα με τις μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες. Συγκεκριμένα δώσαμε στο μοντέλο τα δεδομένα του πειράματος αφού πρώτα τα είχαμε μετασχηματίσει με το ίδιο τρόπο όπως και τα προηγούμενα φάσματα δηλαδή με SNV. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα που μας έδωσε το μοντέλο τα συγκρίναμε με αυτά που μας είχαν δώσει οι αξιολογητές από τον οργανοληπτικό έλεγχο και το αποτέλεσμα που προέκυψε ήταν εξαιρετικό όπως φαίνεται και στο πίνακα 3.4.2.3 μιας και το 86,27% του συνόλου προβλέπονται σωστά. Συγκεκριμένα από τα 51 δείγματα

τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση του μοντέλου μόλις τα 7 δεν κατατάχθηκαν σωστά όπως φαίνεται και στον αντίστοιχο πίνακα.

Πίνακας 3.4.2.3: Αποτελέσματα επικύρωσης του μοντέλου για τη πρόβλεψη της αλλοίωσης μοςχαρίσιου κιμά με τη χρήση του FTIR

Εξωτερική Επικύρωση			
Από/σε	Φρέσκα	Αλλοιωμένα	%
Φρέσκα	21	2	91.30435
Αλλοιωμένα	5	23	82.14
Συνολικά			86.27

Συμπερασματικά μπορούμε να πούμε ότι όπως και στη περίπτωση του VideometerLab έτσι και με το FTIR το μοντέλο με τον τρόπο με τον οποίο αναπτύχθηκε έχει θετικό προμήνυμα μιας και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία. Συγκεκριμένα το FTIR είναι ένα όργανο που παίρνει γρήγορα φάσματα χωρίς να επεμβαίνει στο δείγμα με αποτέλεσμα σε λίγα μόνο λεπτά επικεντρωμένοι στα μήκη κύματος που προαναφέρθηκαν ως σημαντικά μπορεί κανείς γρήγορα, εύκολα και αξιόπιστα να κάνει τον ποιοτικό διαχωρισμό των δειγμάτων.

3.5. Συμπεράσματα

Το κρέας εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητας του σε νερό και της αφθονίας σε θρεπτικά συστατικά θεωρείται ένα από τα πιο ευαλλοίωτα τρόφιμα. Η αλλοίωση του κρέατος είναι ένα οικολογικό φαινόμενο το οποίο αποδίδεται σχεδόν ολοκληρωτικά στη μικροβιακή δραστηριότητα η οποία ποικίλει και εξαρτάται από τα είδη των μικροοργανισμών που απαντώνται σε αυτό, τα χαρακτηριστικά του κρέατος, τον τρόπο συσκευασίας και το περιβάλλον στο οποίο αποθηκεύεται. Η μικροβιακή αλλοίωση προκαλεί το σχηματισμό γλοιώδους υφής και δυσάρεστων οσμών, κάνοντάς το ανεπιθύμητο στον καταναλωτή. Είναι λοιπόν σημαντικό, να βρεθούν γρήγορα και αξιόπιστα συστήματα ώστε να παρακολουθείται η ποιότητα και φρεσκάδα του κρέατος και να προβλέπεται η διάρκεια ζωής του κατά τη παραγωγή και διάθεσή του.

Ο γενικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της διάρκειας ζωής του βόειου κιμά με τη χρήση των εργαλείων της προρρητικής μικροβιολογίας καθώς επίσης και ο προσδιορισμός της αλλοίωσης με διαφορετικές ταχείες, μη καταστρεπτικές και μη επεμβατικές αναλυτικές τεχνικές όπως η πολυφασματική απεικόνιση και η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Τα σημαντικότερα συμπεράσματα της παρούσας μελέτης συνοψίζονται ως εξής:

Η αρχική μικροχλωρίδα των δειγμάτων του βόειου κιμά κατά τη συντήρηση σε διαφορετικές ισόθερμες αερόβιες συνθήκες (2, 6, και 10°C) εξαρτιόταν σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία συντήρησης. Έτσι, την κυρίαρχη μικροχλωρίδα αποτελούσαν οι *Pseudomonas* spp. και ακολουθούσαν με φθίνουσα σειρά οι μικροοργανισμοί *B. thermosphacta*, οξυγαλακτικά βακτήρια και *Enterobacteriaceae*.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το μοντέλο του Baranyi and Roberts, μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ειδικός ρυθμός αύξησης και η φάση υστέρησης για τις μελετούμενες ισόθερμες συνθήκες, περιέγραψε ικανοποιητικά την κινητική της ΟΜΧ. Οι κινητικές αυτές παράμετροι μοντελοποιήθηκαν συναρτήσει της θερμοκρασίας χρησιμοποιώντας το δευτερογενές μοντέλο του τύπου της τετραγωνικής ρίζας. Για τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής έγινε οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων κιμά ώστε να προσδιοριστεί ο χρόνος απόρριψης των δειγμάτων. Στη συνέχεια η διάρκεια ζωής υπολογίστηκε με την εξίσωση του Dalgaard ενώ με τη βοήθεια της τροποποιημένης εξίσωσης του Arrhenius, επιδιώχθηκε η δημιουργία ενός μαθηματικού μοντέλου που περιγράφει την επίδραση της θερμοκρασίας στη διάρκεια ζωής του βόειου κιμά. Ως ελάχιστο επίπεδο αλλοίωσης ορίστηκε ο αριθμός κυττάρων της μικροβιακής χλωρίδας που καθορίζουν ότι το δείγμα είναι απορριπτέο από τους καταναλωτές. Συγκεκριμένα τα αποτελέσματα προέκυψαν από την αξιολόγηση της οσμής μιας και ήταν πιο αντιπροσωπευτικά. Άλλωστε, με βάση το κριτήριο της οσμής υπάρχει ευκρινέστερος διαχωρισμός ανάλογα με τη θερμοκρασία δίνοντας έτσι πιο αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό συμφωνεί απόλυτα με το Danish Meat Research Institute, (<http://dmripredict.dk/Models/ShelfLife/>) όπου αναφέρει ότι η οσμή είναι η οργανοληπτική παράμετρος που μεταβάλλεται πρώτη κατά τη συντήρηση και για το λόγο αυτό είναι ο σημαντικότερος παράγοντας στην πρόβλεψη της διάρκειας ζωής και έτσι επιβεβαιώθηκε ότι η προβλεπόμενη διάρκεια ζωής από το μοντέλο βρίσκεται σε ικανοποιητική συμφωνία με τη διάρκεια ζωής της οργανοληπτικής αξιολόγησης.

Εν συνεχεία, τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν σε ισόθερμες συνθήκες επικυρώθηκαν με δεδομένα που προέκυψαν από ανεξάρτητα πειράματα συντήρησης βόειου κιμά σε μεταβαλλόμενο χρονοθερμοκρασιακό προφίλ (2, 6, 10°C με βήμα οκτώ ωρών και 4, 8°C με βήμα δώδεκα ωρών) προκειμένου να αξιολογήσουμε τη δυναμική του μοντέλου σε πραγματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν πολύ ικανοποιητικά μιας και το μοντέλο της πρόβλεψης του ρυθμού αύξησης σε διαφορετικές θερμοκρασίες έδωσε το 91,67% των προβλέψεων εντός της APZ και για τα δύο μεταβαλλόμενα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ. Καθώς επίσης οι τιμές του συντελεστή ακριβείας (A_f) όπου φαίνεται πως η μέση απόκλιση μεταξύ των εκτιμήσεων και των παρατηρήσεων ήταν μικρότερη από 3,5% και για τα δύο προφίλ. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός της ισοδύναμης θερμοκρασίας των μεταβαλλόμενων θερμοκρασιακών προφίλ ενώ παρατηρήθηκε ότι τα δύο προφίλ δεν διαφέρουν

μεταξύ τους και το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός η μέγιστη θερμοκρασία τους διαφέρει κατά 2°C. Για τον υπολογισμό της διάρκειας ζωής σε ενδιάμεσες θερμοκρασίες συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον οργανοληπτικό έλεγχο με αυτά που προέκυψαν από το μοντέλο που είχε αναπτυχθεί. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ ικανοποιητικά μιας και η απόκλιση των δέκα ωρών που υπάρχει είναι μηδενική μιας και μιλάμε εδώ για ώρες ενώ ο καταναλωτής ως μέτρο σύγκρισης έχει τις μέρες. Αυτό αποδεικνύει ότι το μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το προσδιορισμό της διάρκειας ζωής του βόειου κιμά στη βιομηχανία.

Ακόμα εξετάστηκε η ικανότητα της πολυφασματικής απεικόνισης με τη χρήση του οργάνου VideometerLab ως εργαλείο στην αξιολόγηση της ποιότητας του βόειου κιμά. Από την ανάλυση των φασμάτων προέκυψε ότι η φρεσκότητα χαρακτηρίζεται από τα μήκη κύματος 630, 645 και 660nm που αντιστοιχούν στο κόκκινο χρώμα και πως το παρόν όργανο δίνει εντυπωσιακά αποτελέσματα στη κατηγοριοποίηση σε κλάσεις ποιότητας. Συγκεκριμένα το μοντέλο που αναπτύχθηκε έδωσε κατά 95,38% σωστή κατηγοριοποίηση των δειγμάτων κατά την εσωτερική αξιολόγηση ενώ κατά την εξωτερική επικύρωση που έγινε με τη χρήση των αποτελεσμάτων των δειγμάτων από το δεύτερο πείραμα με τα μεταβαλλόμενα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ έδωσε 100% σωστή κατηγοριοποίηση. Θα περίμενε κανείς ότι το μοντέλο θα έδινε χαμηλότερο ποσοστό επιτυχίας κατά την εξωτερική αξιολόγηση αλλά αυτό δεν έγινε λόγω του ότι το μοντέλο είχε εκπαιδευτεί με κάποια δείγματα τα οποία τα μετρούσαμε αν εικοσιτετράωρο ενώ στο δεύτερο πείραμα ήταν όλα αν δώδεκα ώρες άρα ήταν πιο ξεκάθαρες οι διαφορές και δεν υπήρχαν σφάλματα.

Τέλος εξετάστηκε η ικανότητα της φασματοσκοπίας FTIR ως εργαλείο στην αξιολόγηση της ποιότητας του κρέατος αξιοποιώντας τα μεταβολικά αποτυπώματα του βόειου κιμά συντηρημένα αερόβια σε θερμοκρασίες 2, 6, και 10°C. Διαπιστώθηκε καλή διάκριση μεταξύ των ποιοτικών κατηγοριών του δείγματος οι οποίες αντιστοιχούν σε διαφορετικά επίπεδα αλλοίωσης. Επιπροσθέτως, από την ανάλυση των φασμάτων προέκυψαν τα σημαντικά εύρη κυματαριθμών που χαρακτηρίζουν την αλλοίωση του βόειου κιμά. Η πρόβλεψη του κάθε δείγματος σε ποια κλάση ανήκει απευθείας από τα φασματικά δεδομένα έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ενώ στη συνέχεια έγινε επικύρωση του μοντέλου που αναπτύχθηκε με τη χρήση των φασμάτων όπως προέκυψαν από τα μεταβαλλόμενα χρονοθερμοκρασιακά προφίλ. Τα αποτελέσματα και σε αυτή τη περίπτωση ήταν ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων στην εσωτερική επικύρωση που έγινε κατά την ανάπτυξη του μοντέλου ήταν σωστή για το 91,23% των δειγμάτων ενώ κατά την εξωτερική αξιολόγηση το μοντέλο πρόβλεψε σωστά το 86,27% στο σύνολο των δειγμάτων.

Εν κατακλείδι, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η μικροβιολογία πόρρισης δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για τη πρόβλεψη της ανάπτυξης των μικροοργανισμών ενώ μπορεί να υπολογισθεί η διάρκεια ζωής του μοσχαρίσιου

κιμά με μεγάλη ακρίβεια με τη χρήση των μοντέλων που αναπτύχθηκαν. Εξίσου σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι οι ταχείες μη επεμβατικές και μη καταστρεπτικές μέθοδοι είναι πολλά υποσχόμενες μιας και δίνουν έγκυρα και έγκαιρα αποτελέσματα για τα προϊόντα που μελετούν. Όσον αφορά όμως τη χρήση του VideometerLab και του FTIR στην βιομηχανία κρέατος μπορεί να θεωρηθεί καλύτερο το VideometerLab μιας και δίνει καλύτερα αποτελέσματα από το FTIR, κάτι που είναι λογικό μιας και το VideometerLab μελετά- αναλύει το χρώμα του κιμά και αυτό είναι το χαρακτηριστικό που ακόμα και μακροσκοπικά μεταβάλλεται κατά την αλλοίωση του. Ενώ, δε χρειάζεται να παίρνει μετρήσεις σε όλα τα μήκη κύματος παρά μόνο σε αυτά που αντιστοιχούν στο κόκκινο χρώμα δηλαδή 330, 345, 360nm.

3.6. Μελλοντική έρευνα

Στη παρούσα εργασία αναπτύχθηκαν πολλά μοντέλα τόσο για την πρόβλεψη της διάρκειας ζωής του βόειου κιμά όσο και για τη κατηγοριοποίησή του σε κλάσεις ποιότητας με τη χρήση των οργάνων VideometerLab και του FTIR ενώ παράλληλα αξιολογήθηκαν. Τα δύο όργανα αυτά βρέθηκαν να είναι ικανά να εκτιμήσουν περισσότερο ή λιγότερο την αλλοίωση του κιμά, καθώς επίσης προσδιορίστηκαν τα σημαντικότερα μήκη κύματος και τα εύρη των κυματαριθμών αντίστοιχα που χαρακτηρίζουν τόσο την αλλοίωση όσο και τη φρεσκότητα του βόειου κιμά.

Περαιτέρω μελέτες οι οποίες θα ενισχύσουν την αξιοπιστία αυτών των αποτελεσμάτων. Συγκεκριμένα,

- Θα μπορούσαν να διεξαχθούν πειράματα με τη χρήση μόνο αυτών των κυματαριθμών και των συγκεκριμένων μηκών κυμάτων ώστε να δούμε αν γίνεται σωστά η κατηγοριοποίηση.
- Παράλληλα θα μπορούσε να αναπτυχθούν νέα μοντέλα με τη χρήση άλλων ταχέων μεθόδων ώστε να μπορέσουν να συγκριθούν και να αποφανθούμε ποια είναι η καλύτερη και ταχύτερη μέθοδος για την αξιολόγηση της ποιότητας του βόειου κιμά.

Βιβλιογραφία

- A/S, Videometer. n.d. *Installation and User manual VideometerLab 2 - Multispectral Second Edition (software version 2.6)*.
- Abd El-Rhman H.A., Mamiott N. G., Wang H., Yassein M.M.A., Ahmed A.M. 1998. "Characteristics of minced beef stored at chilled and abuse temperatures." *J Muscle Foods*, 9, 139-152.
- Adams M. R., Moss M.O. 1995. *Food Microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Ahn, D. U., Oslon, O. G., Jo, C., Chen, X., Nu Cand Lee, J. I. 1998. "Effect of muscle type, packaging and irradiation on lipid oxidation, volatile production and color in raw pork pattiew." *Meat Science*, 49, 27-93.
- Ammor, S. A., Argyri, A., Nychas, G.-J. E. 2009. "Rapid monitoring of spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics." *Meat Science*, 81, 507-514.
- Argyri, A.A., Jarvis, R.M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E.Z., Goodacre, R., Nychas, G.-J.E. 2013. "A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage." *Food Control*, 29, 461-470
- Arvanitoyannis, I.S., van Houwelingen-Koukaliaroglou, M. 2003. "Implementation of Chemometrics for Quality Control and Authentication of Meat and Meat Products." *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43, 173-218.
- Baranyi, J. 1997. "Simple is good as it is enough." *Food Microbiology*, 14, 189-192.
- Baranyi, J. 2002. "Stochastic modeling of bacterial lag phase." *Int. J. Food Microbiology*, 73, 203-206.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food." *Int. J. Food Microbiology*, 23, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1995. "Mathematics of predictive food microbiology." *Int. J. Food microbiol*, 26, 199-218.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P.A. 1993. "A non-autonomous differential equation to model bacterial growth." *Food Microbiology*, 10, 43-59.
- Baty, F., Delignette-Muller, M.L. 2004. "Estimating the bacterial lag time: wich model, wich precision?" *Int. J. Food Microbiology*, 91, 261-277.
- Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M., Heberger, K.,. 2007. "Supervised pattern recognition in food analysis." *J of Chrom A*, 1158, 196-214.
- Böcker, U., Ofstad, R., Wu, Z., Bertram, H.C., Sockalingum, G.D., Manfait, M., Egelandsdal, B., & Kohler, A. 2007. "Revealing covariance structures in Fourier transform infrared and Raman microspectroscopy spectra : a

- study on pork muscle fiber tissue subjected to different processing parameters." *Appl Spect*, 6,1 1032-1039.
- Borch E., Kant-Muemansb M.-L, Blix Y. 1996. "Bacterial spoilage of meat products." *Int J Food Microbiol*, 33, 103-120.
- Buchanan, R.L. 1997. "The three phase linear model of bacterial growth: response." *Food Microbiology* 399.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. 1997a. "When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and tree-phase linear models for fitting bacterial growth curves." *Food Microbiology*, 14, 313-326.
- Cayer, M.E., Vigno, C., Garroa, O. 2003. "Modelling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures." *Food Microbiology*, 20, 561-566.
- Chan, W.,K.-M., Hakkarainen, K., Faustman, C., Schaefer, D.,M., Scheller, K.,K., Lian, Q. 1995. "Color stability and microbial growth relationshipw in beef as affected by endognouw a-tocopherol." *Food Science*, 60, 966-971.
- Chen, M., Irudayaraj, J., & McMahon, D. J. 1998. "Examination of full fat and reduced fat cheddar cheese during ripening by Fourier Transform Infrared Spectroscopy." *J Dairy Sci*, 81, 2791–2797.
- Chevallier, S., Bertrand, D., Kohler, A., & Courcoux, P. 2006. "Application of PLS-DA in multivariate image analysis." *Journal of Chemometrics*, 20, 221-229.
- Dalgaard, P. 2002. "Modelling and prediction the self-life of seafood." In *Safety and Quality Issues inFfish Prossesing* , 191-219. Cambridge, England: Woodhead Publishing.
- Dalgaard, P. 1995. "Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fish." *Int. J. Food Microbiology*, 26, 305-317.
- Danish Meat Research Institute: Predictive Models For Meat <http://dmripredict.dk/Models.ShelfLife/>
- Daugaard, S. B., Adler-Nissen, J., & Carstensen, J. M. 2010. "New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat." *Food Control*, 21, 626–632.
- Dermesonluoglu, E., Katsaros, G., Tsevdou, M., Giannakourou, M., Taoukis, P. 2014. "Kinetic study of quality indices and shelf life modelling of frozen spinach under dynamic conditions of the cold chain." *J. Food Eng.* ,148 ,13-23.
- Doulgeraki A. I., Paramithiotis S., Kagli D.M., Nychas G.-J. E. 2010b. "Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under

- aerobic or modified atmosphere packaging conditions." *Food Microbiology*, 27, 1028-1034.
- Drosinos E. H., and Broad R. G. 1995. "Attributes of microbial associations of meat growing as xenic batch in a meat juice at 4 C." *Int J Food Microbial*, 26, 279-293.
- E., Hood D. 1971. "Technical aspects of vacuum packaging and pre-packaging of fresh meat, In Beef Processing and Marketing Conference Proceedings." Dublin: The Agricultural Institute.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., & Goodacre, R. 2004. "Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning." *Analytica Chimica Acta*, 514, 193–201.
- Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., & Goodacre, R. 2002. "Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning." *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2822–2828.
- Ellis, D.I., Goodacre, R. 2001. "Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends." *Trends in Food Science and Technology*, 12, 414–424.
- Ercolini D., Russo F., Torrieri E., Masi P., Villani F. 2006. "Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions." *Appl Environ Microbiol*, 72, 4663-4671.
- Feng, Y. Z., & Sun, D. W. 2012. "Application of hyperspectral imaging in food safety inspection and control: A review." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 1039-1058.
- Fung. D., 2010. *Microbial Hazards in food: Food-born infections and intoxications. Handbook of meat processing. Edited by F. Toldra.* USA: Blackwell Publishing.
- Garthright, W.E. 1997. "Three phase linear model of bacterial growth: a response." *Food Microbiology* 193.
- Gat., Nahum. 2000. "Imaging spectroscopy using tunable filters: A review." *Proceedings of SPIE*, 4056, 50-64.
- Geladi, P., Burger, J., and Lestander, T. 2004. "Hyperspectral imaging: calibration problems and solutions." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 72, 209-217.
- Gill, C.O. 1976. "Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces." *J Appl Bacteriol*, 41, 401-410.
- Gonzalez, M., Skandamis, N. P., Hanninen, M.-L. 2009. "A modified Weibull model for describing the survival of *Campylobacter jejuni* in minced chicken meat." (*Int. J. of Food Microbiology*) 136.

- Gowen, A. A., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., Downey, G., & Frias, J. M. 2007. "Hyperspectral imaging – An emerging process analytical tool for food quality and safety control." *Trends in Food Science & Technology*, 18, 590-598.
- Gowen, A., O'Donnell, C., Cullen, P., Downey, G., & Frias, J. 2007. "Hyperspectral imaging—an emerging process analytical tool for food quality and safety control." *Trends in Food Science and Technology*, 18, 590-598.
- Gram L., Huss H.H. 1996. "Microbiological spoilage of fish and fish products." *Food Microbiology*, 33, 121-137.
- Hansen, J.F. 1999. *On chromatic and geometrical calibration. PhD thesis, Department of Mathematical Modelling*. DTU, Richard Petersens Plads, Building 321, DK-2800 Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark.
- Hardeberg, J. Y., Schmitt, F. J. and Brettel, H. 2002. "Multispectral color image capture using a liquid crystal tunable filter." *Optical Engineering*, 41, 2532-2548.
- Hills, B.P., Wright, K.M. 1994. "A new model for bacteria growth in heterogenous systems." *Journal of Theoretical Biology* 168 31-41.
- Huis in't Veld J.H.J. 1996. "Microbial and Biochemical spoilage of foods: An overview." *Int J Food Microbiol*, 33, 1-18.
- Koutsoumanis K.A., Sofos J.N. 2004. "Microbial contamination." In *Encyclopedia of meat sciences*, by C. Devine, M. Dikeman W.K. Jensen, 727-737. Oxford: Elsevier.
- Koutsoumanis K.A., Stamatiou A.P., Drosinos E.H., Nychas G.-J.E. 2008. "Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-development modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora." *Food Microbiol*, 25, 915-921.
- Koutsoumanis K.A., Stamatiou A.P., Skandamis p., Nychas G.-J.E. 2006. "Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of group meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions." *Appl Environ Microbiol*, 72, 124-134.
- Labuza, T. P., Riboh, D. 1982. "Theory and application of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in food." *Food Technology*, 36, 66-74.
- Lambert A. D., Smith J. P., Dodds K.L. 1991. "Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat: a review." *Food Microbiology*, 267-297.
- Liu, C., Liu, W., Chen, W., Yang, J., & Zheng, L. 2015. "Feasibility in multispectral imaging for predicting the content of bioactive compounds in intact tomato fruit." *Food Chemistry*, 173, 482-488.

- Liu, J., Cao, Y., Wang, Q., Pan, W., Ma, F., Liu, C., Chen, C., Yang, J. 2016. "Rapid and non-destructive identification of water-injection beef samples using multispectral imaging analysis." *Food Chemistry*, 190, 938-943.
- Liu, Y., Lyon, B.C., Windham, W.R., Lyon, C.E., Savage, E.M. 2004. "Prediction of physical, color and sensory characteristics of broiler breast by visible/near infra-red reflectance spectroscopy." *Poultry Science*, 83, 1467-1474.
- Lleó, L., Barreiro, P., Ruiz-Altisent, M., & Herrero, A. 2009. "Multispectral images of peach related to firmness and maturity at harvest." *Journal of Food Engineering*, 93, 229-235.
- MacDougall D., B. 1982. "Change in the color and opacity of meat ." *Food Chemistry*, 9, 75-88.
- McClure, P.J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1993. "A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix Thermosphacta*." *Int. J. Food Microbiology*, 161-178.
- McKeen, T.A., Ross, T. 2002. "Predictive microbiology: providing a knowledge based framework for change management." *Int. J. Food Microbiology*, 78, 133-153.
- McKellar, R.C. 1997. "A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics." *Int. J. Food Microbiology*, 36, 179-186.
- McKellar, R.C., Lu, X.W. 2004. *Modelling microbial responses in foods*. Florida: CRC Press LLC.
- McMeekin, T.A., Olley, J.N., Ross, T., and Rakowsky, D.A. 1993. *Predictive Microbiology: Theory and Application*. New York.
- McMillin K. W., 2008. "Where is MAP going? A review and future potential modified atmosphere packaging for meat." *Meat Science*, 80, 43-65.
- Membre, J.-M., Ross, T., McMeekin, T. 1996. "Behavior of *Listeria monocytogenes* under combined chilling processes. ." *Letters in Applied Microbiology*, 28, 216-220.
- Nielsen, H., Esaiassen, M., Heia, K., Sigernes, S. 2002. "Visible/near-infrared spectroscopy: A new tool for evaluation of fish freshness." *J of Food Sci*, 67, 1821-1826.
- Nychas G.-J., Marshall d. I., Sofos J. N. 2007. "Meat, Poultry and Seafood. In *Food microbiology: fundamentals and frontiers* Edited by M. P. Doyle, L. R. Beuchat." *Washington D.C.: ASM Press*, 105-140.
- Nychas G.-J.E., Drosinos E.H., Board R.G. 1998. "Chemical changes in stored meat." In *In The Microbiology of Meat and Poultry*, by A.R. Davies R.G. Board, 288-326. London, UK: Blackie Academic and Professional.

- Nychas G.-J.E., Skandamis P. 2005. "Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In Improving the Safety of Fresh Meat Edited by J. N. Sofos." *Cambridge, UK: CRC/Woodhead Publishing Limited*, 461-502.
- Nychas G.-J.E., Skandamis P.N., Tassou C.C., Koutsoumanis K. P. 2008. "Meat spoilage during distribution." *Meat Science*, 78, 77-89.
- Nychas G.-J.E., Tassou C.C. 1997. "Spoilage process and proteolysis in chicken as noted by HPLC method." *J Sci Food Agric* 74, 199-208.
- Oscar, T.P. 2009. "Predictive Model for Survival and Growth of Salmonella Typhimurium DT104 on Chicken Skin during Temperature Abuse." *Journal of Food Protection*, 72, 304-314.
- Papadopoulou, O., Doulgeraki, A.I., Cocolin, L., Botta, C., Nychas, G.-J.E. 2013. "Genotypic characterization of *Brochothrix Thermosphacta* isolated during storage of minced pork under aerobic or modified atmosphere packaging conditions." *Meat Science*, 92, 735-738.
- Pappas, C.S., Tarantilis, P.A., Moschopoulou, E., Moatsou, G., Kandarakis, I., Polissiou, M.G. 2008. "Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis." *Food Chem*, 106, 1271–1277.
- Penri, S., Andrew, P.W., Shama, G. 2005. "Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything." *Food Microbiology*, 22, 491-495.
- Prieto, N., Roehe, R., Lavin, P., Batten, G., Andres, S.,. 2009. "Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review." *Meat Science*, 83, 175-186.
- Ratkowsky, D.A. 2004. "Modelling microbial responses in foods." In *Modelling microbial responses in foods* , by R.C. McKellar & X.W. Lu, 152-186. Florida: CRC Press LLC.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. 1983. "Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range." *Journal of Bacteriology*, 154, 1222-1226.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. 1982. "Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures ." *J. Bacteriol.* ,149, 1-5.
- Richards, M., Buys, M.E., De Kock, L.H. 2016. "Survival analysis, consumer perception and physico-chemical analysis of low fat UHT milk stored for time periods." *International Dairy Journal*,57, 56-61.
- Richards, M., Buys, M.E., Henrietta, L.D.K. 2016. "Survival analysis, consumer preception and physico-chemical analysis of low fat UHT milk stored for different time periods." *International Dairy Journal* ,57, 56-61.

- Ross, T. 1996. "Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology." *J. Appl. Bacteriol*, 501-508.
- Ross, T., Baranyi, J., McMeekin, T.A. 1999/2000. "Predictive microbiology and food safety." In *Encyclopedia of Food Microbiology*, by R., Batt, C.A., Patel, P. Robison, 1699-1710. London: Academic Press.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. 2000. "Predictive modeling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products." *International Journal of Food Microbiology*, 62, 231-245.
- Sánchez, A. J., Albarracín, W., Grau, R., Ricolfe, C., & Barat, J. M. 2008. "Control of ham salting by using image segmentation." *Food Control*, 19, 135–142.
- Skovlund Dissing., B. 2011. *New vision technology for multidimensional quality monitoring of food processes. PhD thesis*. Building 321, DK-2800 Kongens Lyngby, Denmark: Technical University of Denmark, Informatics and Mathematical Modelling.
- Socrates, G. 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies 3rd ed*. West Sussex, UK: John Willey & Sons Ltd Press.
- Stanley R. Crouch, James J. Leary, Douglas A. Skoog, Timothy A. Nieman and F. James Holler. 2006. *Principles of instrumental analysis, 6th ed*. Brooks Cole.
- Stien, L. H., Kiessling, A., & Manne, F. 2007. "Rapid estimation of fat content in salmon fillets by colour image analysis." *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 73–79.
- Stiles, Gunter Wyszecski and W.S. 2000. *Color science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae, 2nd ed*. Wiley & sons Inc.
- Stutz, H.K., Silverman, G.J., Angelini, P., & Levin, R.E. 1991. "Bacteria and volatile compounds associated with ground beef spoilage ." *J Food Sci*, 56, 1147-1153.
- Sutherland, J. Vernam A. H. 1999. *Το κρέας και τα προϊόντα του*. Περιστερί, Αττική: ΙΩΝ και ΣΙΑ.
- Taoukis, P.S., Koutsoumanis K., Nychas, G-J. E. 1999. "Use of time temperature integrators and predictive modelling for shelf life control of chilled fish under dynamic storage conditions." *Int. Journal of Food Microbiology*, 53, 21-31.
- Tsigarida E., Nychas G.-J.E. 2001. "Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability." *J Appl Microbiol*, 90, 696-705.

- Viana E.S., Gomide L.A.M., and Vanetti M.C.D. 2005. "Effect of modifies atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork." *Meat Science*, *71*, 696-705.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L. 1993. "Letter to the editor: a classification of models in predictive microbiology. A reply to K.R. Dvey." *Food microbiol*, *10*,113-120.
- Whiting, R.C., Buchanan, R.L. 1994. "Microbial modeling ." *Food Technology*, *48*, 113-120.
- Wu, Z., Bertram, H.C., Kohler, A., Böcker, U., Ofstad, R., & Andersen, H.J. 2006. "Influence of aging and salting on protein secondary structures and water distribution in uncooked and cooked pork. A combines FT-IR microspectroscopy and ¹H NMR relaxometry study." *Agric Food*, *54*, 8589-8597.
- Xia, J., Psychogios, N., Young, N., Wishart, D.S. 2009. "MetaboAnalyst: a web server for metabolomics data analysis and interpretation ." *Nucleid Acids Research*, *37* doi: 10.1093/nar/gkp356.
- Yamamoto, S., Tsumura, N., Nakaguchi, T. and Miyake, Y. 2007. "Development of a multi-spectral scanner using led array for digital color proof." *Journal of Imaging Science and Technology*, *51* (1) 61-69.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., da Wit, J. C., van't Riet, K. 1991. "Modelling of bacterial growth as a function of temperature." *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 204-213.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1990. "Modelling of the bacterial growth curve. ." *Applied and Environmental Microbiology*, *56*, 1875-1881.
- Oscar, T. P. 2005. "Development and validation of primary, secondary and tertiary models for predicting growth of Salmonella Typhimurium on sterile chicken." *Journal of Food Protection*, *68*, 2606-2613.
- Ταραντίλης, Α. Π., Πολυσίου, Γ. Μ., Παππάς, Σ. Χ. 2013. *Ενόργανη Ανάλυση, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις*. Αθήνα: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Χημείας.
- Τσακαλίδου, Ε. 2001. *Μαθήματα Βιοχημείας Τροφίμων Ι*. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- www.textbookofbacteriology.net. n.d.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΟΡΓΑΝΟΛΗΠΤΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Όνομα

αξιολογητή:.....
(συμπληρώνεται από τον αξιολογητή)

Αριθμός

δείγματος:.....
(συμπληρώνεται από τον αξιολογητή)

Κωδικός

δείγματος:.....
(συμπληρώνεται από τον ερευνητή)

ΑΠΑΝΤΗΣΤΕ ΜΕ ΕΝΑ ΝΑΙ/ΟΧΙ ΚΥΚΛΩΝΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΩ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ.

ΧΡΩΜΑ

Αξιολογήστε την **όψη του δείγματος κιμά (ως προς το χρώμα)**. Είναι κατά τη γνώμη σας αποδεκτό (ΝΑΙ)? Ή απορριπτικό (ΟΧΙ)?

ΝΑΙ

ΟΧΙ

Σχόλια

.....
.....

ΟΣΜΗ

Αξιολογήστε την **οσμή του δείγματος κιμά**. Είναι κατά τη γνώμη σας αποδεκτή (ΝΑΙ)? Ή απορριπτική (ΟΧΙ)?

ΝΑΙ

ΟΧΙ

Σχόλια

.....
.....

ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΝΤΥΠΩΣΗ

Αξιολογήστε το **δείγμα κιμά ΣΥΝΟΛΙΚΑ**. Ως καταναλωτής, θα το αγοράζατε/ μαγειρεύατε?

ΝΑΙ

ΟΧΙ

Σχόλια

.....
.....

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Παραδείγματα τμηματικών εικόνων όπως λήφθηκαν μετά από επεξεργασία του VideometerLab

