

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων»

Μελέτη βρεφικών κρεμών - μικροβιολογικά και
φυσικοχημικά χαρακτηριστικά πρώτων υλών
και τελικών προϊόντων

Παναγιώτα Δ. Αγραφιώτη

Χημικός



Επιβλέπων καθηγητής: Νυχάς Γεώργιος

Επιτροπή : Αθ.Μαλλούχος, Ε.Πανάγου

Αθήνα 2016

AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS
FOOD MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND HUMAN NUTRITION

THESIS

POSTGRADUATE STUDIES PROGRAM

«Food Safety and Quality Management»

Study of infant creams - microbiological and
physicochemical characteristics of raw
materials and finished products

Panagiota D. Agrafioti

Chemist



Supervisor: Nychas George

Committee: Ath. Mallouchos, E. Panagou

Athens 2016

Περιεχόμενα

Πρόλογος	3
Περίληψη.....	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Βρεφικές τροφές	6
1.1.1 Γενικά.....	7
1.1.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά βρεφικών τροφών	9
1.1.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των βρεφικών τροφών	13
1.2 Αλλοίωση τροφίμων.....	15
1.2.1 Γενικά.....	15
1.2.2 Μικροβιολογική αλλοίωση γαλακτοκομικών προϊόντων	18
1.3 Μέθοδοι εκτίμησης της ποιότητας των τροφίμων	27
1.3.1 Συμβατικές μέθοδοι (traditional microbiological methods)	28
1.3.2 Ταχείες μη επεμβατικές μέθοδοι.....	29
1.3.2.1 Φασματοσκοπία Δονήσεων	29
1.3.2.2 Ανάλυση εικόνας (Image Analysis).....	49
1.3.2.3 Χημειομετρία.....	50
2. Πειραματικό Μέρος	54
2.1 Μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά πρώτων υλών	54
2.1.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις	55
2.1.2 Ανάλυση εικόνας (VideometerLab).....	55
2.1.3 Ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR.....	56

2.2 Εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας τελικών προϊόντων κρεμών με τη χρήση συμβατικών και ταχέων, μη-επεμβατικών μεθόδων.....	57
2.2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις	57
2.2.2 Ανάλυση εικόνας (VideometerLab).....	58
2.2.3 Ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR.....	59
2.2.4 Αξιολόγηση πολυμεταβλητού μοντέλου NovelEye	60
3 . Αποτελέσματα - Συζήτηση.....	61
3.1 Μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά πρώτων υλών βρεφικών κρεμών ..	61
3.2 Εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας τελικών προϊόντων κρεμών με τη χρήση συμβατικών και ταχέων, μη-επεμβατικών μεθόδων.....	104
4. Συμπεράσματα	131
5. Βιβλιογραφία.....	133

Πρόλογος

Η συγκεκριμένη ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Νυχά Γεώργιου, στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων» του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω το καθηγητή κ. Νυχά Γεώργιο, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με τον υπέροχο κόσμο των μικροοργανισμών, καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια του σε όποια δυσκολία συναντούσα. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την Δρ. Αλεξάνδρα Λιανού για τη βοήθεια της στο εργαστήριο και για τις πολύτιμες συμβουλές της, καθώς και την υποψήφια διδάκτωρ Αθηνά Ροπόδη για τη βοήθειά της στην ανάλυση των δεδομένων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, και την οικογένειά μου η οποία με στήριξε ψυχικά και οικονομικά κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Ατομική δέσμευση σε μια ομαδική προσπάθεια , αυτό είναι που κάνει μια ομάδα να δουλέψει, μια εταιρεία να δουλέψει, μια κοινωνία να δουλέψει, ένα πολιτισμό να δουλέψει. (Βινς Λομπάρντι).

Σας Ευχαριστώ

Περίληψη

Η αυξανόμενη ζήτηση του καταναλωτικού κοινού για υψηλά επίπεδα ποιότητας και ασφάλειας στις παραγωγικές διαδικασίες τροφίμων, απαιτεί την εφαρμογή κατάλληλων προτύπων διασφάλισης ποιότητας καθώς και μεθόδων ελέγχου της διαδικασίας. Σημαντικό μέρος των προτύπων αυτών είναι οι ενόργανες μέθοδοι ανάλυσης οι οποίες θα πρέπει να είναι μη καταστροφικές για το δείγμα και να παρέχουν γρήγορα αποτελέσματα με μικρή προετοιμασία δείγματος. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, παρουσιάζεται η εφαρμογή ταχέων μη επεμβατικών μεθόδων (φασματοσκοπία FT-IR , ανάλυση εικόνας) στον προσδιορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών βρεφικών συνταγών κρέμας και σκόνης τόσο στη βασική συνταγή όσο και στις συνταγές που τροποποιήθηκαν σε κάθε συστατικό. Συνδυαστικά με όλα τα παραπάνω, οι ίδιες τεχνικές χρησιμοποιήθηκαν για έτοιμα προϊόντα των κρεμών του εμπορίου τα οποία εξετάστηκαν και μικροβιολογικά για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πιθανής επιμόλυνσής τους. Η επεξεργασία των δεδομένων που λήφθηκαν από τις μη επεμβατικές μεθόδους έγινε με τη χρήση των χημειομετρικών τεχνικών ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες και διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Principal Components Analysis, PCA και Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA). Η χρήση της πολυμεταβλητής τεχνικής διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) φάνηκε να έχει αποτελεσματικότητα στην ομαδοποίηση των πρότυπων βρεφικών συνταγών που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, τόσο σε μορφή κρέμας όσο και σε μορφή σκόνης, από τις συνταγές που τροποποιήσαμε σε κάθε συστατικό. Από τη χρήση των τεχνικών πολυμεταβλητής ανάλυσης στα τελικά προϊόντα κρεμών παρατηρήθηκε διάκριση μεταξύ των διαφορετικών εταιριών που προμηθεύουν τα εμπορικά σκευάσματα, ενώ οι μικροβιολογικές αναλύσεις έδειξαν ότι τα επιδόρπια κρέμας βανίλιας αποτελούν σταθερά προϊόντα ως προς τη μικροβιολογική αλλοίωση στα πλαίσια ενδεικνυόμενης μεταφοράς και συντήρησης.

Λέξεις κλειδιά: μη επεμβατικές μέθοδοι , FT-IR, ανάλυση εικόνας, βρεφικές κρέμες, μικροβιολογικά χαρακτηριστικά, χημειομετρία.

Abstract

The increasing demand of consumers for high quality and safety in food production processes, requires the implementation of appropriate quality assurance standards and methods of monitoring the process. A significant part of these standards are instrumental methods of analysis which should be non-destructive to the sample and provide quick results with little sample preparation. In this thesis, presents the application of rapid non-invasive methods (FT-IR spectroscopy, image analysis) to determine the physicochemical characteristics of infant cream and powder formulas both in the basic recipes and the recipes were modified in each component. Together all these above, the same techniques used for finished products of commercial creams which were examined microbiologically for detecting and quantifying the possible contamination. Processing of the data received from the non-invasive methods was used of Chemometrics analysis techniques in principal components analysis and discriminant partial least squares (Principal Components Analysis, PCA and Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA). The use of multivariate discriminant analysis technique partial least squares (PLS-DA) appeared to have efficacy in the grouping of standard infant formula prepared in the laboratory, both cream and powder, of the recipes that we modified in each component. By using the techniques of multivariate analysis in the final cream products observed distinction between different companies supplying the commercial formulations, while the microbiological analyzes showed that vanilla cream desserts are stable products in microbiological spoilage.

Key words: FT-IR spectrometry, infant creams, microbiological characteristics, chemometrics

1. Εισαγωγή

1.1 Βρεφικές τροφές

Η περίοδος της βρεφικής και παιδικής ηλικίας χαρακτηρίζεται από ειδική συμπεριφορά στη διατροφή σε σχέση με τις απαιτήσεις για την ενέργεια και για τα θρεπτικά συστατικά, ποσά που υπολογίζονται ανά κιλό μάζας σώματος. Σε αυτές τις ηλικίες, η διατροφή, πέραν του να εξασφαλίζει τη διατήρηση των σωματικών λειτουργιών, θα πρέπει επίσης να υποστηρίζει την με ταχύτατο ρυθμό ανάπτυξη του βρέφους. Η ανάπτυξη αυτή οδηγεί σε διπλασιασμό του σωματικού βάρους μεταξύ της γέννησης και της ηλικίας των τριών έως τεσσάρων μηνών και σε ένα τριπλασιασμό από την ηλικία των 12 μηνών, καταναλώνοντας περίπου 27%, 11% και 5% των συνολικών ενεργειακών δαπανών (TEE) ανάλογα με το τύπο της βρεφικής τροφής από τη γέννηση έως τέσσερις μήνες, από τέσσερις έως έξι μήνες και από έξι έως 12 μήνες, αντιστοίχως (Fomon, 1993).

Επιπλέον, τα μεταβολικά δραστικά όργανα των βρεφών, όπως ο εγκέφαλος, το ήπαρ, η καρδιά και τα νεφρά, είναι, σε σχέση με το σωματικό βάρος τους, μεγαλύτερα από αυτά των ενηλίκων (20% έναντι 5% του σωματικού βάρους), παρά το γεγονός ότι δεν φθάνουν το 50% του μεγέθους των αντίστοιχων ενηλίκων μέχρι το τέλος του δεύτερου έτους της ζωής (Prentice *et al.*, 2013). Αυτά τα τέσσερα όργανα αντιπροσωπεύουν ένα μεγαλύτερο ποσοστό των δαπανών της ενέργειας ηρεμίας (REE) από ότι στους ενήλικες (π.χ. ο εγκέφαλος υπολογίζεται στο 65% στο νεογέννητο σε σύγκριση με περίπου 20% σε ενήλικες). Μια άλλη ιδιαιτερότητα στα νεαρά βρέφη είναι ότι η συνθετική ικανότητα για μερικά μεταβολικά ενδιάμεσα μπορεί να περιορίζεται, καθιστώντας τέτοιες ουσίες μη απαραίτητες στη διατροφή. Ομοιοστατικοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν τις διατροφικές ανισορροπίες σε ενήλικες μπορεί να είναι ανώριμοι στις βρεφικές ηλικίες όσον αφορά στην απορρόφηση και στην αποβολή των ουσιών και, λόγω του μικρού μεγέθους του σώματος, οι αποθήκες των θρεπτικών ουσιών (π.χ. γλυκογόνου) είναι πολύ χαμηλές για να αντισταθμίσουν την ανεπαρκή πρόσληψη. Επιπλέον, η ποσότητα και η ποιότητα των θρεπτικών συστατικών κατά τη διάρκεια της βρεφικής και παιδικής ηλικίας έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με μακροχρόνιες επιπτώσεις στη μελλοντική υγεία, γνωστική ανάπτυξη και στην εμφάνιση ασθενειών (Barker, 1994, Lucas, 1998). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των βρεφών είναι ότι, κατά κανόνα, μία υγρή τροφή είναι η μόνη πηγή διατροφής τους και έτσι πρέπει να παρέχονται οι κατάλληλες ποσότητες ενέργειας, νερού και θρεπτικών συστατικών μέσω αυτής. Το μητρικό γάλα είναι η προτιμώμενη τροφή για όλα τα υγιή βρέφη και παρέχει επαρκή ποσότητα όλων των θρεπτικών ουσιών για την υποστήριξη και υγιή τους ανάπτυξη (με την εξαίρεση της βιταμίνης K κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της ζωής και της βιταμίνης D), ενώ επίσης παρέχει προστασίας έναντι μολύνσεων και λοιμώξεων. Συγκριτικές μελέτες σε εύπορες χώρες έχουν δείξει

σημαντικά πλεονεκτήματα του θηλασμού έναντι στη σίτιση με βρεφικά σκευάσματα για τα βρέφη, όπως χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης γαστρεντερικών και αναπνευστικών λοιμώξεων (Ip *et al.*, 2007, Agostoni *et al.*, 2009) και κατώτερο κίνδυνο παχυσαρκίας (von Kries *et al.*, 1999, Toschke *et al.*, 2002, Owen *et al.*, 2005). Το μητρικό γάλα είναι, ως εκ τούτου, το μοντέλο για τη σύνθεση των παρασκευασμάτων για βρέφη, λαμβάνοντας υπόψη ότι ένα υποκατάστατο του μητρικού γάλακτος δεν πρέπει μόνο να μιμηθεί τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος, αλλά και να αποσκοπεί στην επίτευξη παρόμοιων επιπτώσεων στην υγεία (Koletzko *et al.*, 2005).

Στα παραπάνω πλαίσια, βρεφικά σκευάσματα, τόσο πρώτης όσο και δεύτερης βρεφικής ηλικίας, έχουν θεσπιστεί ως τρόφιμα για ειδική διατροφή σύμφωνα με την οδηγία 2009/39 / EC10, καθώς και την οδηγία 2006/141 / EC11 η οποία βασίζεται σε μια σειρά εκθέσεων από την Επιστημονική Επιτροπή Τροφίμων (EET, 1983 , 1989, 1991, 1993α, 1995, 2003c).

1.1.1 Γενικά

Όπως αναφέρθηκε, αναγνωρίζεται διεθνώς ότι το μητρικό γάλα είναι η καλύτερη πηγή διατροφής για τα βρέφη. Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις όπου μπορεί να είναι ανεπαρκές ή να μην είναι διαθέσιμο, και έτσι τίθεται αναγκαίο να συμπληρωθεί ή να αντικατασταθεί. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ως διαιτητικά υποκατάστατα χρησιμοποιούνται κονιοποιημένοι τύποι γάλακτος, «φόρμουλες σκόνης» (powdered formula, PF), που περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται για βρέφη, τα οποία χρησιμεύουν ως τη μόνη πηγή τροφής
- Παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με άλλα τρόφιμα ως μέρος της διατροφής απογαλακτισμού των βρεφών και μικρών παιδιών
- Παρασκευάσματα σε σκόνη για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που απευθύνονται σε βρέφη και μικρά παιδιά και τα οποία προορίζονται για τη μερική αντικατάσταση ή συμπλήρωση του μητρικού γάλακτος
- Τρόφιμα εμπλουτισμού του γάλακτος που χρησιμοποιούνται για τη συμπλήρωση του μητρικού γάλακτος (CAC/RCP 66 – 2008)

Τα προϊόντα αυτά πρέπει να διακρίνονται από τα έτοιμα-προς-τροφή, υγρής μορφής προϊόντα, που έχουν εμπορικώς αποστειρωθεί (EFSA, 2013).

Δεδομένου ότι οι κονιοποιημένοι τύποι γάλακτος, είναι μη αποστειρωμένα προϊόντα, δεν είναι δυνατόν να αποκλεισθεί η παρουσία μικροοργανισμών, όχι

τουλάχιστον σε χαμηλά πληθυσμιακά επίπεδα. Συνεπώς, η μικροβιολογική τους ασφάλεια απαιτεί την αυστηρή τήρηση ορθών πρακτικών υγιεινής κατά τη διάρκεια τόσο της κατασκευής όσο και της χρήσης.

Ορισμένες εμπορικές εταιρείες που παράγουν βρεφικές τροφές έχουν επεκτείνει τις γραμμές τους για να παράγουν εξειδικευμένα τρόφιμα που απευθύνονται σε νήπια από την ηλικία περίπου των 12 μηνών (Ronald *et al.*, 1998). Τέτοια τρόφιμα περιλαμβάνουν δημητριακά, μικρά γεύματα για φούρνο μικροκυμάτων και άλλα τρόφιμα που έχουν σχεδιαστεί και διατίθενται στο εμπόριο για παιδιά νηπιακής ηλικίας.

Τύποι βρεφικών σκευασμάτων εκτός γαλακτοκομικών προϊόντων

A) Δημητριακά

Σε μια τυπική ημέρα περίπου το ήμισυ των βρεφών στις Η.Π.Α. ηλικίας 4-5 μηνών καταναλώνουν βρεφικά δημητριακά, είτε ως έχουν είτε αναμεμιγμένα με άλλα τρόφιμα. Επίσης, περίπου το 90% των βρεφών ηλικίας 6-12 μηνών καταναλώνουν κάποιο είδος σιτηρών, αν και μόνο τα μισά τρώνε δημητριακά με προδιαγραφές για βρέφη. Τα υπόλοιπα βρέφη τρώνε ρύζι, ψωμί, κράκερ, ζυμαρικά, ή δημητριακά που έχουν σχεδιαστεί για μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά (Siega-Riz *et al.*, 2010).

B) Φρούτα

Σε οποιαδήποτε δεδομένη ημέρα, περίπου το 20% των βρεφών ηλικίας 4-5 μηνών, τρώνε κάποιο είδος καρπών (Siega-Riz *et al.*, 2010). Όπως συμβαίνει με όλα τα τρόφιμα αυτού του είδους, η κατανάλωση φρούτων μπορεί να φορά σε μικρές μερίδες κάποιου φρούτου ή σε κάποιο τρόφιμο που έχει φρούτα ως επιμέρους συστατικά του. Τα δύο τρίτα των βρεφών ηλικίας 6-9 μηνών και μεταξύ του 75% και 85% των βρεφών και των νηπίων ηλικίας άνω των εννέα μηνών, καταναλώνουν κάποιο είδος φρούτου.

Στην ηλικία 6-9 μηνών, τα μισά από τα βρέφη τρώνε προετοιμασμένα για βρέφη τρόφιμα από φρούτα, αλλά νήπια ηλικίας 12 μηνών και άνω κατά κύριο λόγο τρώνε κανονικά φρούτα, όπως φρέσκες μπανάνες ή κονσερβοποιημένα φρούτα. Τα μήλα και οι μπανάνες είναι κοινά φρούτα για βρέφη όλων των ηλικιών. Ο χυμός φρούτων, κυρίως μήλων και σταφυλιών, συνήθως εισάγεται αργότερα από τους καρπούς, και περίπου τα μισά από τα μεγαλύτερα βρέφη και νήπια πίνουν κάποιο είδος 100% φυσικών χυμών φρούτων (Siega-Riz *et al.*, 2010).

Γ) Λαχανικά

Σε μια τυπική ημέρα, περίπου το ένα τέταρτο των βρεφών ηλικίας 4-5 μηνών, τρώνε κάποιο είδος λαχανικών τουλάχιστον μία φορά, πάντα με τις προδιαγραφές που περιλαμβάνουν οι βρεφικές τροφές, συνήθως ένα κίτρινο ή πορτοκαλί λαχανικό, όπως είναι τα καρότα, κολοκύθες και γλυκοπατάτες (Siega-Riz et al., 2010). Στην ηλικία των 6-9 μηνών, περίπου το 60% των βρεφών και περίπου το 70% των νηπίων και μικρών παιδιών, τρώνε λαχανικά, με τα λαχανικά για παιδικές τροφές γρήγορα να αντικαθίστανται από μαγειρεμένα λαχανικά μετά από περίπου εννέα μήνες. Ωμά λαχανικά δεν καταναλώνονται συχνά από βρέφη και νήπια. Με τα πρώτα γενέθλια, σχεδόν το ένα τρίτο των μωρών τρώνε πατάτες (Siega-Riz et al., 2010).

Δ) Κρέας

Πολύ λίγα βρέφη 4-5 μηνών τρώνε κρέας ή άλλη πηγή πρωτεΐνης (εκτός από το γάλα) (Siega-Riz et al., 2010). Έξι έως εννέα μηνών τα μωρά τρώνε κρέας κυρίως ως μέρος ενός τροφίμου σχεδιασμένο για βρέφη που περιέχει μια μικρή ποσότητα του κρέατος μαζί με λαχανικά ή δημητριακά. Περίπου τα τρία τέταρτα των βρεφών από 9-12 μηνών δίνεται είτε κρέας ή άλλη πηγή πρωτεϊνών, όπως τα αυγά, το τυρί, το γιαούρτι, τα φασόλια και οι ξηροί καρποί. Περισσότερο από το 90% των βρεφών ηλικίας 12-18 μηνών, και σχεδόν σε όλα τα νήπια μεγαλύτερης ηλικίας, δίνεται μια πηγή πρωτεΐνης τουλάχιστον μία φορά την ημέρα.

1.1.2 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά βρεφικών τροφών

Τα βρέφη και τα παιδιά αποτελούν μια ιδιαίτερα ευάλωτη ομάδα, μεταξύ των οποίων νεογνά, βρέφη κάτω των δύο μηνών, πρόωρα βρέφη, χαμηλού βάρους γέννησης ή ανοσοκατεσταλμένα βρέφη διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο. Ως εκ τούτου, υπάρχει ανάγκη θέσπισης ειδικών μέτρων για την αποφυγή ασθενειών που προλαμβάνονται.

Οι μικροοργανισμοί ή μικροβιακές τοξίνες που προκαλούν ανησυχία με τη παρουσία τους στη βρεφική σκόνη γάλακτος και η δύναμη των αποδεικτικών στοιχείων της αιτιώδους σχέσης μεταξύ της παρουσίας τους και των ασθενειών που σχετίζονται με τα βρέφη, ταξινομήθηκαν ως εξής (WHO/FAO, 2004):

"Α" ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Τα βακτήρια *Cronobacter sakazakii* και *Salmonella enterica* είναι στην κατηγορία "Α" επειδή και τα δύο είναι καθιερωμένες αιτίες ασθενειών σε βρέφη (π.χ. συστηματική μόλυνση, νεκρωτική εντεροκολίτιδα [NEC] και σοβαρή διάρροια), και έχουν βρεθεί σε συνταγή βρεφικής σκόνης. Μολυσμένα βρεφικά γάλατα σε σκόνη έχουν

συσχειστεί, τόσο επιδημιολογικά όσο και μικροβιολογικά, με βακτηριακές μολύνσεις σε βρέφη (WHO/FAO, 2004).

- *Cronobacter sakazakii* (παλαιότερα γνωστό ως *Enterobacter sakazakii*): Gram-αρνητικό, μη-σπορογόνο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Σε μερικές περιπτώσεις, έχει συνδεθεί με σποραδικά περιστατικά σηψαιμίας, μηνιγγίτιδας και νεκρωτικής εντεροκολίτιδας. Ενώ το *Cr. sakazakii* έχει προκαλέσει νόσο σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, η παρουσία του έχει επικεντρωθεί σε περιπτώσεις που αναφέρονται σε βρέφη κάτω των 28 ημερών. Είναι επίσης πιθανό, ότι ανοσοκατεσταλμένα βρέφη είναι πιο επιρρεπή σε μολύνσεις από *Cr. sakazakii*.

Τα ποσοστά θνησιμότητας έπειτα από μόλυνση με *Cr. sakazakii* έχουν αναφερθεί να είναι υψηλά, προσεγγίζοντας το 50% ή περισσότερο, αλλά το ποσοστό αυτό έχει μειωθεί σε κάτω από 20% τα τελευταία χρόνια. Ενώ η νόσος έχει συνήθως ανταπόκριση σε θεραπεία με αντιβιοτικά, ένας αριθμός επιστημόνων έχουν αναφέρει αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά σε φάρμακα που χρησιμοποιούνται συνήθως για την αρχική θεραπεία της λοίμωξης. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί η δυνατότητα παραγωγής β-λακταμασών και κεφαλοσπορινασών από στελέχη του *Cr. sakazakii* (Pitout et al., 1997).

Το στομάχι των νεογνών, ιδιαίτερα των πρόωρων, είναι λιγότερο όξινο από ότι των ενηλίκων: ένας πιθανώς σημαντικός παράγοντας που συμβάλλει στην επιβίωση μιας μόλυνσης με *Cr. sakazakii* σε βρέφη. Η συχνότητα μόλυνσης βρεφικής σκόνης γάλακτος από *Cr. sakazakii* είναι ανησυχητική, παρόλο που τα επίπεδα συγκέντρωσης του βακτηρίου φαίνεται να είναι συνήθως πολύ χαμηλά (EFSA, 2004).

- *Salmonella enterica*: Gram-αρνητικό, μη-σπορογόνο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Η συχνότητα εμφάνισης της σαλμονέλλωσης μεταξύ των βρεφών αναφέρεται να είναι περισσότερο από οκτώ φορές μεγαλύτερη από την συχνότητα σε όλες τις ηλικίες στις Η.Π.Α. (CDC, 2004). Δεν είναι σαφές αν η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της σαλμονέλλωσης μεταξύ των βρεφών προκύπτει από τη μεγαλύτερη ευαισθησία αυτής της ηλικιακής ομάδας, ή αν τα βρέφη είναι πιο πιθανό από ότι τα άτομα από άλλες ηλικιακές ομάδες να εξεταστούν και να λάβουν ιατρική περίθαλψη. Τουλάχιστον έξι αναφερθέντα κρούσματα σαλμονέλλωσης μετά από τη συμμετοχή περίπου 287 νήπιων έχουν συσχετιστεί με PF μεταξύ 1985 και 2005. Στα περισσότερα από αυτά τα κρούσματα εμπλέκονται ασυνήθιστοι ορότυποι *Salmonella*, οι οποίοι πιθανόν βοήθησαν στην αναγνώριση των κρουσμάτων αυτών (CAC/RCP 66 – 2008).

Υπάρχουν τέσσερις τρόποι με τους οποίους τα βακτήρια *Cr. sakazakii* και *S. enterica* μπορεί να εισέλθουν στη βρεφική σκόνη (PF):

- 1) Μέσω των συστατικών που προστίθενται στις επιχειρήσεις κατά τη ξηρή ανάμιξη στη διάρκεια της κατασκευής της PF,
- 2) Μέσω της μόλυνσης από το περιβάλλον επεξεργασίας κατά τη διάρκεια της ξήρανσης ή μετά από αυτή,
- 3) Μέσω της μόλυνσης της βρεφικής σκόνης μετά το άνοιγμα της συσκευασίας,
- 4) Μέσω της μόλυνσης κατά τη διάρκεια της ανασύστασης, ή μετά από αυτήν, από τον φροντιστή πριν την τροφοδοσία (CAC/RCP 66 – 2008)

Δόση-απόκριση (Dose-response)

Λόγω των περιορισμένων διαθέσιμων πληροφοριών σχετικά με τη δράση του *Cr. sakazakii*, ιδίως όσον αφορά τον αριθμό των οργανισμών που έχουν ασθενήσει μετά από έκθεση στον μικροοργανισμό, δεν ήταν δυνατόν να αναπτυχθεί μια καμπύλη δόσης-απόκρισης για αυτό το παθογόνο.

Για την επίτευξη της αξιολόγηση του κινδύνου, η εκτίμηση ασφάλειας σε περίπτωση μόλυνσης ανά οργανισμό (r-τιμή στο εκθετικό μοντέλο) βασίζεται σε ορισμένες τιμές των οποίων η εκτίμηση μπορεί να γίνει, υποθέτοντας ότι μόλυνση θα περιέχει έναν μόνο οργανισμό. Δεδομένου ότι η ανάπτυξη θα συμβεί, αυτό θα είναι πάντα μια τιμή ασφαλούς αστοχίας και η πραγματική τιμή θα είναι ένας ακόμη μικρότερος αριθμός.

Σε μία χώρα αναφέρθηκαν δέκα κρούσματα λοιμώξεων από *E.sakazakii* σε νεογνά πάνω από 40 χρόνια. Ένα σύνολο των 12500 μωρών γεννιούνται ανά εκατομμύριο ανθρώπους στη χώρα ετησίως. Από αυτά τα μωρά, 2% θεωρείται ότι θα γεννηθεί με βάρος γέννησης κάτω των 2000 g. Αυτό σημαίνει ότι τα 250 μωρά από 2000 g ή λιγότερο γεννήθηκαν ανά εκατομμύριο ανθρώπους ετησίως. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι υποθέσεις αυτές έγιναν με βάση τις συγκεκριμένες πληροφορίες που διατίθενται σε μία συγκεκριμένη χώρα και ότι ο αριθμός των χαμηλού βάρους μωρών θα διαφέρουν από τη μία χώρα στην άλλη. Επίσης, χαμηλού βάρους βρέφη θεωρούνται γενικά να είναι από 2500 g ή λιγότερο. Επειδή κονιοποιημένη βρεφική φόρμουλα είναι μια πηγή διατροφής για πολλά βρέφη που διατρέχουν κίνδυνο, ένας πολύ μεγάλος αριθμός των μερίδων καταναλώνονται. Έτσι, υπάρχει μια μικρή πιθανότητα ότι ακόμη και μία ή λίγες ανασυσταθέντες βρεφικές σκόνες γάλακτος θα μπορούσαν να προκαλέσει ασθένεια. Θεωρήθηκε ότι 300 τροφοδοτήσεις παρέχονται σε ένα μωρό σε ένα μήνα, και ότι μέσα στη ζωή του μωρού η περίοδος κινδύνου είναι 1 μήνας. Σε επίπεδο πληθυσμού, όπου υπολογίζεται ότι 250 μωρά

ανά εκατομμύριο ανθρώπους ετησίως ζυγίζουν 2000 g ή λιγότερο, 75000 τροφές (250 μωρά × 300 τροφές) καταναλώνονται. Σε μια περίοδο 40, στο επίπεδο του πληθυσμού, 45000000 τροφές καταναλώνονται από τα μωρά των 2000 g, δηλαδή 75000 (τροφοδοτεί ετησίως ανά εκατομμύριο κατοίκων) × 40 (αρ. Χρόνια) × 15 (εκατομμύρια πληθυσμού).

Η πιθανότητα (P) της λοίμωξης είναι ίσος με τον αριθμό των υποθέσεων/αριθμός των ανοιγμάτων σε έναν οργανισμό.

Για την προσέγγιση της σχέσης δόσης-απόκρισης σε χαμηλές δόσεις, $P = rD$, όπου r είναι η μολυσματικότητα ανά οργανισμό και D είναι η δόση ή το ποσό κατάποσης του οργανισμού.

Δεδομένου ότι η παραδοχή ότι όλες οι μολυσμένες μερίδες περιέχουν μόνον ένα οργανισμό, $D = 1$. Τότε $P = r * 1$, το οποίο είναι ίσο με τον αριθμό των υποθέσεων/αριθμός των ανοιγμάτων σε έναν οργανισμό.

Έτσι, $r = 0$ αριθμός των περιπτώσεων/αριθμός των ανοιγμάτων σε έναν οργανισμό. Αν η πιθανότητα ενός οργανισμού που είναι παρόντες στη ζωοτροφή είναι 0.025 (επιπολασμός), ο αριθμός των μολυσμένων τροφοδοτήσεων ανά 40 χρόνια για μωρά από 2 000 g ή λιγότερο σε αυτή τη χώρα, δηλαδή ο αριθμός των ανοιγμάτων σε έναν οργανισμό, υπολογίζεται ως $45000000 \times 0.025 = 1125000(2)$. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο αριθμός των κρουσμάτων στη χώρα αυτή σε 40 χρόνια είναι 10(1).

Τότε το R είναι υπολογίζεται ως εξής:

$$(1)/(2) = 10/1125000 = 8,9 \times 10^{-6}$$

Η τιμή αυτή βασίζεται σε έναν υπολογισμό χρησιμοποιώντας επιλεγμένες τιμές τέτοιες ώστε η μολυσματικότητα να έχει υπερεκτιμηθεί. Εάν η δόση είναι μικρότερη από 10000, μπορεί να υποτεθεί ότι « $1 - \exp(-RD) \approx (-RD)$ » και η επίδραση της δόσης είναι στη γραμμική περιοχή (EFSA, 2004, FAO/WHO, 2006)

"B" ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Άλλες βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae ανήκουν στην κατηγορία "B" επειδή, αν και έχουν αναγνωρισθεί ως αιτίες ασθενειών σε βρέφη (π.χ. συστηματική λοίμωξη, και σοβαρή διάρροια) και έχουν βρεθεί σε βρεφικά γάλατα σε μορφή σκόνης, δεν υπάρχουν επαρκείς αποδείξεις (επιδημιολογικές ή μικροβιολογικές) για

τη σύνδεση μολυσμένης φόρμουλας γάλακτος σε σκόνη και λοιμώξεων σε βρέφη (WHO/FAO, 2004). Μικροοργανισμοί που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι οι ακόλουθοι: συνύπαρξη *Pantoea* spp. και *Escherichia vulneris* (γνωστό και ως *Enterobacter agglomerans*), *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *C. freundii*, *Klebsiella oxytoca* και *Enterobacter cloacae*.

Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι αυξημένης σημασίας ως παθογόνα νεογνών και, όντας *Enterobacteriaceae* (είναι γνωστό ότι είναι παρούσα σε χαμηλά επίπεδα σε βρεφικά παρασκευάσματα σκόνης), είναι εν δυνάμει υποψήφια παθογόνα που μπορούν να μεταδοθούν μέσω της κονιοποιημένης βρεφικής φόρμουλας. (Thurm και Gericke, 1994).

"Γ" ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στην κατηγορία "Γ" είναι βακτήρια που (i) αν και δυνητικά προκαλούν ασθένεια σε βρέφη (π.χ. συστηματική μόλυνση, NEC και σοβαρή διάρροια), δεν έχουν εντοπιστεί σε βρεφική σκόνη, ή (ii) αν και έχουν εντοπιστεί σε βρεφική σκόνη, δεν έχουν συσχετιστεί με περιστατικά βρεφικών λοιμώξεων. Αυτοί οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν τα βακτηριακά είδη *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, *C. botulinum*, *Staphylococcus aureus* και τη *Listeria monocytogenes*.

Το *Bacillus cereus* είναι ένα Gram-θετικό σπορογόνο είδος που εκκρίνει μια εντεροτοξίνη η οποία έχει απομονωθεί από ανασύσταση βρεφικού γάλακτος σκόνης (Rowan και Anderson, 1998). Παρά το γεγονός ότι ένα επιβεβαιωμένο κρούσμα που σχετίζεται με τα παρασκευάσματα για βρέφη έχει αναφερθεί στη Χιλή (Cohen et al., 1984), ωστόσο καμία ένδειξη δεν υπήρξε που να επιβεβαίωνε τη μόλυνση από *B. cereus*. Έτσι, η αιτιώδης σχέση μεταξύ της βρεφικού γάλακτος σε σκόνη και της λοίμωξης από *B. cereus* δεν αποδείχθηκε. Το *Clostridium difficile* είναι συχνός αποικιστής των νεογνών, συνήθως χωρίς κλινικές εκδηλώσεις. Σε μια μελέτη, η οποία διενεργήθηκε με στόχο την επιδημιολογική διερεύνηση του θανάτου δύο βρεφών (σύνδρομο αιφνίδιου βρεφικού θανάτου, SDIS) τα κόπρανα των οποίων βρέθηκαν θετικά για το *C. difficile*, διαπιστώθηκε ότι νεογνά που τρέφονταν με βρεφική φόρμουλα είχαν σημαντικά μεγαλύτερο αποικισμό από το παραπάνω παθογόνο σε σχέση με εκείνα που θηλάζουν (Cooperstock et al., 1982).

1.1.3 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των βρεφικών τροφών

Σύμφωνα με τον CODEX STAN 72-1981, τα παρασκευάσματα για βρέφη χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα του μητρικού γάλακτος ή σαν συμπλήρωμα διατροφής, είναι ειδικά κατασκευασμένα για να ικανοποιούν, από μόνα τους, τις ανάγκες διατροφής των βρεφών κατά τους πρώτους μήνες της ζωής τους μέχρι την εισαγωγή κατάλληλων συμπληρωματικών τροφών. Το προϊόν είναι επεξεργασμένο

και συσκευασμένο με τέτοιο τρόπο ώστε να αποτρέπει την είσοδο και ανάπτυξη μικροοργανισμών (CODEX STAN 72-1981). Το γάλα σκόνης είναι υγροσκοπική ουσία. Τέτοιες ουσίες τείνουν να προσελκύουν το νερό εύκολα από υγρές ατμόσφαιρες. Όταν τα επίπεδα υγρασίας είναι υπερβολικά, το γάλα σκόνης μπορεί να γίνει κολλώδες, συμπαγές ή άμορφο, και εμφανίζει μειωμένη ρευστότητα και διαλυτότητα. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν την ευκολία χρήσης του προϊόντος και μπορεί να επηρεάσουν και τη γεύση του, αλλά δεν δημιουργούν όμως πρόβλημα στην ασφάλεια του προϊόντος (Semeniuc, 2011). Η αδιαλυτότητα αποδίδεται γενικά στην αντίδραση Maillard, η οποία περιλαμβάνει τη μείωση των σακχάρων και των πρωτεϊνών. Μελέτες αποθήκευσης των γαλακτοκομικών προϊόντων σε σκόνη έχουν δείξει ότι τα προϊόντα που αποθηκεύονται σε μια ποικιλία συνθηκών μπορεί να εμφανίσει μικρές αλλαγές διαλυτότητας.

Σε ορισμένες μελέτες, το pH του γάλακτος σε σκόνη που αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου φάνηκε να μειώνεται. Η μεταβολή του pH μπορεί επίσης να αποδοθεί στην συγκόλληση των αμινομάδων με λακτόζη στην αντίδραση Maillard. Οι σκόνες γάλακτος περιέχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις λακτόζης και πρωτεΐνης υψηλού περιεχομένου σε λυσίνη (ένα αμινοξύ). Υπό την παρουσία υγρασίας, τα συστατικά αυτά μπορούν να συμμετέχουν άμεσα στην αντίδραση Maillard (Celestino, 1997). Αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην ποιότητα της πρωτεΐνης που συνοδεύεται ή ακολουθείται από ανεπιθύμητες αλλαγές χρώματος. Συνήθως τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία των συνθηκών αποθήκευσης έχουν επίδραση στην αντίδραση Maillard (Labuza, 1982).

Οι σκόνες γάλακτος περιέχουν και τα είκοσι ένα πρότυπα αμινοξέα, τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών, και είναι πλούσια σε διαλυτές βιταμίνες και μέταλλα. Σύμφωνα με USAID, (USAID, 2009) οι τυπικές μέσες ποσότητες κύριων θρεπτικών συστατικών του άπαχου γάλακτος σκόνης είναι (κατά βάρος) 36% πρωτεΐνη, 52% υδατάνθρακες (κυρίως λακτόζη), ασβέστιο 1,3%, 1,8% κάλιο, του πλήρους γάλακτος σε σκόνη, από την άλλη πλευρά, περιέχει κατά μέσο όρο 25-27% πρωτεΐνη, 36-38% υδατάνθρακες, 26-40% λίπος, και 5-7% τέφρα (ορυκτά). Ωστόσο, ακατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης, όπως η υψηλή σχετική υγρασία και υψηλή θερμοκρασία περιβάλλοντος μπορεί να υποβαθμίσει σημαντικά την θρεπτική αξία του γάλακτος σε σκόνη (Okamoto, 1985). Οι εμπορικές σκόνες γάλακτος έχει αναφερθεί ότι περιέχουν οξυστερόλες (οξειδωμένη χοληστερόλη) (Fox *et al.*, 2006) σε υψηλότερες ποσότητες από ό, τι σε φρέσκο γάλα (μέχρι 30 $\mu\text{g} / \text{g}$, έναντι ίχνη σε φρέσκο γάλα) (Dabrowski, 2004). Οι οξυστερόλες είναι παράγωγα της χοληστερόλης που παράγονται είτε από ελεύθερες ρίζες ή από ένζυμα. Μερικές ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από οξυστερολών έχουν ενοχοποιηθεί ύποπτοι ως εμπνευστές των αθηρωματικών πλακών (The Associated Press, 2013).

1.2 Αλλοίωση τροφίμων

Αλλοίωση των τροφίμων μπορεί να οριστεί ως "οποιαδήποτε αισθητήρια αλλαγή (απτικά, οπτικά, οσφρητικά ή γευστικά)", την οποία ο καταναλωτής θεωρεί ως μη αποδεκτή. Αλλοίωση μπορεί να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας. Αλλοιώσεις μπορεί να προκύψουν από έντομα, από βλάβες στο σώμα του τροφίμου, αυτόχθονη δραστηριότητα ενζύμου στο ζωικό ή φυτικό ιστό ή από μικροβιακές λοιμώξεις (Abdel-Aziz *et al* ,2016). Τα περισσότερα φυσικά τρόφιμα έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής. Ευπαθή τρόφιμα όπως τα ψάρια, το κρέας και το ψωμί έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Άλλα τρόφιμα μπορούν να διατηρηθούν για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, αλλά αποσυντίθεται τελικά (Martorell *et al*,2005). Τα ένζυμα μπορεί να επιφέρουν την καταστροφή των πολυμερών σε ορισμένα τρόφιμα, ενώ οι χημικές αντιδράσεις, όπως η οξειδωση και η τάγγιση αποσυνθέτουν άλλους, αλλά η κύρια αιτία της αλλοίωσης των τροφίμων είναι εισβολή μικροοργανισμών , όπως μύκητες, ζύμες και βακτήρια. Σε περίπτωση αλλοίωσης από μύκητα , παρατηρείται μία χνουδωτή ανάπτυξη και το φαγητό γίνεται μαλακό ενώ συχνά μυρίζει άσχημα. Η μόλυνση από βακτήρια είναι πιο επικίνδυνη, διότι πολύ συχνά τα τρόφιμα δε φαίνεται να έχουν κάτι, οπότε ακόμη κι αν έχουν μολυνθεί σοβαρά, μπορεί να φαίνονται απολύτως φυσιολογικά. Ακόμα πιο επικίνδυνη είναι η παρουσία τοξινών και των σπορίων που προέρχονται από τα βακτήρια η παρουσία των οποίων συχνά δεν ανιχνεύεται μέχρι και μετά το ξέσπασμα της τροφικής δηλητηρίασης, μόνο εργαστηριακή εξέταση αποκαλύπτει αυτό τον μολυσματικό παράγοντα(Rawat,2015).

1.2.1 Γενικά

Αιτίες αλλοίωσης τροφίμων

Οι κυριότερες αιτίες της αλλοίωσης των τροφίμων περιλαμβάνουν:

1. Μικροοργανισμούς, την ανάπτυξη και τη δραστηριότητά τους

Οι μικροοργανισμοί ικανοί να χαλάσουν τα τρόφιμα και είναι παρών συνήθως στο έδαφος, το νερό και τον αέρα, στο δέρμα των βοοειδών, τα φρούτα και τα λαχανικά, στα φτερά των πουλερικών .Επίσης μικροοργανισμοί μεταφέρονται από τα ρούχα και το δέρμα του προσωπικού χειρισμού μέσα σε μία βιομηχανία τροφίμων, στον εξοπλισμό επεξεργασίας και μέσα στα έντερα και τις κοιλότητες του σώματος των ανθρώπων και των ζώων.Υπάρχουν τρεις τύποι των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων - ζύμες, μύκητες και τα βακτήρια(Pitt,2009). Με αύξηση των ζυμών προκαλείται ζύμωση η οποία είναι το αποτέλεσμα του μεταβολισμού τους. Υπάρχουν δύο τύποι ζυμών η πραγματική μαγιά και ψευδείς μαγιά. Η πραγματική μαγιά μεταβολίζει τα σάκχαρα και παράγει αλκοόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Αυτό είναι γνωστό ως ζύμωση. Ψευδείς ζύμες

αναπτύσσονται ως ένα ξηρό φιλμ σε μια επιφάνεια τροφίμων, όπως στο τουρσί άλμης. Ψευδείς ζύμες εμφανίζονται σε τρόφιμα που έχουν υψηλό ποσοστό σε σάκχαρα ή περιβάλλον υψηλής οξύτητας. Εκμαγεία μεγαλώνουν σε ίνες που σχηματίζουν μια σκληρή μάζα που είναι ορατό ως `ανάπτυξη «μούχλας», τα οποία είναι ικανά να προκαλέσουν κάποια ασθένεια, ειδικά αν το άτομο είναι αλλεργικό. Συνήθως όμως, τα κύρια συμπτώματα από την κατανάλωση μουχλιασμένων τροφίμων είναι ναυτία ή εμετός από την άσχημη γεύση και μυρωδιά. Τόσο οι ζύμες όσο και οι μύκητες μπορούν να ευδοκιμήσουν σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα οξέων όπως είναι τα φρούτα, οι ντομάτες, οι μαρμελάδες, τα ζελέ και τα τουρσιά. Και οι δύο καταστρέφονται εύκολα από τη θερμότητα. Επεξεργασία τροφών με υψηλή περιεκτικότητα οξέος σε θερμοκρασία 100 ° C (212 ° F), σε ένα δοχείο ζέσης νερού ειδικό για τρόφιμα και για το κατάλληλο χρονικό διάστημα είναι ικανό να καταστρέψει ζύμες και μούχλες(Beak,2008)

Τα βακτήρια είναι μικροοργανισμοί με μορφή είτε στρογγυλή, ραβδοειδή ή σε σχήμα σπειροειδές. Η αύξηση των βακτηρίων μπορεί να προέλθει υπό μία ευρεία ποικιλία συνθηκών. Υπάρχουν πολλοί τύποι βακτηρίων που προκαλούν αλλοίωση. Μπορούν να χωριστούν σε: σπορογόνους, δηλαδή αυτούς που σχηματίζουν σπόρια είτε σε μη σπορογόνους. Τα βακτήρια προτιμούν γενικά τα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας, όπως τα λαχανικά και το κρέας. Προκειμένου να καταστραφούν τα σπόρια των βακτηρίων σε ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, τα τρόφιμα χαμηλής οξύτητας θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία για την κατάλληλη χρονική διάρκεια στους 116°C (240 ° F) σε ένα συσκευαστή τροφίμων υπό πίεση (θερμοκρασίες υψηλότερες από 100°C [212 °F] μπορεί να πραγματοποιούνται μόνο με κονσερβοποίηση)(Pitt,2009)

2. Η δράση των φυσικών ενζύμων

Η δραστηριότητα των ενδογενών ενζύμων σε φυτικά και ζωικά τρόφιμα είναι σύνθητες μετά τη συγκομιδή/σφαγή ζώου ,λόγω της έλλειψης μηχανισμών ελέγχου στο εργοστάσιο συγκομιδής τροφίμων/σφαγμένο ζώο. Το φυσικό ένζυμο μπορεί να αδρανοποιηθεί με θερμότητα, ακτινοβολία ή από τη χρήση συγκεκριμένων χημικών ουσιών.

Ενζυμική αμαύρωση, μπορεί να προκληθεί σε ορισμένα τρόφιμα από τη στιγμή που είναι εκτεθειμένα στον αέρα(Mandrell,2006). Όταν γίνεται αποκοπή ή χτύπημα στα τρόφιμα, όπως το μήλο, η εκτεθειμένη επιφάνεια αλλάζει χρώμα, λόγω της δραστηριότητας των ενζύμων (Ιοαννου,2013).

Ενζυμα είναι αυτά που εμπλέκονται και στη διαδικασία που προκαλεί ωρίμανση σε ορισμένα τρόφιμα, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά. Άγουρες μπανάνες για παράδειγμα, περιέχουν άμυλο το οποίο σταδιακά μετατρέπεται σε σάκχαρα, έως ότου η μπανάνα γίνεται πολύ γλυκιά, και το χρώμα του δέρματος της αλλάζει από

πράσινο σε κίτρινο. Τελικά, το χρώμα του δέρματος αλλάζει σε σκούρο καφέ και δεν είναι πλέον κατάλληλο για να καταναλωθεί (Seymour,2012)

3. Έντομα, τρωκτικά και τα παράσιτα

Παράσιτα μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό κυρίως μέσω των πουλερικών τα οποία δεν έχουν μαγειρευτεί σωστά. Τα τρωκτικά, εκτός από την κατανάλωση σημαντικής ποσότητας τροφίμων μολύνουν επίσης το φαγητό μέσα από τα περιττώματα και τα ούρα. Τα τρωκτικά είναι επίσης μεταφορείς παθογόνων βακτηρίων (Biranjia-Hurdoyal,2016)

4. Οι χημικές αντιδράσεις των συστατικών των τροφίμων

Η ποιότητα των τροφίμων μπορεί να υποβαθμιστεί λόγω των χημικών αντιδράσεων των συστατικών των τροφίμων. Για παράδειγμα, συστατικά όπως ακόρεστα λιπαρά οξέα υφίστανται οξειδωση λόγω της έκθεσης σε ατμοσφαιρικό αέρα δημιουργώντας έτσι οξειδωτικό τάγγισμα σε τρόφιμα πλούσια σε λίπος. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μπορούν επίσης να απελευθερωθούν λόγω της υδρολυτικής τάγγισης προκαλώντας δυσάρεστη οσμή, καθώς και ανεπιθύμητες αλλαγές στην υφή των τροφίμων. Επίσης λόγω των χημικών αντιδράσεων των ενδογενών συστατικών των τροφίμων μπορεί να προκληθεί απώλεια των βιταμινών (Biranjia-Hurdoyal,2016).

5. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η υγρασία, ο αέρας και το φως

Αέρας και το οξυγόνο μπορεί να έχουν αρνητικές συνέπειες για τη βιταμίνη A, C, το χρώμα των τροφίμων, τη γεύση και άλλα συστατικά. Για παράδειγμα, αντιδράσεις οξείδωσης διευκολύνονται λόγω της παρούσας αέρα. Επίσης, το φως μπορεί να καταστρέψει τη ριβοφλαβίνη, βιταμίνη A, βιταμίνη C και προωθεί τις αντιδράσεις οξείδωσης που επηρεάζουν τη γεύση και το χρώμα των τροφίμων. Ενώ στη περίπτωση του γάλατος προκαλεί καταστροφή των πρωτεϊνών(Boor,2006)

6. Χρόνος

Όταν τα τρόφιμα συγκομίζονται ή σφάζονται πρέπει να καθαρίζονται και να ψύχονται αμέσως. Αυτό καθυστερεί την έναρξη της υποβάθμισης της ποιότητας των τροφίμων, αλλά δεν την εμποδίζει (Hammond,2015)

1.2.2 Μικροβιολογική αλλοίωση γαλακτοκομικών προϊόντων

Το γάλα είναι ένα εξαιρετικό μέσο ανάπτυξης για τις οικογένειες βακτηρίων (Deeth,1983). Αλλοιωγόνα βακτήρια μπορεί να προέρχονται από την επεξεργασία, τον εξοπλισμό, το περιβάλλον ή το άρμεγμα και σε μονάδες μεταποίησης από τον εξοπλισμό, τους υπαλλήλους, ή τον αέρα. Οι μικροοργανισμοί του γένους *Lactobacillus* είναι συνήθως τα κυρίαρχα μικρόβια στο νωπό γάλα και πολλαπλασιάζονται αν το γάλα δεν ψύχεται επαρκώς. Όταν οι πληθυσμοί φθάσουν περίπου 10⁶ cfu/ml, εκτός από τη γεύση που αναπτύσσεται στο γάλα λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, εμφανίζονται αλλαγές στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά που οφείλονται και σε άλλες ενώσεις. Η ψύξη καταστέλλει την ανάπτυξη και μέσα σε μία ημέρα ψυχρόφιλα βακτήρια (*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Alcaligenes* και μερικά σπόρια) αυξάνονται και μπορεί τελικά να παράγουν ταγγείς οσμές μέσω της δράσης λιπασών και πεπτιδίων από τη δράση των πρωτεασών (Dogan *et al*,2003). Η παστερίωση σκοτώνει τα ψυχρόφιλα και μεσόφιλα βακτήρια(LAB), αλλά θερμοάνθεκτικά είδη (*Alcaligenes*, *Microbacterium*, και τα σπορογόνα *Bacillus* και *Clostridium*) επιβιώνουν και να μπορεί αργότερα να προκαλέσουν αλλοίωση στο γάλα ή άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. Αμέσως μετά την παστερίωση, οι βακτηριδιακές μετρήσεις είναι συνήθως <1.000 cfu /ml. Ωστόσο, η μόλυνση μετά την παστερίωση του γάλακτος, ιδιαίτερα με *Pseudomonas* και μερικά θετικά κατά Gram ψυχρόφιλα στελέχη είναι πιθανό να συμβεί (Stevenson *et al*,2003, Mayr *et al*,2004). Οι ζύμες και οι μύκητες είναι η κύρια αιτία μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (γιαούρτι, κρέμα γάλακτος και το βουτυρόγαλα), επειδή η υψηλή οξύτητα των προϊόντων αυτών αναστέλλει πολλά βακτήρια(Mayoral *et al*,2005). Οι κρέμες μπορεί να γίνουν ταγγείς όταν οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών *Pseudomonas* και *Enterobacter* πολλαπλασιάζονται (Rawat, 2015).

Σημαντικότεροι μικροοργανισμοί στα γαλακτοκομικά προϊόντα

- Γαλακτικά Βακτήρια

Υπερβολική μεταβολή του ιξώδους μπορεί να συμβεί στο αποβουτυρωμένο γάλα και στη κρέμα γάλακτος από την ανάπτυξη των έγκλειστων γαλακτοκοκκων που παράγουν βλεννώδεις ουσίες. Επιπλέον, το διακετύλιο μπορεί να μειωθεί με την αναγωγή του διακετυλίου που παράγεται από τα προϊόντα των γαλακτοκοκκων τα οποία αυξάνονται στους 7°C (Hogarty & Frank, 1982), με αποτέλεσμα η γεύση να θυμίζει αυτή του γιαουρτιού. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια όπως *Lactobacilli* και *Leuconostoc* μεταβολίζουν τη λακτόζη και παράγουν γαλακτικό, οξικό, αιθανόλη και CO₂ σε περίπου ισομοριακές συγκεντρώσεις (Hutkins, 2001). Η ανάπτυξή τους ευνοείται σε σχέση με τα ομοζυμωτικά βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης, όταν η ωρίμανση πραγματοποιείται σε 15°C όχι 8°C (Cromie, Giles, & Dullely, 1987). Όταν τα

ομοζυμωτικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτυγχάνουν να μεταβολίσουν το σύνολο των ζυμώσιμων σακχάρων σε ένα τυρί, τα ετεροζυμωτικά βακτήρια που είναι συχνά παρόντες ολοκληρώνουν τη ζύμωση (Johnson, 2001). Επιπλέον, προαιρετικά γαλακτοβάκιλλοι μπορούν καταβολίσουν το κιτρικό και το γαλακτικό οξύ και παράγουν CO₂ (Fryer et al 1970, Laleye, Simard, Lee, Holley, & Giroux, 1987).

- **Ζύμες**

Οι ζύμες μπορούν να αναπτυχθούν καλά στο χαμηλό pH των ζυμωμένων προϊόντων, όπως το βουτυρόγαλα και ξινή κρέμα. Επιπλέον, οι ζύμες μπορούν να μεταβολίσουν το διακετύλιο σε αυτά τα προϊόντα (Wang & Frank, 1981), οδηγώντας στη παραγωγή γεύσης «γιαουρτιού». Μόλυνση στο τυρί cottage από την ζύμη *Geotrichum candidum* συχνά οδηγεί σε μία μείωση της περιεκτικότητας σε διακετύλιο. Η *Geotrichum candidum* μειώνει τις συγκεντρώσεις σε διακετύλιο 52-56% σε τυρί με χαμηλά λιπαρά cottage μετά από 15-19 ημέρες από την αποθήκευση σε 4-7°C (Antinone & Ledford, 1993). Οι ζύμες είναι μια σημαντική αιτία της αλλοίωσης του γιαουρτιού στην οποία το χαμηλό pH παρέχει ένα επιλεκτικό περιβάλλον για την ανάπτυξή τους (Fleet, 1990, Rohm, Eliskasses, & Bräuer, 1992). Γιαούρτια που παράγονται υπό συνθήκες ορθής πρακτικής πρέπει να εμπεριέχουν περισσότερα από 10 κύτταρα ζύμης και να έχουν μια διάρκεια ζωής 3-4 βδομάδες στους 5°C. Παρόλαυτα, γιαούρτια με πληθυσμούς χαμηλότερους από > 100 CFU/g τείνουν να χαλάσουν γρήγορα. Το χαμηλό pH και το διατροφικό προφίλ των περισσότερων τυριών είναι ευνοϊκό για την ανάπτυξη των ζυμομυκήτων. Η επιφανειακή υγρασία, συχνά περιέχει γαλακτικό οξύ, πεπτίδια και αμινοξέα και έτσι ευνοεί την ταχεία ανάπτυξη τους. Πολλές ζύμες παράγουν αιθανόλη και CO₂, με αποτέλεσμα το τυρί να έχει έντονη τη γεύση «ζύμης» (Horwood, Stark, και Hull, 1987). Η λιπόλυση παράγει λιπαρά οξέα που συνδυάζονται με αιθανόλη για να σχηματίσει φρουτώδεις εστέρες. Ορισμένα στελέχη πρωτεολυτικής μαγιάς παράγουν θειούχες ενώσεις, που έχουν σαν αποτέλεσμα την οσμή αυγού. Κοινές ζύμες που μολύνουν το τυρί είναι οι *Candida spp.*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum candidum*, *Debaryomyces hansenii*, and *Pichia spp.* (Johnson, 2001).

- **Μικροοργανισμοί που έχουν σημασία για τη θερμική επεξεργασία**

Όλοι οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τροφικές δηλητηριάσεις είναι υψίστης σημασίας σε οποιοδήποτε προπαρασκευασμένες τροφές, ωστόσο τα αποστειρωμένα επεξεργασμένα τρόφιμα, είναι αυτά που μπορούν να σχηματίσουν ανθεκτικά στη θερμότητα σπόρια και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου ότι μπορούν δυνητικά να επιβιώσουν κατά τη θερμική διαδικασία (Stumbo, 1965). Μερικά θερμοφιλά βακτηρίδια μπορούν να σχηματίσουν σπόρια που είναι εξαιρετικά ανθεκτικά στη θερμότητα (π.χ. σπόρια του *Clostridium thermosaccharolyticum* έχουν καταγραφεί με τιμές τόσο υψηλές όσο 195 λεπτά στους 121 ° C). Οι μύκητες δημιουργούν λιγότερη ανησυχία για τα αποστειρωμένα

προϊόντα, αφού ακόμη και οι πιο ανθεκτικοί στη θερμότητα μύκητες δεν μπορούν να επιβιώσουν από 95 έως 100 °, οπότε αποτελούν μεγαλύτερο πρόβλημα για τα παστεριωμένα τρόφιμα ή ως αποτέλεσμα μόλυνσης ύστερης επεξεργασίας. Για τα εμπορικά παραγόμενα τρόφιμα, η ασφάλεια είναι υψίστης σημασίας, αλλά και η σταθερότητα των προϊόντων είναι επίσης πολύ σημαντική, διότι τα τρόφιμα που είναι υποβαθμισμένα δεν μπορούν να πωληθούν (Goldblith, 1971, 1972). Εμπορική στείρωση των θερμικώς επεξεργασμένων τροφίμων νοείται η κατάσταση που επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της θερμοκρασίας, η οποία καθιστά την τροφή απαλλαγμένη από μικροοργανισμούς ικανούς να αναπαράγουν στα τρόφιμα υπό συνθήκες περιβάλλοντος (δηλαδή κανονικά μη-ψύξη) συνθήκες αποθήκευσης και διανομής, βιώσιμους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των σπορίων, επικίνδυνων για τη δημόσια υγεία (Pflug, 2003).

Μύκητες

Τα βλαστικά νημάτια των μυκήτων (υφές) καταστρέφονται κάτω από σχετικά ήπια θέρμανση (65°C). Μύκητες με μεγαλύτερη σημασία στα τρόφιμα πολλαπλασιάζουμε με ζυγοσπόρια, κονίδια ή ασκοσπόρια που είναι όλα πιο ανθεκτικά στη θερμότητα από τις βλαστικές μορφές. Τα ασκοσπόρια ιδιαίτερα μπορεί να είναι ανθεκτικά στη θερμότητα (π.χ. *Byssochlamys fulva* παράγει ασκοσπόρια που έχουν μια μέση τιμή στους 90°C μεταξύ 1 και 12 λεπτά). Αν και σπανίως εμπλέκονται σε τροφικές δηλητηριάσεις με θερμικώς επεξεργασμένα τρόφιμα (Pflug, 2003). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ορισμένοι μύκητες παράγουν μυκοτοξίνες που μπορούν να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση ή ασθένεια. Μερικοί από τους μυκήτες που βρέθηκαν που συνδέονται με την αλλοίωση των τροφίμων είναι οι παρακάτω:

- *Byssochlamys spp.* μπορεί να προκαλέσει αλλοίωση, ως αποτέλεσμα των ανθεκτικών στη θερμότητα ασκοσπορίων της και των πηκτινασών που παράγουν οι μυκοτοξίνες.
- *Rhizopus stolonifer* εύκολα μπορεί να σκοτωθεί με θέρμανση, αλλά μπορεί να παράγει θερμότητα σταθερή πηκτινάσες που μπορεί να επιμείνει και να προκαλέσει μαλακή σήψη.
- *Aspergillus* έχει ενοχοποιηθεί στην αλλοίωση ενός μεγάλου αριθμού τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων μπέικον, ψωμί, τα φιστίκια, τα ψάρια, κλπ παράγουν μυκοτοξίνες.
- *Fusarium spp.* σχηματίζουν μεγάλα μυκήλια καφέ, κόκκινα, μωβ και ροζ. Παράγουν μυκοτοξίνες.

Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι η πιο σημαντική ομάδα μικροοργανισμών στην οποία οφείλονται οι περισσότερες τροφικές δηλητηριάσεις αλλά και η αλλοίωση των τροφίμων. Έτσι, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία σε αυτούς κατά τη θερμική επεξεργασία των τροφίμων (Pflug, 2003). Τα βακτήρια μπορούν να χωριστούν σε ομάδες ανάλογα με την θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται. Η εικόνα 2.1.1 παρουσιάζει κάποια δεδομένα για τη θερμική αντίσταση των σπορίων διαφόρων βακτηρίων που είναι σημαντικά για τη θερμική επεξεργασία. Η τιμή *D* είναι ένα μέτρο της αντίστασης θερμότητας του μικροοργανισμού και η τιμή του *z* παρέχει πληροφορίες για το πώς αυτή η αντοχή στη θερμότητα αλλάζει με τη θερμοκρασία.

Species	Temperature (°C)	z-value (°C)	Typical D-value (minutes)
Mesophiles			
<i>Bacillus cereus</i>	100		5.5
	121		2.37
<i>B. coagulans</i>	121		3.0
<i>B. licheniformis</i>	100		13.0
<i>B. subtilis</i>	121		0.3–0.7
<i>B. coagulans</i>	100		9.5
	121		1.6–3.4
<i>Clostridium butyricum</i>	85		12–23
	100		0.1–0.5
<i>C. sporogenes</i>	121		0.2–1.5
<i>C. perfringens</i>	100		0.3–17.6
<i>C. botulinum*</i>	121	10.0	0.21
<i>C. botulinum</i> Type A (proteolytic)	121	9.0	0.13
<i>C. botulinum</i> Type B (proteolytic)	121	11.0	0.15
<i>C. botulinum</i> Type B (non-proteolytic)	82	8.3–16.5	1.5–32.3
<i>C. botulinum</i> Type E (non-proteolytic)	77		0.7–1.95
<i>C. botulinum</i> Type F (proteolytic)	121	9.3–12.1	0.14–0.22
<i>C. botulinum</i> Type F (non-proteolytic)	77		1.6–9.5
<i>C. botulinum</i> Type G (proteolytic)	116	20.9–27.3	0.25–0.29
Thermophiles			
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	121	7.7	6–16.0
<i>Desulphotomaculum nigrificans</i>	121	9.5	55.0
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	121	6.9–11.0	68.0–195.0
General microorganisms			
Vegetative bacteria, yeasts and moulds	65		0.5–1.00

* Most commonly used for thermal process calculations

Εικόνα 2.1.1: Τυπικά σπορογόνα βακτήρια ανθεκτικά στη θερμοκρασία (Marshall et al., 2009)

1. Θερμόφιλα

C. thermosaccharolyticum είναι ένας από τους πιο ανθεκτικούς στη θερμότητα μικροοργανισμούς που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα κατά τη παραγωγική διεργασία. Είναι ένα Gram-θετικό, ραβδόμορφο αναερόβιο βακτήριο. Τα βακτήρια αυτά είναι σακχαρολυτικά και παράγουν μεγάλες ποσότητες CO₂ και H₂ (τα οποία προκαλούν ανατίναξη σε κονσέρβες). Τα βακτήρια αυτά δεν είναι ανθεκτικά σε υψηλά επίπεδα οξύτητας, αλλά είναι σημαντικά σε προϊόντα μέτριας οξύτητας. Σε περίπτωση που οι εν λόγω μικροοργανισμοί εμπλέκονται στην αλλοίωση, συνήθως εισάγονται στο προϊόν με τις πρώτες ύλες, επειδή οι συνθήκες για τον πολλαπλασιασμό τους στον εξοπλισμό των εγκαταστάσεων και την επεξεργασία σπάνια υπάρχουν (τα βακτηρίδια είναι αναερόβια) (Marshall et al, 2009)

G. stearothermophilus (*Bacillus stearothermophilus*) είναι ένα ραβδόμορφο, Gram-θετικό βακτήριο. Είναι θερμοφίλο και συχνά βρίσκεται στο έδαφος, σε θερμές πηγές, ωκεανούς και είναι η αιτία της αλλοίωσης στα τρόφιμα από την παραγωγή διαφόρων οργανικών οξέων. Δεν παράγει αεριούχες ενώσεις αλλά εμφανίζεται σχηματίζοντας και παράγοντας «επιφανειακή ξινή» αλλοίωση σε κονσέρβες τροφίμων. Θα αυξηθεί μέσα σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 30 έως 75°C, αλλά η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι στους 55°C. Τα σπόρια του *G. stearothermophilus* μπορούν να εισέλθουν στο τρόφιμο από το έδαφος ή μέσω ωμών τροφίμων, αλλά μπορούν να βρεθούν και σε συστατικά, όπως τα μπαχαρικά, τη ζάχαρη, τη σόγια, το αλεύρι και τα άμυλα (Ternstrom et al, 1993). Οι πληθυσμοί μπορεί να αυξηθούν σε οποιοδήποτε σημείο όπου υπάρχουν σωστές περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης (δηλαδή σε εξοπλισμό χειρισμού των τροφίμων ή σε μια γραμμή κονσερβοποίησης που λειτουργεί μέσα στο θερμοφίλο εύρος ανάπτυξης). Η παρουσία τους σε ορισμένα επεξεργασμένα δοχεία αποθήκευσης των εμπορικά στείρων τροφίμων χαμηλής οξύτητας μπορεί να θεωρείται φυσιολογική και δεν προκαλεί ιδιαίτερη ανησυχία διότι, αν και *G. stearothermophilus* μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο 30 έως 45 ° C. Τα σπόρια δεν θα αναπτυχθούν εάν το προϊόν είναι αποθηκευμένο σε θερμοκρασίες κάτω των 43°C. Ως εκ τούτου, η σωστή ψύξη μετά από θερμική επεξεργασία και η αποφυγή των υψηλών θερμοκρασιών κατά την αποθήκευση και τη διανομή των τροφίμων είναι απαραίτητα για τον έλεγχο επιμόλυνσης από *G. stearothermophilus*.

D. nigrificans είναι ένα αυστηρά αναερόβιο θερμοφίλο βακτήριο. Αυτά τα βακτήρια μπορεί να προκαλέσουν το φαινόμενο αλλοίωσης γνωστό και ως «θειούχα βρωμιά». Παράγουν υδρόθειο (H₂S) στο προϊόν, καταλήγοντας σε μια κακή μυρωδιά (που μοιάζει με την οσμή του χαλασμένου αυγού). Το H₂S διαλύεται στο περιεχόμενο των εμπορικών δοχείων και τα δοχεία αυτά συχνά παραμένουν «επίπεδα». Το H₂S αλληλεπιδρά με το σίδηρο στα δοχεία, με αποτέλεσμα το περιεχόμενο να χρωματίζεται σε μαύρο. Αυτό το βακτήριο συχνά χαρακτηρίζεται ως

Clostridia, και εξακολουθεί να αναφέρεται ως *Clostridium nigrificans* σε ορισμένα βιβλία (Zoon *et al*,1996)

Alicyclobacillus acidoterrestis είναι ένα θερμοοξεόφιλο, μη παθογόνο, σπορογόνο βακτήριο. Τα σπόρια του *A. acidoterrestis* είναι ανθεκτικά σε παστερίωση χαμηλού pH και μπορούν να βλαστήσουν και να αναπτυχθούν προκαλώντας αλλοίωση, η οποία χαρακτηρίζεται από μία φαρμακευτική ή απολυμαντική οσμή που αποδίδεται στη χημική ένωση γουαϊακόλη (ο-διυδροξυβενζόλιο),την οποία παράγουν. Είναι ένας ασυνήθιστος μικροοργανισμός καθώς είναι σχεδόν ο μόνος θερμοφίλος μικροοργανισμός που μπορεί να αντέξει συνθήκες πολύ υψηλής οξύτητας.

2. Μεσόφιλα - σπορογόνα βακτήρια

Τα περιστατικά δηλητηριάσεων από τρόφιμα που οδηγούν σε θάνατο δεν είναι συνηθισμένα. Ωστόσο, ένα βακτήριο που μπορεί να προκαλέσει θάνατο είναι *C. Botulinum* (Kalogridou-Vassiliadou, 1992). Η τοξίνη αλλαντίασης που παράγει είναι μία από τις πιο ισχυρές νευροτοξίνες, στο βαθμό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιολογικό πόλεμο. Τρόφιμα μολυσμένα με μόνο μερικά ng (10^{-9} g) μπορεί να είναι τοξικά (Klijn, Nieuwendorf, Hoolwerf, van der Waals, & Weerkamp, 1995). Για το λόγο αυτό, ενώ είναι αρκετά ασυνήθιστο, έχει ληφθεί πολύ σοβαρά υπόψη από όλους τους παραγωγούς που συσκευάζουν προϊόντα σε αναερόβιο περιβάλλον και πρόκειται να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, (π.χ. κονσέρβες και υπό κενό συσκευασμένα τρόφιμα). Όλες οι διαδικασίες παρασκευής τροφίμων χαμηλής οξύτητας είναι σχεδιασμένα λαμβάνοντας υπόψη την αποφυγή επιμόλυνσης από μικροοργανισμούς όπως *C. Botulinum* (Rees και Bettison, 1991).

C. botulinum είναι Gram-θετικό, υποχρεωτικά αναερόβιο, σπορογόνο βακτήριο. Βρίσκεται συνήθως σε εδάφη σε όλο τον κόσμο, σε οποιαδήποτε περιοχή. Δεδομένου ότι βρίσκονται στο έδαφος, μολύνουν τα λαχανικά που καλλιεργούνται εντός ή επί του εδάφους και αποικίζουν στο γαστρεντερικό σωλήνα των ψαριών, των πτηνών και των θηλαστικών. *C. botulinum* είναι ταξινομημένα ως ένα είδος βακτηρίων, αλλά περιλαμβάνουν τουλάχιστον τρεις γενετικά διακριτές ομάδες οργανισμών που έχουν αναγνωρισθεί να είναι τοξικές για τους ανθρώπους (*C. botulinum*, *C. baratii* και *C. Butyricum*). Αυτοί οι μικροοργανισμοί χωρίζονται με βάση την ικανότητα τους να παράγουν τις νευροτοξίνες. Η αλλαντίαση του ανθρώπου έχει περιγραφεί με τα στελέχη του *C. botulinum* που παράγουν τοξίνη τύπου A, B και E (Marshall *et al* ,2009)

Τα βακτήρια *C. botulinum* παράγουν σπόρια τα οποία είναι ανθεκτικά στη θερμότητα και δεν μπορούν να σκοτωθούν απλά με παστερίωση .Κατά τις διαδικασίες αποστείρωσης κονσερβοποιημένων τροφίμων γίνεται ειδικός σχεδιασμός έτσι ώστε να εξαλειφθεί το ενδεχόμενο τυχόν σπόρια να επιβιώσουν. Η τοξίνη, ωστόσο, είναι πιο ευαίσθητη στη θερμότητα και με θέρμανση στους 80° C

για 30 λεπτά ή στους 100°C για 10 λεπτά καταστρέφεται. Παράγοντες που περιορίζουν την ανάπτυξη του *C. botulinum* περιλαμβάνουν:

- Χαμηλό pH: *C. botulinum* δεν παράγει τοξίνη σε οξίνα τρόφιμα (δηλαδή κάτω από pH 4,6).
- Χαμηλή ενεργότητα νερού: Ένα ελάχιστο a_w του 0,94 που χρειάζεται για να υποστηρίξει την ανάπτυξη των βακτηρίων και την παραγωγή τοξινών. Αυτή η ενεργότητα νερού αντιστοιχεί σε ένα διάλυμα 10% άλατος (NaCl), η οποία είναι και ο λόγος που το αλάτισμα μερικές φορές χρησιμοποιείται ως μέθοδος συντήρησης.
- Θερμοκρασία: Τα περισσότερα στελέχη αναπτύσσονται καλύτερα στους 40°C, αλλά μερικά από τα ψυχρόφιλα στελέχη μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες τόσο χαμηλές όσο 3°C
- Συντηρητικά τροφίμων: Πολλά συντηρητικά (νιτρώδες, σορβικό οξύ, φαινολικά αντιοξειδωτικά, πολυφωσφορικά, κλπ) αναστέλλουν την ανάπτυξη του *C. botulinum*.
- Ανταγωνιστικές μικροοργανισμών.

Υπάρχει ένας αριθμός άλλων μεσόφιλων βακτηρίων με σημασία για τη θερμική επεξεργασία. Οι κυριότεροι από αυτούς περιγράφονται παρακάτω:

B. coagulans είναι θερμοανθεκτικά και οξύ-ανθεκτικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από τα κονσερβοποιημένα προϊόντα τομάτας, όπου προκαλούν μια μείωση στο pH στα αλλοιωμένα προϊόντα από την παραγωγή οξέος χωρίς σχηματισμό CO₂. Η βέλτιστη ανάπτυξη είναι μεταξύ 37 και 45°C και σε επίπεδα pH μεταξύ 5,0 και 7,0. *B. coagulans* δεν είναι τόσο ανθεκτικό στη θερμότητα ως *G. stearothermophilus* αλλά μπορεί να αυξηθεί σε χαμηλότερες τιμές pH (π.χ. κάτω από pH 4.2).

G. butyricum είναι ένα Gram-θετικό, σπορογόνο, αναερόβιο βακτήριο. Αυτά τα βακτήρια αλλοιώνουν τα μέτριας οξύτητας τρόφιμα, με τιμές pH πάνω από 4,0, καθώς και άλλα προϊόντα χαμηλής οξύτητας. Το βουτυρικό οξύ και αεριούχες ενώσεις παράγονται κατά το μεταβολισμό τους.

C. perfringens είναι Gram-θετικό, σπορογόνο, αναερόβιο ραβδόμορφο βακτήριο. Είναι ευρέως υπαρκτό στη φύση και βρίσκεται επίσης στα έντερα των ζώων και των ανθρώπων. Τα σπόρια του δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά θερμότητα (σε σύγκριση με τα σπόρια του *C. botulinum*) και η τροφική δηλητηρίαση από αυτόν τον μικροοργανισμό συνδέεται συνήθως με μαγειρεμένα τρόφιμα που έχουν

ανεπαρκώς ψυχθεί και διατηρηθεί για αρκετές ώρες πριν από την κατανάλωση. Αυτός ο μικροοργανισμός παράγει μια τοξίνη που προκαλεί έντονες κοιλιακές κράμπες και διάρροια.

Bacillus cereus είναι ένα Gram-θετικό, προαιρετικά αερόβιο ή αναερόβιο, σπορογόνο, ραβδοειδές βακτήριο (Valero *et al*, 2003). Αυτά και άλλα χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων των βιοχημικών δοκιμών, χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση και την επιβεβαίωση της παρουσίας του *B. cereus*, παρόλο που αυτά είναι κοινά χαρακτηριστικά για τα βακτήρια *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* και *B. anthracis*. Η διαφοροποίηση αυτών των μικροοργανισμών βασίζεται σε:

- προσδιορισμό της κινητικότητας (τα περισσότερα στελέχη *B. cereus* είναι κινητικά)
- παρουσία τοξίνης (*B. thuringiensis*)
- αιμολυτική δραστηριότητα (*B. cereus* και άλλα *Bacillus* είναι αιμολυτικά, ενώ το *B. anthracis* συνήθως είναι μη-αιμολυτικό)
- ριζοειδείς ανάπτυξη, η οποία είναι χαρακτηριστική της *B. cereus. var mycoides*

B. weihenstephanensis, επίσης μέλος αυτής της ομάδας, είναι ένα ψυχρότροφο στέλεχος, και έτσι μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψυγείου (BadBugBook, 2012, Valero *et al*, 2003). Το εμετικό σύνδρομο προκαλείται από μια εξαιρετικά σταθερή τοξίνη που επιβιώνει στις υψηλές θερμοκρασίες, έκθεση σε θρυψίνη, πεψίνη, και σε ακραίες τιμές pH. Τα κρούσματα εμετικού τύπου συνδέονται συνήθως με αμυλούχα τρόφιμα όπως μακαρόνια και επιδόρπια βανίλιας (Heo *et al*, 2009). Η παραγωγή της εντεροτοξίνης που σχετίζεται με την εμφάνιση εμετού από τροφική δηλητηρίαση εξαιτίας στο *B. cereus* έχει ανιχνευθεί και σε άλλους βακίλους, συμπεριλαμβανομένου του *B. weihenstephanensis*. Αυτό υποδηλώνει ότι το πλασμίδιο που φέρει τη τοξίνη στην οποία οφείλεται το σύμπτωμα του εμετού μπορεί να υποστεί πλευρική μεταφορά, που προσδίδει τις ίδιες ιδιότητες για τα άλλα μη-παθογόνα στελέχη. Το διαρροϊκό σύνδρομο προκαλείται από μια οξύ-ασταθή εντεροτοξίνης. Τα τρόφιμα που εμπλέκονται στα διαρροϊκά κρούσματα είναι αρκετά όπως λαχανικά, σαλάτες, κρέατα και φαγητά κατσαρόλας (Valero *et al*, 2006, Heo *et al*, 2009). *B. cereus* είναι ευρέως διαδεδομένο στο περιβάλλον (Sinigaglia *et al*, 2002). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 28°C έως 35°C, με ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 4°C και ένα μέγιστο στους 48°C. Η ανάπτυξη μπορεί να συμβεί σε περιοχές pH από 4,9 έως 9,3, και ο μικροοργανισμός ανέχεται συγκέντρωση άλατος 7,5% (BadBugBook, 2012)

3. Μεσόφιλα –μη σπορογόνα παθογόνα βακτήρια

Salmonella spp. είναι Gram-αρνητικό, ραβδόμορφο βακτήριο που δεν σχηματίζει σπόρια. Είναι ευρέως διαδεδομένο μπορεί να βρεθεί για παράδειγμα σε γλυκό και

αλμυρό νερό, στο έδαφος και στα ζωικά περιττώματα. Διάφορα τρόφιμα έχουν βρεθεί να σχετίζονται με σαλμονέλωση, την ασθένεια που προκαλείται από την *Salmonella spp.*, συμπεριλαμβανομένου του ωμού κρέατος, των πουλερικών και των θαλασσιών, ωμά αυγά και τρόφιμα που γίνονται από ωμά αυγά, αποξηραμένα ζελατίνη, κακάο, σοκολάτα, φυστικοβούτυρο, μαγιά και καρύδα. Η σαλμονέλωση προκαλείται στον οργανισμό και σε εξαιρετικά χαμηλές δόσεις, επίπεδα τόσο χαμηλά όσο 15 κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν την ασθένεια (Tucker, 2010)

Staphylococcus aureus είναι ένα Gram-θετικό, βακτήριο που εμφανίζεται σε μορφή κόκκων, και μπορεί να παράγει μια σταθερή στη θερμότητα τοξίνη. Λιγότερο από το 1 mg τοξίνης μπορεί να προκαλέσει ασθένεια. Ο *S. aureus* βρίσκεται παντού, αλλά η πιο κοινή πηγή μόλυνσης των τροφίμων είναι μέσω των ανθρώπων, δηλαδή από χειριστές τροφίμων. Σταφυλόκοκκοι βρίσκονται στις ρινικές διόδους, στο στόμα, στο δέρμα και τα μαλλιά του περισσότερο από το ήμισυ των υγιών ανθρώπων. Η τροφική δηλητηρίαση μπορεί να προκύψει από μολυσμένα τρόφιμα που είτε κρατούνται όχι σε υψηλή θερμοκρασία (δηλαδή $60\text{ }^\circ\text{C}$) είτε όχι αρκετά κρύα (δηλαδή >math>8\text{ }^\circ\text{C}</math>), η οποία επιτρέπει στον οργανισμό να αναπτυχθεί και να παράγει την τοξίνη της. Τα συμπτώματα (ναυτία, εμετός, κράμπες) της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης είναι πολύ γρήγορα (μερικές ώρες) και συνήθως οξεία (Deak, 2013).

Escherichia coli είναι Gram-αρνητικό βακτήριο που βρίσκεται στα έντερα όλων των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων. Τα βακτήρια *E. coli* παράγουν τοξίνες που μπορούν να προκαλέσουν τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες ασθενειών που απασχολούν τη βιομηχανία τροφίμων. Η πρώτη κατηγορία είναι η ασθένεια που παρουσιάζεται με τη μορφή γαστρεντερίτιδα. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει *E. coli* 0157: H7 (EHEC), η οποία είναι εντεροαιμορραγικής. Ο δεύτερος τύπος αναφέρεται ως εντεροτοξικογόνου (ETEC), το τρίτο είναι εντεροπαθογόνοι (EPEC) (Marshall, 2009). Τα κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης λόγω *E. coli* συνήθως συνδέονται με κοπρανώδους μόλυνσης του νερού, από τους χειριστές τροφίμων ή λόγω μη επεξεργασμένων ή υπό-επεξεργασμένων (και μαγειρεμένα) τροφίμων. Το πρόσφατο ενδιαφέρον σε βιολογικά συστήματα παραγωγής τροφίμων επέτρεψε *E. coli* να αναπτυχθούν και να μολύνουν τα φρούτα και φυτικές πρώτες ύλες, με αποτέλεσμα το ξέσπασμα στο παστεριωμένο χυμό μήλου (Deak, 2013)

Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι μια μεγάλη διαφορετική ομάδα που αποτελείται από βακτήρια από *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, κ.λπ. Αυτά τα βακτήρια συνήθως εμπλέκονται με αντιδράσεις ζύμωσης που είναι επιθυμητές, αλλά μπορεί επίσης να προκαλέσουν αλλοίωση. Η επαναμόλυνση μετά τη διαδικασία είναι η πλέον πιθανή αιτία, εάν ένα περιστατικό αλλοίωσης αποδίδεται σε βακτήρια γαλακτικού οξέος. Αυτό συμβαίνει επειδή αυτά τα βακτήρια δεν είναι καθόλου ανθεκτικά στην θερμότητα (Deak, 2013)

4. Ψυχρόφιλα

Υπάρχουν πολύ λίγα ψυχρόφιλα βακτήρια που προκαλούν ανησυχία κατά τη θερμική επεξεργασία. Ωστόσο, ένας από τους λίγους που μπορεί να προκαλέσει προβλήματα σε τρόφιμα αυτής της κατηγορίας είναι το *Pseudomonas spp.* Αυτό ανήκει σε μια μεγάλη ομάδα Gram-αρνητικών βακτηρίων, ραβδοειδούς σχήματος που είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση πολλών πρωτεϊνούχων προϊόντων που διατηρούνται υπό ψύξη (π.χ. κρέας, ψάρι, αυγά, γάλα). Κάποια στελέχη παράγουν μπλε-πράσινες χρωστικές ουσίες καιέχουν εμπλακεί σε πολλές περιπτώσεις αλλοίωσης των τροφίμων (π.χ. πράσινη σήψη, μαύρη σήψη, ροζ σήψη και κόκκινη σήψη). Έχουν πολύ ποικίλες διατροφικές απαιτήσεις και μπορεί να προκαλέσουν ακόμη και αλλοίωση του εμφιαλωμένου νερού.

1.3 Μέθοδοι εκτίμησης της ποιότητας των τροφίμων

Σε μια κοινωνία ταχείας τεχνολογικής ανάπτυξης και αλλαγής του καταναλωτικού τρόπου ζωής η βιομηχανία των τροφίμων καλείται να ανταπεξέλθει στις απαιτήσεις της αγοράς λαμβάνοντας υπόψη και τα παγκόσμια οικονομικά προβλήματα. Οι εταιρίες τροφίμων καλούνται να ευχαριστήσουν τις αμφίσημες απαιτήσεις των καταναλωτών που επιδιώκουν προϊόντα ενισχυμένης διατροφικής και οργανοληπτικής αξίας, εγγυημένης ασφάλειας, αλλά και φθηνές τροφές με λιγότερη επεξεργασία, λιγότερα πρόσθετα και «τεχνολογικές» παρεμβάσεις (Rorodí et al., 2016). Ταυτόχρονα αναμένουν εκτεταμένη διάρκεια ζωής και την ευκολία στην παρασκευή και χρήση. Για να διορθωθεί αυτό, η βιομηχανία τροφίμων και τα άλλα ενδιαφερόμενα μέρη (π.χ. αρχές των ΗΠΑ, της ΕΕ και λιανοπωλητές) θα πρέπει να στηρίξουν την ανάπτυξη και την εφαρμογή αποτελεσματικών συστημάτων διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας με βάση τον έλεγχο, την παρακολούθηση και καταγραφή των κρίσιμων παραμέτρων σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα. Αυτό δεν μπορεί να υλοποιηθεί με συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους (π.χ μέθοδος μέτρησης αποικιών) ή μοριακές τεχνικές οι οποίες θεωρούνται πιο αξιόπιστες και ακριβείς (Velusamy et al., 2010). Αυτό συμβαίνει διότι και οι δύο είναι χρονοβόρες, απαιτούν επεξεργασία και καταστροφή του δείγματος και χρειάζονται άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό το οποίο δυνητικά μπορεί να χρειάζεται είτε στο εσωτερικό της γραμμής παραγωγής είτε σε κάποια άλλη θέση (Nychas, Scandamis et al, 2008, Papadopoulou et al. , 2011). Επιπλέον, στην περίπτωση των μοριακών τεχνικών, τα αποτελέσματα μπορεί να είναι παραπλανητικά, καθώς οι τεχνικές αυτές επικεντρώνονται μέχρι στιγμής σε παθογόνους μικροοργανισμούς και όχι σε ομάδες μικροοργανισμών οι οποίες συμβάλλουν στην αλλοίωση και εξαρτώνται από τις συνθήκες αποθήκευσης και συσκευασίας (Dougleraki, 2012). Αυτή η μοριακή προσέγγιση είναι επίσης δαπανηρή, καθώς τα όργανα που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση είναι υψηλής τεχνολογίας και ευαισθησίας.

Ως εκ τούτου, έχουν γίνει προσπάθειες για αντικατάσταση των συμβατικών και μοριακών μικροβιολογικών αναλύσεων με τεχνικές που ανιχνεύουν βιοχημικές αλλαγές που συμβαίνουν στα τρόφιμα και που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της αλλοίωσης ή της ασφάλειας των τροφίμων (Ropodi et al, 2016). Πρόσφατα, μερικές πολλά υποσχόμενες αναλυτικές προσεγγίσεις προωθούνται για την ταχεία και ποσοτική παρακολούθηση της ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων. Αυτές οι προσεγγίσεις βασίζονται:

(i) συστοιχίες βιομημητικών αισθητήρων,

(ii) δονητική φασματοσκοπία (μετασχηματισμού Fourier υπέρυθρες -FT-IR, Raman) και

(iii) χημεία υπέρ/πολυφασματικής απεικόνισης (Argyri et al. 2014, Kamruzzaman, Maniko, & Oshita, 2014, Shankar, & Rayappan, 2015, Nunes, 2014, Chao, Kim, Lu, & Burks, 2013, Sun, 2009, Teena, Manickavasagan, Mothershaw, El Hadi, & Jayas, 2013, Velusamy et al, 2010, Xiong, Sun, Zeng, Xie, 2014).

Η χρήση αυτών των αισθητήρων βασίζεται κυρίως στην αρχή ότι τα παραπροϊόντα είτε από τη μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών, ή και η ίδια η προέλευση του προϊόντος εμφανίζουν διαφορετικά βιοχημικά προφίλ. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να δίνουν χαρακτηριστικά «δακτυλικά αποτυπώματα» που αντιστοιχούν σε κάθε βιοχημική μετατροπή και που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της ποιότητας και ασφάλειας (Ellis & Goodacre, 2001, Νυχάς et al, 2008). Εκτός αυτού, οι τεχνικές αυτές έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους, δεδομένου ότι είναι άμεσες, μη επεμβατικές και απαιτούν ένα ελάχιστο ποσό δείγματος. Ωστόσο, η τεράστια ποσότητα των δεδομένων που προκύπτουν από αυτή την τεχνολογία είναι πολύ δύσκολο να ερμηνευτούν. Ανάλογα με τον τύπο του αισθητήρα και την πολυπλοκότητα των δεδομένων, η ανάλυση περιλαμβάνει κλάδους όπως η ανάλυση εικόνας / επεξεργασία εικόνας, επεξεργασία σήματος, στατιστική ανάλυση, Χημειομετρία, μηχανική, υπολογιστικές τεχνικές νοημοσύνης, κλπ (Goodacre, 2003, Haralick & Shapiro, 1991, Hastie, Tibshirani, & Friedman, 2009, Liu, Wang, Wang, & Li, 2013, Loutfi et al, 2015, Marini, 2009, Nunes, 2014, Oliveri & Downey, 2012).

1.3.1 Συμβατικές μέθοδοι (traditional microbiological methods)

Η ανίχνευση και η καταμέτρηση των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα και στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα είναι ένα σημαντικό μέρος κάθε ολοκληρωμένου ερευνητικού προγράμματος για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων σε ολόκληρη την αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων. Αμφότερες οι κρατικές αρχές και οι εταιρείες τροφίμων χρησιμοποιούν μικροβιολογικές αναλύσεις για την παρακολούθηση της πιθανής μόλυνσης των τροφίμων ανά πάσα στιγμή και

αναλύουν τα επίκαιρα φαινόμενα , ώστε να εντοπίσουν τους αναδυόμενους κινδύνους. Η μικροβιολογική ανάλυση είναι επίσης ένα απαραίτητο εργαλείο για τη διενέργεια δοκιμών σύμφωνα με τα μικροβιολογικά κριτήρια που καθορίζονται για κάθε τύπο τροφίμων, καθώς είναι απαραίτητα και για την αξιολόγηση των διαφόρων στρατηγικών διαχείρισης συστημάτων ασφάλειας και ποιότητας με βάση την Ανάλυση Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου (HACCP) (Stannard 1997, Jasson et al 2010). Η εφαρμογή των προληπτικών συστημάτων, όπως το HACCP έχει βελτιώσει σημαντικά την ασφάλεια των τροφίμων, αλλά δεν θα είναι πλήρως αποτελεσματική μέχρι να αναπτυχθούν καλύτερες μέθοδοι ανάλυσης. Αυτές οι νέες μέθοδοι ανίχνευσης είναι καινοτόμες τεχνολογίες που θα βελτιώσουν σημαντικά την ασφάλεια των τροφίμων. Η μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων βασίζεται στην ανίχνευση των μικροοργανισμών με ποιοτικές – ποσοτικές δοκιμές , βιοχημικές, ανοσολογικές.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι καλλιέργειας για την ανίχνευση μικροοργανισμών σε τρόφιμα γίνεται με βάση την ενσωμάτωση ενός δείγματος τροφίμου σε ένα θρεπτικό μέσο στο οποίο οι μικροοργανισμοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν, παρέχοντας έτσι οπτική αναγνώριση από τον τρόπο ανάπτυξής τους. Αυτές οι συμβατικές μέθοδοι δοκιμών είναι απλές, εύκολες προσαρμόσιμες, πολύ πρακτικές, και γενικά ανέξοδες. Αν και δεν στερούνται ευαισθησίας, είναι επίπονες και εξαρτώνται από την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε διάφορα μέσα καλλιέργειας (προ-εμπλουτισμού, εκλεκτικού εμπλουτισμού, επιλεκτική επιμετάλλωση), το οποίο μπορεί να απαιτεί αρκετές ημέρες πριν να γίνουν γνωστά αποτελέσματα. Τα προϊόντα που είναι ελάχιστα επεξεργασμένα έχουν εγγενώς μικρή διάρκεια ζωής, η οποία εμποδίζει τη χρήση πολλών από αυτών των συμβατικών μεθόδων. Ως εκ τούτου, η εκτενής έρευνα έχει διεξαχθεί όλα αυτά τα χρόνια για να μειώσει το χρόνος δοκιμασίας με τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων για την ανίχνευση μικροοργανισμών και να μειώσει το ποσό της χειρωνακτικής εργασίας με μεθόδους αυτοματοποίησης όπου είναι δυνατόν (Jantzen et al 2006, Feng 2007, Betts, 2009, Jasson et al 2010). Παρά τη σπουδαιότητά της, η μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων έχει πολλούς περιορισμούς. Η μικροβιολογική ανάλυση των τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση για όλες σχεδόν τις δοκιμασίες και τις τεχνολογίες, ειδικά για συγκεκριμένα παθογόνα είδη (Feng 2007).

1.3.2 Ταχείες μη επεμβατικές μέθοδοι

1.3.2.1 Φασματοσκοπία Δονήσεων

Η φασματοσκοπία δόνησης (VS) είναι ένας συλλογικός όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει δύο αναλυτικές τεχνικές την υπέρυθη φασματοσκοπία και τη φασματοσκοπία Raman. Η υπέρυθη (IR) και η φασματοσκοπία Raman είναι

τεχνικές μη καταστρεπτικές για το δείγμα, μη επεμβατική εργαλεία που παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή σύνθεση, τη δομή και τις αλληλεπιδράσεις μέσα σε ένα δείγμα. Αυτές οι τεχνικές μετρούν τα δονητικά επίπεδα ενέργειας, οι οποίες συνδέονται με τους χημικούς δεσμούς στο δείγμα. Το φάσμα του δείγματος είναι χαρακτηριστικό, όπως ένα δαχτυλικό αποτύπωμα και η δονητική φασματοσκοπία χρησιμοποιείται για την ανίχνευση, τον χαρακτηρισμό, τη διαλεύκανση της δομής, την παρακολούθηση της αντίδρασης, τον ποιοτικό έλεγχο και τη διασφάλιση ποιότητας του τροφίμου. Η Υπέρυθρη (IR) φασματοσκοπία και η τεχνική Raman παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες για τη μοριακή δομή και έχουν βρει μια ευρεία ποικιλία εφαρμογών στην ανάλυση της ποιότητας των τροφίμων (Ropodi et al, 2016).

Στην περίπτωση της υπέρυθρης φασματοσκοπίας, αρκετές μελέτες έχουν εφαρμοστεί στην αξιολόγηση της αλλοίωσης των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που είναι ζωικής προέλευσης όπως το κρέας, το γάλα και το τυρί, καθώς και τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως το σιτάρι, τα αποστάγματα φρούτων και η μπύρα (Argiri et al., 2014, Damez & Clerjon, 2013). Από την άλλη πλευρά, οι μελέτες που αναφέρθηκαν για την αξιολόγηση της αλλοίωσης των τροφίμων μέσω χρήσης της φασματοσκοπίας Raman είναι μάλλον περιορισμένες, συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων τροφίμων όπως είναι το κρέας και το γάλα.

Τα προκύπτοντα δεδομένα για τα δύο είδη φασματοσκοπίας είναι δύο διαστάσεων, δηλ φάσματα που αποτελούνται από το μήκος κύματος και τη τιμή της μετρούμενης παραμέτρου. Αρκετές μέθοδοι για την προ-επεξεργασία των δεδομένων πριν από την ανάλυση, και συνδυασμοί τους, έχουν προταθεί, καθώς τα δεδομένα μπορεί να επηρεάζονται από το θόρυβο (Engel et al, 2013, Jarvis & Goodacre, 2005). Τέλος, ένας γενετικός αλγόριθμος χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να αποφασίσει την κατάλληλη μέθοδο ή συνδυασμό μεθόδων για την προ-επεξεργασία στη λήψη των φασμάτων FT-IR (Jarvis & Goodacre, 2005).

Εισαγωγή στη φασματοσκοπία

Η φασματοσκοπία είναι ο τομέας της επιστήμης ο οποίος ασχολείται με την αλληλεπίδραση διαφόρων τύπων ακτινοβολίας με την ύλη. Αρχικά το ενδιαφέρον είχε στραφεί μόνο στην επίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη. Πλέον όμως σήμερα η έννοια της φασματοσκοπίας έχει διευρυνθεί και περιλαμβάνει και φαινόμενα αλληλεπίδρασης της ύλης με άλλες μορφές ενέργειας. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές στις οποίες χρησιμοποιείται τόσο ορατή όσο υπεριώδη και υπέρυθρη ακτινοβολία, ονομάζονται οπτικές τεχνικές, λόγω της ομοιότητας των οργάνων που χρησιμοποιούνται και για τις τρεις περιοχές του φάσματος του φωτός καθώς και του κοινού τρόπου με τον οποίο ερμηνεύονται οι αλληλεπιδράσεις του με την ύλη.

Όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέρχεται μέσα από ένα στρώμα στερεού υγρού ή αερίου, είναι δυνατόν να απομακρυνθούν εκλεκτικά με απορρόφηση μερικές συχνότητες ως αποτέλεσμα της μεταφοράς ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας στα άτομα, τα ιόντα ή τα μόρια, τα οποία συνθέτουν το δείγμα. Η απορρόφηση προάγει αυτά τα σωματίδια από τις θεμελιώδεις ή βασικές καταστάσεις τους σε μία ή περισσότερες διεγερμένες καταστάσεις ενεργειακά υψηλότερες.

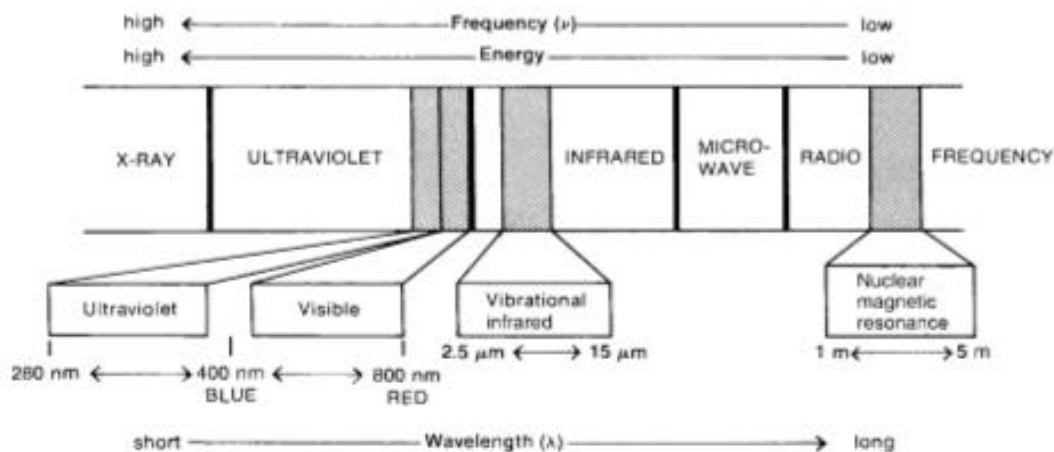
Σύμφωνα με τη κβαντική θεωρία, τα άτομα, μόρια ή ιόντα έχουν περιορισμένο αριθμό διακριτών ενεργειακών επιπέδων και έτσι για να απορροφηθεί ακτινοβολία, πρέπει το φωτόνιο το οποίο θα προκαλέσει τη διέγερση να έχει ακριβώς την ενέργεια που αντιστοιχεί στη διαφορά ενεργειών της βασικής και μίας διεγερμένης κατάστασης του σωματιδίου που το απορροφά. Επειδή αυτές οι διαφορές ενεργειών είναι μοναδικές για κάθε σωματίδιο, η μελέτη των συχνοτήτων της ακτινοβολίας που απορροφάται χρησιμεύει ως μέσο για το χαρακτηρισμό των συστατικών ενός δείγματος μιας ουσίας. Με αυτό τον τρόπο παρέχονται χαρακτηριστικά φάσματα της απορρόφησης σε συνάρτηση με το μήκος κύματος ή τη συχνότητα για την ουσία.

Φασματοσκοπία Υπερύθρου

Σχεδόν κάθε ένωση που έχει ομοιοπολικούς δεσμούς, είτε οργανική είτε ανόργανη, απορροφά διάφορες συχνότητες της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Αυτή η περιοχή βρίσκεται σε μήκη κύματος μακρύτερα από εκείνα που σχετίζονται με το ορατό φως, οι οποίες κυμαίνονται από περίπου 400 έως 800 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), αλλά βρίσκεται σε μήκη κύματος μικρότερα από εκείνα που συνδέονται με φούρνους μικροκυμάτων, τα οποία είναι περισσότερο από 1 mm. Για χημικούς σκοπούς, μας ενδιαφέρει το δονητικό τμήμα της περιοχής υπέρυθρων. Περιλαμβάνει ακτινοβολία με μήκη κύματος (λ) μεταξύ 2.5 μm και 25 μm ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$). Οι περισσότεροι χημικοί αναφέρονται στην ακτινοβολία της δονητικής υπέρυθρης περιοχής του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος από την άποψη μιας μονάδας που ονομάζεται κυματαριθμός ($\bar{\nu}$), αντί μήκους κύματος (μ ή μm). Αυτό συμβαίνει λόγω της γραμμικής σχέσης της συγκεκριμένης μονάδας με την ενέργεια αλλά και τη συχνότητα. Οι κυματαριθμοί εκφράζονται σε αντίστροφα εκατοστόμετρα (cm^{-1}) και εύκολα υπολογίζεται με βάση το αντίστροφο του μήκους κύματος που εκφράζεται σε εκατοστά. Εύκολα ο κυματαριθμός μετατρέπεται στην αντίστοιχη συχνότητα (ν) πολλαπλασιαζόμενος επί την ταχύτητα του φωτός (που εκφράζεται σε εκατοστόμετρα ανά δευτερόλεπτο).

$$\bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\text{cm})} \quad \text{και} \quad \nu(\text{Hz}) = \bar{\nu}c$$

Το φάσμα του υπέρυθρου χωρίζεται σε τρεις περιοχές: σε εγγύς ($12800-4000\text{ cm}^{-1}$), μέσο ($4000-200\text{ cm}^{-1}$) και άπω υπέρυθρο ($200-10\text{ cm}^{-1}$). Η περισσότερο όμως χρησιμοποιούμενη περιοχή είναι αυτή των ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) (Pavia, 2009)

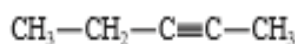
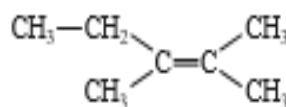
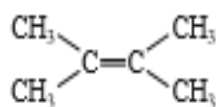


Εικόνα 1.3.2.1.1. Ένα τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που δείχνει τη σχέση της δόνησης υπέρυθρων σε άλλους τύπους ακτινοβολίας (Pavia, 2009)

Όπως και με άλλους τύπους απορρόφησης ενέργειας, τα μόρια διεγείρονται σε υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση όταν απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία. Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, όπως και άλλες διαδικασίες απορρόφησης, είναι μια κβαντισμένη διαδικασία. Ένα μόριο απορροφά μόνο επιλεγμένες συχνότητες (ενέργειες) της υπέρυθρης ακτινοβολίας. Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας αντιστοιχεί σε ενεργειακές μεταβολές της τάξεως των 8 έως 40 kJ/mole. Ακτινοβολία σε αυτό το φάσμα της ενέργειας αντιστοιχεί στο εύρος που περιλαμβάνει το τέντωμα και την κάμψη δονητικών συχνοτήτων των δεσμών στα περισσότερα ομοιοπολικά μόρια. Κατά τη διαδικασία απορρόφησης, αυτές οι συχνότητες της υπέρυθρης ακτινοβολίας που ταιριάζουν με τις φυσικές συχνότητες δόνησης του εν λόγω μορίου που απορροφάται, η ενέργεια που απορροφάται χρησιμεύει για την αύξηση του πλάτους των δονητικών κινήσεων των δεσμών στο μόριο. Σημειώστε, ωστόσο, ότι δεν είναι όλοι οι δεσμοί σε ένα μόριο ικανοί για την απορρόφηση υπέρυθρης ενέργειας, ακόμα και αν η συχνότητα της ακτινοβολίας ταιριάζει ακριβώς σε εκείνη της κίνησης δεσμού. Μόνο αυτοί οι δεσμοί που έχουν διπολική ροπή που αλλάζει ως συνάρτηση του χρόνου είναι ικανοί να απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία (Bock, 2011)

Συμμετρικοί δεσμοί, όπως εκείνοι του H_2 ή Cl_2 , δεν απορροφούν την υπέρυθρη ακτινοβολία. Ένας δεσμός πρέπει να παρουσιάσει ένα ηλεκτρικό δίπολο που αλλάζει με την ίδια συχνότητα όπως η εισερχόμενη ακτινοβολία για την ενέργεια που πρόκειται να μεταφερθεί. Το μεταβαλλόμενο ηλεκτρικό δίπολο του δεσμού μπορεί στη συνέχεια ζευγάρι με την ημιτονοειδή μεταβαλλόμενο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο της εισερχόμενης ακτινοβολίας. Έτσι, ένας συμμετρικός δεσμός που έχει

ταυτόσημες ή σχεδόν ταυτόσημες ομάδες σε κάθε άκρο δεν θα απορροφήσει στο υπέρυθρο. Για τους σκοπούς της οργανικής χημείας, οι πιο πιθανοί δεσμοί που μπορεί να επηρεαστούν από αυτή την αυτοσυγκράτηση είναι εκείνες συμμετρικών ή ψευδοσυμμετρικών αλκένιων ($C=C$) και αλκινίων ($C\equiv C$) (Pavia, 2009)



Συμμετρικά

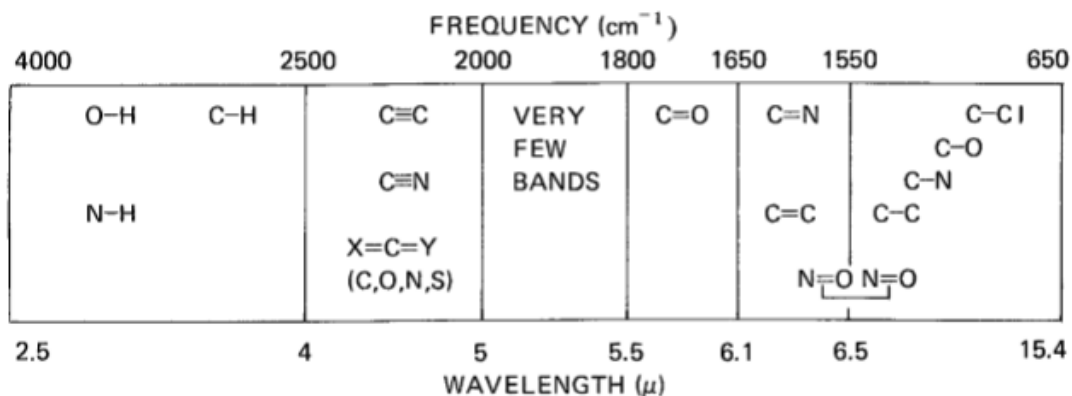
Ψευδοσυμμετρικά

Χρήσεις του Υπερύθρου φάσματος

Δεδομένου ότι κάθε τύπος δεσμού έχει διαφορετική φυσική συχνότητα δόνησης, και δεδομένου ότι δύο ίδιου είδους δεσμοί σε δύο διαφορετικές ενώσεις είναι σε δύο ελαφρώς διαφορετικά περιβάλλοντα, δεν υπάρχουν δύο μόρια με διαφορετική δομή που να έχουν ακριβώς το ίδιο μοτίβο στην υπέρυθη απορρόφηση, ή ίδιο υπέρυθρο φάσμα. Αν και ορισμένες από τις συχνότητες που απορροφούνται στις δύο αυτές περιπτώσεις μπορεί να είναι ίδιες, σε καμία περίπτωση τα δύο διαφορετικά μόρια δε θα εμφανίσουν ταυτόσημα φάσματα υπέρυθρου (τα μοτίβα απορρόφησης).

Έτσι, το φάσμα υπέρυθρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα μόριο όσο ένα δακτυλικό αποτύπωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον άνθρωπο. Συγκρίνοντας τα υπέρυθρα φάσματα δύο ουσιών που πιστεύεται ότι είναι πανομοιότυπες, μπορείτε να διαπιστώσετε αν είναι στην πραγματικότητα πανομοιότυπα. Εάν τα φάσματα τους υπέρυθρης συμπίπτουν κορυφή με κορυφή, στις περισσότερες περιπτώσεις οι δύο ουσίες θα είναι ίδιες.

Μια δεύτερη και πιο σημαντική χρήση του υπέρυθρου φάσματος είναι να καθορίσει δομικές πληροφορίες για ένα μόριο. Οι απορροφήσεις κάθε δεσμού του τύπου (N-H, C-H, O-H, C-X, C=O, C-O, C=C, C-C, $C\equiv N$ και ούτω καθεξής) βρίσκονται τακτικά μόνο σε ορισμένα μικρά τμήματα δόνησης στην υπέρυθη περιοχή. Ένα μικρό φάσμα απορρόφησης μπορεί να οριστεί για κάθε τύπο των δεσμών. Εκτός αυτού του εύρους, οι απορροφήσεις συνήθως οφείλονται σε κάποιο άλλο είδος δεσμών. Για παράδειγμα, οποιαδήποτε απορρόφηση στο εύρος $3.000 \pm 150 \text{ cm}^{-1}$ είναι σχεδόν πάντα λόγω της παρουσίας ενός δεσμού C-H στο μόριο, μια απορρόφηση της τάξης $1715 \pm 100 \text{ cm}^{-1}$ είναι κανονικά λόγω της παρουσίας ενός C=O δεσμού (ομάδα καρβονυλίου) στο μόριο. Ο ίδιος τύπος του φάσματος ισχύει για κάθε τύπο δεσμού.



Εικόνα 1.3.2.1.2 Οι κατά προσέγγιση περιοχές όπου απορροφούν διάφοροι κοινοί τύποι δεσμών (Pavia,2009)

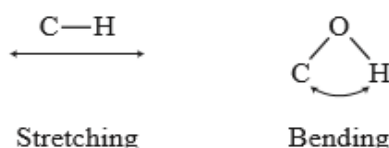
Πίνακας 1.3.2.1.1 Ένας απλοποιημένος πίνακας αντιστοιχίας (Salman et al,2010 και Pavia et al 2009)

	Τύπος Δόνησης	Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Ένταση
C-H	Αλκάνια (stretch)	3000-2850	s
	-CH ₃ (bend)	1450 και 1375	m
	-CH ₂ - (bend)	1465	m
	Αλκένια (stretch)	3100-3000	m
	Αλκένια (out of plane bend)	1000-650	s
	Αρωματικά (stretch)	3150-3050	s
	(out of plane bend)	900-690	s
	Αλκίνια	3300	s
	Αλδεύδες	2900-2800	w
			2800-2700
C-C	Αλκάνια	-	
C=C	Αλκένια	1680-1600	m-w
	Αρωματικά	1600-1475	m-w
C≡C	Αλκίνια	2250-2100	m-w
C=O	Αλδεύδες	1740-1720	s
	Κετόνες	1725-1705	s
	Καρβ.οξύ	1725-1700	s
	Εστέρες	1750-1730	s
	Αμίδια	1680-1630	s
	Ανυδρίτες	1810 και 1760	s
C-O	Αλκοόλες,Εστέρες,Αιθέρες, Καρβ.οξέα,ανυδρίτες	1300-1000	s

O-H	Αλκοόλες, Φαινόλες	3650-3600	m
	Καρβ.οξέα	3400-2400	m
N-H	Πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες ή αμίδια	3500-3100	m
		1640-1550	m-s
C-N	Αμίνες	1350-1000	m-s
C≡N	Νιτρίλια	2260-2240	m
S=O	Σουλφοξείδια	1050	s
N=O	Νιτρο-(R-NO ₂)	1550 και 1350	s

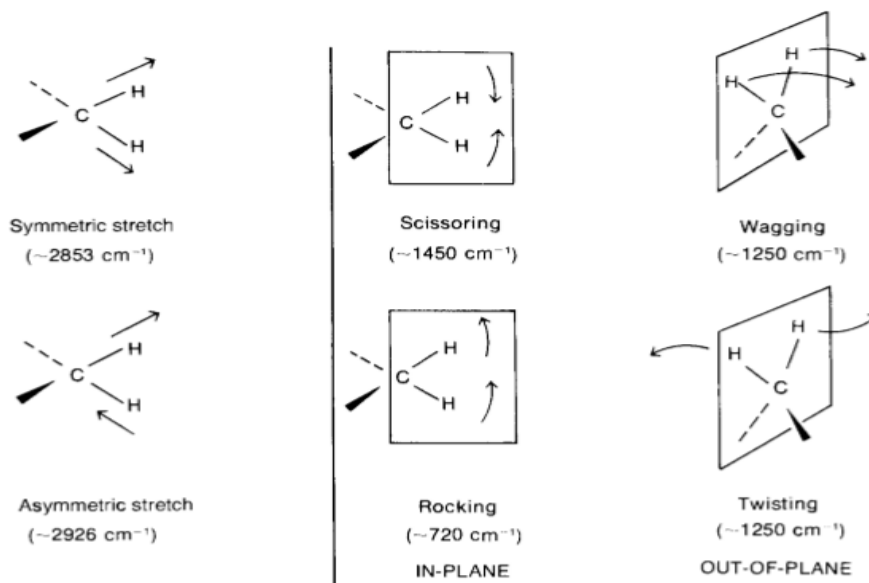
Είδη μοριακών δονήσεων

Τα απλούστερα είδη ή τρόποι παλμικών κινήσεων σε ένα μόριο που είναι δραστικό στην υπέρυθη ακτινοβολία-εκείνους που οδηγούν σε απορροφήσεις-είναι οι δονήσεις έκτασης ή τάσης (**stretching**) και οι δονήσεις κάμψης (**bending**).



Εικόνα 1.3.2.1.3 Μορφή δονήσεων

- **Δονήσεις έκτασης ή τάσης(stretching):** Χαρακτηρίζονται από μία συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων και κατά μήκος του δεσμού τους χωρίς να αλλάζουν κατεύθυνση ή γωνία. Διακρίνονται σε μεμονωμένες (π.χ O-H) και σε συζευγμένες (π.χ ομάδα μεθυλενίου -CH₂)
- **Δονήσεις κάμψης (bending):** Χαρακτηρίζονται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ δύο δεσμών. Αυτές οι δονήσεις διακρίνονται σε εκείνες που γίνονται εντός του επιπέδου ισορροπίας, που σχηματίζεται από τρία άτομα και τους δεσμούς τους ψαλιδοειδής(scissoring), λικνιζόμενους(rocking) και εκείνες που γίνονται εκτός του επιπέδου ισορροπίας παλλόμενες(wagging) ή συστρεφόμενες(twisting)(Pavia,2009, Skoog,2002)

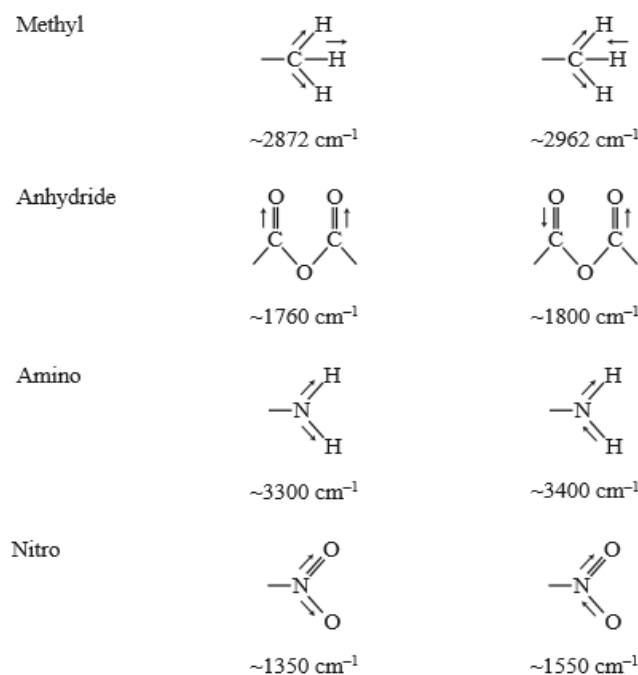


Εικόνα 1.3.2.1.4 Δονήσεις τάσης

Δονήσεις κάμψης

Ωστόσο, και άλλοι πιο σύνθετοι τύποι δονήσεων τάσης και κάμψης είναι επίσης δραστικές. Οι παρακάτω εικόνες των κανονικών τρόπων δόνησης για μια ομάδα μεθυλενίου εισαγάγει αρκετές όρους. Σε γενικές γραμμές, οι ασύμμετρες δονήσεις έκτασης συμβαίνουν σε υψηλότερες συχνότητες από ότι οι συμμετρικές δονήσεις τάσης. Επίσης, οι δονήσεις έκτασης συμβαίνουν σε υψηλότερες συχνότητες από δονήσεις κάμψης.

Σε κάθε ομάδα από τρία ή περισσότερα άτομα, τουλάχιστον δύο από τα οποία είναι πανομοιότυπα, υπάρχουν δύο τρόποι που εκτείνεται: *συμμετρική* και *ασύμμετρη*. Παραδείγματα τέτοιων ομάδων είναι $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$ και ανυδρίτες. Η ομάδα μεθυλίου δημιουργεί μια συμμετρική δόνηση τάσης στα περίπου 2872 cm^{-1} και μία ασύμμετρη έκταση στα περίπου 2962 cm^{-1} . Η λειτουργική ομάδα ανυδρίτη δίνει δύο απορροφήσεις στην περιοχή $\text{C}=\text{O}$ λόγω των ασύμμετρων και συμμετρικών δονήσεων τάσης. Ένα παρόμοιο φαινόμενο συμβαίνει στην αμινομάδα, όπου μια πρωτοταγής αμίνη (NH_2) έχει συνήθως δύο απορροφήσεις στην περιοχή τάσης $\text{N}-\text{H}$, ενώ μία δευτεροταγής αμίνη (R_2NH) έχει μόνο μία κορυφή απορρόφησης. Τα αμίδια παρουσιάζουν παρόμοιες ζώνες απορρόφησης. Υπάρχουν δύο ισχυρές κορυφές έκτασης για μία νίτρο ομάδα $\text{N}=\text{O}$, με το συμμετρική δόνηση τάσης να εμφανίζεται σε περίπου 1350 cm^{-1} και την ασύμμετρη δόνηση έκτασης να εμφανίζεται σε περίπου 1550 cm^{-1} (Pavia, 2009, Bock, 2011)



Εικόνα 1.3.2.1.5

Συμμετρικές δονήσεις

Ασύμμετρες δονήσεις

τάσης

τάσης

Οι δονήσεις που συζητήσαμε ονομάζονται θεμελιώδεις απορροφήσεις και προέρχονται με διέγερση από την βασική κατάσταση στη χαμηλότερη ενεργειακή διεγερμένη κατάσταση. Συνήθως, το φάσμα είναι περίπλοκο λόγω της παρουσίας αδύναμων απόηχων, συνδυασμών, και διαφορετικών ζωνών. Αρμονικά αποτελέσματα προκύπτουν από διέγερση από την θεμελιώδη κατάσταση σε υψηλότερες ενεργειακές καταστάσεις, οι οποίες αντιστοιχούν σε ακέραια πολλαπλάσια της συχνότητας της θεμελιώδους (n).

Όργανα υπέρυθρου

Το μέσο που προσδιορίζει το φάσμα απορρόφησης για μία ένωση ονομάζεται **υπέρυθρο φασματοόμετρο** ή ακριβέστερα, ένα **φασματοφωτόμετρο**. Τα όργανα για τη μέτρηση της απορρόφησης υπέρυθρου διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- Όργανα διασποράς, τα οποία διαθέτουν ένα φράγμα διασποράς της ακτινοβολίας και χρησιμοποιούνται κυρίως σε ποιοτικές μετρήσεις
- Μετασχηματισμού Fourier (FT), είναι πολυπλεκτικά όργανα τα οποία χρησιμοποιούνται τόσο για ποιοτικές όσο και για ποσοτικές μετρήσεις

Και τα δύο αυτά είδη μέσων παρέχουν φάσματα των ενώσεων σε εύρος περιοχής 4000 έως 400 cm^{-1} . Παρόλο που και τα δύο παρέχουν σχεδόν ταυτόσημα φάσματα για μία δοθείσα ένωση, τα FT υπέρυθρα φασματοόμετρα παρέχουν το υπέρυθρο φάσμα πολύ πιο γρήγορα από τα μέσα διασποράς.

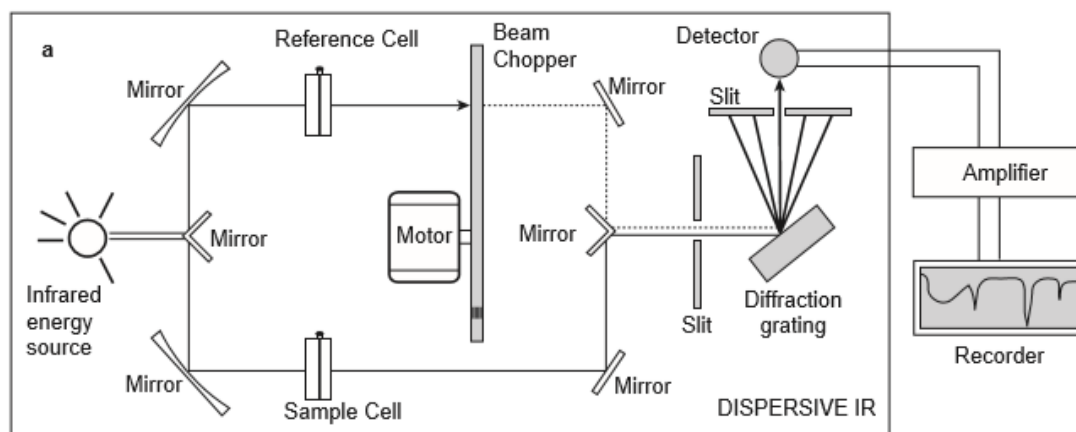
- Μη διασπείροντα φωτόμετρα, τα οποία έχουν αναπτυχθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών οργανικών ενώσεων στην ατμόσφαιρα με φασματοσκοπία απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης.

Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του '80, η λειτουργία των περισσότερων οργάνων για τη μέση υπέρυθρη περιοχή του φάσματος βασιζόταν στη χρήση φασμάτων περίθλασης. Από τότε όμως έχουν πραγματοποιηθεί αλλαγές στην επιστήμη της φασματοσκοπίας και έτσι πλέον η πλειονότητα των οργάνων βασίζεται στον μετασχηματισμό Fourier.

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου χρησιμοποιείται ευρύτατα, ενώ βρίσκει σημαντική εφαρμογή στον προσδιορισμό της δομής διαφόρων ενώσεων, στην ταυτοποίηση τους καθώς και στην ποσοτική ανάλυση (Skoog, 2002).

Υπέρυθρο φασματοόμετρο Διασποράς

Στην εικόνα 1.3.2.1.6 απεικονίζονται σχηματικά τα στοιχεία ενός απλού υπέρυθρου φασματοόμετρου διασποράς. Το όργανο παράγει μια δέσμη της υπέρυθρης ακτινοβολίας από ένα θερμό σύρμα και, μέσω των κατόπτρων, αυτό χωρίζεται σε δύο παράλληλες ακτίνες ακτινοβολίας ίσης έντασης. Το δείγμα τοποθετείται σε μία ειδική θέση και η άλλη χρησιμοποιείται ως αναφορά. Οι δοκοί τότε περνούν στο μονοχρωμάτορα, ο οποίος διασκορπίζει έκαστο σε ένα συνεχές φάσμα συχνοτήτων του υπέρυθρου φωτός. Ο μονοχρωμάτορας αποτελείται από έναν γρήγορα περιστρεφόμενο τομέα (chopper beam), που περνάει τις δύο δέσμες εναλλάξ σε ένα φράγμα περίθλασης (ένα πρίσμα σε παλαιότερα μέσα). Η αργά περιστρεφόμενη φράγμα περίθλασης μεταβάλλει τη συχνότητα ή το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που φτάνει στον ανιχνευτή θερμοστοιχείου. Ο ανιχνευτής ανιχνεύει την αναλογία μεταξύ των εντάσεων των δεσμών αναφοράς και δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο, ο ανιχνευτής καθορίζει ποιες συχνότητες έχουν απορροφηθεί από το δείγμα και ποιες συχνότητες δεν επηρεάζονται από το φως που διέρχεται από το δείγμα. Αφού το σήμα από τον ανιχνευτή ενισχύεται, η συσκευή αντλεί το προκύπτον φάσμα του δείγματος σε ένα γράφημα. Είναι σημαντικό να συνειδητοποιήσουμε ότι το φάσμα καταγράφεται ως η συχνότητα της υπέρυθρης ακτινοβολίας, αλλαγών με περιστροφή του φράγματος περίθλασης.



Εικόνα 1.3.2.1.6 Σχηματική απεικόνιση φασματοφωτόμετρου διασποράς(Pavia,2009)

A. Φασματοσκοπία Υπερύθρου-Μετασχηματισμού Fourier (FT-IR)

Ιστορική Αναδρομή

Η φασματοσκοπία σχηματισμού Fourier χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1950, από τους αστρονόμους, προκειμένου να γίνει η μελέτη των φασμάτων υπερύθρου των απομακρυσμένων αστερών, με σκοπό να απομονωθούν τα πολύ ασθενή σήματα αυτών των πηγών από το θόρυβο. Η πρώτη χημική εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier έγινε 10 χρόνια μετά και πραγματοποιήθηκε στην ενεργειακά φτωχή περιοχή του άπυ υπερύθρου. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 εμφανίστηκαν στο εμπόριο όργανα αυτού του τύπου που αποσκοπούσαν στην χημική μελέτη τόσο της άπυ υπέρυθρης όσο και της υπέρυθρης περιοχής.

Όταν τα φασματοφωτόμετρα υπερύθρου – μετασχηματισμού Fourier εμφανίστηκαν για πρώτη φορά στην αγορά, ήταν ογκώδη, υψηλού κόστους και απαιτούσαν συχνές μηχανικές ρυθμίσεις. Έτσι η χρήση τους περιοριζόταν σε ειδικές εφαρμογές όπου τα εξαιρετικά χαρακτηριστικά τους (ταχύτητα, υψηλή σταθερότητα, ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια) ήταν απολύτως απαραίτητα. Σήμερα όμως τα φασματοφωτόμετρα FT-IR έχουν αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τα πιο προσιτά όργανα διασποράς ακτινοβολίας, καθώς είναι πλέον πιο μικρά σε μέγεθος, οικονομικά και αξιόπιστα, ενώ επίσης συντηρούνται αρκετά πιο εύκολα.

Τμήματα ενός οργάνου μετασχηματισμού Fourier

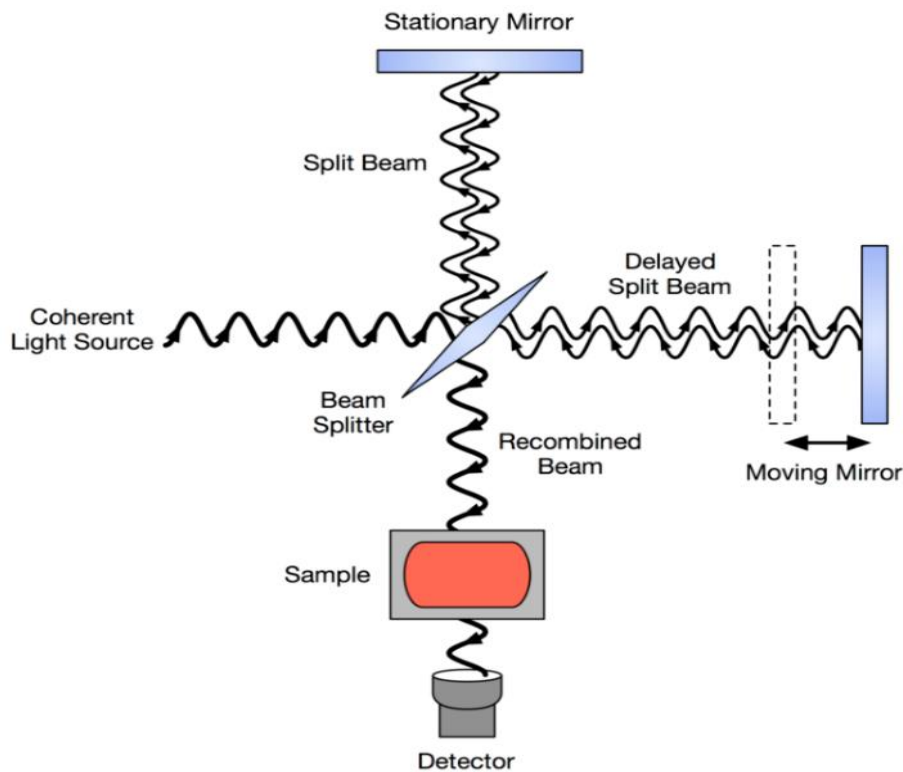
Τα πιο σύγχρονα υπέρυθρα φασματοφωτόμετρα (φασματοφωτόμετρα) λειτουργούν με μια διαφορετική αρχή. Ο σχεδιασμός του οπτικού μονοπατιού παράγει ένα μοτίβο που ονομάζεται παρεμβολή. Το διάγραμμα παρεμβολής είναι ένα σύνθετο σήμα,

αλλά σαν μοτίβο κύματος περιέχει όλες τις συχνότητες που συνθέτουν το υπέρυθρο φάσμα. Ένα διάγραμμα παρεμβολής είναι ουσιαστικά μια γραφική παράσταση της έντασης συναρτήσει του χρόνου (ένα φάσμα πεδίου χρόνου). Ωστόσο, ένας χημικός ενδιαφέρεται περισσότερο για ένα φάσμα που είναι μια γραφική παράσταση της έντασης συναρτήσει της συχνότητας (ένα φάσμα συχνοτήτων στο πεδίο). Μια μαθηματική πράξη γνωστή ως μετασχηματισμός Fourier (FT) μπορεί να διαχωρίσει τις μεμονωμένες συχνότητες απορρόφησης από το συμβολογράφημα, παράγοντας ένα φάσμα ουσιαστικά ίδιο με εκείνο που λαμβάνεται με ένα φασματομέτρο διασποράς. Αυτό το είδος της πράξης είναι γνωστός ως ένα φασματομέτρο υπέρυθρου – μετασχηματισμός Fourier ή FT-IR (Pavia, 2009).

Το πλεονέκτημα ενός μέσου FT-IR είναι ότι αποκτά το συμβολογράφημα σε λιγότερο από ένα δευτερόλεπτο. Είναι έτσι δυνατόν να συλλέγει δεκάδες παρεμβολές του ίδιου δείγματος συσσωρεύοντας τους στη μνήμη του υπολογιστή. Όταν ο μετασχηματισμός Fourier εκτελείται το άθροισμα των συσσωρευμένων παρεμβολών, δίνει ένα φάσμα με ένα καλύτερο λόγο σήματος προς θόρυβο. Ένα όργανο FT-IR είναι συνεπώς ικανό για μεγαλύτερη ταχύτητα και μεγαλύτερη ευαισθησία από ένα όργανο διασποράς. Το σημαντικότερο τμήμα ενός φασματοφωτομέτρου υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier είναι το συμβολόμετρο το οποίο σχεδιάστηκε από τον Albert Michelson το 1891.

Ένα συμβολόμετρο Michelson αποτελείται από:

1. Την πηγή ακτινοβολίας
2. Τον διαχωριστή δέσμης
3. Ένα σταθερό κάτοπτρο
4. Ένα κινητό κάτοπτρο με μηχανισμό κίνησης
5. Τον ανιχνευτή
6. Τον υποδοχέα του δείγματος ανάμεσα στο συμβολόμετρο και τον ανιχνευτή.

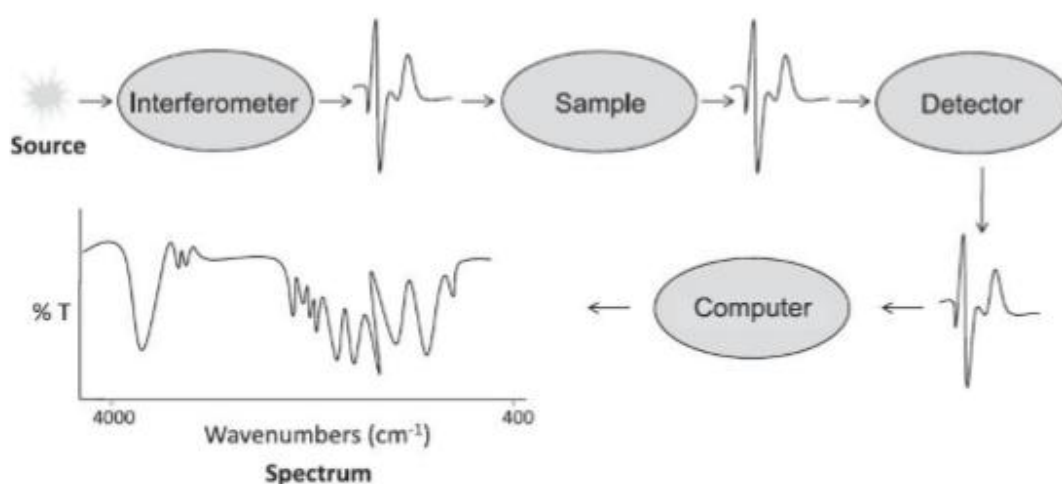


Εικόνα 1.3.2.1.7 Σχεδιάγραμμα συμβολόμετρου Michelson (Pavia, 2009)

Ένα σχηματικό διάγραμμα μιας FT-IR παρουσιάζεται στην Εικόνα 1.3.2.1.7. Το FT-IR χρησιμοποιεί ένα συμβολόμετρο για την επεξεργασία της ενέργειας που αποστέλλεται στο δείγμα. Στο συμβολόμετρο, η φωτεινή δέσμη της πηγής ακτινοβολίας περνά μέσα από ένα διαχωριστή δέσμης, έναν καθρέφτη τοποθετημένο σε μια γωνία 45° ως προς την εισερχόμενη ακτινοβολία, η οποία επιτρέπει στην εισερχόμενη ακτινοβολία να περάσει από μέσα, αλλά χωρίζεται σε δύο κάθετες δέσμες, μία εκτρέπεται, η άλλη είναι προσανατολισμένη σε μια γωνία 90° . Οι διαχωριστές δέσμης κατασκευάζονται από διαφανή υλικά με κατάλληλα επιλεγμένους δείκτες διάθλασης, ώστε περίπου το 50% της ακτινοβολίας να ανακλάται και το υπόλοιπο 50% να τους διαπερνά. Υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι λεπτά φιλμ από Mylar για την υπέρυθρη περιοχή, ή φιλμ γερμανίου που έχουν αποθεθεί σε βρωμιούχο κάλιο για τη μέση υπέρυθρη περιοχή, ή μια επίστρωση οξειδίου του σιδήρου σε φθοριούχο ασβέστιο για την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου.

Μία δέσμη, προσανατολισμένη στις 90° , πηγαίνει σε ένα σταθερό κάτοπτρο και επιστρέφεται στο διαμεριστή ακτίνας. Η μη αποκλίνουσα δέσμη πηγαίνει σε ένα κινούμενο κάτοπτρο και επίσης επιστρέφεται στο διαμεριστή ακτίνας. Η κίνηση του κατόπτρου προκαλεί την μήκος διαδρομής που η δεύτερη δέσμη διασχίζει να ποικίλλει. Όταν οι δύο δέσμες συναντηθούν στο διαχωριστή δέσμης,

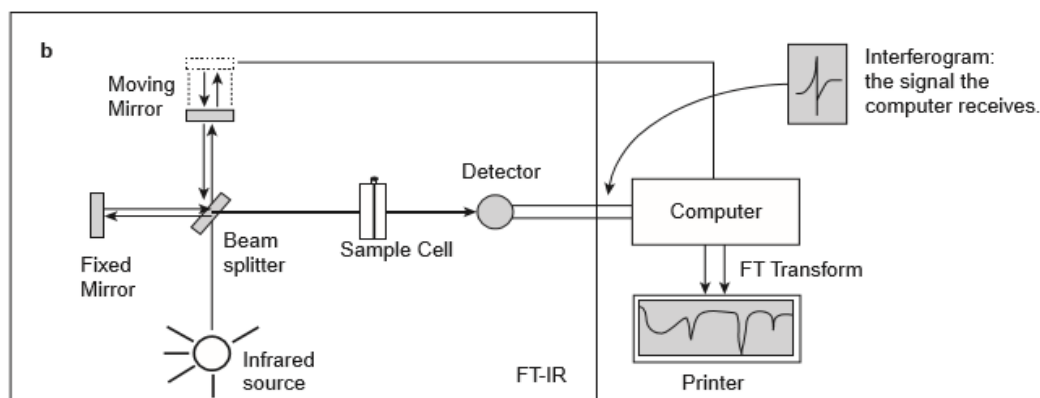
ανασυνδυάζονται. Η επανενωμένη δέσμη που δημιουργείται τελικά από τον διαχωριστή περνά από το δείγμα που δημιουργείται μερική ή ολική απορρόφηση ορισμένων συχνοτήτων της δέσμης. Το τροποποιημένο σήμα παρεμβολής που φθάνει στον ανιχνευτή περιέχει πληροφορίες σχετικά με την ποσότητα της ενέργειας που απορροφήθηκε σε κάθε μήκος κύματος (συχνότητα). Ο ανιχνευτής αντιλαμβάνεται την υπέρυθη ακτινοβολία που διέρχεται μέσα από το δείγμα. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ανιχνευτή είναι αυτοί που χρησιμοποιούν δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (DTGS). Η λειτουργία αυτού του τύπου ανιχνευτών στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του που προκαλείται από την πρόσπτωση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, η οποία έχει προηγουμένως διέλθει από το δείγμα. Αποτέλεσμα αυτής της αύξησης θερμοκρασίας είναι η δημιουργία μιας διαφοράς δυναμικού.



Εικόνα 1.3.2.1.8 Σχηματική απεικόνιση της πορείας της ακτινοβολίας μέσα από τα μέρη ενός φασματοφωτόμετρου (Santos et al,2010)

Τέλος γίνεται μετατροπή του αναλογικού αυτού σήματος σε ψηφιακό και εισέρχεται στον υπολογιστή, όπου με το κατάλληλο λογισμικό λαμβάνεται το συμβολόγραμμα. Μια μαθηματική διαδικασία που ονομάζεται μετασχηματισμός Fourier εφαρμόζεται από τον υπολογιστή για να εξαχθούν οι μεμονωμένες συχνότητες που απορροφήθηκαν και να σχεδιαστεί τελικά αυτό που αναγνωρίζουμε ως ένα τυπικό υπέρυθρο φάσμα. Για να ληφθεί ένα φάσμα μιας ένωσης, ο χημικός αποκτά πρώτα μια παρεμβολής του «θορύβου» (background), η οποία αποτελείται από τον υπέρυθρο ενεργό ατμοσφαιρικό αέριο, διοξείδιο του άνθρακα και υδρατμούς (οξυγόνου και αζώτου δεν είναι ενεργά στο υπέρυθρο). Το συμβολόγραμμα υποβάλλεται σε μετασχηματισμό Fourier, το οποίο αποδίδει το φάσμα στο «θόρυβο» (background). Στη συνέχεια, ο χημικός τοποθετεί την ένωση (δείγμα) στην ακτίνα και αποκτά το φάσμα που προκύπτει από το μετασχηματισμό Fourier. Αυτό το φάσμα περιέχει ζώνες απορρόφησης τόσο για την ένωση όσο και για τον «θόρυβο». Το λογισμικό του υπολογιστή αφαιρεί αυτόματα το φάσμα του

υποβάθρου από το φάσμα του δείγματος, δίδοντας το φάσμα της ένωσης που αναλύεται.

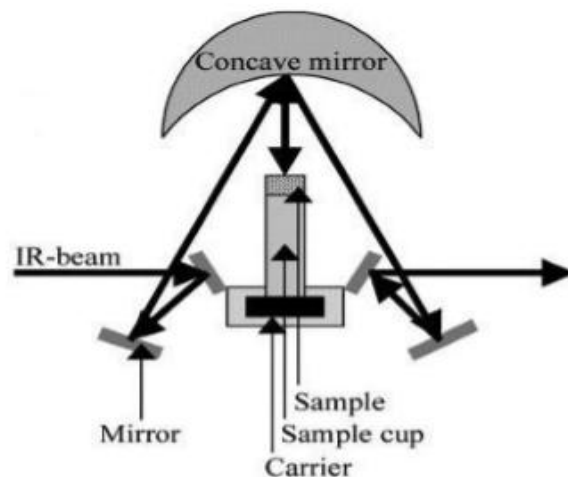


Εικόνα 1.3.2.1.9 Σχηματική απεικόνιση υπέρυθρου φασματοφωτομετρου- μετασχηματιστή Fourier (Santos, 2010)

Διάχυτη ανάκλαση φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (DRFTS)

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές δειγματοληψίας που μπορούν να εφαρμοστούν σε φασματοσκοπία FT-IR ανάλογα με τον τύπο του δείγματος που αναλύεται. Αυτές περιλαμβάνουν την εξασθενημένη ολική ανάκλαση (ATR), κατοπτρικής ανάκλασης (SR), διάχυτη φασματοσκοπία ανάκλασης FT-IR/FT-IR, φασματοσκοπία (DRIFTS), Ανάκλαση-Απορρόφηση Φασματοσκοπία IR (RAIRS), μετάδοσης (TR), Φωτοακουστική Φασματοσκοπία (PAS), μικροφασματοσκοπία FT-IR και πολλαπλή Φασματοσκοπία εσωτερικής Ανάκλασης (MIR FT-IR) (Argyri *et al*, 2014)

Η διάχυτη ανάκλαση φασματοσκοπίας υπέρυθρου αποτελεί μία από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για την λήψη φασμάτων από στερεά δείγματα. Αυτό το οφείλει στη μεγάλη ευκολία προετοιμασίας του δείγματος, καθώς δεν απαιτεί προηγούμενη κατεργασία του για την τοποθέτησή του στο μηχάνημα εκτός της λυοτρίβισης και της τυχόν ανάμειξης του με KBr. Έτσι η τεχνική αυτή είναι απλή και πολύ γρήγορη. Αφού το στερεό δείγμα μετατραπεί σε πολύ ψιλή σκόνη(πούδρα) τοποθετείται ελάχιστη ποσότητα στον ειδικό υποδοχέα.



Εικόνα 1.3.2.1.10 Σχηματική απεικόνιση του οργάνου DRFTS (Pavia, 2009)

Πλεονεκτήματα φασματοσκοπίας FT-IR

Η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σημαντικότερα από τα οποία είναι:

- Η ικανότητα μέτρησης των πολύ ασθενών σημάτων, λόγω του ότι αποτελούνται από λίγα μόνο οπτικά στοιχεία, ενώ καμία σχισμή δεν εξασθενεί την ακτινοβολία. Έτσι τα οπτικά τους συστήματα εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ενεργειακή απόδοση σε σχέση με τα όργανα διασποράς.
- Ο λόγος σήματος προς θόρυβο είναι μεγαλύτερος κατά τουλάχιστον μίας τάξης μεγέθους σε σχέση με τα καλής ποιότητας φασματοφωτόμετρα διασποράς.
- Εμφανίζουν υψηλή διακριτική ισχύ ($0,1 \text{ cm}^{-1}$) και συνεπώς μεγάλη ακρίβεια αλλά και επαναληψιμότητα
- Όλη η πληροφορία που βρίσκεται στην ακτινοβολία φτάνει συγχρόνως στον ανιχνευτή και έτσι εξασφαλίζεται συλλογή των δεδομένων για ολόκληρο το φάσμα σε ελάχιστο χρόνο, πολλές φορές και λιγότερο του δευτερολέπτου (Skoog, 2002).
- Διαθέτουν μηχανική απλότητα, ο κινούμενος καθρέφτης στο συμβολόμετρο είναι το μόνο συνεχώς κινούμενο μέρος στο όργανο. Έτσι, υπάρχει πολύ μικρή πιθανότητα μηχανικής βλάβης.
- Τα μέσα αυτά χρησιμοποιούν ένα λέιζερ HeNe ως εσωτερικό πρότυπο βαθμονόμησης μήκους κύματος (αναφέρεται ως Advantage Connes). Τα μέσα αυτά είναι η αυτο-βαθμονομιμένα και δε χρειάζεται να διακριβώνονται από τον χρήστη ποτέ (Pavia, 2009).

Εφαρμογές της φασματοσκοπίας FT-IR

Η φασματοσκοπία FT-IR έχει πλέον αρχίσει να χρησιμοποιείται πάρα πολύ αφού είναι σε θέση να προσδιορίσει και να μετρήσει τις συγκεντρώσεις πολλών χημικών στοιχείων μέσω μέτρησης των φασμάτων τους και με χαμηλό έως μηδενικό κόστος λειτουργίας. Βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς από τη βαριά βιομηχανία μέχρι τον τομέα των τροφίμων και των μικροοργανισμών.

Μερικές κοινότητες, ιδιαίτερα μουσουλμανικές και Εβραϊκές, είναι πολύ ανήσυχες για την αυθεντικότητα των προϊόντων τροφίμων που επισημαίνονται ως Halal. Η υπέρυθη φασματοσκοπία (FTIR) έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες που αφορούν την ανίχνευση της νοθείας των διαθέσιμων στο εμπόριο προϊόντων διατροφής (κατεψυγμένα τηγανητές πατάτες) και φυτικά έλαια (αραβοσιτέλαιο, ηλιέλαιο, φοινικέλαιο και ελαιολάδου) από λαρδί. Το FTIR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της νοθείας των μεταποιημένων προϊόντων διατροφής από λαρδί (Al-Kathani *et al*,2016).

Τρόφιμα που αποτελούνται από ζωικούς μύες, όπως το κρέας, πουλερικά, ψάρια και συναφή προϊόντα, είναι από τα πιο ευπαθή προϊόντα διατροφής λόγω της ευαισθησίας τους στη μικροβιολογική αλλοίωση η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κρίσιμα προβλήματα της ασφάλειας τροφίμων. Οι παραδοσιακές τεχνικές για την ανίχνευση και την αξιολόγηση των μικροβιακής αλλοίωσης στα μυϊκά τρόφιμα είναι κουραστική, επίπονη και χρονοβόρα. Τα τελευταία χρόνια, φασματοσκοπικές και απεικόνιση τεχνολογίες έχουν δείξει μεγάλες δυνατότητες για την αξιολόγηση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων λόγω του ότι είναι μη καταστροφική για το δείγμα, μη επεμβατική και χαμηλού κόστους. Η φασματοσκοπία FT-IR σε συνδυασμό με χημειομετρικές ανάλυσεις, όπως φασματική μεθόδους προεπεξεργασίας και μοντελοποίησης, έχουν αναπτυχθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό του συνολικού μικροβιακού φορτίου, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, και βακτήρια γαλακτικού οξέος στα τρόφιμα αυτά (Cheng *et al*,2015). Η φασματοσκοπική μέθοδος μετασχηματισμού Fourier με τη χρήση (PLS) μοντέλου παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε από ερευνητές για την πρόβλεψη της περιεκτικότητας σε σάκχαρα σε δείγματα μελιού (Anjos *et al*,2015).

Σημαντικές έρευνες που έχουν γίνει με τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR ακουμπούν μείζονα θέματα υγείας όπως είναι η αναστολή της παχυσαρκίας. Σύγχρονοι ερευνητές χρησιμοποίησαν αυτή τη τεχνική για την ανίχνευση ενός αναστολέα της παγκρεατικής λιπάσης στα εκχυλίσματα του φυτού *Aquilaria malaccensis* (Jamahseri *et al*,2014). Η γαλακτοζαιμία είναι μία μεταβολική νόσος που οφείλεται σε ένα αυτοσωμικό υπολειπόμενο γονίδιο έλλειψης του ενζύμου ουριδυλο-τρανσφεράσης της 1- φωσφορικής γαλακτόζης. Η συσσώρευση γαλακτόζης επάγει στα νεογέννητα πολλά συμπτώματα, όπως ηπατοπάθεια, καταρράκτη, και σήψη που οδηγούν στο θάνατο αν δεν αντιμετωπιστεί. Νεογνικοί

έλεγχοι αναπτύσσονται και εφαρμόζονται σε πολλές χώρες που χρησιμοποιούν διάφορες μεθόδους για την ανίχνευση γαλακτόζης. Η φασματοσκοπία FT-IR ερευνήθηκε ως πιθανό εργαλείο στις τρέχουσες μεθόδους διαλογής. IR φάσματα ελήφθησαν από το πλάσμα του αίματος υγιών, διαβητικοί, και γαλακτοζαιμικών ασθενών. Οι μεγάλες φασματικές διαφορές ήταν στην περιοχή των υδατανθράκων, που για πρώτη φορά αναλύεται με έναν διερευνητικό τρόπο χρησιμοποιώντας ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)(Lacombe *et al*,2015)

Στην περίπτωση γαλακτοκομικών προϊόντων η τεχνική FT-IR έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πολλές εφαρμογές. Το FT-IR έχει τη δυνατότητα να καθιερωθεί ως μια τεχνική για τον έλεγχο της ταυτότητας του γάλακτος, δεδομένου ότι έχει βρεθεί σε θέση να εντοπίσει και να γίνει διάκριση μεταξύ του αγελαδινού, κατσικίσιου ή πρόβειου γάλατος καθώς και να προσδιοριστεί η συγκέντρωση της ουρίας στο γάλα (Baumgartner *et al.*,2003). Επιπλέον, η φασματοσκοπία FT-IR έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κατιόντων των πρωτεϊνών στο γάλα (Hewavitharana και Brakel, 1997, Luginbuhl, 2002, Etzion *et al.*, 2004, Kher *et al.* 2007, Haque *et al.* 2011) και το γιαούρτι (Argyri,2014). Εφαρμόστηκε επίσης στην ανάλυση του γάλακτος για την ποσοτικό προσδιορισμό των κατιόντων λακτόζης (Cocciardi *et al.* ,2004, Yang *et al.* ,2007, Kittivachra *et al.*,2007) και του λίπους, πρωτεΐνης και λακτόζης. Έχει εφαρμοστεί για να καθορίσει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων του γάλακτος (Ulberth και Henninger,1994, Afseth *et al.*, 2010) και για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και του λίπους κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού (Chen *et al.*, 1998).Τέλος, το FT-IR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποιοτική και ημιποσοτική διαλογή μολυσμένων τροφίμων από ένα μεγάλο αριθμό ώριμων και ημι-ωριμασμένων τυριών με ανίχνευση κυκλοπιαζονικού οξέως (CPA) ένα τοξικό μυκητιασικό δευτερογενή μεταβολίτη που έχει απομονωθεί από μύκητες (Monaci *et al.* 2007).

B. Φασματοσκοπία Raman

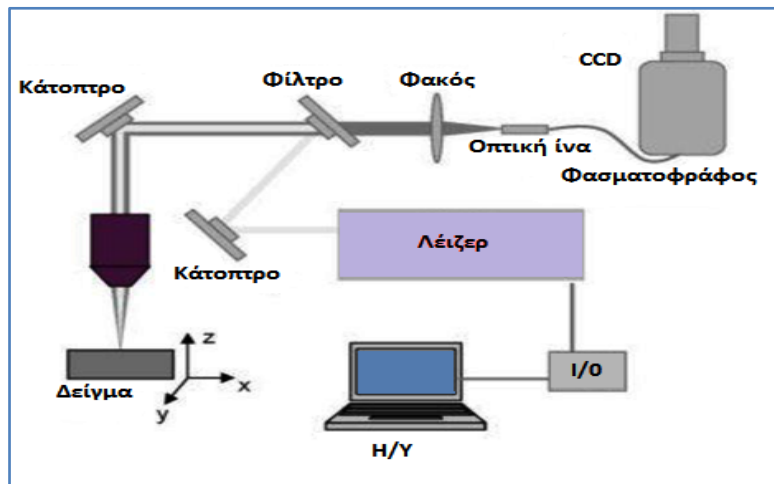
Η φασματοσκοπία Raman είναι μια φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη δονήσεων, περιστροφική, και άλλες χαμηλής συχνότητας λειτουργίες σε ένα σύστημα (Gardiner και Graves 1989). Όταν ένα μόριο ακτινοβολείται με ένα μονοχρωματικό φως, αυτό οδηγεί πάντα σε δύο τύπους σκέδαση φωτός, ελαστικές και ανελαστικές. Στην ελαστική σκέδαση, δε συμβαίνει καμία αλλαγή στη συχνότητα των φωτονίων ή δε παρουσιάζεται κάποια μεταβολή στο μήκος κύματος και την ενέργεια του, αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως σκέδαση Rayleigh. Η ανελαστική σκέδαση συνοδεύεται από αλλαγή στην συχνότητα των φωτονίων λόγω διέγερσης ή απενεργοποίησης των μοριακών δονήσεων στα οποία είτε το φωτόνιο μπορεί να χάσει κάποια ποσότητα της ενέργειας ή να αυξήσει την ενεργειακή του κατάσταση (Das και Agrawal 2011). Εάν το μόριο αποκτά την ενέργεια, διάσπαρτα φωτόνια μετατοπίζονται προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, προκαλώντας σκέδαση Stokes στο φάσμα Raman.

Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να μεταφερθούν σε βραχύτερα μήκη κύματος, δίνοντας αφορμή για σκέδαση αντι-Stokes στο φάσμα Raman. Οι μετατοπίσεις συχνότητας του σκεδαζόμενου φωτός μπορούν να αναλυθούν και να παρουσιάζονται ως φάσματα. Το φάσμα Raman παράγεται όταν η μοριακή δόνηση ή περιστροφή του ενός μορίου προκαλούν αλλαγές στην πολωσιμότητα του, ενώ στα φάσματα IR η μοριακή δόνηση ή περιστροφή προκαλεί αλλαγές της διπολικής ροπής. Είναι χαρακτηριστικό ότι στη φασματοσκοπία Raman, οι συμμετρικές δονήσεις παρουσιάζουν έντονες φασματικές ζώνες και αν ένα μόριο έχει υψηλή συμμετρία, θα είναι συχνά ανενεργό στο IR. Τέλος, οι ζώνες που παρατηρήθηκαν στα φάσματα, αντιπροσωπεύουν δονητικά χαρακτηριστικά για χημικούς δεσμούς και λειτουργικές ομάδες που αποτελούν τις συνιστώσες στα δείγματα που εξετάστηκαν, ευνοώντας την ανάλυση των διαφόρων ειδών δειγμάτων και παρέχοντας έτσι τη βάση για τη δομή, την ποιοτική ανάλυση και τον ποσοτικό προσδιορισμό (Yang και Ying 2011).

Raman φασματόμετρο και μετασχηματισμού Fourier φασματόμετρο Raman

Ένα φασματόμετρο Raman αποτελείται από μια πηγή φωτός, μονοχρωμάτορα, εισαγωγέα του δείγματος και τον ανιχνευτή. Δύο σημαντικές τεχνολογίες χρησιμοποιούνται για τη συλλογή των φασμάτων Raman, φασματοσκοπία Raman και μετασχηματισμού Fourier φασματοσκοπία Raman, με διαφορά στις πηγές λέιζερ τους (στην ορατή, εγγύς υπέρυθρο ή υπεριώδες φάσμα) και με τον τρόπο με τον οποίο η σκέδαση Raman ανιχνεύεται και αναλύεται. Και οι δύο αυτές τεχνικές έχουν μοναδικά πλεονεκτήματα και προτιμάται η μέθοδος που ταιριάζει καλύτερα το δείγμα (Das και Agrawal, 2011). Στα μέσα διασποράς Raman, αυτό επιτυγχάνεται με την εστίαση του διάχυτου φωτός Raman πάνω σε ένα φράγμα περίθλασης, χωρίζοντας την ακτίνα στα μήκη κύματος που τη συνθέτουν και που κατευθύνονται πάνω στον ανιχνευτή. Η διασπορά Raman απασχολεί συνήθως την ορατή ακτινοβολία λέιζερ, με τυπικό μήκος κύματος λέιζερ συμπεριλαμβανομένων των 785, 780, 671, 633, 532, και 473 nm. Η ένταση της σκέδασης Raman είναι ανάλογη του λόγου $1 / \lambda^4$, έτσι μήκη κύματος λέιζερ μικρής διέγερσης παρουσιάζουν ένα πολύ ισχυρότερο σήμα Raman.

Στη θέση του ορατού λέιζερ διέγερσης, ένα φασματόμετρο του τύπου FT-Raman χρησιμοποιεί ένα λέιζερ στο εγγύς υπέρυθρο συνήθως στα 1064 nm. Σε αυτό το μήκος κύματος ο φθορισμός είναι σχεδόν εντελώς απών, ωστόσο, λόγω του $1 / \lambda^4$ η σχέση μεταξύ της έντασης της σκέδασης Raman και του μήκος κύματος, δίνει ένα ασθενές σήμα Raman. Μια συμβολόμετρο μετατρέπει το σήμα Raman σε παρεμβολή, που επιτρέπει στον ανιχνευτή να συλλέξει όλο το φάσμα Raman ταυτόχρονα. Σε χαμηλά επίπεδα σήματος ο φασματικός θόρυβος είναι κατά κύριο λόγο σκοτεινός θόρυβος από τον ανιχνευτή και είναι ανεξάρτητος από την ένταση του σήματος Raman, έτσι παρέχοντας όλο το φάσμα αμέσως στον ανιχνευτή βελτιώνεται σημαντικά ο λόγος σήματος προς θόρυβο.



Εικόνα 1.3.2.1.11 Οργανολογία φασματόμετρου Raman (Yang και Ying 2011)

Με εφαρμογή του αλγορίθμου μετασχηματισμού Fourier στην παρεμβολή μετατρέπονται τα αποτελέσματα σε ένα συμβατικό φάσμα Raman. Η τεχνική FT-Raman έχει τρία κύρια πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συστήματα διασποράς Raman:

(1) Ικανότητα μέτρησης ασθενών σημάτων γνωστό και ως πλεονέκτημα Jaquinot (Jaquinot advantage), επειδή τα όργανα μετασχηματισμού Fourier αποτελούνται από λίγα μόνο οπτικά στοιχεία και καμία σχισμή δεν εξασθενίζει την ακτινοβολία. Κατά συνέπεια, η ισχύς της ακτινοβολίας, η οποία φθάνει στον ανιχνευτή, είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από αυτή των οργάνων που διασπείρουν την ακτινοβολία και συνεπώς ο λόγος σήματος προς θόρυβο είναι επίσης μεγαλύτερος.

(2) Καθιστά δυνατή τη συλλογή δεδομένων για ολόκληρο το φάσμα σε ένα δευτερόλεπτο ή και λιγότερο.

(3) Δείχνει μια υψηλή φασματική ανάλυση με μεγάλη ακρίβεια (Yang και Ying 2011).

Τεχνικές δειγματοληψίας

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές δειγματοληψίας που μπορούν να εφαρμοστούν στη φασματοσκοπία Raman ανάλογα με την εφαρμογή και τον τύπο του δείγματος που αναλύεται. Αυτές περιλαμβάνουν τη φασματοσκοπία Raman Συχνότητας Συντονισμού, Επιφανειακή Ενισχυμένη Φασματοσκοπία Raman (SERS), Επιφανειακή Ενισχυμένη Φασματοσκοπία Συντονισμού Raman (SERRS), Αυθόρμητη Φασματοσκοπία Raman (SRS), Συνεκτική φασματοσκοπία αντι-Stokes Raman (CARS), Μετάδοση Raman, Αντίστροφη φασματοσκοπία Raman (Argyri *et al* , 2014)

1.3.2.2 Ανάλυση εικόνας (Image Analysis)

Η υπερφασματική και πολυφασματική απεικόνιση (**HSI** και **MSI**) είναι τεχνικές με τις οποίες μπορούμε να λάβουμε τόσο φασματικές όσο χωρικές πληροφορίες από τους χημικούς στόχους. Αυτή η τεχνική χημικής απεικόνισης συνδυάζει τη φασματοσκοπία δονήσεων με την ανάλυση της εικόνας που λαμβάνουμε στον υπολογιστή (Rorodi *et al*,2016)

Η προαναφερθείσα τεχνική είναι μία τεχνική εικόνας που εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του προσπίπτοντος φωτός και μορίων από τα οποία αποτελείται η ύλη. Καθώς η φασματομετρική ανάλυση χρησιμοποιεί μόνο ένα μικρό μέρος του δείγματος τροφίμων (ως εκ τούτου, τα φάσματα, για να κυριολεκτήσουμε, μερικές φορές δεν είναι αντιπροσωπευτικά του συνόλου του δείγματος), οι τεχνολογίες που λαμβάνουν υπόψη το σύνολο του δείγματος ή ένα μεγάλο μέρος του μπορεί να παρέχουν πιο αντιπροσωπευτικές και λεπτομερές μετρήσεις (Huang *et al*,2013)

Για να αποκτήσουμε τις χωρικές πληροφορίες που επιθυμούμε, χρησιμοποιείται μια άλλη τεχνική, που βασίζεται στην εικόνα του δείγματος που λαμβάνουμε στον υπολογιστή (Liu *et al*,2014). Αυτή η τεχνολογία μιμείται την αρχή της ανθρώπινης όρασης, χρησιμοποιώντας τρεις ζώνες (κόκκινο, πράσινο και μπλε) για να αποκτήσει τα χαρακτηριστικά των αντικειμένων. Τα φάσματα λαμβάνονται στο ορατό και τα χαρακτηριστικά που λαμβάνονται από την εικόνα που παρουσιάζεται στον υπολογιστή περιλαμβάνουν το σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος και την υφή (Aguirre *et al*,2008)

Ωστόσο, μόνο περιστασιακά αυτή η μέθοδος από μόνη της αναφέρεται ότι είναι αποτελεσματική για την ανίχνευση χημικών και βιολογικών παραμέτρων. Αντίθετα, ο συνδυασμός της τεχνικής φασματοσκοπίας και της εικόνας του υπολογιστή έχουν βρει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών στη βιομηχανία τροφίμων (Rorodi *et al*,2015). Ωστόσο, και οι δύο τεχνικές έχουν τα δικά τους μειονεκτήματα. Ένα βασικό πλεονέκτημα είναι ότι και οι δύο συνδυάζονται στην υπερφασματική απεικόνιση, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την χημική χαρτογράφηση δείχνοντας έτσι τις κατανομές των παραμέτρων που μας ενδιαφέρουν (Paradourouli *et al*,2012)

Ωστόσο, οι ποικίλες πληροφορίες που λαμβάνονται από την υπερφασματική απεικόνιση οδηγούν σε δυσκολίες στην επεξεργασία των δεδομένων, γεγονός που τη καθιστά δύσκολα εφαρμόσιμη στις βιομηχανικά προγράμματα. Για να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, μια απλουστευμένη τεχνολογία που ονομάζεται πολυφασματική απεικόνιση (MSI) είναι διαθέσιμη. Η διαφορά μεταξύ των δύο έγκειται μόνο στον αριθμό των ζωνών που εμπλέκονται. Για την HSI, υπάρχουν συνήθως περισσότερες από 100 ζώνες, ενώ για την MSI, είναι συνήθως λιγότερο

από 20. Η επιτυχία της MSI βασίζεται κυρίως στην αποτελεσματικότητα της HSI για την παροχή σημαντικών μηκών κύματος (Rorodi *et al*,2016)

Με την υπερφασματική απεικόνιση, υπάρχει η δυνατότητα αρκετών επιλογών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να πραγματοποιηθεί η εργασία ανίχνευσης. Αυτές οι επιλογές περιλαμβάνουν το εγγύς υπέρυθρο HSI, η τεχνική φθορισμού HSI, καθώς και η Raman HSI, οι οποίες παρέχουν μεγάλη ευελιξία στην εύρεση λύσεων για όλα τα είδη προβλημάτων ανίχνευσης. Με άλλα λόγια, η ευελιξία της υπερφασματικής απεικόνισης έχει δημιουργήσει ευρείες εφαρμογές στην εποπτεία των τροφίμων. Πολλές ανασκοπήσεις έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τη δυνατότητα εφαρμογής των υπερφασματικών απεικόνισης σε διάφορες πτυχές της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων (Gowen *et al*,2015, Liu *et al*,2015).

Τα δεδομένα λαμβάνονται σε μια τρισδιάστατη (3D) κυβική εικόνα, παρέχοντας τόσο χωρική όσο και φασματική πληροφορία (Dufour,2011).Ως «χωρική» πληροφορία συνεπάγεται η ένταση των pixel, όταν επιλέγεται ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος και «φασματική» πληροφορία είναι η ένταση του κάθε pixel σε διαφορετικά συκροτήματα. Είναι προφανές ότι αυτό το είδος των δεδομένων είναι εξαιρετικά κατατοπιστικό, αλλά και πολύ περίπλοκο. Ως εκ τούτου, ένα βήμα επεξεργασίας εικόνας ως προς το φασματικό και χωρικό επίπεδο είναι απαραίτητη για την ανάλυση. Η προ-επεξεργασία περιλαμβάνει την αφαίρεση του θορύβου, της θαμπάδας και των γεωμετρικών στρεβλώσεων. Επιπλέον, ένα βήμα κατάτμησης εικόνας μπορεί να είναι απαραίτητο για να αφαιρέσετε τις ανεπιθύμητες περιοχές μιας εικόνας, π.χ. για την αφαίρεση εικόνα φόντου και επιλέξετε μια περιοχή ενδιαφέροντος (ROI) (Teena *et al.*, 2013).Τα βασικά χαρακτηριστικά εξάγονται για περαιτέρω ανάλυση, με τη χρήση απλών στατιστικών μέτρων, π.χ. μέση ένταση pixel ανά μήκος κύματος (Panagou *et al* 2014, Rorodi *et al.*,2015), ή πιο σύνθετα δεδομένα, όπως τα χαρακτηριστικά υφής (Duchesne *et al.*, 2012).

Βασικό εργαλείο που χρησιμοποιείται με την πολυφασματική ανάλυση είναι οι στατιστικές μέθοδοι και αλγόριθμοι ομαδοποίησης που βασίζονται σε στοιχεία από πολυφασματικές εικόνες και έχουν διερευνηθεί σχολαστικά για την αξιολόγηση της ποιότητας των τροφίμων (Tran *et al.* ,2005).

1.3.2.3 Χημειομετρία

Η απόκτηση δεδομένων ανάλυσης από κάποιον από τους παραπάνω αισθητήρες των μεθόδων που αναπτύχθηκαν ή και από περισσότερους από έναν κατατάσσει τα δεδομένα αυτά σε ένα χώρο πολυμεταβλητών συνόλων, δηλαδή ένα μεγάλο αριθμό μεταβλητών x που συνδέονται με μία παρατηρούμενη τιμή ή με μία κατηγορία y .Εμφανώς τα δεδομένα αυτά παρουσιάζουν μεγάλη πολυπλοκότητα και είναι εξαιρετικά δύσκολο να επεξεργαστούν.

Τη λύση έρχεται να δώσει η Χημειομετρία, μέσω της μηχανικής μάθησης και εξελικτικής των υπολογιστικών μεθόδων συμβάλει στην απεικόνιση, μείωση των διαστάσεων και στη συμβολή της κάθε μεταβλητής στο τελικό αποτέλεσμα.

Χημειομετρία είναι η επιστήμη εξόρυξης πληροφοριών από τα χημικά συστήματα και αναπτύχθηκε ως συνέπεια της εφαρμογής του υπολογιστή στη χημεία, ενώ ένας πραγματικός ορισμός της Χημειομετρίας είναι : η χημική πειθαρχία που χρησιμοποιεί μαθηματικές και στατιστικές μεθόδους, για να σχεδιάσει ή να επιλέξει τη βέλτιστη διαδικασία μετρήσεων στα πειράματα, και να παρέχουν το μέγιστο ποσοστό χημικών πληροφοριών από την ανάλυση των χημικών δεδομένων ή του σήμα που παράγεται από τα σύγχρονα αναλυτικά όργανα (Otto, 2007).

Η μηχανική μάθηση είναι η επιστημονική πειθαρχία που επικεντρώνεται στην ανάπτυξη και την εφαρμογή των αλγορίθμων που έχουν σχεδιαστεί για να «μάθουν» από τα δεδομένα. Ειδικότερα , στην μηχανική μάθηση παράδειγμα τα δεδομένα που εισάγονται χρησιμοποιούνται για να κατασκευάσουν ένα μοντέλο για να κάνουν προβλέψεις ή / και να πάρουν αποφάσεις (Kohavi & Provost, 1998). Ως εκ τούτου, είναι ένα υπό-πεδίο της επιστήμης των υπολογιστών, που χρησιμοποιώντας μια ποικιλία των υπολογιστικών εργασιών μπορεί να πάει πολύ πιο πέρα από το ρητό προγραμματισμό και συμπίπτει με την υπολογιστική νοημοσύνη. Επιπλέον, συνδέεται με πεδία, όπως η στατιστική και τα μαθηματικά, τα οποία παρέχουν ένα μεγάλο μέρος της θεωρίας πίσω από τα κατασκευασμένα μοντέλα. Είναι επίσης ένα μεγάλο εργαλείο για την ανάλυση των διερευνητικών δεδομένων και αποτελεί τη βάση των διαφόρων εφαρμογών π.χ. υπολογιστική όραση και την οπτική αναγνώριση χαρακτήρων (OCR) (Ropidi *et al*, 2016)

Οι εξελικτικοί αλγόριθμοι είναι μια άλλη υποκατηγορία της υπολογιστικής νοημοσύνης στην οποία ο κύριος στόχος των εφαρμοσμένων αλγορίθμων είναι η ανάπτυξη μιας διαδικασίας βελτιστοποίησης μιας επαναληπτικής διαδικασίας που βασίζεται στην ιδέα της εξέλιξης και της φυσικής γενετικής. Πιο αναλυτικά, οι αλγόριθμοι του ασχολούνται με την επαναληπτική ανάπτυξη ενός πληθυσμού είναι εμπνευσμένο από τους μηχανισμούς της εξέλιξης και είναι μια προσεκτική διαδικασία επιλογής. Οι εξελικτικοί αλγόριθμοι, ενώ είναι υπολογιστικά ακριβοί, παρέχουν εξαιρετικά βελτιστοποιημένες διαδικασίες και έχουν πολλές εφαρμογές σε διάφορα πεδία, συμπεριλαμβανομένης της επιστήμης των τροφίμων. Μερικοί από αυτούς τους αλγόριθμους περιλαμβάνουν γενετικούς αλγόριθμους, τις στρατηγικές της εξέλιξης, εξελικτικό προγραμματισμό και γενετικού προγραμματισμού (GP) (Αργύρη *et al.*, 2014).

Οι χημειομετρικές μέθοδοι μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες τεχνικών, επιβλεπόμενες (supervised) και μη επιβλεπόμενες (unsupervised) μέθοδοι. Η μη επιβλεπόμενη μέθοδος βασίζεται στην ανάλυση διασποράς (Everitt, Landau, Leese, & Stahl, 2011) και εστιάζει στην εύρεση πόσο παρόμοιο είναι ένα

δείγμα με ένα άλλο. Από την άλλη πλευρά, η επιβλεπόμενη προσπαθήσει να διαμορφώσει ή / και χαρτογράφηση τις μεταβλητών που εισάγονται (x-δεδομένα) με βάση τα δεδομένα εξόδου (y-data) (Goodacre, 2003). Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι μη επιβλεπόμενες τεχνικές επικεντρώνονται κυρίως στην ομαδοποίηση δειγμάτων και στη διάκριση αντικειμένων με πληθυσμούς που δεν σχετίζονται, υπό την επίβλεψη των τεχνικών –τόσο ποιοτικών όσο και ποσοτικών- τείνουν να λειτουργούν καλά. Το μειονέκτημα με τις τελευταίες τεχνικές είναι ότι τείνουν να είναι πιο περίπλοκες, καθώς μία ή περισσότερες παράμετροι πρέπει να προσαρμόζονται με βάση μετρήσεις όπως τη μέση-ρίζα--τετραγωνικού σφάλματος (RMSE). Η διαδικασία αυτή ονομάζεται βαθμονόμηση ή κατάρτιση και μπορεί να είναι απλή ή πολύ περίπλοκη ανάλογα τη μέθοδο. Το προκύπτον μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει την κατηγορία ή την αξία εξόδου ενός νέου δείγματος (Ropodi *et al*, 2016).

A. Μη επιβλεπόμενη μάθηση - «Unsupervised» μέθοδος χημειομετρικής ανάλυσης

Από όλες τις μεθόδους μη επιβλεπόμενης (unsupervised) χημειομετρικής ανάλυσης η Ιεραρχική Ανάλυση Συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis (HCA)) και Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε εφαρμογές τροφίμων (Argyri *et al*, 2014, Everitt *et al*, 2011, Jolliffe, 2002). Στην HCA, η απόσταση (Ευκλείδεια ή άλλη) μεταξύ των αντικειμένων (δείγματα) υπολογίζεται και με περαιτέρω επεξεργασία με αλγοριθμική απόσταση, προκειμένου να κατασκευάσει ένα δενδρόγραμμα που συνδυάζει τα δείγματα σύμφωνα με τις ομοιότητές του ενός με το άλλο (Everitt *et al.*, 2011). Από την άλλη πλευρά, η PCA είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που επιτρέπει μία σημαντική μείωση της υπερψώσης των διαστάσεων, ενώ την ίδια στιγμή επιλέγοντας ασυσχέτιστες μεταβλητές (που ονομάζονται Principal Components PCs) εξηγεί το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης στη λίστα των δεδομένων. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι μπορεί να "μεταφράσει" ένα πολυπαραγοντικό σύνολο δεδομένων σε ένα σύνολο δεδομένων με λίγα Principal Components και συνεπώς να βοηθήσει στο να απεικονιστούν τα δείγματα, π.χ. με δυσδιάστατα και τρισδιάστατα διαγράμματα ανάλυσης κυρίων συνιστωσών PCA όπου να ομαδοποιούνται οι κατηγορίες των δειγμάτων.. Εξαιτίας αυτής της ικανότητας, η PCA είναι συνήθως η πρώτη ανάλυση που πραγματοποιείται όταν παρουσιάζεται με αυτό τον τρόπο το είδος των δεδομένων. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ακραία ανίχνευση, δηλαδή για ένα δείγμα που ξεφεύγει της διαδικασίας, τονίζοντας σημαντικά χαρακτηριστικά που πρέπει να χρησιμοποιούνται για την περαιτέρω ανάλυση, μια διαδικασία γνωστή ως επιλογή μεταβλητής (Argyri *et al.*, 2014, Goodacre, 2003).

B. Επιβλεπόμενη μάθηση - «Supervised» μέθοδος χημειομετρικής ανάλυσης

Ανάλογα με τη φύση του προβλήματος υπάρχουν μέθοδοι διακρίνουσας και παλινδρόμησης αλγορίθμων για ποιοτικές και ποσοτικές προσεγγίσεις, αντίστοιχα. Διακρίνουσα συνάρτηση Ανάλυσης (DFA) είναι μία μέθοδος σε συστάδες που χρησιμοποιείται για την ταξινόμηση των ατόμων σε δύο ή περισσότερες προκαθορισμένες ομάδες. Μπορεί να θεωρηθεί ως μία ανάποδη διαδικασία της πολυμεταβλητής ανάλυσης διακύμανσης (Rorodi *et al*, 2016). Οι μέθοδοι γραμμικής παλινδρόμησης χρησιμοποιούνται ευρέως σε εφαρμογές τροφίμων, δεδομένου ότι είναι σχετικά εύκολο να εφαρμοστεί. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (MLR), παλινδρόμηση κύριου συστατικού (PCR) και μερική παλινδρόμηση ελαχίστων τετραγώνων (PLSR) (Goodacre, 2003). MLR είναι η απλούστερη μορφή της γραμμικής παλινδρόμησης, με βάση ελαχίστων τετραγώνων. Η PLSR (de Jong, 1993, Wold *et al*, 2001), όπως η PCR, είναι μια γραμμική μέθοδος, με την έννοια ότι τα νέα δεδομένα είναι γραμμικοί συνδυασμοί των αρχικών μεταβλητών. Ενώ η PCR χρησιμοποιεί PCA για να εξαγάγει τα νέα στοιχεία (κύρια συστατικά-Υ), οι εργασίες με PLSR μπορεί τόσο να παρατηρήσει όσο και να προβλέψει τιμές σε ένα χώρο και τότε ένα γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης να εγκατασταθεί. PLS μπορεί να συνδυαστεί με διάφορους αλγόριθμους επιλογής μεταβλητών και αρκετές από τις παραλλαγές της έχουν τροποποιηθεί για να φιλοξενήσουν διαστηματικές μεθοδολογίες επιλογής, π.χ. διαστηματική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (iPLS), (Xiaobo, Holmes, 2010). Επιπλέον η γραμμική διακριτική ανάλυση (LDA), μπορεί να επεκταθεί σε διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για σκοπούς κατηγοριοποίησης (Barker & Rayens, 2003).

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά πρώτων υλών

Δείγματα σκόνης – κρέμας

Για τις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε η συνταγή σχεδιασμού δύο προϊόντων βρεφικών κρεμών του εμπορίου και πάνω σε αυτές έγιναν αλλαγές +10% και -10% σε κάθε συστατικό της βασικής συνταγής. Στόχος ήταν να προσδιοριστούν πιθανές αποκλίσεις από την βασική συνταγή που θα βοηθήσουν την εταιρία παραγωγής να φτιάξει ένα πρόγραμμα που να προβλέπει λάθη που συμβαίνουν στο πρώτο στάδιο της γραμμής παραγωγής. Οι δύο συνταγές έχουν ως βάση το αλεύρι ή το ρυζάλευρο. Οι βασικές συνταγές παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1.1

Πίνακας 2.1.1. Βασικές συνταγές βρεφικών κρεμών όπως χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία.

ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΑΛΕΥΡΟ	
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (kg) Σύνολο 850 kg
Νερό	550,0
Πλήρες γάλα	50,0
Αλεύρι	75,0
Ζάχαρη	50,0
Άμυλο	50,0
Ορρός	37,5
Γάλα Άπαχο	37,5
ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΡΥΖΑΛΕΥΡΟ	
ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ (kg) Σύνολο 767,5kg
Νερό	500,0
Ρυζάλευρο	100,0
Ορρός	32,5
Πλήρες γάλα	62,5
Ζάχαρη	47,5
Γάλα Άπαχο	25,0

Οι ποσότητες των παραπάνω συνταγών διαιρέθηκαν στο μισό και προσαρμόστηκαν σε γραμμάρια ώστε να είναι εύκολη η παρασκευή τους στο εργαστήριο.

Για κάθε συστατικό της συνταγής έγινε αλλαγή στο +10% και -10% επί της ποσότητας που δεικνύεται στη βασική συνταγή. Κάθε μονός αριθμός του πίνακα (3.1.2) δηλώνει αύξηση των συστατικών κατά 10% ενώ κάθε ενώ κάθε ζυγός

αριθμός μείωση στο συστατικό κατά 10%. Στο γαλατούχο ρυζάλευρο έτσι έγιναν 10 αλλαγές στο σύνολο ενώ στο γαλατούχο άλευρο 12.

Σε δεύτερο στάδιο οι συνταγές σκόνης που παρασκευάστηκαν αναμίχθηκαν με ποσότητα νερού (94mL απιονισμένου H₂O ανά 50g συνταγής σκόνης γαλατούχου ρυζάλευρου και 92mL απιονισμένου H₂O ανά 50 g γαλατούχου άλευρου). Στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε κωνική φιάλη των 250mL και θερμάνθηκαν μέχρι θερμοκρασίας 80°C για 10 λεπτά για το γαλατούχο ρυζάλευρο και στους 70 °C για 2 λεπτά για το γαλατούχο άλευρο σε θερμαντική πλάκα στο εργαστήριο υπό ανάδευση. Η θερμοκρασία ελεγχόταν με θερμόμετρο ώστε να μη ξεφύγει της πειραματικής διαδικασίας. Έπειτα ο χυλός που χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση εικόνας στο VideometerLab αλλά και στη φασματοσκοπική τεχνική του FT-IR.

2.1.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων των πρώτων υλών, ποσότητες των 25 g μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σακούλες ομογενοποίησης και σε 225 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (LabMLimited, Lancashire, UK), και ομογενοποιήθηκαν (LabBlender 400, SewardMedical, London, UK) για 60 s σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μία διαδοχική δεκαδική αραιώσεις στο ίδιο διαλύμα Ringer, και 0.1 ή 1 ml από επιλεγμένες αραιώσεις επιστρώθηκαν επιφανειακά σε τρυβλία Petri με τα ακόλουθα θρεπτικά υποστρώματα: (i) trypticglucoseyeastagar-PCA, (Biolife, Milan, Italy) για μέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (επώαση στους 30°C για 48-72 h), (ii) Bacillus cereus selective agar base-MYP, ενισχυμένο με το αντιμικροβιακό συμπλήρωμα polymyxinB sulphate (Biolife)(επώαση στους 30°C για 24-48 h) και (iii) Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) LAB088, για προσδιορισμό μικροοργανισμών του γένους *Enterobacteriaceae* (επώαση στους 37°C για 24 h). Οι βακτηριακές αποικίες (colonyformingunits, cfu) οι οποίες απαριθμήθηκαν σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα μετασχηματίστηκαν σε logcfu ανά γραμμάριο υλικού σκόνης (logcfu/g).

2.1.2 Ανάλυση εικόνας (VideometerLab)

Η απόκτηση δεδομένων ανάκλασης για κάθε συνταγή κρέμας και σκόνης έγινε με τη χρήση του συστήματος VideometerLab (CarstensenandHansen, 2003), το οποίο παρέχει πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος που κυμαίνονται από 405 έως 970 nm. Πιο συγκεκριμένα, η φασματική ακτινοβολία των 18 ζωνών δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένη σε όλη την περιοχή δειγματοληψίας, αλλά σε μήκη κύματος 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm. Το σύστημα καταγράφει τις ανακλάσεις των επιφανειών με μια τυπική μονόχρωμη κατηγορία σε συνδυασμό με μία συσκευή ολοκληρωμένου κυκλώματος (chip), το οποίο είναι ένθετο σε μια PointGreyScorpion φωτογραφική μηχανή.

Τα δείγματα των συνταγών, διαμοιρασμένα σε τρυβλία Petri, τοποθετήθηκαν μέσα σε μία σφαίρα ενσωμάτωσης Ulbricht πάνω στην οποία είναι η φωτογραφική μηχανή. Η σφαίρα στο εσωτερικό της έχει επικάλυψη με επίστρωση ματ. Η επικάλυψη μαζί με την καμπυλότητα της σφαίρας εξασφαλίζει μια ομοιόμορφη ανάκλαση του φωτός, και κατά επέκταση ομοιόμορφο φωτισμό μέσα στη σφαίρα. Στο χείλος της σφαίρας, οι δίοδοι εκπομπής φωτός (LED) με στενή ζώνη κατανομής φασματικής ακτινοβολίας τοποθετούνται δίπλα-δίπλα. Τα LED τοποθετούνται σε τέτοιο σημείο το οποίο τα διανέμει ομοιόμορφα γύρω από ολόκληρο το χείλος. Όταν λαμβάνεται η εικόνα, οι λυχνίες LED ενεργοποιούνται διαδοχικά, και η ανάκλαση από το συγκεκριμένο μήκος κύματος καταγράφεται από την κορυφή όπου είναι τοποθετημένη η κάμερα. Το αποτέλεσμα είναι μια μονόχρωμη εικόνα με 32-bit κινητής υποδιαστολής ακρίβειας για κάθε τύπο LED, δίνοντας στο τέλος ένα υπερφασματικό κύβο διαστάσεων 1280 × 960 × 19. Το σύστημα αρχικά βαθμονομείται ραδιομετρικά και γεωμετρικά χρησιμοποιώντας καλά καθορισμένα πρότυπα στόχους (Folm-Hansen, 1999).

Το ομοιογενές διάχυτο φως, μαζί με τα στάδια βαθμονόμησης, εξασφαλίζει μια βέλτιστη δυναμική περιοχή και ελαχιστοποιεί τις σκιές και τα εφέ σκίασης, καθώς και κατοπτρική ανάκλαση. Το σύστημα έχει αναπτυχθεί για να χρησιμοποιηθεί σε συγκριτικές μελέτες χρονοσειρών ή σε μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών δειγμάτων (Hansen et al., 2005, Clemmensen et al., 2007, Gomez et al., 2007, Dissing et al., 2009).

Μετά τη λήψη των πολυφασματικών εικόνων για τις συνταγές σκόνης και κρεμών του γαλατούχου άλευρου και γαλατούχου ρυζάλευρου, τα συλλεχθέντα δεδομένα ανάκλασης αναλύθηκαν κάνοντας χρήση πολυμεταβλητών τεχνικών και του ειδικού υπολογιστικού προγράμματος MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των δεδομένων ανάκλασης, ήταν η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA), η διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA), και η τεχνική ιεράρχησης σε συστάδες.

2.1.3 Ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR

Τα φάσματα FT-IR αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα ZnSe 45 ° εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) κρύσταλλο σε ένα φασματόμετρο FT-IR Nicolet 6700 εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή DLaTGS (δευτεριωμένο L-αλανίνης ενισχυμένα με θεική τριγλυκερίνη) με KBr διαχωριστή δέσμης. Ο κρύσταλλος είναι ικανός για 12 εξωτερικές αντανάκλασεις, με πεδίο που πραγματοποιεί ένα βάθος 1.01 μm. Τα φάσματα των συνταγών κρέμας συλλέχθηκαν σε όλο το εύρος αριθμών με μήκη κύματος 4000-400 cm⁻¹, με τη συσσώρευση 100 σαρώσεων και με ανάλυση 4 cm⁻¹ (Lianou et al., 2015).

Μικροποσότητα από τις συνταγές κρεμών που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο, τόσο για το γαλατούχο άλευρο όσο και για το γαλατούχο ρυζάλευρο, τοποθετήθηκε με μία σπάτουλα με προσοχή στην ειδική υποδοχή του κρυστάλλου και έπειτα μεταφέρθηκε στην θέση του οργάνου όπου πιέστηκε από μία πρέσα για ομοιόμορφη κατανομή της κρέμας σε όλη την επιφάνεια του κρυστάλλου. Η δέσμη του φωτός περνώντας από το δείγμα έδωσε χαρακτηριστικό φάσμα για κάθε συνταγή κρέμας. Πριν από την ανάλυση λήφθηκε το φάσμα μόνο του κρυστάλλου ώστε να αφαιρεθεί από το φάσμα του αναλυόμενου δείγματος. Η τελευταία διαδικασία πραγματοποιήθηκε ανά τρία δείγματα για να διασφαλιστεί ότι οι αλλαγές στο περιβάλλον δε θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Στη συνέχεια, τα ληφθέντα FT-IR φάσματα της περιοχής $1800-800\text{ cm}^{-1}$ επεξεργάστηκαν περεταίρω κάνοντας χρήση πολυμεταβλητών τεχνικών και του ειδικού υπολογιστικού προγράμματος MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Ομοίως και με την επεξεργασία των δεδομένων ανάκλασης, οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι PCA, PLS-DA και η τεχνική ιεράρχησης σε συστάδες.

2.2 Εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας τελικών προϊόντων κρεμών με τη χρήση συμβατικών και ταχέων, μη-επεμβατικών μεθόδων

Οι κρέμες βανίλιας είναι ένα έτοιμο προς κατανάλωση, μη ζυμωμένο, γαλακτοκομικό προϊόν, το οποίο υπόκεινται σε θερμική επεξεργασία πριν από τη συσκευασία, ώστε να διασφαλιστεί με αυτό τον τρόπο η ποιότητα και η ασφάλεια του προϊόντος (Panagou and Nychas, 2008).

Δείγματα κρέμας

Εμπορικά παρασκευασμένα δείγματα κρέμας βανίλιας (170 g ανά πακέτο), προερχόμενα από τέσσερις διαφορετικές εταιρίες παραγωγής (Α, Β, Γ και Δ), ελήφθησαν από διαφορετικά σημεία λιανικής πώλησης, και αποθηκεύτηκαν στους 4° , για μέγιστο χρονικό διάστημα ίσο με αυτό της διάρκειας ζωής τους, μέχρι να υποβληθούν σε αναλύσεις στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Συνολικά εξετάστηκαν 66 δείγματα κρέμας, τα οποία αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τόσο συμβατικές μικροβιολογικές αναλύσεις όσο και δύο ταχείες, μη-επεμβατικές μεθόδους: τη φασματοσκοπία FT-IR και την ανάλυση εικόνας χρησιμοποιώντας το σύστημα VideometerLab

2.2.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων κρέμας, ποσότητες των 25 g μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε σακούλες ομογενοποίησης και σε 225 ml

αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (LabMLimited, Lancashire, UK), και ομογενοποιήθηκαν (LabBlender 400, SewardMedical, London, UK) για 60 s σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στο ίδιο διάλυμα Ringer, και 0.1 ή 1 ml από επιλεγμένες αραιώσεις επιστρώθηκαν επιφανειακά σε τρυβλία Petri με τα ακόλουθα θρεπτικά υποστρώματα: (i) trypticglucoseyeastagar-PCA, (Biolife, Milan, Italy) για μέτρηση της ολικής μικροβιακής χλωρίδας (επώαση στους 30°C για 48-72 h), και (ii) Bacillus cereus selective agar base-MYP, ενισχυμένο με το αντιμικροβιακό συμπλήρωμα polymyxin B sulphate (Biolife) (επώαση στους 30°C για 24-48). Οι βακτηριακές αποικίες (colony forming units, cfu) οι οποίες απαριθμήθηκαν σε κάθε θρεπτικό υπόστρωμα μετασχηματίστηκαν σε log cfu ανά γραμμάριο κρέμας (log cfu/g).

2.2.2 Ανάλυση εικόνας (VideometerLab)

Η απόκτηση δεδομένων ανάκλασης για κάθε δείγμα κρέμας έγινε με τη χρήση του συστήματος VideometerLab (Carstensen and Hansen, 2003, Videometer 2009), το οποίο παρέχει πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά μήκη κύματος που κυμαίνονται από 405 έως 970 nm. Πιο συγκεκριμένα, η φασματική ακτινοβολία των 18 ζωνών δεν είναι ομοιόμορφα κατανομημένη σε όλη την περιοχή δειγματοληψίας, αλλά σε μήκη κύματος 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm. Το σύστημα καταγράφει τις ανακλάσεις των επιφανειών με μια τυπική μονόχρωμη κατηγορία σε συνδυασμό με μία συσκευή ολοκληρωμένου κυκλώματος (chip), το οποίο είναι ένθετο σε μια Point Grey Scorpion φωτογραφική μηχανή.

Τα δείγματα των κρεμών, διαμοιρασμένα σε τρυβλία Petri, τοποθετήθηκαν μέσα σε μία σφαίρα ενσωμάτωσης Ulbricht πάνω στην οποία η φωτογραφική μηχανή. Η σφαίρα στο εσωτερικό της έχει επικάλυψη με επίστρωση ματ. Η επικάλυψη μαζί με την καμπυλότητα της σφαίρας εξασφαλίζει μια ομοιόμορφη ανάκλαση του φωτός, και κατά επέκταση ομοιόμορφο φωτισμό μέσα στη σφαίρα. Στο χείλος της σφαίρας, οι δύο εκπομπές φωτός (LED) με στενή ζώνη κατανομής φασματικής ακτινοβολίας τοποθετούνται δίπλα-δίπλα. Τα LED τοποθετούνται σε τέτοιο σημείο το οποίο τα διανέμει ομοιόμορφα γύρω από ολόκληρο το χείλος. Όταν λαμβάνεται η εικόνα, οι λυχνίες LED ενεργοποιούνται διαδοχικά, και η ανάκλαση από το συγκεκριμένο μήκος κύματος καταγράφεται από την κορυφή όπου είναι τοποθετημένη η κάμερα. Το αποτέλεσμα είναι μια μονόχρωμη εικόνα με 32-bit κινητής υποδιαστολής ακρίβειας για κάθε τύπο LED, δίνοντας στο τέλος ένα υπερφασματικό κύβο διαστάσεων 1280 × 960 × 19. Το σύστημα αρχικά βαθμονομείται ραδιομετρικά και γεωμετρικά χρησιμοποιώντας καλά καθορισμένα πρότυπα στόχους (Folm-Hansen, 1999).

Το ομοιογενές διάχυτο φως, μαζί με τα στάδια βαθμονόμησης, εξασφαλίζει μια βέλτιστη δυναμική περιοχή και ελαχιστοποιεί τις σκιές και τα εφέ σκίασης, καθώς

και κατοπτρική ανάκλαση. Το σύστημα έχει αναπτυχθεί για να χρησιμοποιηθεί σε συγκριτικές μελέτες χρονοσειρών ή σε μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών δειγμάτων (Hansenetal., 2005, Clemmensenetal., 2007, Gomezetal., 2007, Dissingetal., 2009).

Μετά τη λήψη των πολυφασματικών εικόνων για τα συνολικά 66 δείγματα κρέμας, τα συλλεχθέντα δεδομένα ανάκλασης αναλύθηκαν κάνοντας χρήση πολυμεταβλητών τεχνικών και του ειδικού υπολογιστικού προγράμματος MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία των δεδομένων ανάκλασης, ήταν η ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA), η διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA), και η τεχνική ιεράρχησης σε συστάδες.

2.2.3 Ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR

Τα φάσματα FT-IR αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα ZnSe 45 ° εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (ATR) κρύσταλλο σε ένα φασματόμετρο FT-IR Nicolet 6700 εξοπλισμένο με έναν ανιχνευτή DLaTGS (δευτεριωμένο L-αλανίνης ενισχυμένα με θειική τριγλυκερίνη) με KBr διαχωριστή δέσμης. Ο κρύσταλλος είναι ικανός για 12 εξωτερικές αντανάκλασεις, με πεδίο που πραγματοποιεί ένα βάθος 1.01 μm. Τα φάσματα των 66 δειγμάτων κρέμας συλλέχθηκαν σε όλο το εύρος αριθμών με μήκη κύματος 4000-400 cm⁻¹, με τη συσσώρευση 100 σαρώσεων και με ανάλυση 4 cm⁻¹ (Lianouetal., 2015).

Μικροποσότητα από τις κρέμες τοποθετήθηκε με μία σπάτουλα με προσοχή στην ειδική υποδοχή του κρυστάλλου και έπειτα μεταφέρθηκε στην θέση του οργάνου όπου πιέστηκε από μία πρέσα για ομοιόμορφη κατανομή της κρέμας σε όλη την επιφάνεια του κρυστάλλου. Η δέσμη του φωτός περνώντας από το δείγμα έδωσε χαρακτηριστικό φάσμα για κάθε δείγμα κρέμας. Πριν από την ανάλυση λήφθηκε το φάσμα μόνο του κρυστάλλου ώστε να αφαιρεθεί από το φάσμα του αναλυόμενου δείγματος. Η τελευταία διαδικασία πραγματοποιήθηκε ανά τρία δείγματα για να διασφαλιστεί ότι οι αλλαγές στο περιβάλλον δε θα επηρεάσουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης.

Στη συνέχεια, τα ληφθέντα FT-IRφάσματα της περιοχής 1800-800 cm⁻¹επεξεργάστηκαν περαιτέρω κάνοντας χρήση πολυμεταβλητών τεχνικών και του ειδικού υπολογιστικού προγράμματος MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/>). Ομοίως και με την επεξεργασία των δεδομένων ανάκλασης, οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι PCA, PLS-DAκαι η τεχνική ιεράρχησης σε συστάδες.

2.2.4 Αξιολόγηση πολυμεταβλητού μοντέλου NovelEye

Η εφαρμογή NovelEye, η οποία αναπτύχθηκε προγενέστερα στα πλαίσια του ομώνυμου ερευνητικού προγράμματος, λειτουργεί σε περιβάλλον Windows. Δίνει τη δυνατότητα στον χρήστη να δημιουργήσει και να αξιολογήσει το τελικό μοντέλο που επιθυμεί, διαμορφώνοντας μόνο τις τελικές λεπτομέρειες του μοντέλου. Ο ταξινομητής(classifier) που χρησιμοποιείται σαν βάση για το μοντέλο είναι “Support Vector Machine” και η μεθοδολογία εκπαίδευσής του είναι η τεχνική “Sequential Minimal Optimization”.

Οι παράμετροι που πρέπει να καθορίσει ο χρήστης για να διαμορφώσει το τελικό μοντέλο είναι ο πολυωνυμικός βαθμός (Polynomial DEGREE) του πυρήνα (kernel) και το όριο του μικροβιακού φορτίου (Positive Above LIMIT) πάνω από το οποίο σηματοδοτείται ένα μη αποδεκτό (rejected) προϊόν. Μετά την αξιολόγηση του μοντέλου οι δύο αυτές παράμετροι προτείνονται να έχουν τις τιμές 2 και 4,5 αντίστοιχα. Ξεκινώντας λοιπόν την εφαρμογή, οι παραπάνω τιμές είναι ήδη προκαθορισμένες, ενώ αλλαγή των ρυθμίσεων αυτών προτείνεται να γίνεται μόνο από κάποιον έμπειρο χρήστη.

Οι τρεις βασικές λειτουργίες που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της συγκεκριμένης εφαρμογής περιλαμβάνουν:

- την εκπαίδευση ενός νέου μοντέλου (TRAIN) σε νέα δεδομένα ή/και νέες παραμέτρους,
- την αποθήκευση του νέου μοντέλου (module SAVE/LOAD)
- την αξιολόγηση/έλεγχο νέων δεδομένων-δειγμάτων (TEST) με βάση το μοντέλο που το εκπαιδεύσαμε.

Με τα ληφθέντα από τα 66 δείγματα κρεμών δεδομένα (μικροβιολογικά δεδομένα, δεδομένα φασμάτων FT-IR και δεδομένα ανάκλασης), επιχειρήθηκε η τρίτη από τις παραπάνω λειτουργίες του μοντέλου, δηλαδή η περαιτέρω αξιολόγησή του μέσω του ελέγχου νέων δεδομένων-δειγμάτων. Για τον σκοπό αυτό, η εκπαίδευση του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με ένα μεγάλο όγκο δεδομένων-δειγμάτων κρεμών (της Εταιρίας Α) που είχαν συλλεχθεί σε προγενέστερο στάδιο στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.

3 . Αποτελέσματα - Συζήτηση

3.1 Μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά πρώτων υλών βρεφικών κρεμών

Η παρασκευή των βρεφικών κρεμών σκόνης απαιτεί ακριβή σχεδιασμό του προϊόντος από την ανάμειξη κιάλας των πρώτων υλών. Απευθυνόμενες σε ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού καθιστούν την εταιρία υπεύθυνη για την πρόσληψη των απαιτούμενων θρεπτικών συστατικών στις ενδεικνυόμενες ποσότητες, ειδικότερα σε περιπτώσεις που το μητρικό γάλα θηλασμού απουσιάζει από τη διατροφή του παιδιού. Τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται στην ενότητα αυτή είναι προϊόν έρευνας που σκοπό είχε τη συλλογή δεδομένων τα οποία θα είναι χρήσιμα στη βιομηχανία (i) στον εντοπισμό αστοχίας κατά την ανάμειξη των πρώτων υλών, και (ii) στον προσδιορισμό παρτίδων με αποκλίσεις στις ποσότητες των πρώτων υλών, έτσι όπως αυτές έχουν οριστεί στη βασική συνταγή του προϊόντος, και στη λήψη διορθωτικών μέτρων πριν την εξαγωγή τους. Για το σκοπό αυτό αξιολογήθηκαν ταχείες, μη-επεμβατικές μέθοδοι, και πιο συγκεκριμένα, η φασματοσκοπία FT-IR και η ανάλυση εικόνας με το σύστημα VideometerLab.

A. Μικροβιολογικά πρώτων υλών

Το βασικότερο ζήτημα για τη βιομηχανία τροφίμων είναι ο μικροβιολογικός έλεγχος των προϊόντων που βγαίνουν στην αγορά και αυτό διασφαλίζεται από την αρχή κιάλας της παραγωγικής διαδικασίας. Σε αυτό το πλαίσιο, σε πρώτη φάση και πριν από οποιαδήποτε άλλη πειραματική διαδικασία, προσδιορίστηκε μέσω συμβατικών μικροβιολογικών αναλύσεων ή παρουσία (και τα επίπεδα) μικροοργανισμών στις πρώτες ύλες των βρεφικών κρεμών. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων για όλες τις πρώτες ύλες (και τις συσκευασίες/παρτίδες αυτών) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.1.1. Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1.1 γίνεται αντιληπτό ότι σπάνια οι πρώτες ύλες δεν είναι επιμολυσμένες από μικροοργανισμούς της οικογένειας *Enterobacteriaceae* με εξαίρεση τα άλευρα (ρυζάλευρο και αλεύρι). Οι μικροοργανισμοί του γένους *Bacillus* φαίνεται ότι απουσιάζουν από τη πλειονότητα των πρώτων υλών που εξετάστηκαν. Η ολική μικροβιακή χλωρίδα των πρώτων υλών του γάλακτος και των αλεύρων ήταν αυξημένη σε όλες σχεδόν τις συσκευασίες που εξετάστηκαν, ενώ για την ζάχαρη το άμυλο και τον ορό δεν παρατηρήθηκε κάποια αυξημένη παρουσία ολικού μικροβιακού φορτίου.

Πίνακας 3.1.1. Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων πρώτων υλών βρεφικών κρεμών.

Πρώτη ύλη	Συμβολισμός	Συσκευασία	log cfu/g		
			O.M.X	<i>Bacillus</i> ssp.	Enterobacteriaceae
Πλήρες γάλα	WM	1	2.30	<2.00	<1.00
		2	2.47	<2.00	<1.00
		3	<2.00	<2.00	<1.00
Άπαχο γάλα	LM	1	2.47	2.00	<1.00
		2	2.90	2.69	<1.00
		3	2.85	2.85	<1.00
		4	2.47	<2.00	<1.00
Αλεύρι	F	1	3.17	<2.00	1.60
		2	2.95	<2.00	2.14
		3	2.77	<2.00	2.27
		4	2.30	<2.00	3.17
Ρυζάλευρο	RF	1	2.30	<2.00	2.00
		2	3.30	3.17	2.30
		3	2.47	2.30	<1.00
		4	2.00	<2.00	1.00
		5	2.30	<2.00	2.14
Ορρός γάλατος	Wh	1	<2.00	<2.00	<1.00
		2	2.00	<2.00	<1.00
Άμυλο	A	1	2.00	<2.00	<1.00
		2	2.00	<2.00	<1.00
		3	<2.00	<2.00	<1.00
Ζάχαρη	S	1	<2.00	<2.00	<1.00
		2	<2.00	<2.00	<1.00
		3	<2.00	<2.00	<1.00
		4	<2.00	<2.00	<1.00
Αλεύρι βρώμης	O	1	2.84	<2.00	<1.00
Αλεύρι Σίκαλης	RayF	1	2.47	<2.00	<1.00
Αλεύρι Κριθαριού	BF	1	2.87	<2.00	<1.00

B. Ανάλυση Εικόνας (Videometer) – Συνταγές σε μορφή σκόνης

Για κάθε συνταγή που παρασκευάστηκε σε μορφή σκόνης καθώς και για τη βασική συνταγή εφαρμόστηκε ανάλυση εικόνας στο σύστημα VideometerLab. Έπειτα αυτά τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν σε σύστημα πολυμεταβλητής ανάλυσης.

Πίνακας 3.1.3: Στο πίνακα παρουσιάζονται οι βασικές συνταγές βρεφικών κρεμών στις ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο και αλλαγές ως προς το κάθε συστατικό.

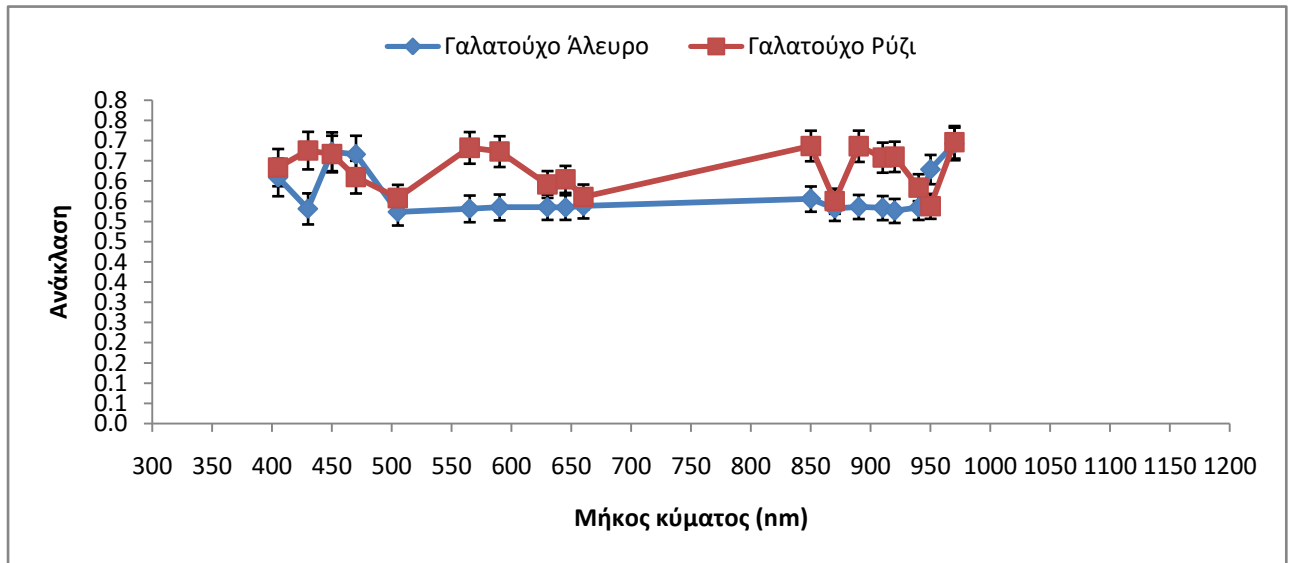
ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΡΥΖΑΛΕΥΡΟ

Συστατικά	A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Ρυζάλευρο	50g	55g	45g	50g	50g	50g	50g	50g	50g	50g	50g
Ορρός	16,2g	16,2g	16,2g	17,8g	14,6g	16,2g	16,2g	16,2g	16,2g	16,2g	16,2g
Πλήρες γάλα	31,2g	31,2g	31,2g	31,2g	31,2g	34,4g	28,12g	31,2g	31,2g	31,2g	31,2g
Ζάχαρη	23,75g	23,75g	23,75g	23,75g	23,75g	23,75g	23,75g	26,12g	21,37g	23,75g	23,75g
Άπαχο γάλα	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g	12,5g	13,75g	11,25g

ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΑΛΕΥΡΟ

Συστατικά	A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Πλήρες γάλα	25g	27,5g	22,5g	25g	25g	25g	25g	25g	25g	25g	25g	25g	25g
Αλεύρι	37,5g	37,5g	37,5g	41,25g	33,75g	37,5g	37,5g	37,5g	37,5g	37,5g	37,5g	37,5g	37,5g
Ζάχαρη	25g	25g	25g	25g	25g	27,5g	22,5g	25g	25g	25g	25g	25g	25g
Άμυλο	25g	25g	25g	25g	25g	25g	25g	27,5g	22,5g	25g	25g	25g	25g
Ορρός	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	20,62g	16,87g	18,75g	18,75g
Άπαχο γάλα	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	18,75g	20,62g	16,87g

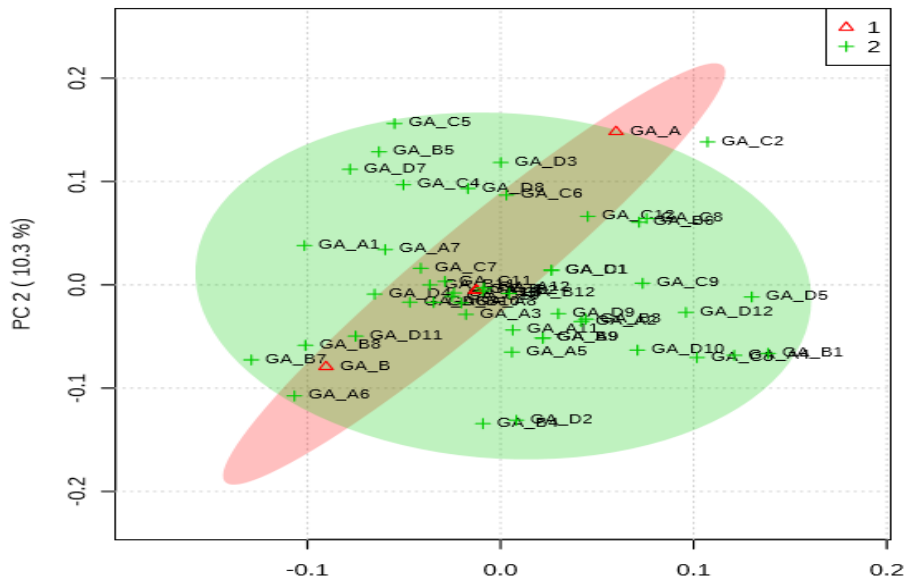
Για κάθε συνταγή που παρασκευάστηκε δημιουργήθηκαν δύο δείγματα από τα οποία λήφθηκε εικόνα στο αναλυτικό όργανο και τα αποτελέσματα τα εισήχθησαν στο σύστημα πολυμεταβλητών όπου και εφαρμόστηκε ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (PrincipalComponentsAnalysis, PCA) καθώς και διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PartialLeastSquaresDiscriminantAnalysis, PLS-DA).



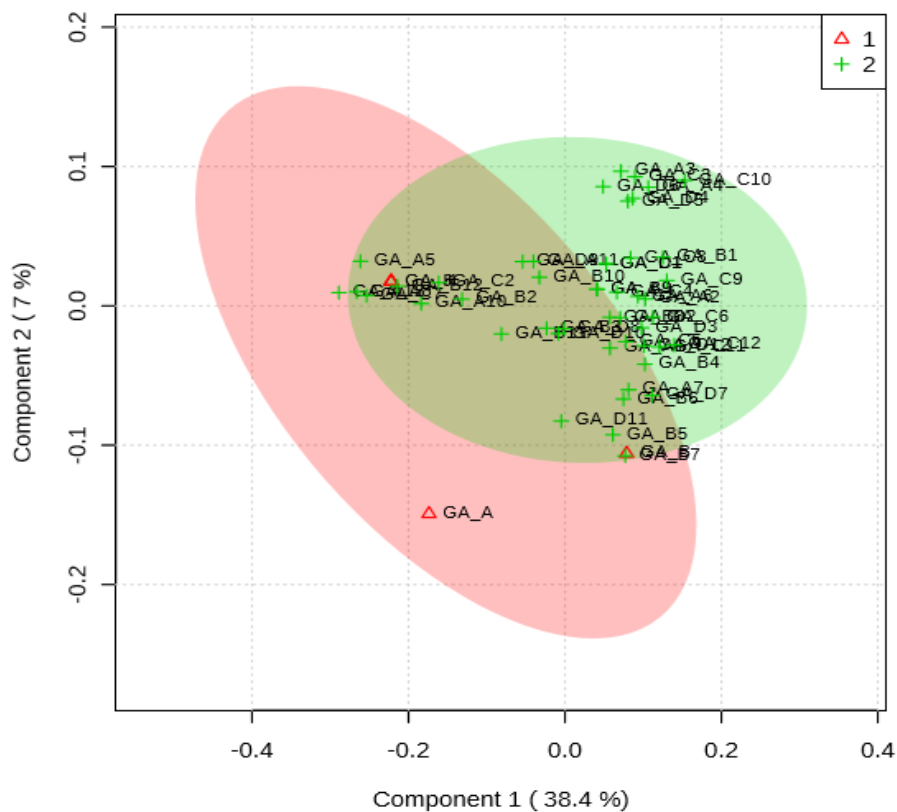
Διάγραμμα 3.1.1. Φάσματα ανάκλασης (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) των δύο βασικών συνταγών σκόνης βρεφικών κρεμών (γαλατούχοάλευρο, γαλατούχο ρυζάλευρο), ληφθέντα με το σύστημα VideometerLab.

ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΑΛΕΥΡΟ (συνταγή σε σκόνη)

Σε μία πρώτη δοκιμή συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα δημιουργώντας δύο κατηγορίες. Ως κατηγορία 1 ορίσθηκε η βασική συνταγή και ως κατηγορία 2 όλες τις τροποποιήσεις για να βρεθεί αν αποκλίνουν από τη βασική.



Εικόνα 3.1.1. Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών).

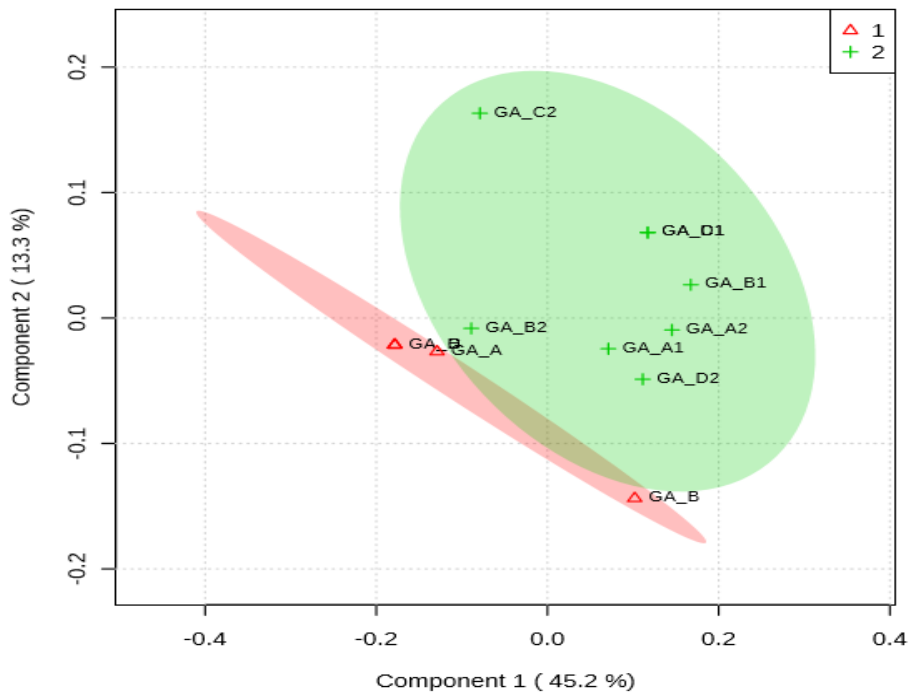


Εικόνα 3.1.2 Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών).

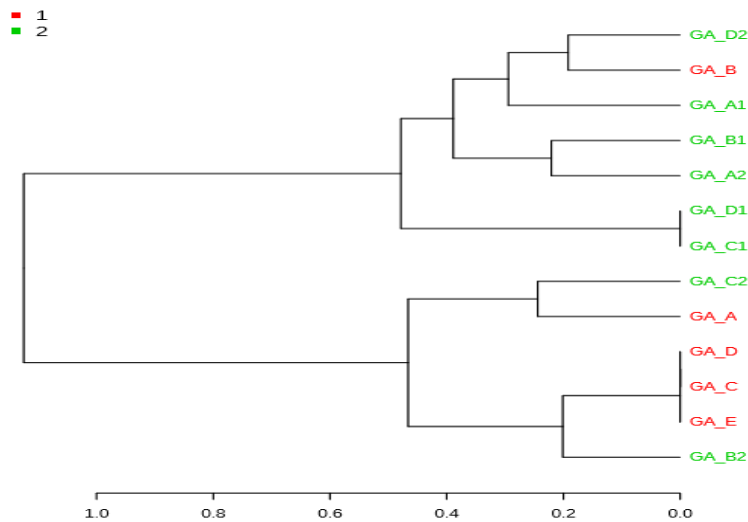
Όπως φαίνεται από τις δύο εικόνες 3.1.1 και 3.1.2 καλύτερος διαχωρισμός των δύο κατηγοριών παρατηρήθηκε στην εφαρμογή της τεχνικής διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Σε αυτή τη περίπτωση οι συνταγές που έχουν παρασκευαστεί και που διαφοροποιούνται (Κατηγορία 2) ως προς τη βασική (Κατηγορία 1) αποκλίνουν από αυτήν στο μεγαλύτερο ποσοστό.

Ωστόσο, λόγω του όγκου των δειγμάτων των διαφοροποιημένων συνταγών σε σχέση με τα δείγματα της βασικής συνταγής, δεν είναι εύκολη η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων που να πιστοποιούν αυτό τον διακριτό διαχωρισμό των δύο κατηγοριών. Έτσι, δοκιμάστηκε στη συνέχεια η εφαρμογή των ίδιων τεχνικών πολυμεταβλητής ανάλυσης αλλά δημιουργώντας ως κατηγορία 1 τη βασική συνταγή και σαν κατηγορία 2 τις διαφοροποιημένες συνταγές επί του ίδιου συστατικού στο +10% και -10%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες () ξεχωριστά για κάθε υλικό.

- Πλήρες γάλα

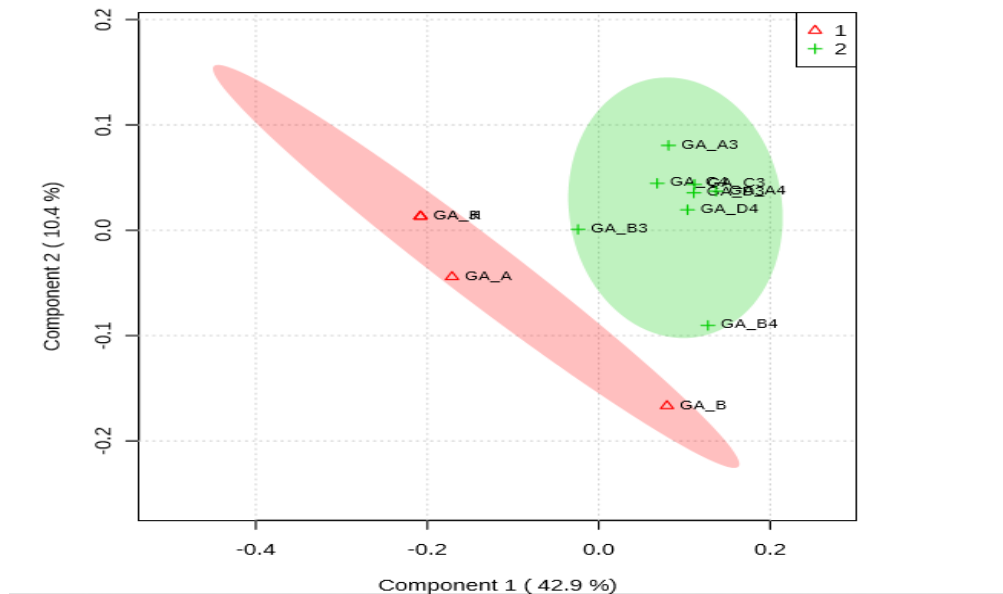


Εικόνα 3.1.3 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το πλήρες γάλα).



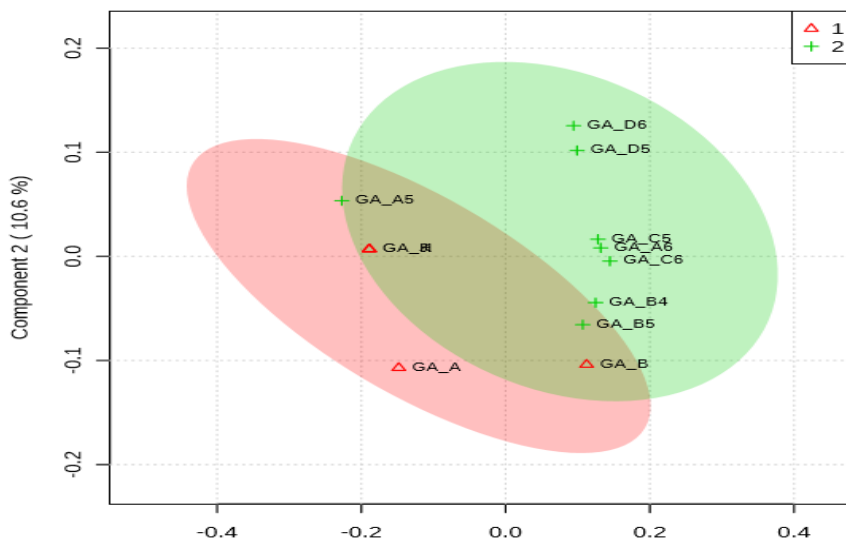
Εικόνα 3.1.4 : Αποτελέσματα ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων με τη μορφή δενδρογράμματος για τις κατηγορίες 1 (Δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (Δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το πλήρες γάλα).

- Αλεύρι



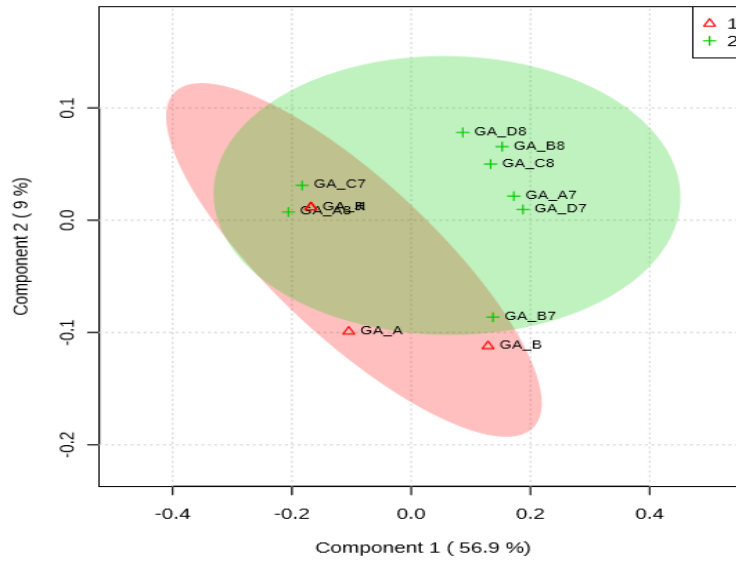
Εικόνα 3.1.5 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το αλεύρι).

- Ζάχαρη



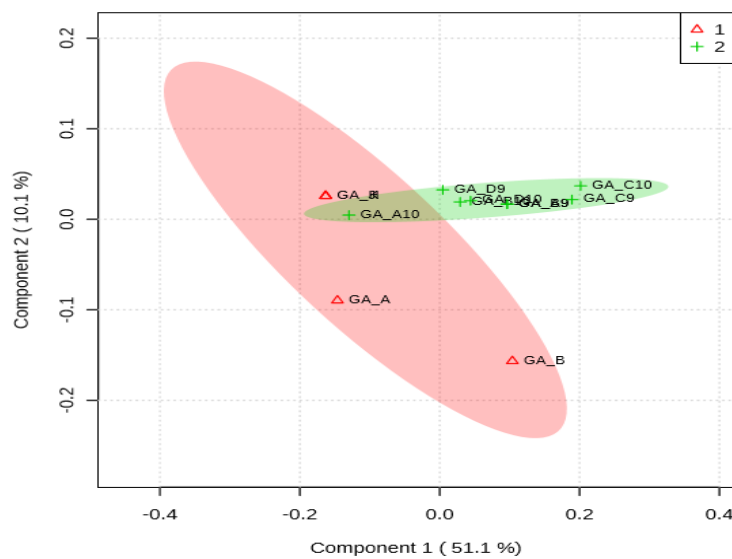
Εικόνα 3.1.6 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τη ζάχαρη)

- Άμυλο



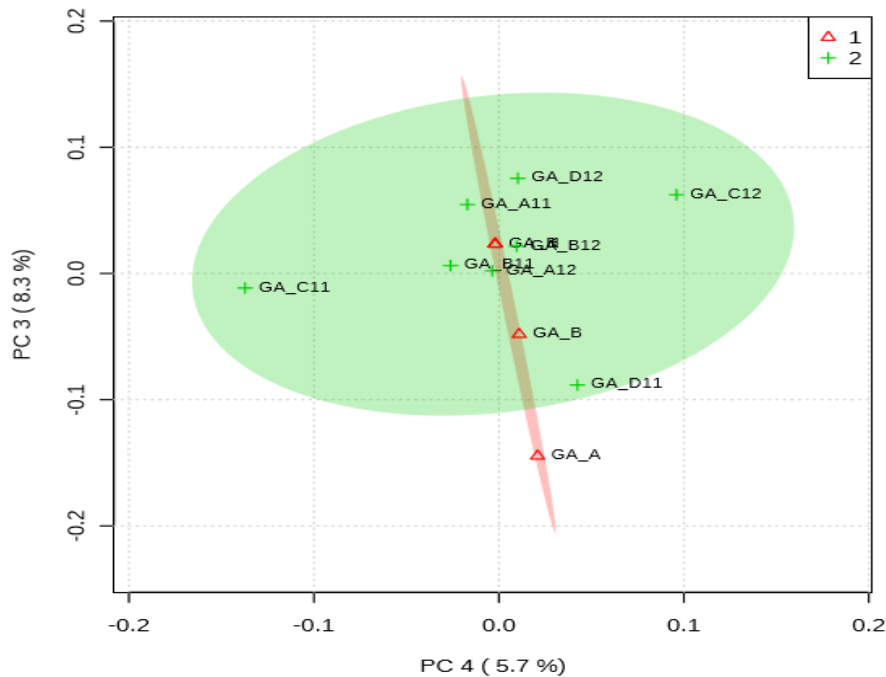
Εικόνα 3.1.7 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άμυλο).

- Ορός γάλατος



Εικόνα 3.1.8 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τον ορό)

- Άπαχο γάλα



Εικόνα 3.1.9: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άπαχο γάλα)

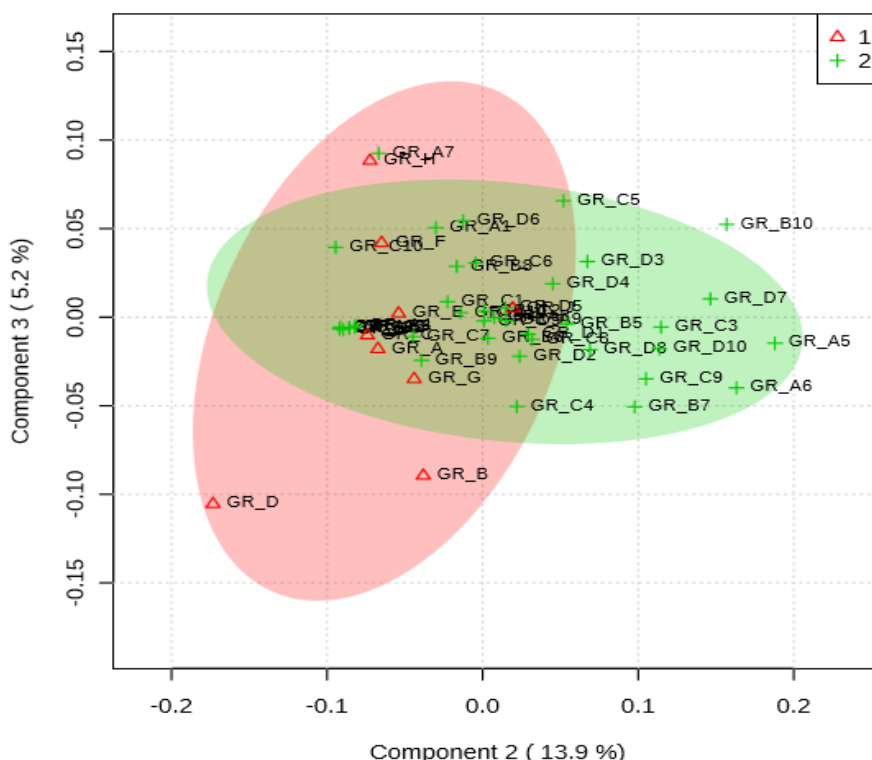
Παρατηρώντας τα αποτελέσματα από την διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) που έγινε για κάθε συστατικό συγκρινόμενο με την βασική συνταγή, φαίνεται οι συνταγές που διαφοροποιούνται στο αλεύρι(3.1.5) και στο πλήρες γάλα(3.1.3) να ομαδοποιούνται από αυτές των βασικών. Αποτέλεσμα που μπορεί να ενισχυθεί από το γεγονός ότι το πλήρες γάλα και το αλεύρι αποτελούν δύο από τα συστατικά μεγαλύτερα σε ποσότητα στη βασική συνταγή, άρα κάποια πιθανή διαφοροποίηση τους θα είχε πιο σημαντικό αντίκτυπο στο σύνολο του προϊόντος.

Οι συνταγές με τροποποίηση στον ορρό γάλατος, τη ζάχαρη, το άμυλο και το άπαχο γάλα(3.1.6, 3.1.7,3.1.8, 3.1.9) δεν δείχνουν τόσο ξεκάθαρη κατηγοριοποίηση όσο τα άλλα δύο συστατικά που αναφέραμε όμως ομαδοποιούνται και αυτά εν συγκρίσει με τη βασική συνταγή.

ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΡΥΖΑΛΕΥΡΟ (συνταγή σε σκόνη)

Τις ίδιες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για το γαλατούχο άλευρο πραγματοποιήθηκαν και για το γαλατούχο ρυζάλευρο. Ελέγχθηκαν οι συνταγές τόσο στο πρώτο στάδιο ανάμειξης με τη μορφή σκόνης πριν την έναρξη της παραγωγικής διαδικασίας, ώστε να εντοπιστεί αν με τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν ανιχνεύονται οι μετατροπές (λάθη) επί των βασικών συνταγών.

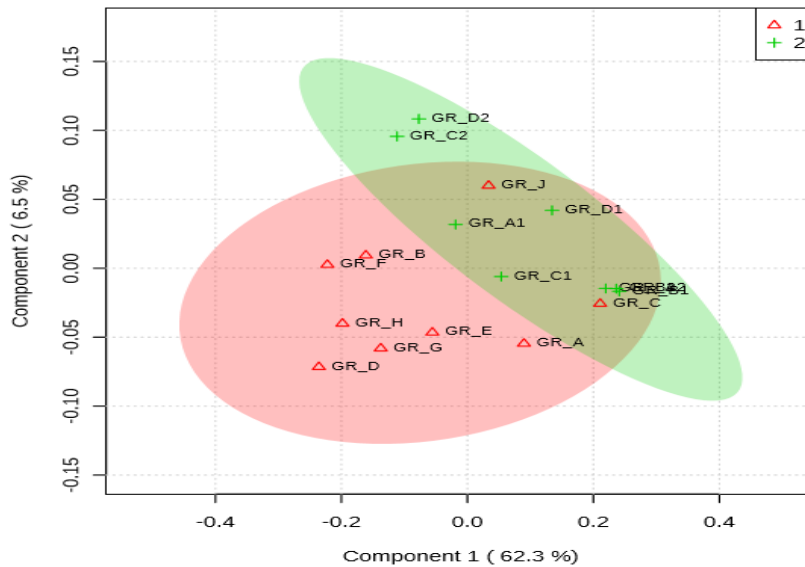
Σε πρώτη δοκιμή συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα με τη δημιουργία δύο κατηγοριών. Ως κατηγορία 1 ορίστηκε η βασική συνταγή και ως κατηγορία 2 όλες τις τροποποιήσεις.



Εικόνα 3.1.10 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών)

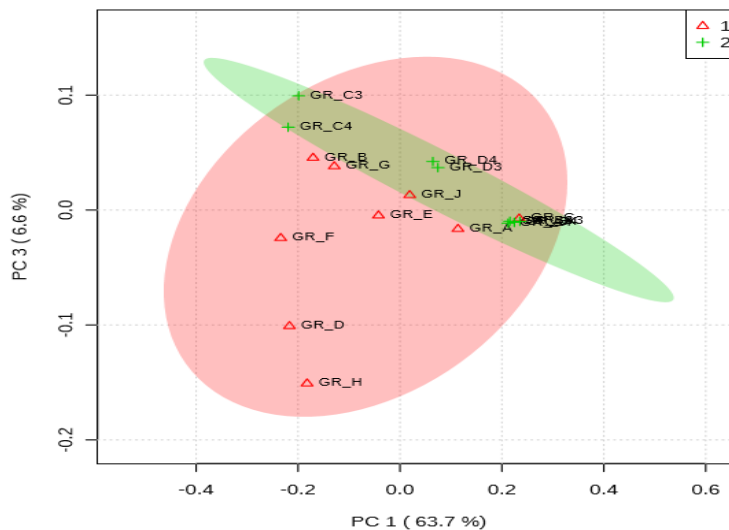
Ο μεγάλος όγκος δειγμάτων τροποποιημένων συνταγών εν συγκρίσει με τις βασικές δεν οδηγεί σε ασφαλή συμπεράσματα για τον ξεκάθαρο διαχωρισμό ανάμεσα στις δύο κατηγορίες κάτι που οδηγεί στο να δοκιμαστεί ξεχωριστά η σύγκριση των διαφοροποιημένων συνταγών ως προς κάθε συστατικό με αυτές τις βασικής συνταγής.

- Ρυζάλευρο



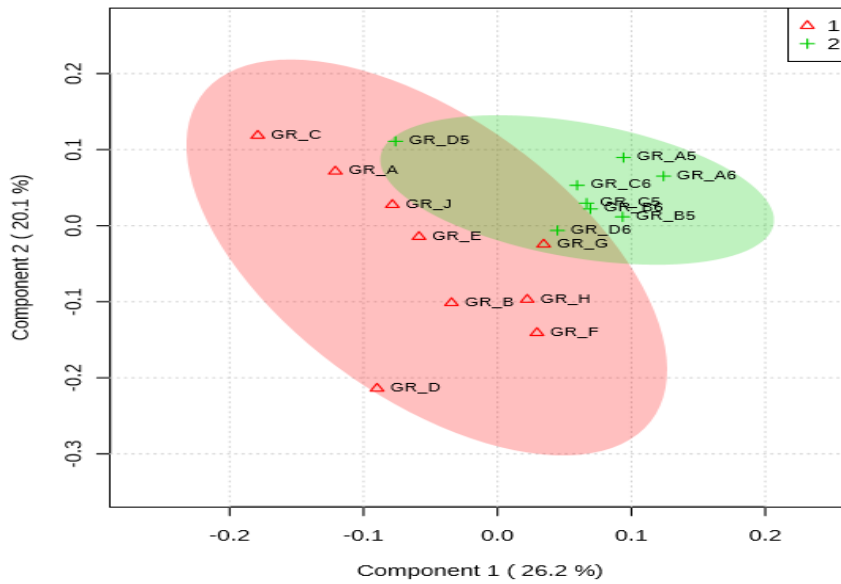
Εικόνα 3.1.11: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το ρυζάλευρο)

- Ορρός γάλατος

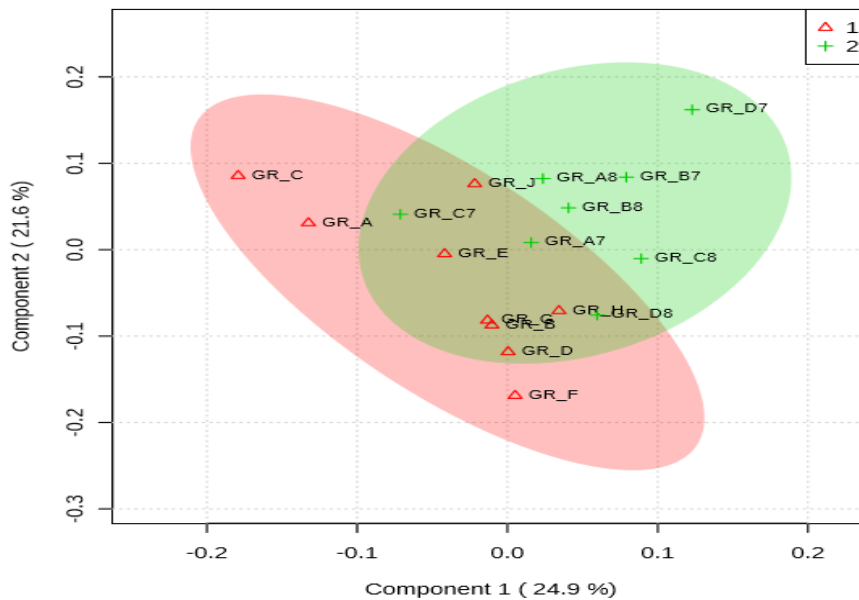


Εικόνα 3.1.12 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τον ορρό γάλατος)

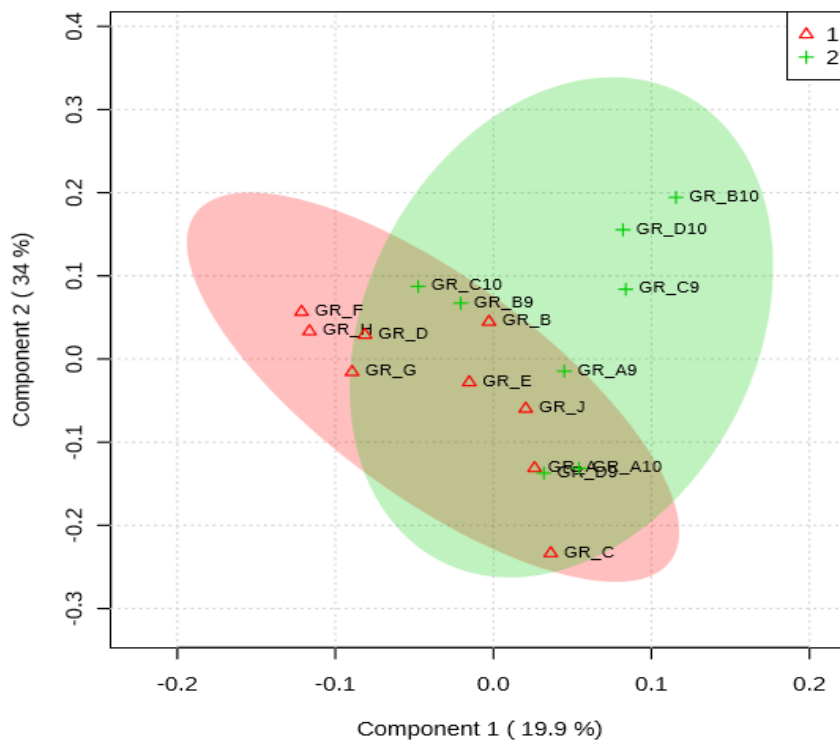
- Πλήρες γάλα



Εικόνα 3.1.13: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το πλήρες γάλα)



Εικόνα 3.1.14: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τη ζάχαρη)



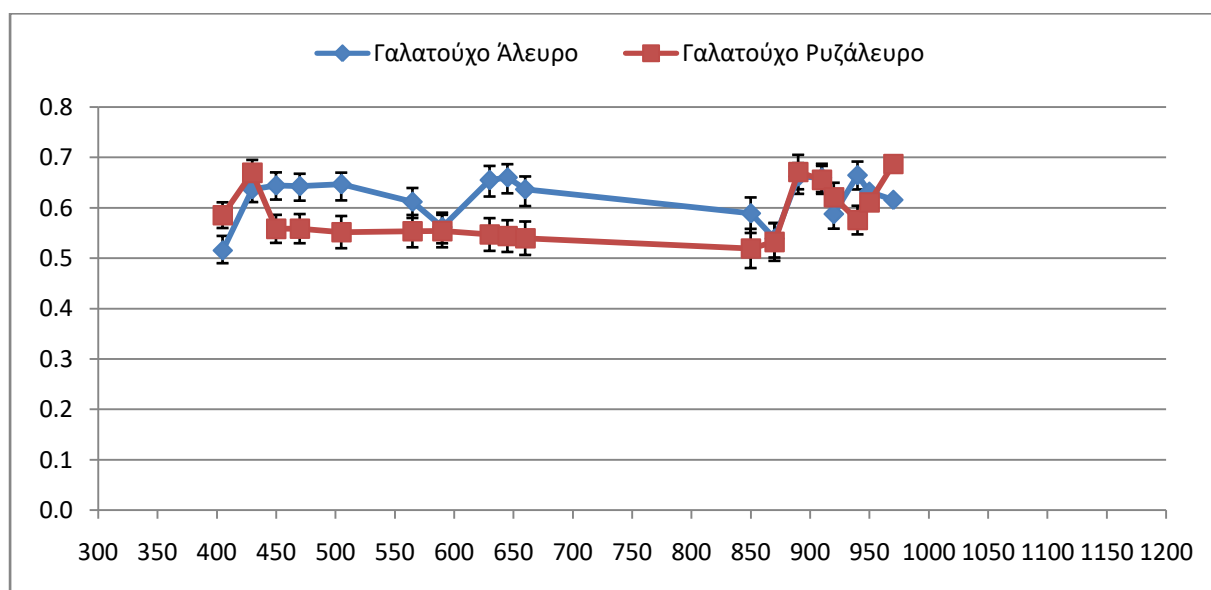
Εικόνα 3.1.15: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άπαχο γάλα)

Τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής ανάλυσης στα δύο είδη βασικών συνταγών σε σκόνη συγκριτικά έδειξαν μία καλή εφαρμογή της PLS-DA στο να εντοπίζει τις τροποποιήσεις που δημιουργήθηκαν σε κάθε συνταγή ως προς το κάθε συστατικό. Επίσης σημαντικό είναι να παρατηρηθεί η αλλαγή ποιων δύο συστατικών επιφέρει τη βασική διαφορά σε κάθε συνταγή. Στη περίπτωση του γαλατούχου αλεύρου σε σκόνη, η αλλαγή στο αλεύρι δείχνει έναν χαρακτηριστικό διαχωρισμό και διαφοροποιεί τις βασικές συνταγές από τις τροποποιημένες. Αντίθετα, στην περίπτωση του γαλατούχου ρυζάλευρου το συστατικό που οδηγεί σε διακριτό διαχωρισμό χρησιμοποιώντας τις τεχνικές πολυμεταβλητής ανάλυσης είναι το πλήρες γάλα.

Στις δοκιμές που έγιναν για το ρυζάλευρο ικανοποιητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τη χρήση της τεχνική PLS-DA, λιγότερο ικανοποιητικά όμως σε σχέση με τις αναλύσεις στο γαλατούχο άλευρο σκόνης. Φαίνεται να είναι μία καλή τεχνική στον εντοπισμό των διαφοροποιήσεων που δημιουργήθηκαν στη βασική συνταγή για να εντοπίσουμε λάθη πριν την εισαγωγή του προϊόντος στη παραγωγική διαδικασία.

Γ. Ανάλυση εικόνας (Videometer) – Συνταγή σε μορφή κρέμας

Οι συνταγές που παρασκευάστηκαν στο πρώτο στάδιο στη συνέχεια της επεξεργασίας αναμείχθηκαν με την κατάλληλη ποσότητα νερού που αντιστοιχεί στο πρότυπο της κάθε συνταγής (ποσότητα νερού πρότυπης συνταγής δια του δύο σε γραμμάρια) και θερμάνθηκαν παίρνοντας ένα χυλό κρέμας ο οποίος αναλύθηκε ως προς κάθε διαφοροποιημένη συνταγή και ως προς τη βασική στο VideometerLab.



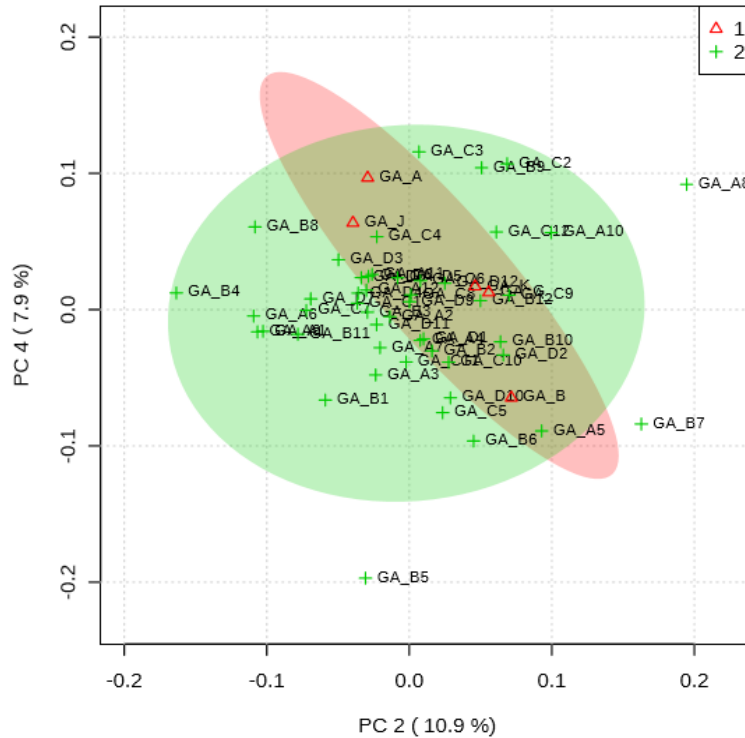
Διάγραμμα 3.1.2 Φάσματα ανάκλασης (μέσες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις) των δύο βασικών συνταγών βρεφικών κρεμών (γαλατούχο άλευρο, γαλατούχο ρυζάλευρο), ληφθέντα με το σύστημα VideometerLab.

ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΑΛΕΥΡΟ (Συνταγή σε μορφή χυλού κρέμας)

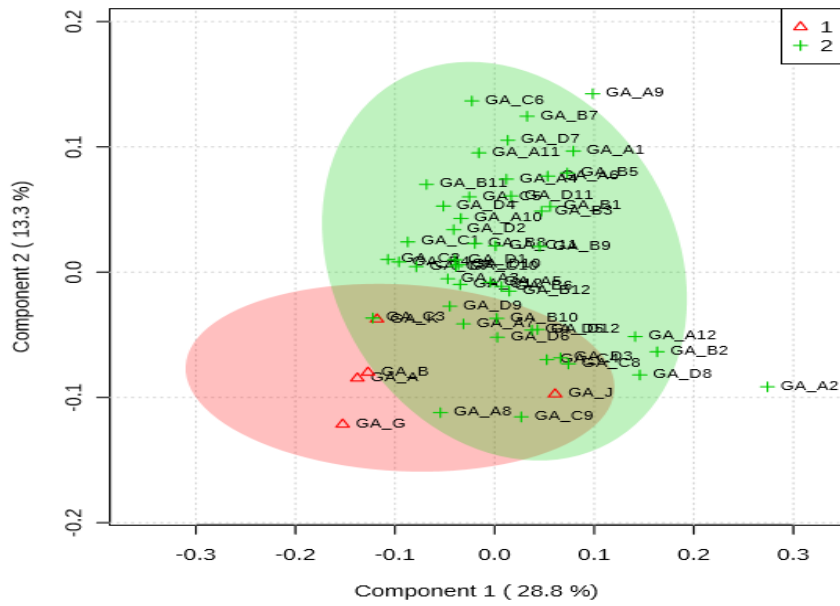
Στην εικόνα 3.1.16 και 3.1.17 φαίνονται οι επεξεργασίες με που έγιναν με τη χρήση διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) και ανάλυση με κύριες συνιστώσες (PCA) για τις δύο κατηγορίες που δημιουργήθηκαν. Η μία αφορά τη βασική συνταγή του γαλατούχου αλεύρου κρέμας και η άλλη όλες τις διαφοροποιημένες συνταγές που έχουν μετατραπεί σε χυλό.

Αρκετά καλά φαίνεται να ξεχωρίζουν οι κατηγορίες στην τεχνική PLS-DA (Εικόνα 3.1.17), όπου οι διαφοροποιημένες συνταγές κρέμας έχουν δημιουργήσει μία πυκνή περιοχή σχετικά απομακρυσμένη από τα δείγματα της κατηγορίας 1 δηλαδή της βασικής συνταγής κρέμας. Επίσης, και στις συνταγές κρέμας του γαλατούχου αλεύρου όπως και των συνταγών σκόνης τα δείγματα των τροποποιημένων συνταγών ήταν πολυπληθέστερα σε σχέση με τη βασική κάτι που δεν οδηγεί στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Σε ένα επόμενο στάδιο δοκιμάστηκε κάθε διαφοροποιημένη συνταγή ξεχωριστά με τις βασικές συνταγές και συγκρίθηκε αν εμφανίζεται κάποια διαφορά που να ενισχύσει την εντύπωση πραγμάτωσης λάθους στις συνταγές συγκρινόμενη πάντα με τη βασική.

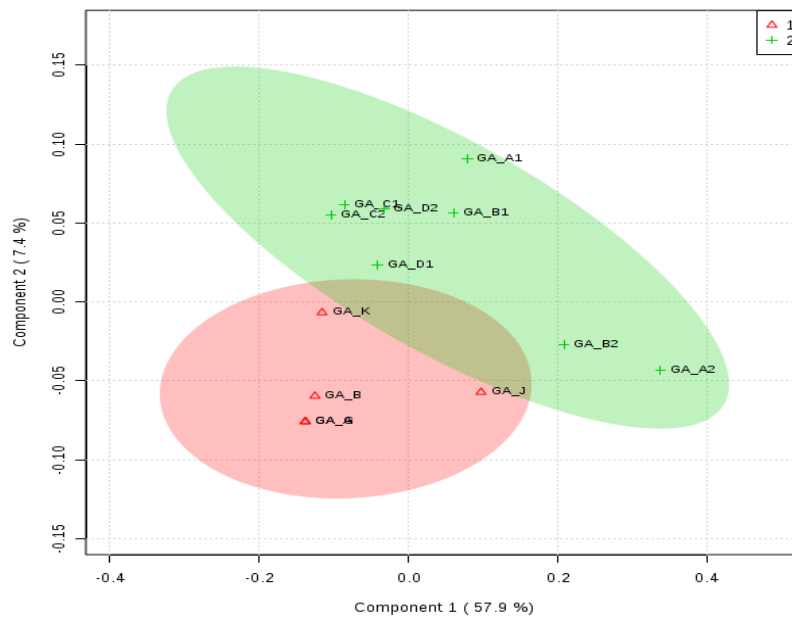


Εικόνα 3.1.16 : Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2(δείγματα τροποποιημένων συνταγών).



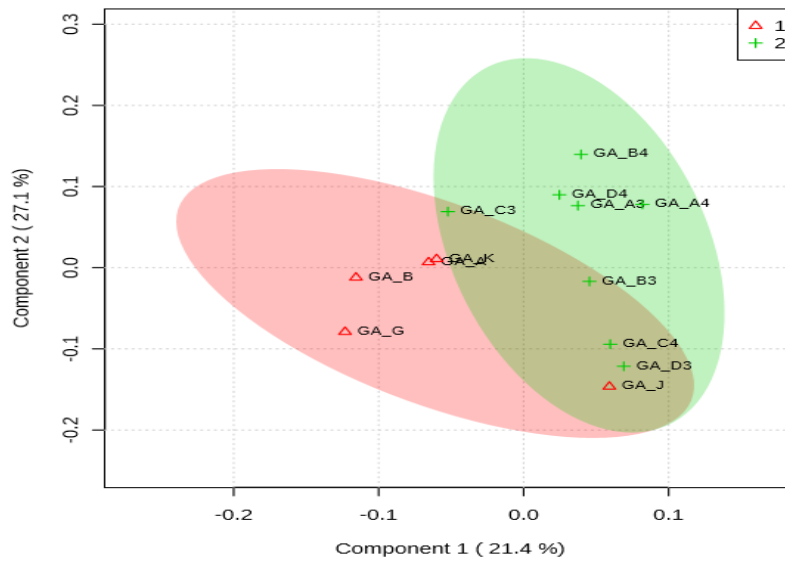
Εικόνα 3.1.17: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών κρέμας)

- Πλήρες γάλα



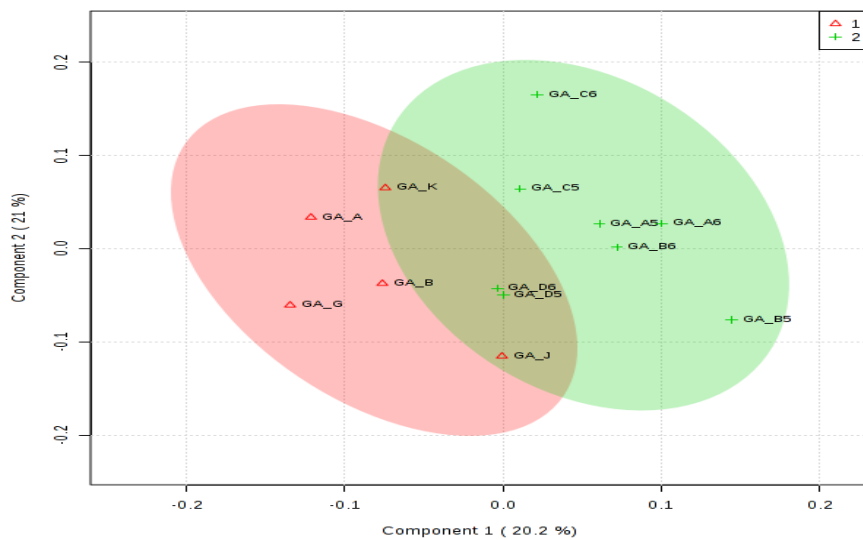
Εικόνα 3.1.18 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το πλήρες γάλα

- Αλεύρι



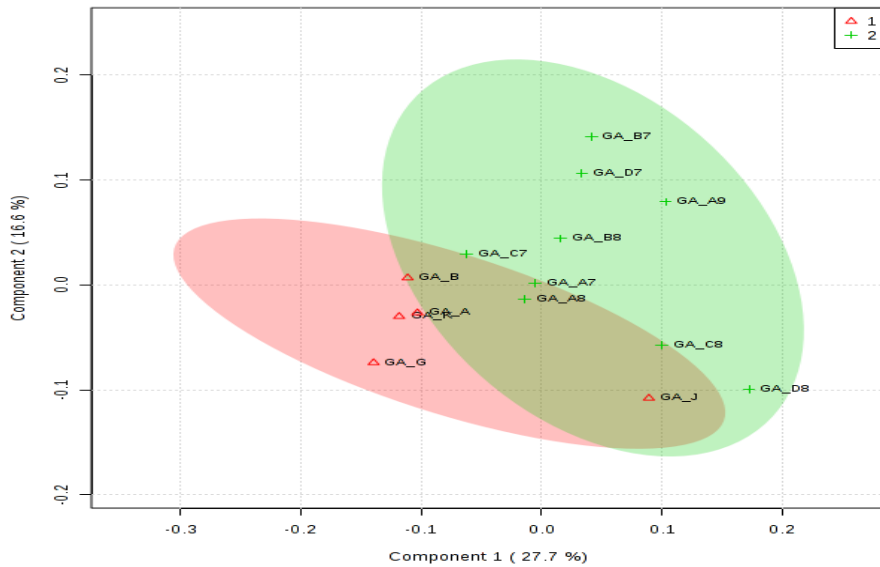
Εικόνα 3.1.19 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το αλεύρι)

- Ζάχαρη



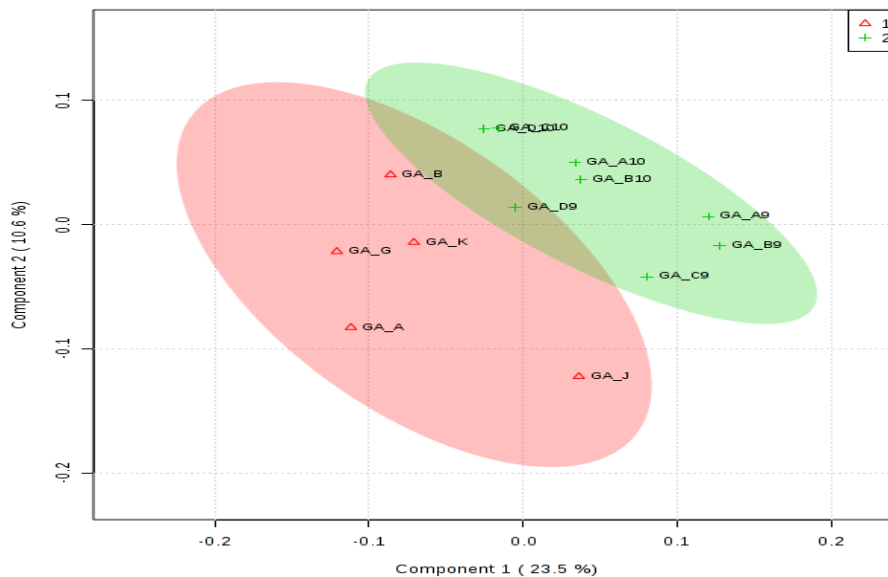
Εικόνα 3.1.20 Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τη ζάχαρη)

- Άμυλο



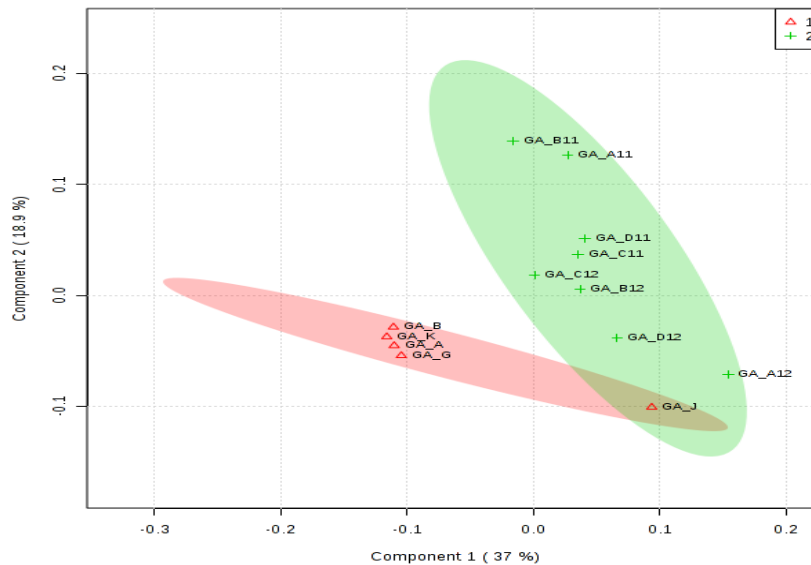
Εικόνα 3.1.21 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άμυλο).

- Ορρός γάλατος



Εικόνα 3.1.22: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τον ορρό).

- Άπαχο γάλα



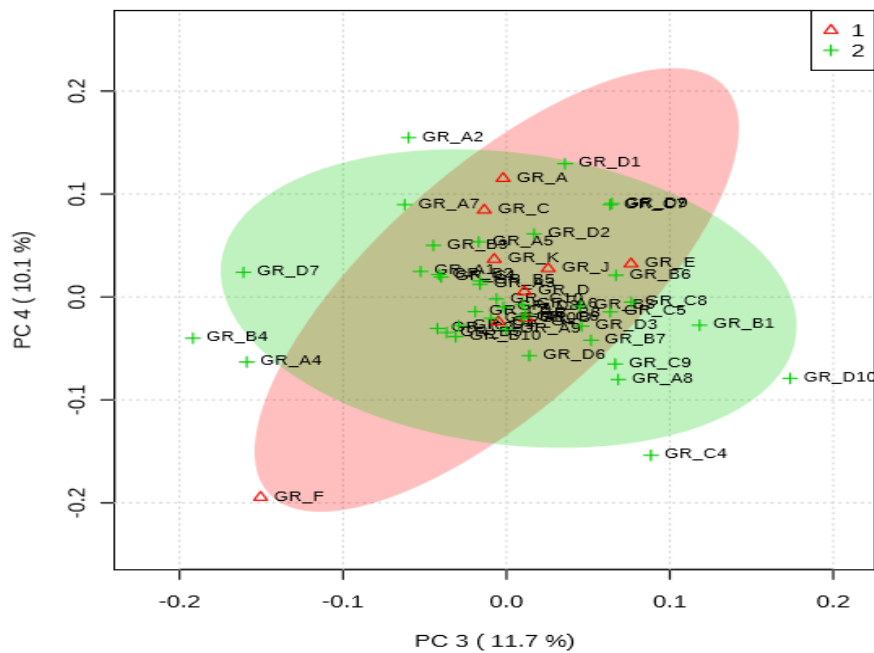
Εικόνα 3.1.23 : Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άπαχο γάλα)

Στην Εικόνα 3.1.23 παρατηρείται ότι τα δεδομένα των συνταγών που έχουν υποστεί αλλαγή ως προς το άπαχο γάλα διαχωρίζονται τόσο ως προς τη βασική συνταγή αλλά και μεταξύ τους. Δηλαδή, οι συνταγές του +10% στο άπαχο γάλα (A,B,C,D11) είναι διαχωρισμένες από τις συνταγές του -10% στο άπαχο γάλα (A,B,C,D12). Επίσης, οι συνταγές που έχουν αλλαγή στο πλήρες γάλα δείχνουν να διαφοροποιούνται με την εφαρμογή της τεχνικής PLS-DA. Με αυτό τον τρόπο μία αλλαγή στο πλήρες γάλα κατά την ανάμειξη των υλικών παρασκευής των κρεμών θα μπορούσε να δώσει με αυτή τη τεχνική ένδειξη ότι κάποια τροποποίηση έχει πραγματοποιηθεί. Στην εικόνα 3.1.22 διακρίνεται η διαφοροποίηση που έχουν οι τροποποιημένες συνταγές στον ορρού σε σχέση με τη βασική συνταγή κρέμας που παρασκευάσαμε. Επίσης φαίνεται οι συνταγές του +10%(A9) ως προς τον ορρό να διαχωρίζονται από τις συνταγές του -10% (A10). Τόσο οι αλλαγές στο αλεύρι και το πλήρες γάλα όσο και οι αλλαγές στη ποσότητα της ζάχαρης έχουν ένα θετικό αποτέλεσμα διαχωρισμού από τη βασική συνταγή της κρέμας.

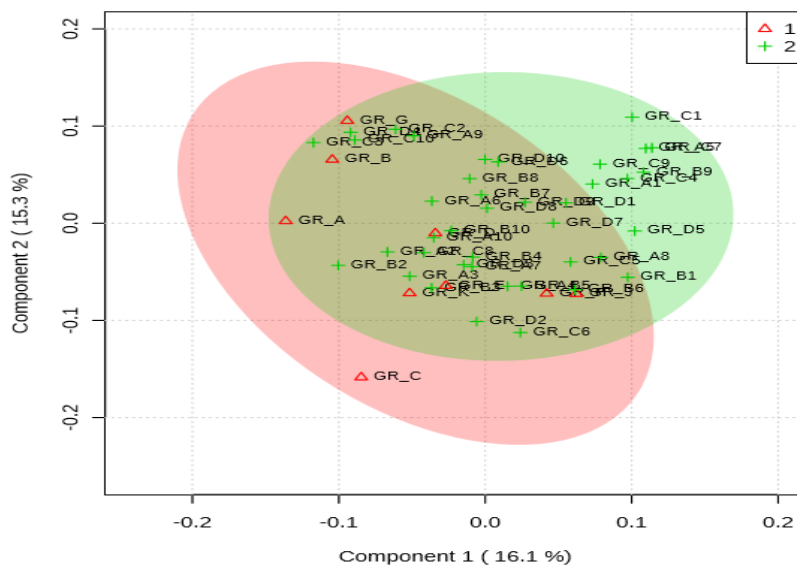
ΓΑΛΑΤΟΥΧΟ ΡΥΖΑΛΕΥΡΟ (Συνταγή σε μορφή κρέμας)

Στην εικόνα 3.1.24 και 3.1.25 παρουσιάζονται οι επεξεργασίες που έγιναν με τη χρήση κυρίων συνιστωσών(PCA) και διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) για τις δύο κατηγορίες που δημιουργήθηκαν και η μία αφορά

τη βασική συνταγή του γαλατούχου ρυζάλευρου κρέμας και η άλλη όλες τις διαφοροποιημένες συνταγές που έχουν μετατραπεί σε χυλό.



Εικόνα 3.1.24 : Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών).

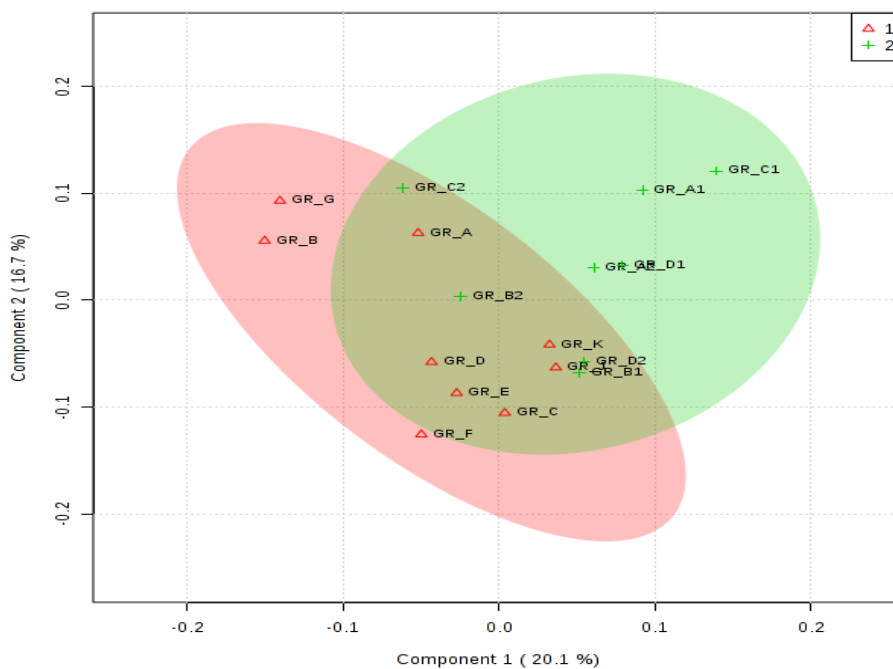


Εικόνα 3.1.25: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών)

Από τα δεδομένα της PLS-DA όσο και της PCA για τις κατηγορίες που αφορούν τα δεδομένα της βασικής συνταγής (κατηγορία 1) και των διαφοροποιημένων συνταγών (κατηγορία 2), παρατηρούμε ότι οι κατηγορίες δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους αλλά σχηματίζουν μία πυκνή περιοχή στην οποία παρουσιάζονται όλες μαζί.

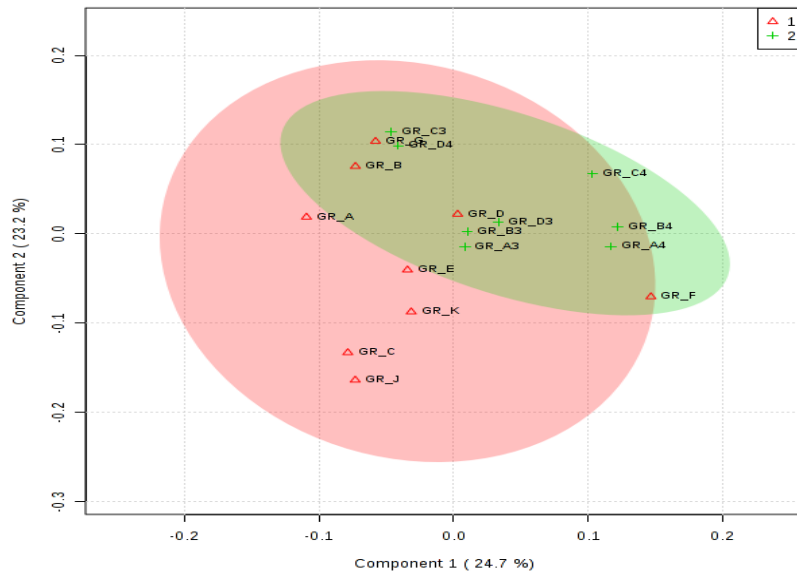
Για αυτό το λόγο δοκιμάσαμε να δημιουργήσουμε δύο κατηγορίες εκ των οποίων η μία αφορά τα δεδομένα που λάβαμε για τη βασική συνταγή κρέμας γαλατούχου ρυζάλευρου από το ViedometerLab και η άλλη τα δεδομένα για κάθε μία από τις τροποποιήσεις σε κάθε υλικό ξεχωριστά. Στα δεδομένα εισάγαμε και τις αλλαγές του +10% και του -10% για κάθε υλικό.

- **Ρυζάλευρο**



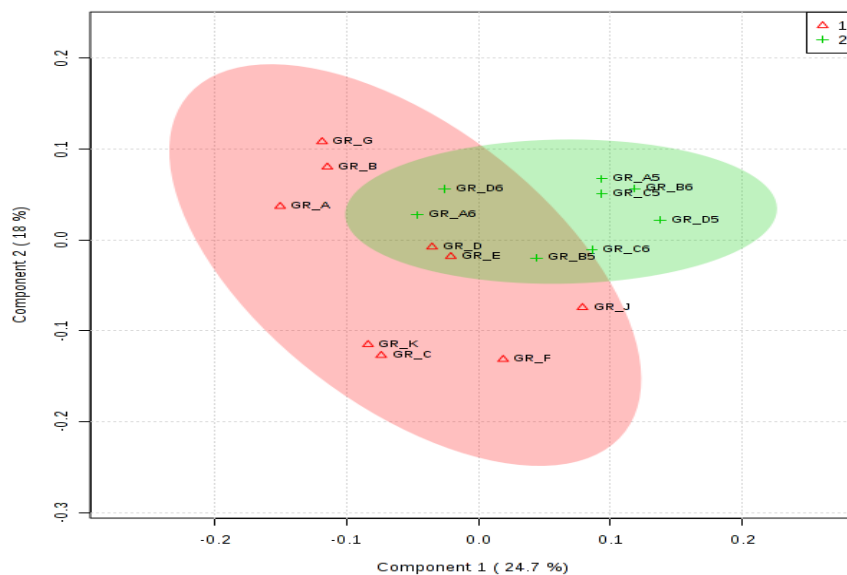
Εικόνα 3.1.26: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το ρυζάλευρο)

- Ορρός γάλατος



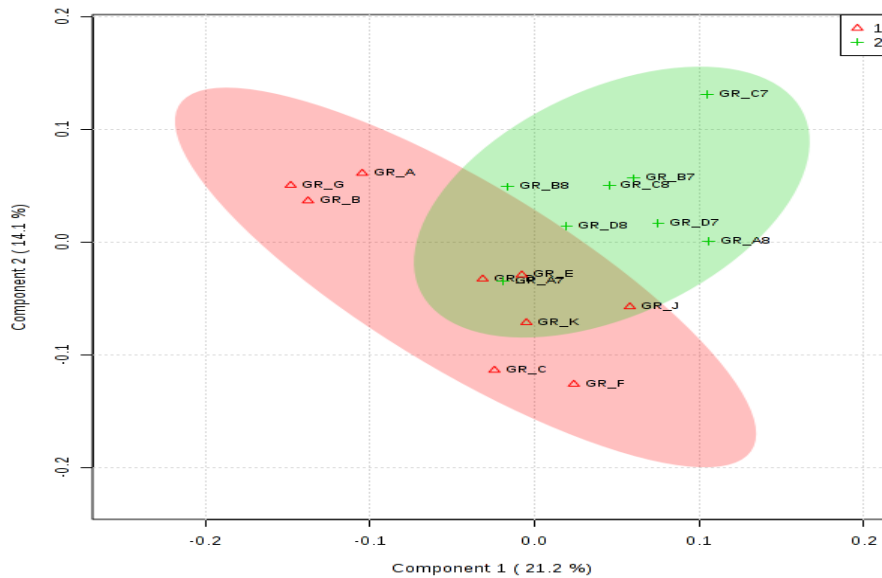
Εικόνα 3.1.27: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τον ορρό γάλατος)

- Πλήρες γάλα



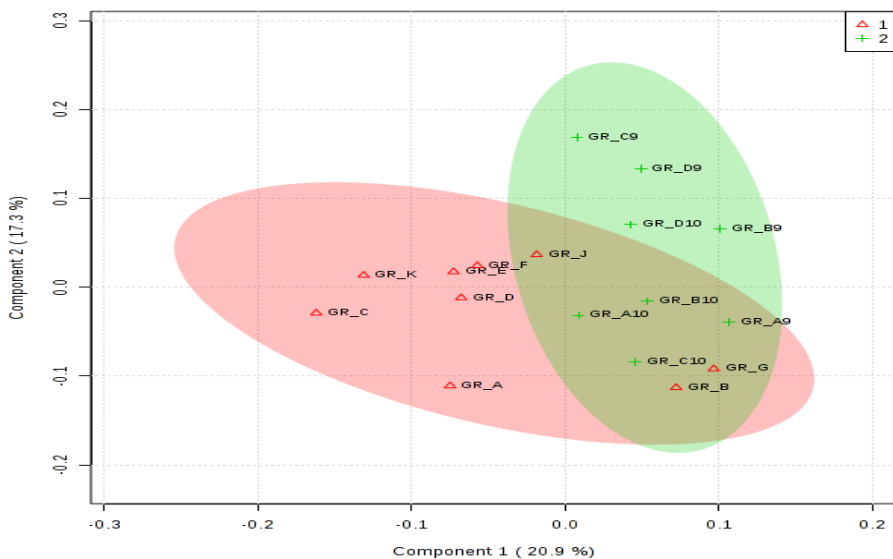
Εικόνα 3.1.28: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το πλήρες γάλα)

- Ζάχαρη



Εικόνα 3.1.29: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τη ζάχαρη)

- Άπαχο γάλα



Εικόνα 3.1.30: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άπαχο γάλα)

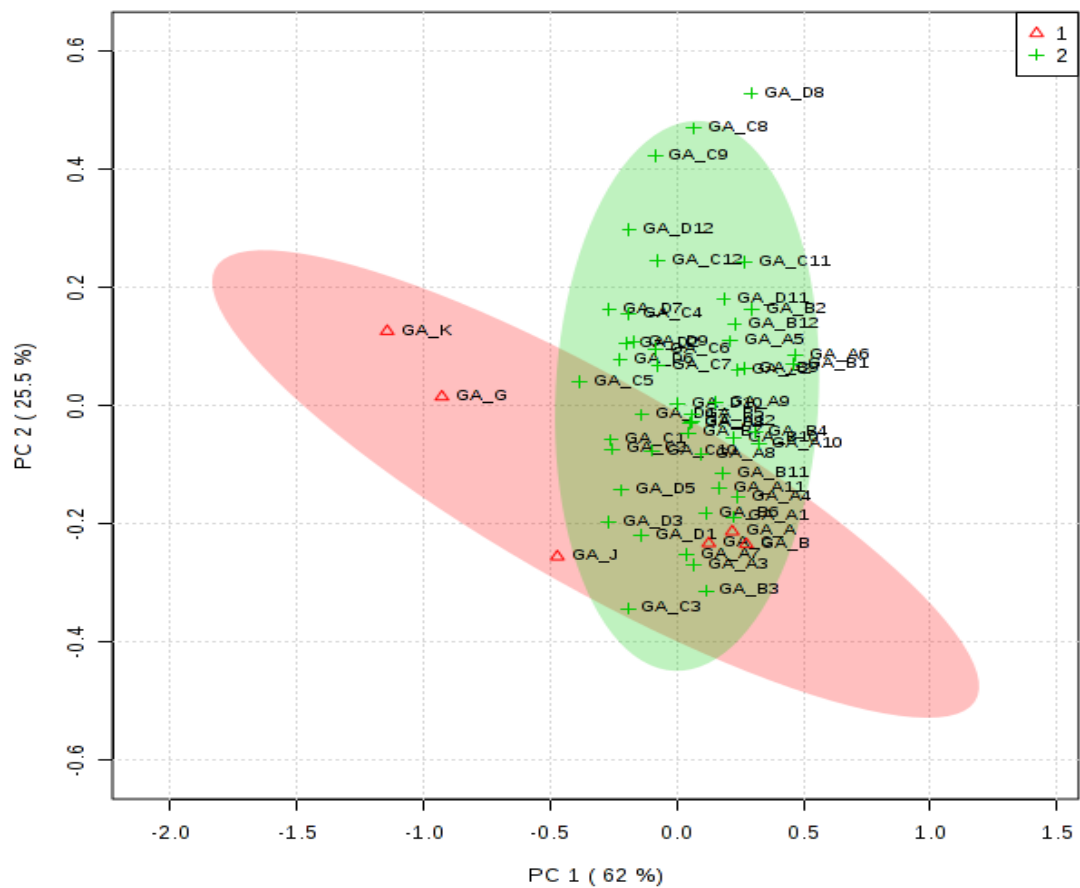
Από την Εικόνα 3.1.30 φαίνονται οι συνταγές που έχουν υποστεί αλλαγή +10% στο άπαχο γάλα (A9,B9,C9,D9) να απομακρύνονται σε σχέση με τα δεδομένα της κατηγορίας 1 και συνεπώς της βασικής συνταγής. Στο σύνολό τους οι τροποποιημένες συνταγές διαχωρίζονται αλλά όχι σημαντικά, ειδικότερα οι συνταγές της κατηγορίας 2 με το -10% (A10,B10,C10,D10) βλέπουμε ότι πλησιάζουν πολύ κοντά στα δείγματα της βασικής συνταγής. Αυτό μας δείχνει ότι η αλλαγή με μείωση της ποσότητας του άπαχου γάλατος δεν προκαλεί κάποιο αλλαγή στη βασική συνταγή, ικανή να ανιχνευθεί με δεδομένα ανάκλασης. Από τα αποτελέσματα για τις τροποποιημένες συνταγές στο ρυζάλευρο (Εικόνα 3.1.26) παρατηρείται ότι οι δύο κατηγορίες διαχωρίζονται μεταξύ τους, χωρίς όμως να διαφοροποιούνται αισθητά. Οι συνταγές του -10% (C2,D2,A2,B2) πλησιάζουν αυτές της βασικής συνταγής (κατηγορία 1), ενώ αντίθετα αυτές του +10% (A1,B1,C1,D1) ως προς το ρυζάλευρο απομακρύνονται από την κατηγορία 1 αυτή της βασικής συνταγής. Από παρατήρηση της εικόνας 3.1.27 φαίνεται πως επηρεάζεται σε σχέση με τη πρότυπη συνταγή κρέμας κάποια διαφοροποίηση ως προς τον ορρό γάλατος. Από τα αποτελέσματα δε παρατηρείται διακριτός διαχωρισμός καθώς η κατηγορία 1 (βασικές συνταγές κρέμας) και η κατηγορία 2 (τροποποιημένες συνταγές στον ορρό) φαίνεται να αλληλεπικαλύπτονται. Ωστόσο, οι συνταγές στις οποίες έχουμε δοκιμάσει το -10% στον ορρό γάλατος (A4,C4,D4,B4), φαίνεται να απομακρύνονται από τη βασική συνταγή κρέμας.

Δ. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ FT-IR (βρεφικές συνταγές σε μορφή κρέμας)

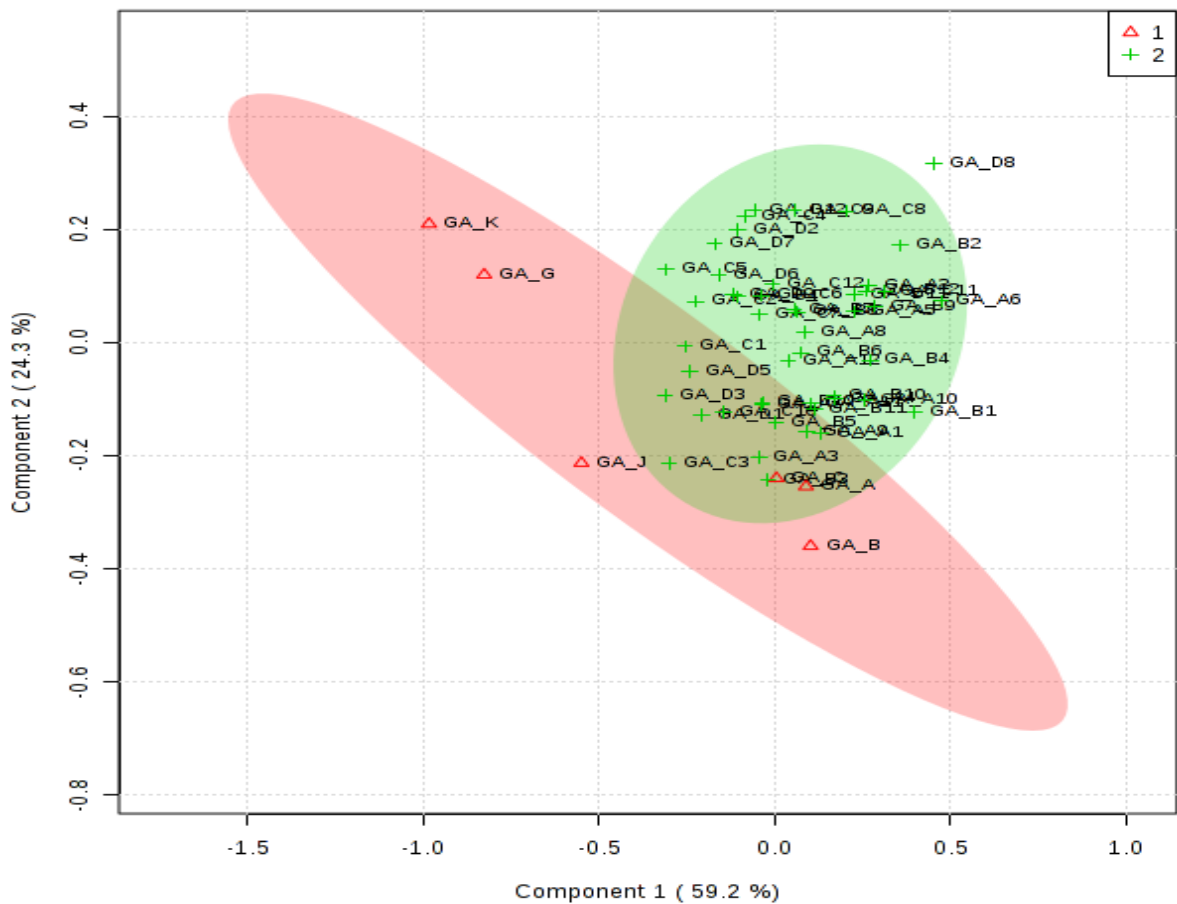
Όλα τα δείγματα συνταγών κρέμας γαλατούχου αλεύρου και γαλατούχου ρυζάλευρου εξετάστηκαν και φασματοσκοπία FT-IR. Ομοίως με παραπάνω, με τη λήψη αυτών των δεδομένων και τη χρήση τεχνικών πολυμεταβλητής ανάλυσης, αξιολογήθηκε η δυνατότητα ανίχνευσης τροποποιήσεων στις συνταγές (της τάξης του $\pm 10\%$ στις ποσότητες των επιμέρους βασικών συστατικών).

Γαλατούχο Άλευρο (συνταγές κρέμας)

Ομοίως με παραπάνω, τα ληφθέντα δεδομένα χωρίστηκαν αρχικά σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που αφορούν στη βασική συνταγή του γαλατούχου αλεύρου κρέμας (κατηγορία 1) και σε αυτά που αφορούν σε τροποποιήσεις σε κάποιο συστατικό (κατηγορία 2). Με εισαγωγή των δεδομένων στο σύστημα πολυμεταβλητής ανάλυσης και εφαρμογή των τεχνικών PCA και PLS-DA λάβαμε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες παρακάτω.



Εικόνα 3.1.31: Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών).

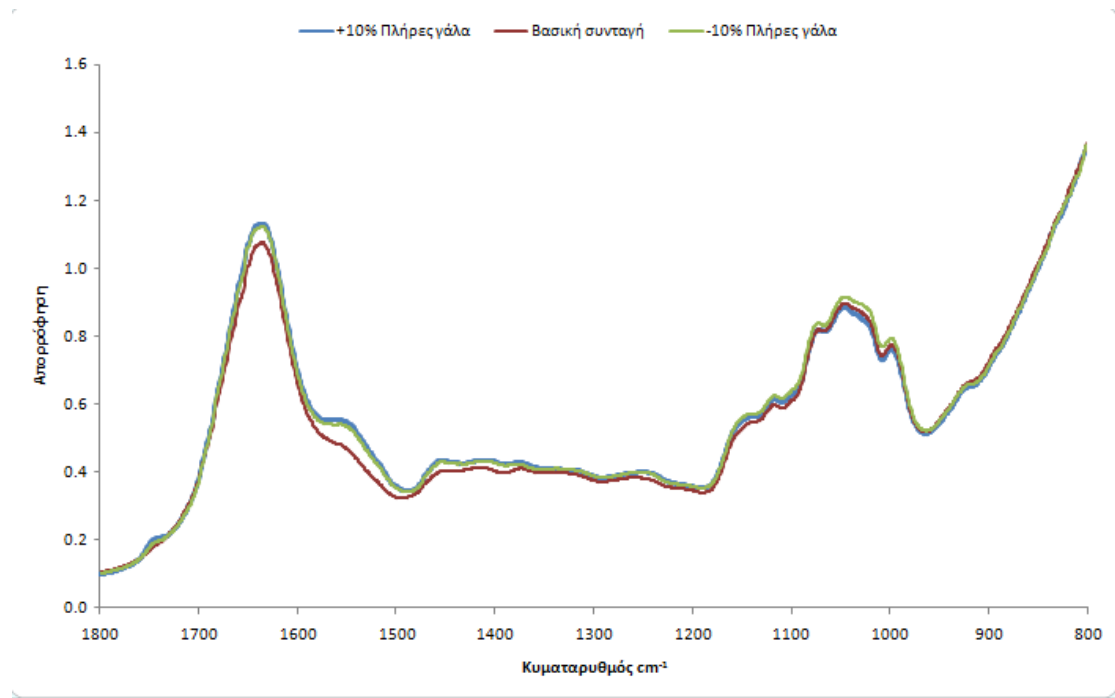


Εικόνα 3.1.32: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών)

Συγκρίνοντας τις κατηγορίες των βασικών συνταγών έναντι των τροποποιημένων, φαίνεται μετά από την εφαρμογή της PLS-DA ότι η ομαδοποίηση μεταξύ των κατηγοριών δεν είναι διακριτή. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα δεδομένα της βασικής συνταγής είναι λίγα σε σχέση με τα δεδομένα των διαφοροποιημένων συνταγών. Με αυτό τον τρόπο η εξαγωγή σαφούς αποτελέσματος δεν είναι εφικτή. Η εφαρμογή της PLS-DA στα δεδομένα του FT-IR (Εικόνα,3.1.32) παρουσιάζει τις δύο κατηγορίες ομαδοποιημένες με κάπως καλύτερο τρόπο συγκρινόμενη με την PLS-DA για τα ίδια δεδομένα του VideometerLab (Εικόνα 3.1.17).

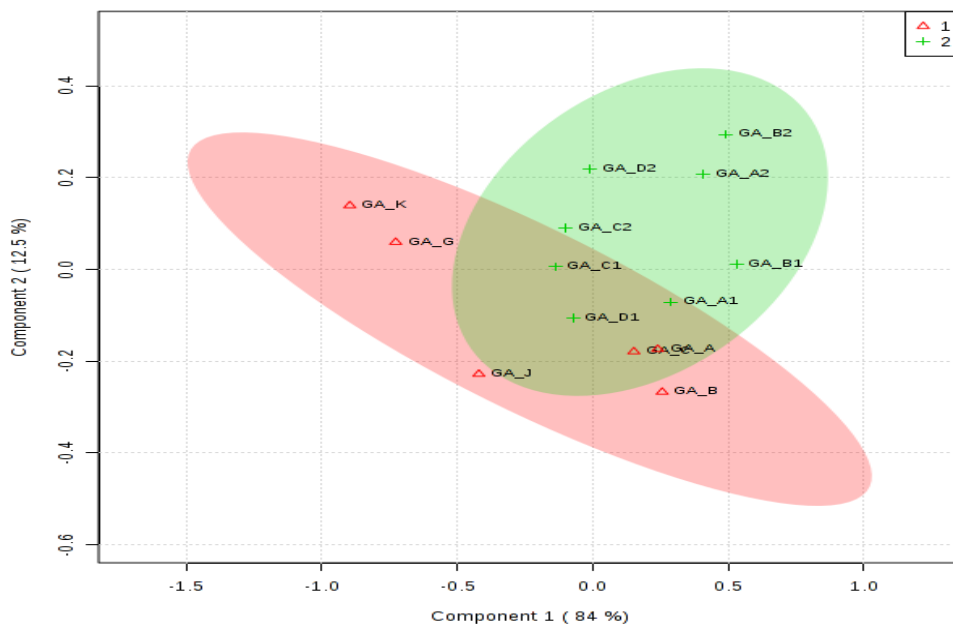
Κατά αντιστοιχία με τα όσα περιγράφηκαν παραπάνω, στις επόμενες αναλύσεις για τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από το αναλυτικό όργανο φασματοσκοπίας FT-IR, χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες, με τη μία να αφορά τα δεδομένα των βασικών συνταγών κρέμας (κατηγορία 1) και την άλλη τα δεδομένα ξεχωριστά για κάθε αλλαγμένο συστατικό (κατηγορία 2)

- Πλήρες γάλα



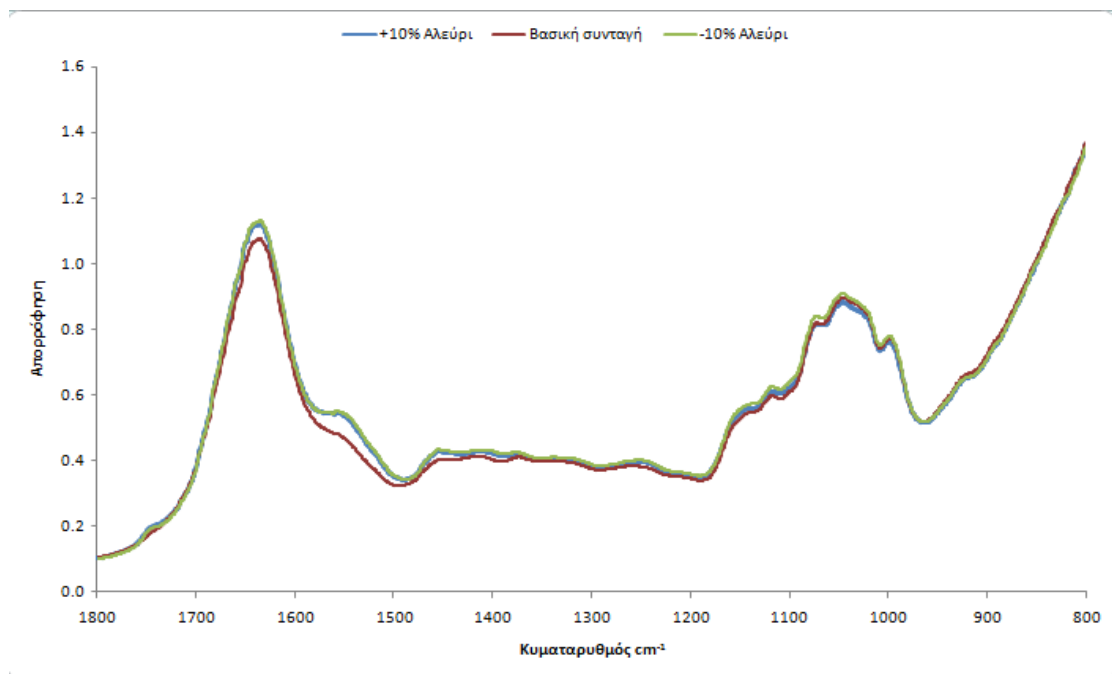
Διάγραμμα 3.1.3: Παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR της βασικής συνταγής κρέμας και των δύο διαφοροποιημένων ως προς το πλήρες γάλα.

Από το διάγραμμα 3.1.3 παρατηρούνται διαφορές στις κορυφές της βασικής συνταγής με την συνταγή του +10% και -10% στο πλήρες γάλα στα 1520- 1580cm⁻¹, καθώς η βασική συνταγή εκεί δίνει μία λιγότερο έντονη κορυφή από αυτή του +10% στο πλήρες γάλα. Αντίθετα, στα 1010-1050 cm⁻¹ παρατηρούμε αλλαγές μεταξύ της βασικής συνταγής που δίνει λιγότερο έντονη κορυφή σε σχέση με τη συνταγή του -10% στο πλήρες γάλα.



Εικόνα 3.1.33: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το πλήρες γάλα)

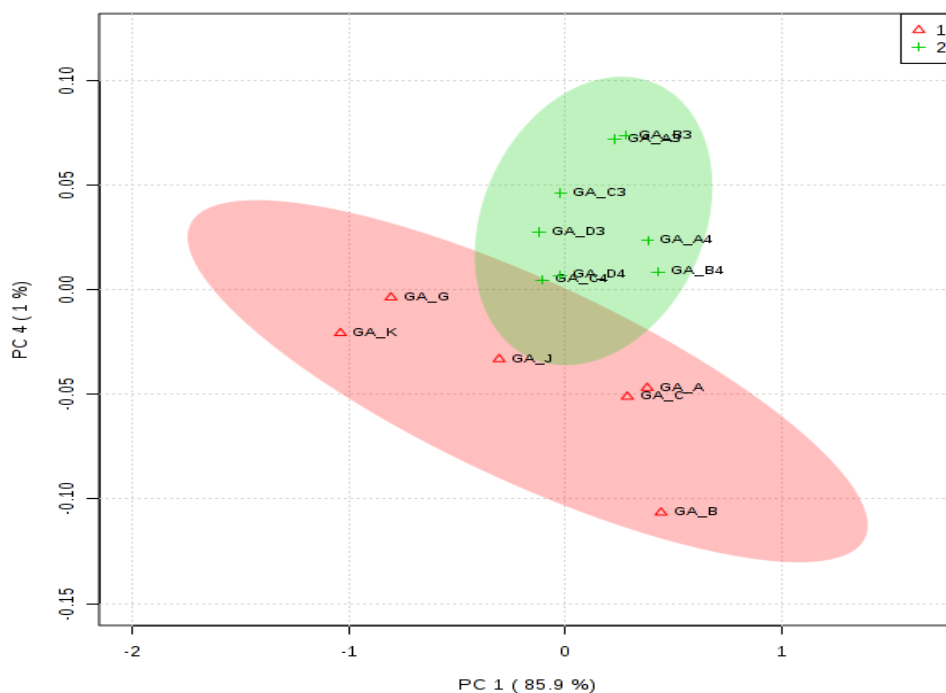
- **Αλεύρι**



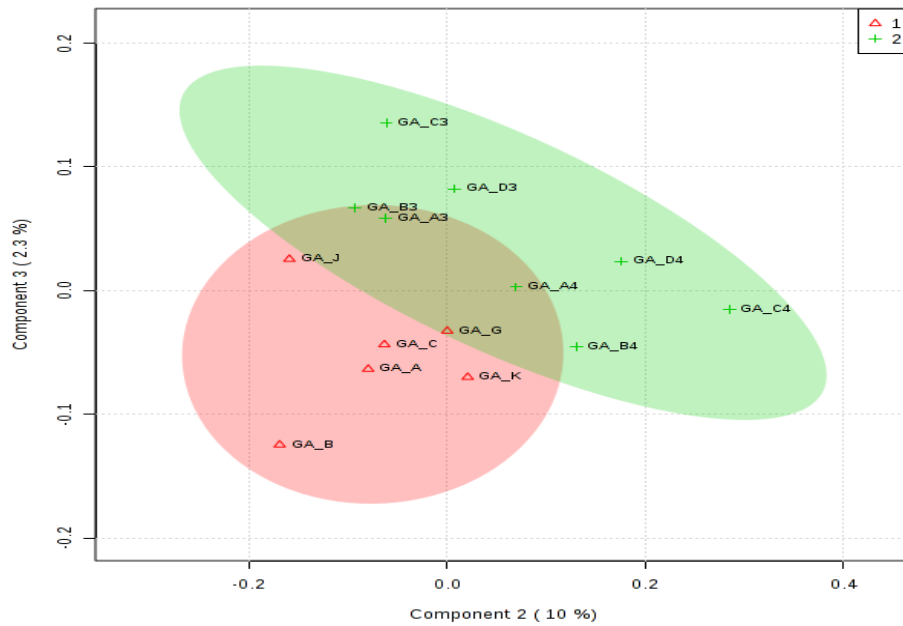
Διάγραμμα 3.1.4: Παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR της βασικής συνταγής κρέμας και των δύο διαφοροποιημένων ως προς το αλεύρι.

Από τα φάσματα των τριών συνταγών στο διάγραμμα 3.1.4 παρατηρούνται διαφορές κυρίως στις κορυφές της βασικής συνταγής και των -10% ,+10% μεταξύ $1520-1580\text{ cm}^{-1}$ και $1020-1070\text{ cm}^{-1}$.

Το συστατικό που τροποποιήθηκε με +10% και -10% επί της βασικής του ποσότητας ήταν το αλεύρι που αποτελεί και το μεγαλύτερο σε ποσότητα συστατικό της συνταγής. Μετά από επεξεργασία των κρεμών στο FT-IR παρουσιάστηκαν τα εξής αποτελέσματα με τη βοήθεια της πολυμεταβλητής ανάλυσης (Εικόνες 3.1.49-3.1.51). Παρατηρήθηκε ότι κατά την εφαρμογή της PCA (Εικόνα 3.1.34), ο διαχωρισμός μεταξύ της κατηγορίας 1 που αποτελεί τα δεδομένα της βασικής συνταγής και της κατηγορίας 2 που μας δείχνει τις αλλαγμένες συνταγές ως προς το αλεύρι είναι διακριτός. Η PCA ενώ εμφανίζει διακριτά τις δύο κατηγορίες (Εικόνα 3.1.34) για τα δεδομένα του FT-IR δεν έδωσε τα ίδια αποτελέσματα στα δεδομένα από την ανάλυση εικόνας όσο η PLS-DA (Εικόνες 3.1.21 και 3.1.22). Η PLS-DA είναι μία τεχνική που φάνηκε αποτελεσματική στο διαχωρισμό των κατηγοριών 1 και 2 μεταξύ των δεδομένων βασικής συνταγής και συνταγής που είχε υποστεί αλλαγή ως προς το αλεύρι. Η αποτελεσματικότητά της τόσο στο VideometerLab όσο και στο FT-IR ήταν να διαφοροποιήσει τις βασικές συνταγές από τις τροποποιημένες και έτσι να μας ενισχύσει την άποψη ότι είναι μία μέθοδος ικανή να εντοπίσει πως και ακόμα μικρές αλλαγές στη ποσότητα κάποιου συστατικού έχουν αντίκτυπο στο σύνολο της συνταγής.

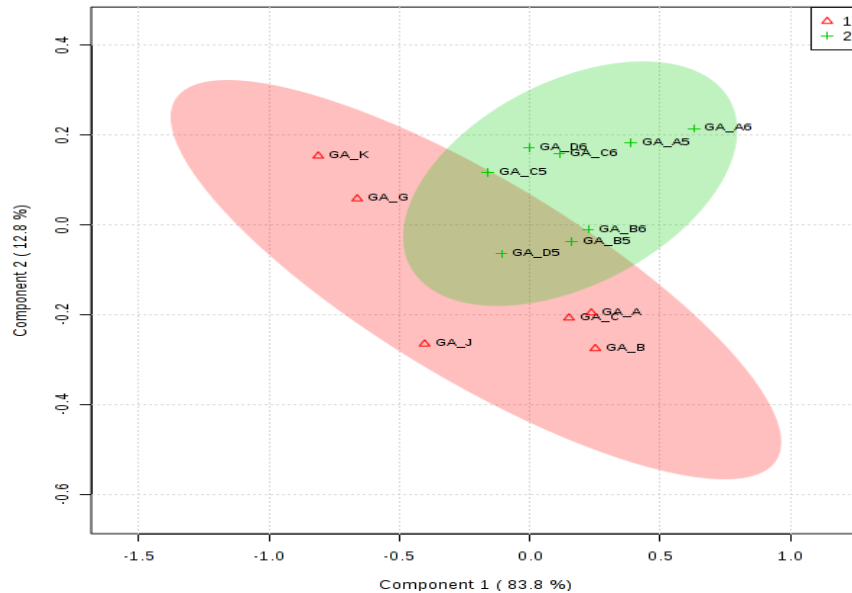


Εικόνα 3.1.34 : Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το αλεύρι).

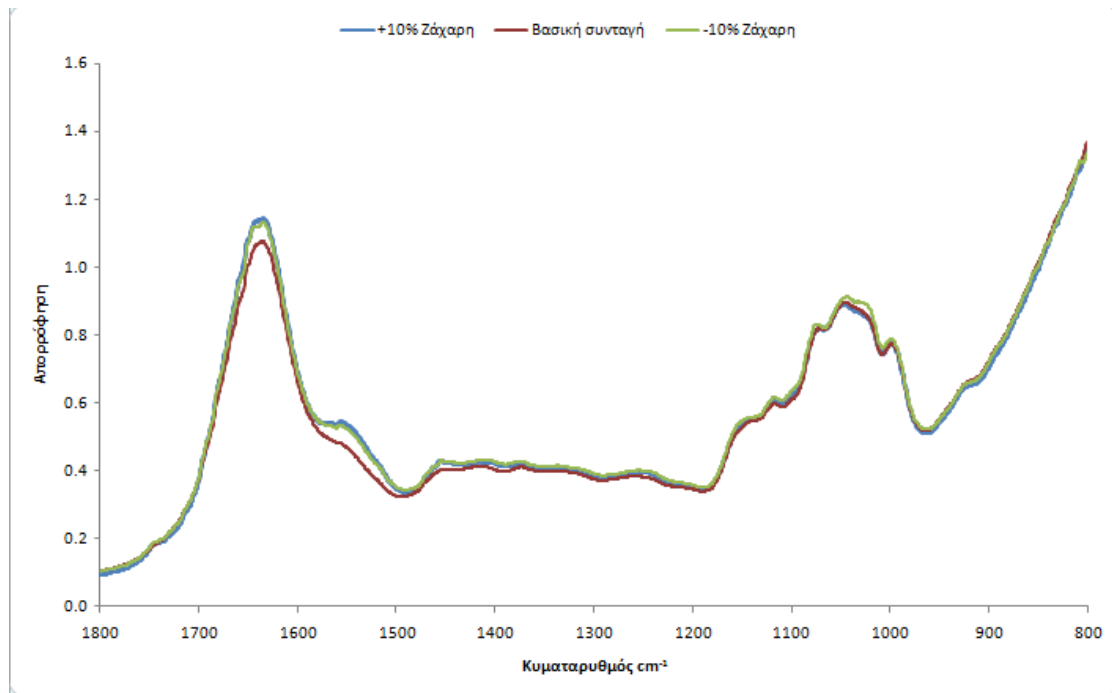


Εικόνα 3.1.35: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το αλεύρι)

- Ζάχαρη



Εικόνα 3.1.36: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τη ζάχαρη)

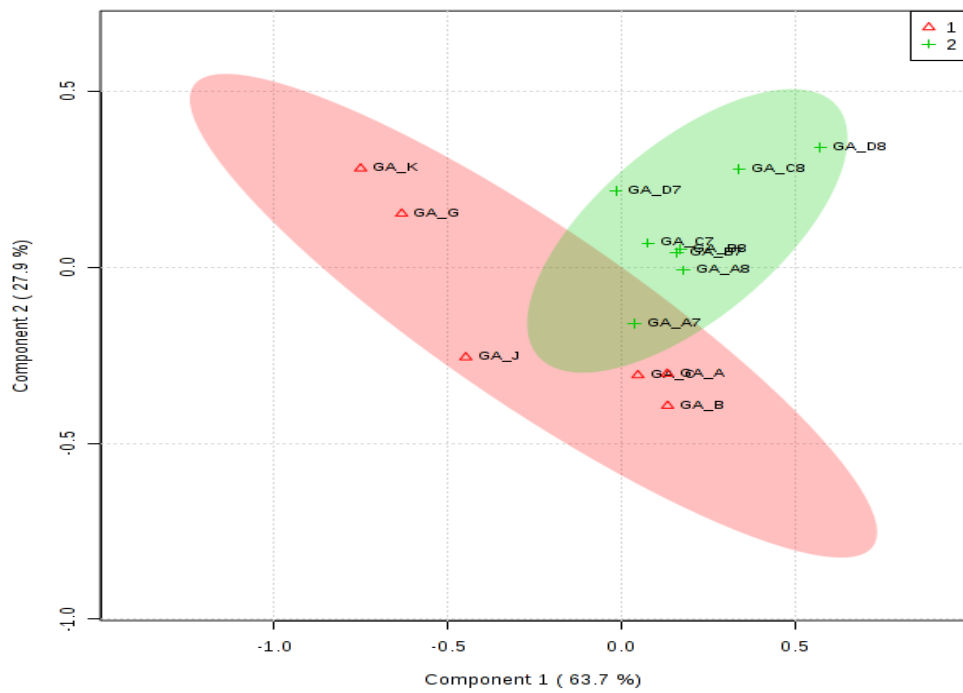


Διάγραμμα 3.1.5 : Παρουσιάζονται τα φάσματα του FT-IR για τη βασική συνταγή κρέμας και για τις τροποποιημένες ως προς τη ζάχαρη.

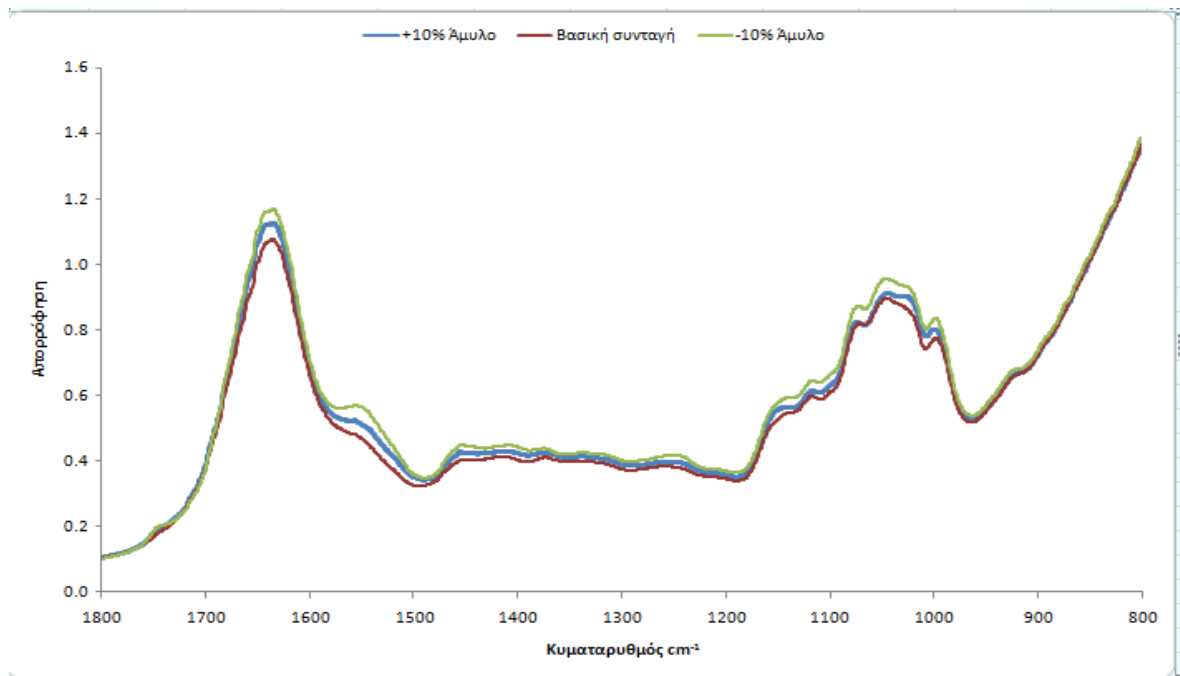
Στο διάγραμμα 3.1.5 οι διαφορές που παρουσιάζονται στις κορυφές μεταξύ των φασμάτων των συνταγών είναι για τις περιοχές $1520-1580\text{ cm}^{-1}$ και $1020-1080\text{ cm}^{-1}$.

- **Άμυλο**

Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της PLS-DA ήταν αποτελεσματικά στο να διαχωρίσουν από τη βασική συνταγή εκείνες που είχαν υποστεί τις μεταβολές στη ποσότητα του αμύλου (Εικόνα 3.1.37).



Εικόνα 3.1.37: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άμυλο)

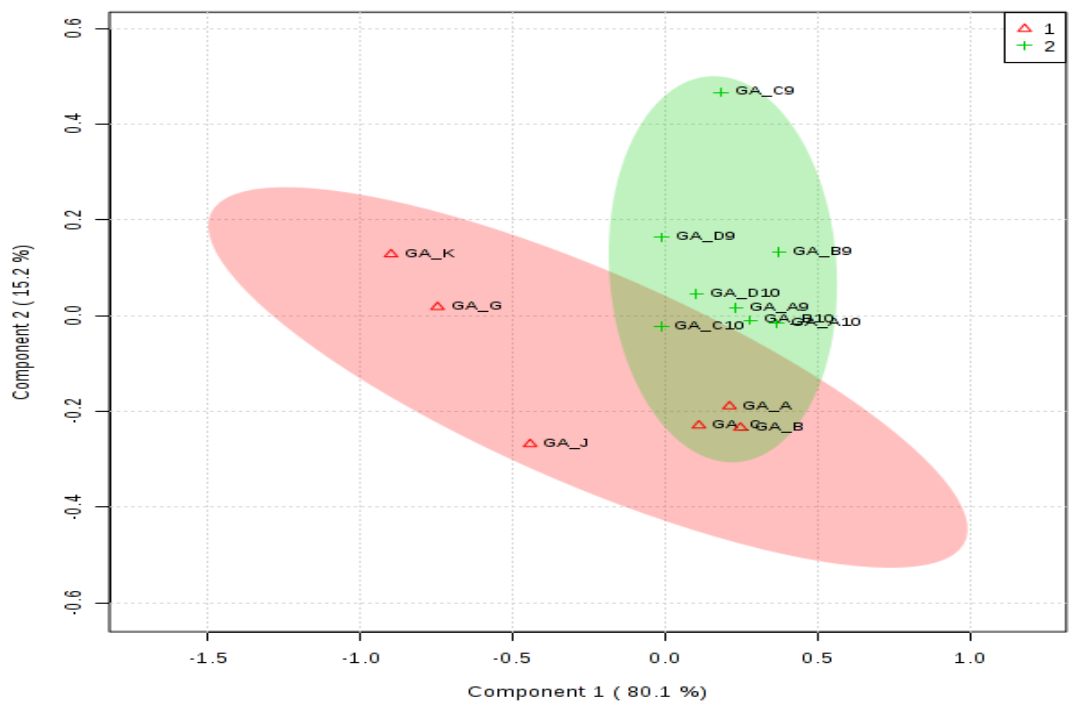


Διάγραμμα 3.1.6: Παρουσιάζονται τα φάσματα για τη βασική συνταγή και τις τροποποιημένες συνταγές ως προς το άμυλο όπως συλλέχθηκαν από το FT-IR.

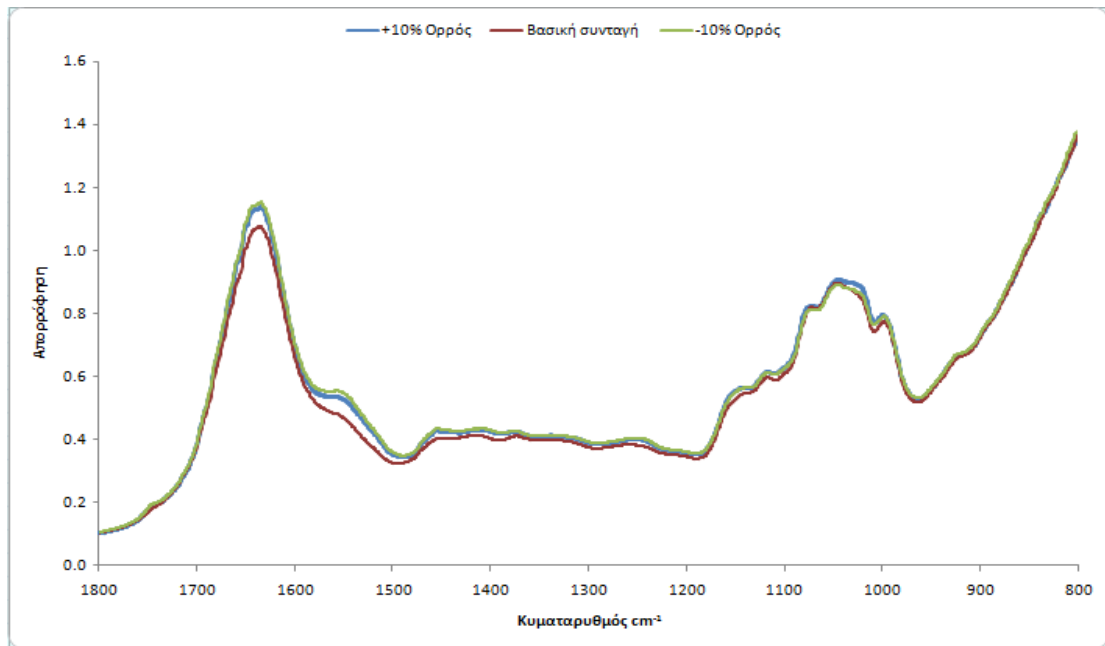
Στη περίπτωση της αλλαγής στο άμυλο σε ποσοστό +10% ή -10% παρατηρούνται αλλαγές στα φάσματα των συνταγών κρέμας σε σχέση με τη βασική συνταγή. Η κύρια διαφορά εντοπίζεται στις κορυφές μεταξύ $1530-1580\text{ cm}^{-1}$ και $1000-1090\text{ cm}^{-1}$. Ειδικότερα η συνταγή του -10% στο άμυλο, εμφανίζει πιο έντονη κορυφή σε αυτά τα cm^{-1} σε σχέση και με τις άλλες δύο συνταγές (+10% στο άμυλο και της βασικής). Συνδυάζοντας αυτές τις διαφοροποιήσεις στα φάσματα με τα αποτελέσματα της πολυμεταβλητής ανάλυσης καταλαβαίνουμε ότι μία μεταβολή στη ποσότητα του αμύλου μπορεί να ανιχνευτεί με το FT-IR.

- **Ορρός γάλατος**

Η μέθοδος PLS-DA έδειξε αποτελεσματικότητα στο να ομαδοποιήσει τις κατηγορίες και στην περίπτωση τροποποιήσεων στις ποσότητες στον ορρό γάλακτος (Εικόνα 3.1.38) αλλά και στο άπαχο γάλα (Εικόνα 3.1.39), συστατικά τα οποία βρίσκονται σε σχετικά μικρές ποσότητες, σε σχέση με αυτές του αλεύρου ή του πλήρους γάλακτος για παράδειγμα.



Εικόνα 3.1.38: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τον ορρό)



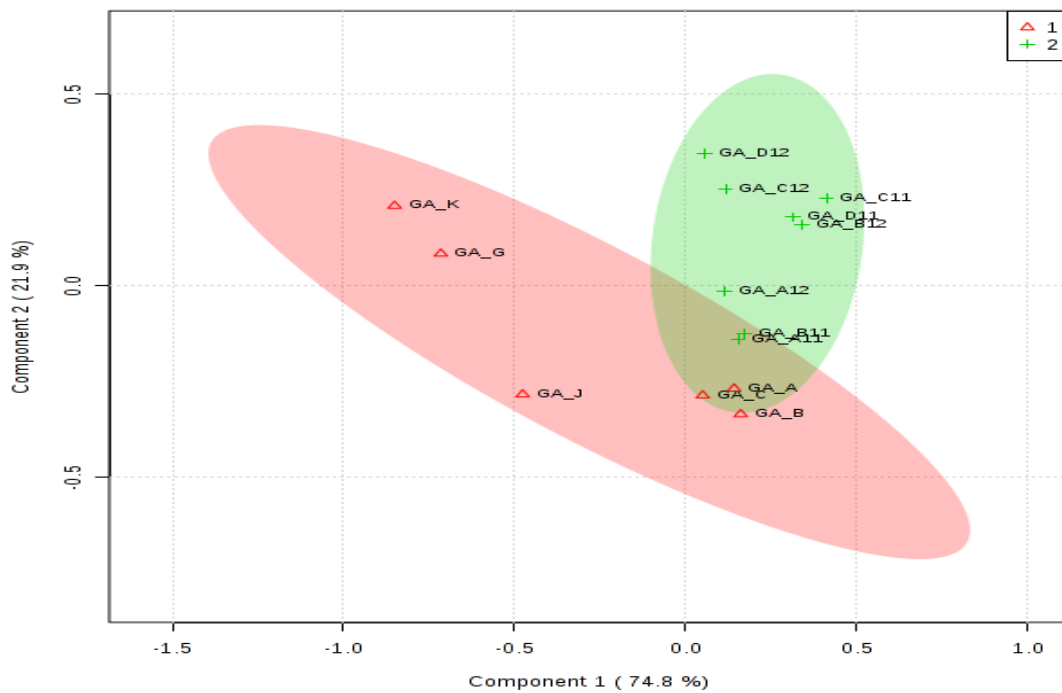
Διάγραμμα 3.1.7 : Παρουσιάζονται τα φάσματα του FT-IR για τη βασική συνταγή και τις συνταγές που έχουν τροποποιηθεί ως προς τον ορρό

Από το διάγραμμα 3.1.6 παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στην περιοχή 1530-1580 cm^{-1} στα 1630-1670 cm^{-1} .

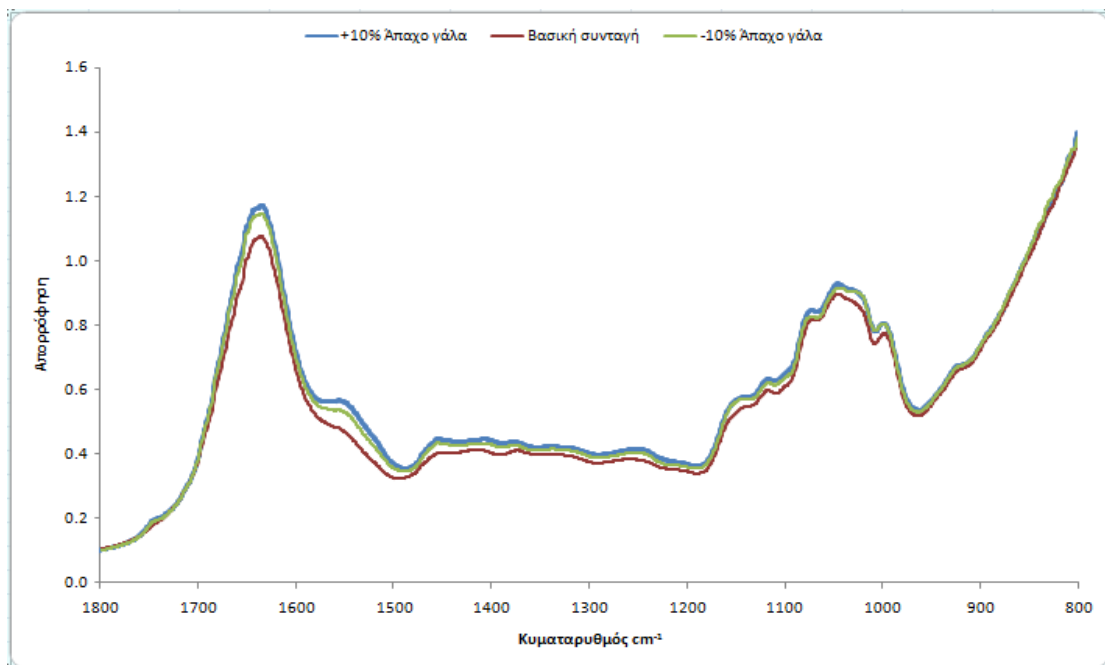
- **Άπαχο γάλα**

Η μέθοδος PLS-DA έδειξε και αυτή τη φορά αποτελεσματικότητα στο να ομαδοποιήσει τις κατηγορίες δηλαδή να παρουσιάσει πως μία αλλαγή στο άπαχο γάλα της τάξης του +10% ή -10% μπορεί να ανιχνευτεί ακόμα και για συστατικά όπως είναι αυτά του άπαχου γάλατος και του ορρού που στη βασική συνταγή οι ενδεικνυόμενες ποσότητές του είναι σχετικά μικρές σε σχέση με αυτές του αλεύρου ή του πλήρες γάλατος για παράδειγμα.

Ίσως ακριβώς το γεγονός ότι στη βασική συνταγή η ποσότητά τους (άπαχο γάλα, ορρός) είναι μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα συστατικά η ενισχυμένη παρουσία (+10%) ή απουσία (-10%) να δημιουργεί αυτή τη διαφοροποίηση από τη βασική συνταγή.



Εικόνα 3.1.39: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άπαχο γάλα)



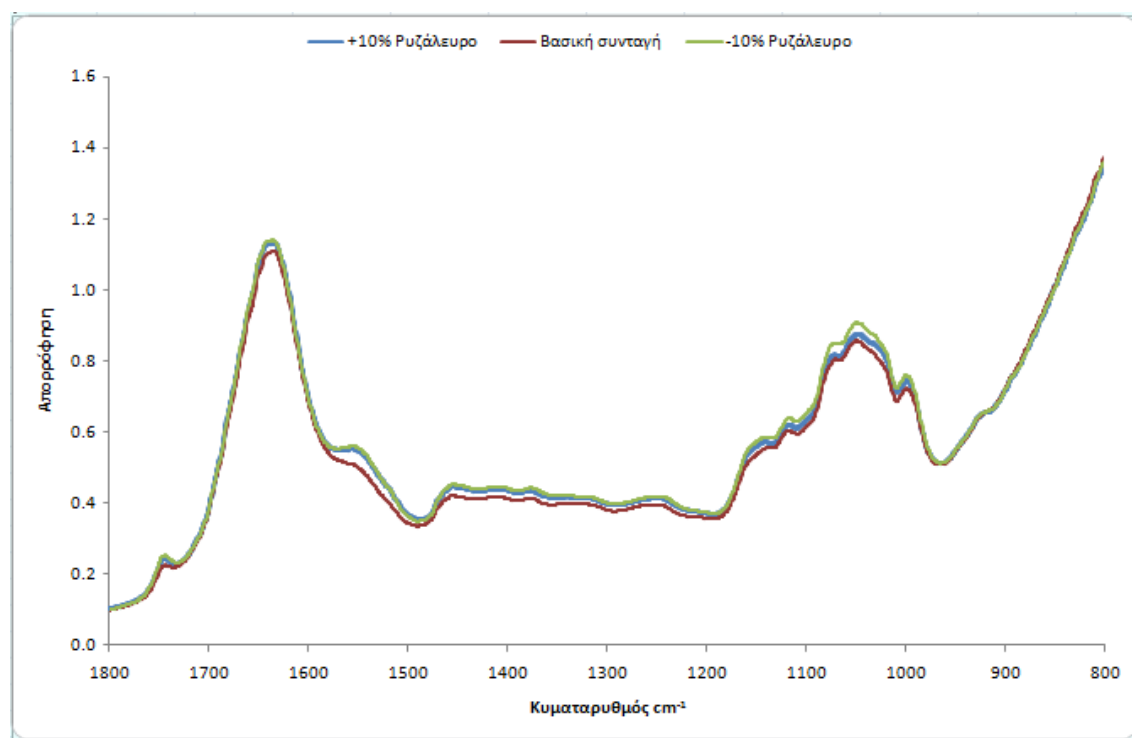
Διάγραμμα 3.1.8 : Παρουσιάζει τα φάσματα FT-IR για τις συνταγές κρέμας που έχουν τροποποιηθεί ως προς το άπαχο γάλα και της βασικής συνταγής.

Στο διάγραμμα 3.1.8 παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στην περιοχή $1530-1580\text{ cm}^{-1}$ στα $1630-1670\text{ cm}^{-1}$ αλλά και στα $1140-1170\text{ cm}^{-1}$.

Γαλατούχο Ρυζάλευρο (συνταγές κρέμας)

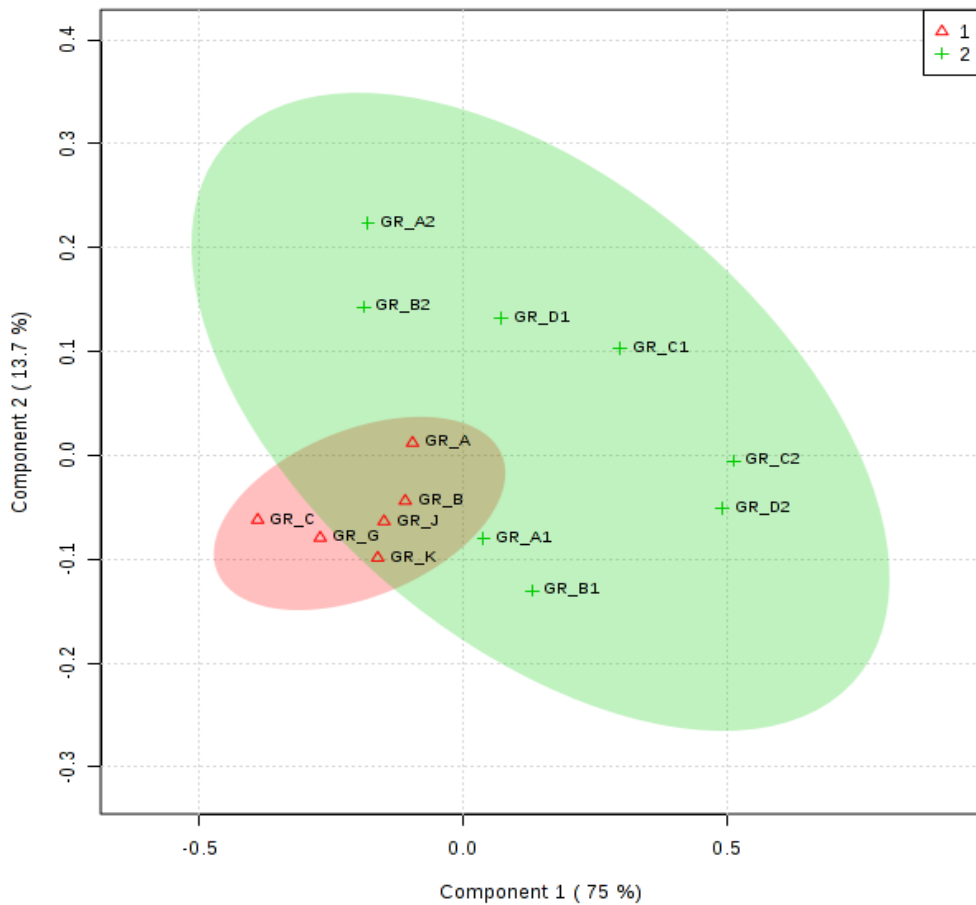
Ομοίως με παραπάνω, τα ληφθέντα δεδομένα χωρίστηκαν αρχικά σε δύο κατηγορίες: σε αυτά που αφορούν στη βασική συνταγή του γαλατούχου ρυζάλευρου κρέμας (κατηγορία 1) και σε αυτά που αφορούν σε τροποποιήσεις σε κάποιο συστατικό (κατηγορία 2). Με εισαγωγή των δεδομένων στο σύστημα πολυμεταβλητής ανάλυσης και εφαρμογή της τεχνικής PLS-DA λάβαμε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις Εικόνες παρακάτω.

- **Ρυζάλευρο**



Διάγραμμα 3.1.9 : Παρουσιάζει τα φάσματα FT-IR για τις συνταγές κρέμας που έχουν τροποποιηθεί ως προς το ρυζάλευρο και της βασικής συνταγής.

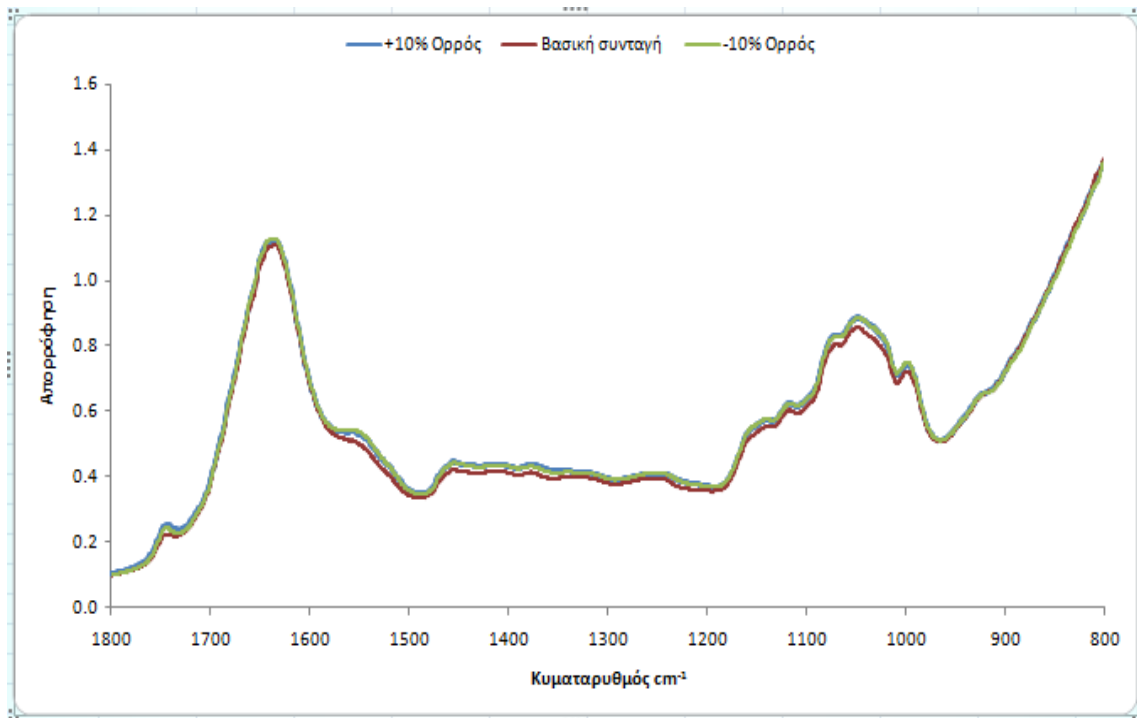
Στο διάγραμμα εντοπίζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των συνταγών στις περιοχές κυματαριθμών μεταξύ $1520-1570\text{ cm}^{-1}$ και στα $1040-1070\text{ cm}^{-1}$. Παρατηρείται ότι οι συνταγές του -10% και της βασικής συνταγής παρουσιάζουν παρομοία συμπεριφορά απορρόφησης ενώ η συνταγή του +10% παρουσιάζει διαφορετικές κορυφές στα ανώτερα αναφερθέντα μήκη κύματος.



Εικόνα 3.1.40: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το ρυζάλευρο)

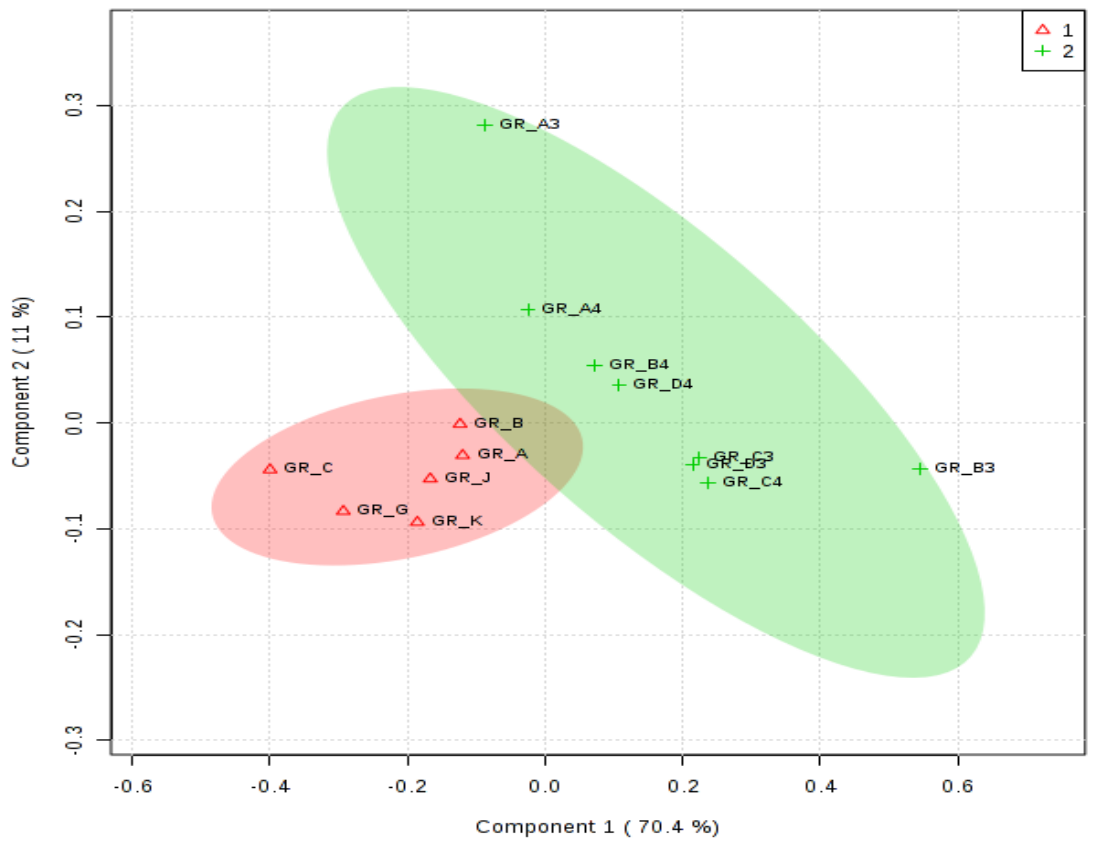
Από τα αποτελέσματα της διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) παρατηρήθηκε ότι οι συνταγές της βασικής συνταγής ομαδοποιούνται σε σχέση με τις διαφοροποιημένες. Ωστόσο είναι φανερό ότι τα όρια εμπιστοσύνης για τις τροποποιημένες συνταγές είναι τέτοια που δεν μπορούν να εξασφαλίσουν ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα.

- Ορρός γάλατος



Διάγραμμα 3.1.10 : Παρουσιάζει τα φάσματα FT-IR για τις συνταγές κρέμας που έχουν τροποποιηθεί ως προς τον ορρό και της βασικής συνταγής.

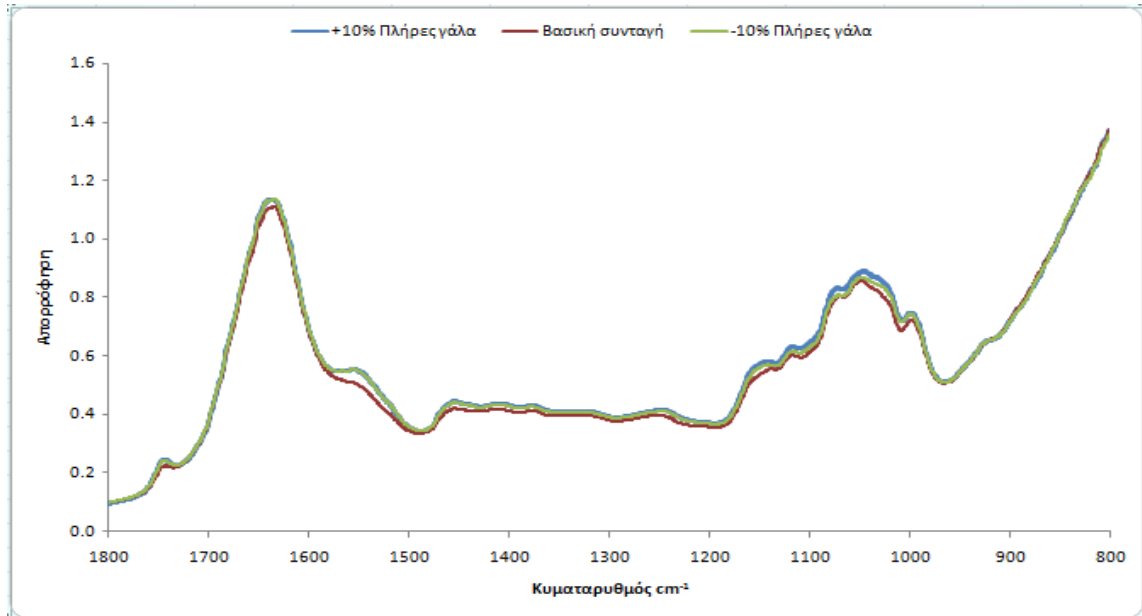
Στο διάγραμμα εντοπίζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των συνταγών στις περιοχές κυματαριθμών μεταξύ $1520-1570\text{ cm}^{-1}$ και στα $1040-1070\text{ cm}^{-1}$. Παρατηρείται ότι οι συνταγές του -10% και της βασικής συνταγής παρουσιάζουν παρομοία συμπεριφορά απορρόφησης ενώ η συνταγή του +10% παρουσιάζει διαφορετικές κορυφές στα ανώτερα αναφερθέντα μήκη κύματος.



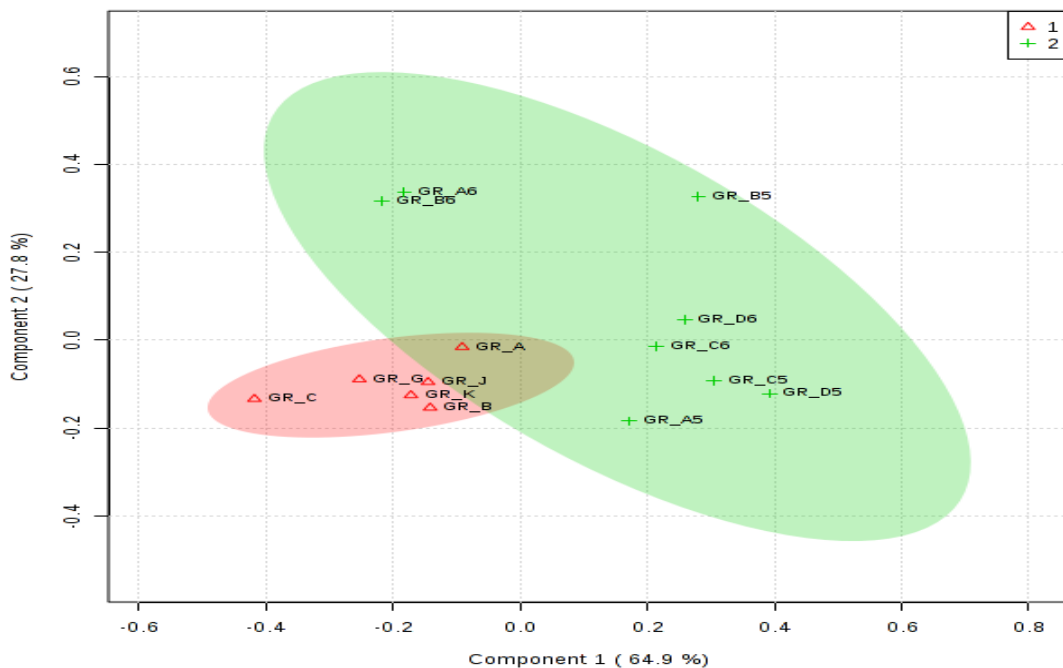
Εικόνα 3.1.41: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τον ορό)

Από τα αποτελέσματα της διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) παρατηρήθηκε ότι οι συνταγές της βασικής συνταγής ομαδοποιούνται σε σχέση με τις διαφοροποιημένες. Στη περίπτωση του γαλατούχου ρυζάλευρου που τα δείγματα της βασικής συνταγής είναι ισάριθμα σχεδόν με τα δείγματα των διαφοροποιημένων συνταγών θα μπορούσε να αναφερθεί με μεγαλύτερη ασφάλεια η αξιοπιστία του αποτελέσματος.

- Πλήρες γάλα



Διάγραμμα 3.1.10 : Παρουσιάζει τα φάσματα FT-IR για τις συνταγές κρέμας που έχουν τροποποιηθεί ως προς το πλήρες γάλα και της βασικής συνταγής.

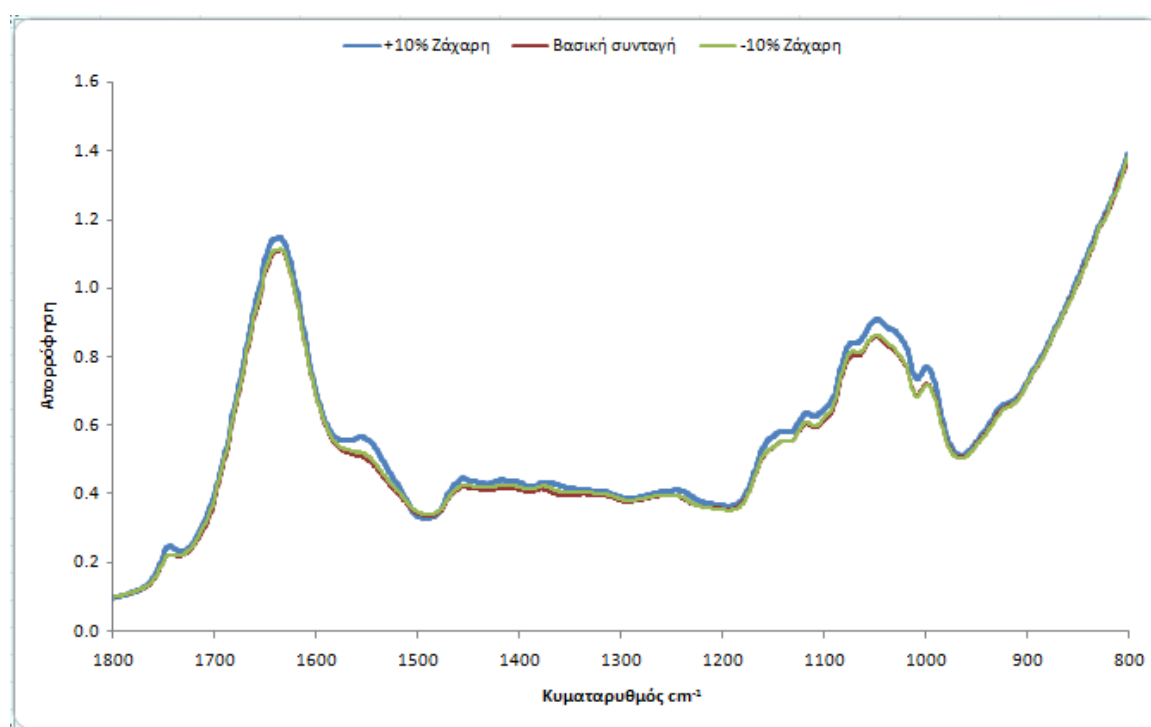


Εικόνα 3.1.42: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το πλήρες γάλα)

Στο διάγραμμα 3.1.10 εντοπίζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των συνταγών στις περιοχές κυματαριθμών μεταξύ $1520-1570\text{ cm}^{-1}$, στα $1130-1170\text{ cm}^{-1}$ και $1020-1050\text{ cm}^{-1}$. Παρατηρείται ότι οι συνταγές του -10% και της βασικής συνταγής παρουσιάζουν παρομοία συμπεριφορά απορρόφησης ενώ η συνταγή του +10% παρουσιάζει διαφορετικές κορυφές στα ανώτερα αναφερθέντα μήκη κύματος.

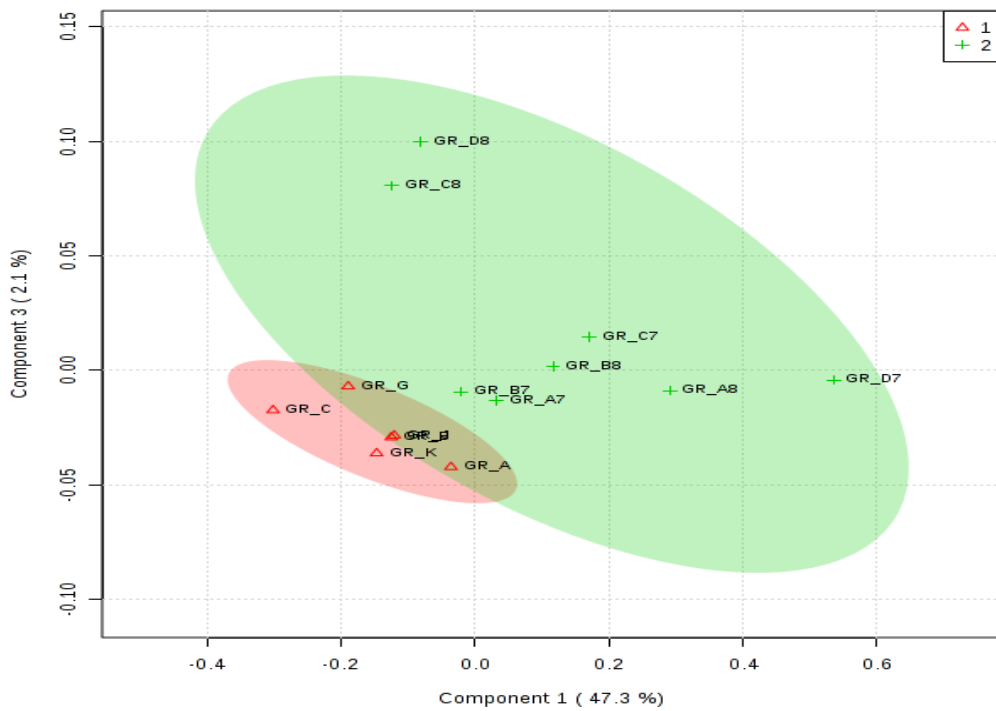
Από τα αποτελέσματα της διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) παρατηρήθηκε ότι οι συνταγές της βασικής συνταγής ομαδοποιούνται σε σχέση με τις διαφοροποιημένες στο πλήρες γάλα. Στη περίπτωση του γαλατούχου ρυζάλευρου που τα δείγματα της βασικής συνταγής είναι ισάριθμα σχεδόν με τα δείγματα των διαφοροποιημένων συνταγών θα μπορούσε να αναφερθεί με μεγαλύτερη ασφάλεια η αξιοπιστία του αποτελέσματος.

- **Ζάχαρη**



Διάγραμμα 3.1.11 : Παρουσιάζει τα φάσματα FT-IR για τις συνταγές κρέμας που έχουν τροποποιηθεί ως προς τη ζάχαρη και της βασικής συνταγής.

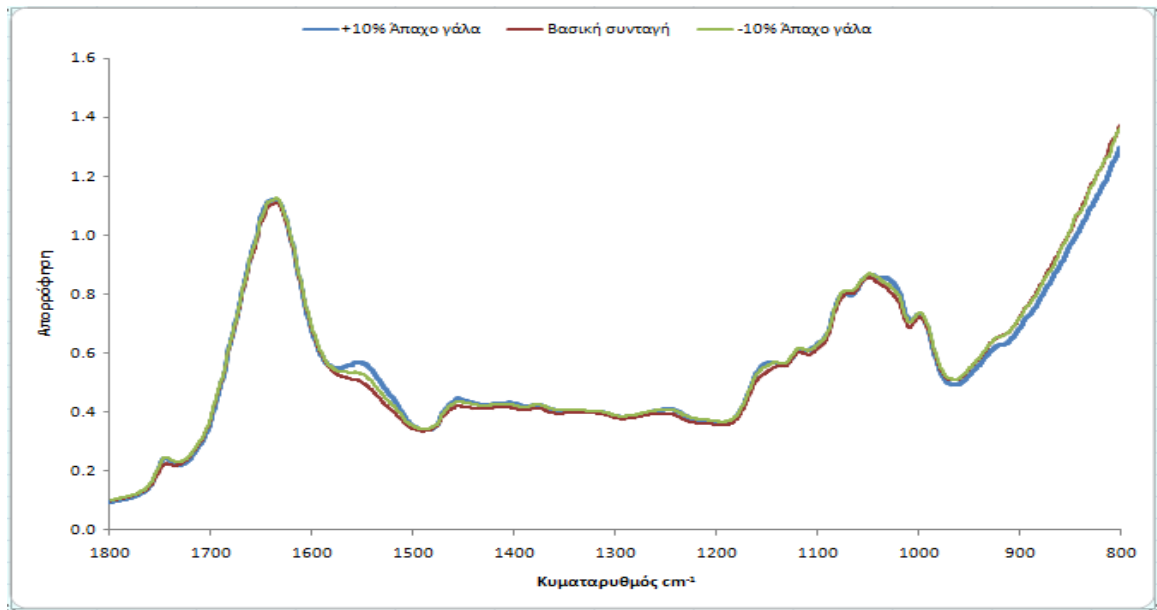
Χαρακτηριστικά πιο έντονες κορυφές παρατηρούνται στα δείγματα της συνταγής του +10% ζάχαρης ειδικότερα στις περιοχές μηκών κύματος $1530-1580\text{ cm}^{-1}$ αλλά και στη περιοχή $1010-1050\text{ cm}^{-1}$.



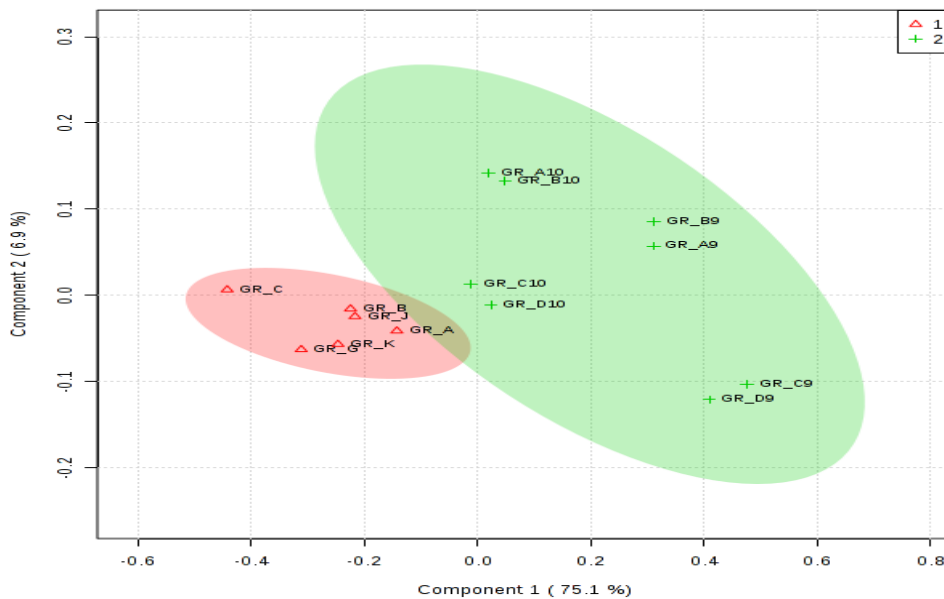
Εικόνα 3.1.43: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς τη ζάχαρη)

Από τα αποτελέσματα της διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) παρατηρήθηκε ότι οι συνταγές της βασικής συνταγής ομαδοποιούνται σε σχέση με τις διαφοροποιημένες στη ζάχαρη (Εικόνα 3.1.43). Στη περίπτωση του γαλατούχου ρυζάλευρου που τα δείγματα της βασικής συνταγής είναι ισάριθμα σχεδόν με τα δείγματα των διαφοροποιημένων συνταγών θα μπορούσε να αναφερθεί με μεγαλύτερη ασφάλεια η αξιοπιστία του αποτελέσματος.

- Άπαχο γάλα



Διάγραμμα 3.1.12 : Παρουσιάζει τα φάσματα FT-IR για τις συνταγές κρέμας που έχουν τροποποιηθεί ως προς το άπαχο γάλα και της βασικής συνταγής.



Εικόνα 3.1.44: Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα βασικής συνταγής) και 2 (δείγματα τροποποιημένων συνταγών ως προς το άπαχο γάλα)

Από τα αποτελέσματα της διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) παρατηρήθηκε ότι οι συνταγές της βασικής συνταγής ομαδοποιούνται σε σχέση με τις διαφοροποιημένες στο άπαχο γάλα (Εικόνα 3.1.44). Στη περίπτωση του γαλατούχου ρυζάλευρου που τα δείγματα της βασικής συνταγής είναι ισάριθμα σχεδόν με τα δείγματα των διαφοροποιημένων συνταγών θα μπορούσε να αναφερθεί με μεγαλύτερη ασφάλεια η αξιοπιστία του αποτελέσματος. Στο διάγραμμα 3.1.12 εντοπίζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των συνταγών στις περιοχές κυματαριθμών μεταξύ $1520-1570\text{ cm}^{-1}$, και $1020-1050\text{ cm}^{-1}$.

3.2 Εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας τελικών προϊόντων κρεμών με τη χρήση συμβατικών και ταχέων, μη-επεμβατικών μεθόδων

A. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Δείγματα κρεμών του εμπορίου αναλύθηκαν μικροβιολογικά για να υπολογιστεί το ποσοστό αλλοίωσης. Η ανάλυση για μία πρώτη εκτίμηση έγινε με την παραδοσιακή μικροβιολογική μέθοδο υπολογισμού των $\log\text{ cfu/g}$ στα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν. Τα δείγματα που αγοράστηκαν από διάφορα εμπορικά καταστήματα που προμηθεύουν τα επιδόρπια κρεμών ήταν συνολικά 66, και προέρχονταν από τέσσερις διαφορετικές εταιρίες. Από αυτές τις τέσσερις διαφορετικές εταιρίες αναλύθηκαν δείγματα διαφορετικών παρτίδων.

Τα χαρακτηριστικά των κρεμών φαίνονται στο Πίνακα 3.2.1, όπου αναγράφονται οι εταιρίες παραγωγής, η ημέρα ανάλυσης του προϊόντος σε σχέση με την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης (δηλαδή ποια μέρα πριν την ημερομηνία λήξης έγινε η ανάλυση) στη συσκευασία της κάθε κρέμας, και η παρτίδα από την κάθε εταιρία.

Πίνακας 3.2.1

Τα δείγματα κρεμών του εμπορίου που αναλύθηκαν, η εταιρία παραγωγής τους, η παρτίδα παραγωγής (εντός της κάθε εταιρίας) και η ημέρα ανάλυσής τους (πριν από την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης).

Δείγμα κρέμας (α/α)	Εταιρία	Ημέρα ανάλυσης	Παρτίδα
1	A	7	1
2	A	7	1
3	A	21	2
4	A	21	2
5	A	19	3
6	A	19	3
7	A	29	4
8	A	29	4
13	A	27	4
14	A	27	4
17	A	25	5

18	A	25	5
23	A	20	6
24	A	20	6
25	A	20	6
26	A	19	4
27	A	19	6
28	A	19	4
31	A	16	7
32	A	16	7
33	A	16	8
34	A	23	8
35	A	20	9
36	A	20	9
37	A	20	9
38	A	20	9
45	A	24	3
46	A	24	3
49	A	21	3
50	A	21	3
51	A	21	3
52	A	21	3
53	A	19	3
54	A	19	3
55	A	19	10
56	A	19	10
57	A	19	3
58	A	19	3
61	A	17	11
62	A	17	11
9	B	1	1
10	B	1	1
19	B	10	1
20	B	12	1
21	B	13	1
22	B	13	1
59	B	5	1
60	B	5	1
63	B	9	2
64	B	9	2
65	B	9	1
66	B	9	1
15	Γ	7	1
16	Γ	7	1
29	Γ	5	1
30	Γ	5	1
41	Γ	6	1
42	Γ	9	1
43	Γ	10	1
44	Γ	10	1
47	Γ	4	1
48	Γ	4	1
11	Δ	14	1

12	Δ	14	1
39	Δ	7	1
40	Δ	7	1

Τα 66 δείγματα κρεμών αναλύθηκαν μικροβιολογικά για υπολογισμό του μικροβιακού φορτίου, και ειδικότερα του πληθυσμού βακτηρίων του γένους *Bacillus* (και *B. cereus*), καθώς και της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.2.

Πίνακας 3.2.2

Πληθυσμοί (log cfu/g) *Bacillus* spp. και ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (ΟΜΧ).

Δείγμα (α/α)	Log cfu/g	
	<i>Bacillus</i> spp.	ΟΜΧ
1	<2.00	2.95
2	<2.00	<2.00
3	<2.00	2.00
4	<2.00	<2.00
5	<2.00	<2.00
6	<2.00	<2.00
7	<2.00	<2.00
8	<2.00	2.00
13	<2.00	<2.00
14	<2.00	<2.00
17	<2.00	<2.00
18	<2.00	<2.00
23	<2.00	<2.00
24	<2.00	<2.00
25	<2.00	<2.00
26	<2.00	<2.00
27	<2.00	<2.00
28	<2.00	<2.00
31	<2.00	<2.00
32	<2.00	<2.00
33	<2.00	2.30
34	<2.00	<2.00
35	<2.00	<2.00
36	2.00	<2.00
37	<2.00	2.30
38	<2.00	<2.00
45	<2.00	<2.00
46	<2.00	<2.00
49	<2.00	<2.00
50	<2.00	<2.00
51	<2.00	<2.00
52	<2.00	2.69
53	<2.00	<2.00
54	<2.00	<2.00
55	<2.00	<2.00
56	<2.00	<2.00
57	<2.00	<2.00

58	<2.00	<2.00
61	<2.00	2.30
62	<2.00	<2.00
9	<2.00	<2.00
10	<2.00	7.00
19	<2.00	<2.00
20	<2.00	2.00
21	<2.00	<2.00
22	<2.00	<2.00
59	<2.00	<2.00
60	<2.00	2.30
63	<2.00	5.38
64	<2.00	5.14
65	<2.00	<2.00
66	<2.00	<2.00
15	<2.00	<2.00
16	<2.00	<2.00
29	<2.00	3.63
30	<2.00	4.40
41	<2.00	<2.00
42	<2.00	<2.00
43	2.69	2.47
44	2.60	2.30
47	<2.00	6.89
48	<2.00	4.17
11	<2.00	2.00
12	<2.00	2.00
39	<2.00	<2.00
40	<2.00	<2.00

Από την ανάλυση που διεξήχθη στα δείγματα κρεμών φαίνεται ότι τα προϊόντα αυτά είναι αρκετά σταθερά μικροβιολογικά. Πιο συγκεκριμένα, από τα 66 δείγματα των διαφορετικών εταιριών τα οποία αναλύθηκαν συνολικά, μόνο τα 15 (1, 10, 33, 37, 52, 61, 60, 63, 64, 29, 30, 43, 44, 47, 48) παρουσίασαν ολικό μικροβιακό φορτίο πάνω από το όριο ανίχνευσης της εφαρμοζόμενης μικροβιολογικής μεθόδου (2 log cfu/g). Με βάση τα αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν στο χρησιμοποιούμενο επιλεκτικό υπόστρωμα (*Bacillus cereus* selective agar), μόνο 2 δείγματα κρεμών (43, 44) προσδιορίστηκαν να έχουν πληθυσμούς *Bacillus* spp. >2.00 log cfu/g. Επίσης, οι αναπτυσσόμενες βακτηριακές αποικίες (υπο-κίτρινου χρώματος χωρίς σχηματισμό ιζήματος) δεν είχαν τυπική εμφάνιση αποικιών *B. cereus*.

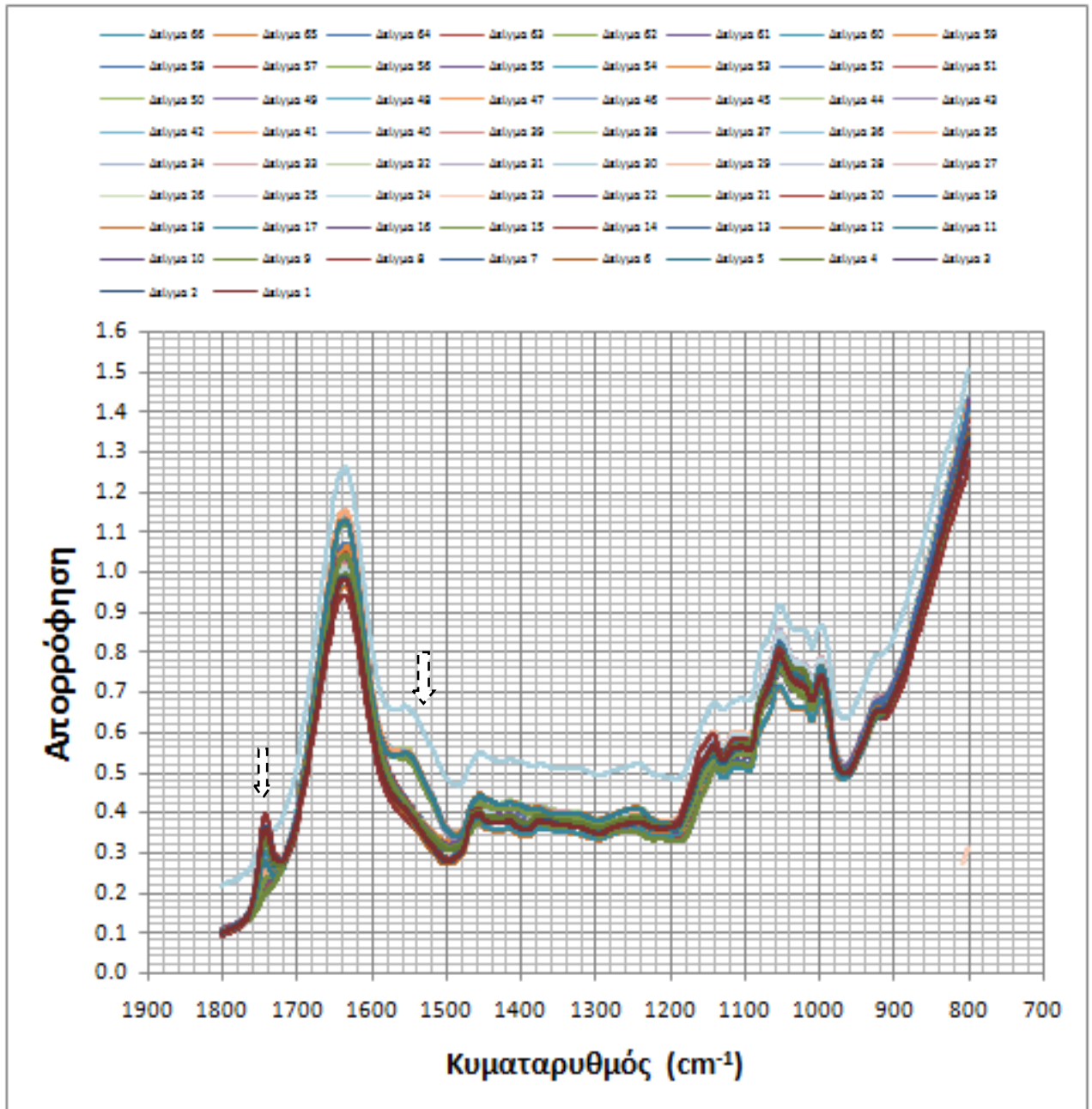
Αναλύοντας τα ληφθέντα μικροβιολογικά δεδομένα ανά εταιρία, παρατηρούμε ότι μόνο 5 από τα συνολικά 40 αναλυθέντα δείγματα (12.5%) της εταιρίας Α εμφάνισαν ανιχνεύσιμους και σε χαμηλά επίπεδα μικροβιακούς πληθυσμούς (ολική μεσίφιλη χλωρίδα), οι οποίοι κυμάνθηκαν από 2.30 έως 2.95 log cfu/g. Περνώντας, αντίθετα, στην εταιρία Β, παρατηρούμε ένα υψηλότερο ποσοστό δειγμάτων με ανιχνεύσιμα επίπεδα ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (4/12, 33.3%), τα οποία κυμάνθηκαν από 2.00 έως 7.00 log cfu/g και είχαν μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) ίση με 4.50 (\pm 3.54).

Ομοίως, παρατηρώντας τα αποτελέσματα για την εταιρία Γ, βλέπουμε ότι τα 6 από τα 10 δείγματα κρεμών που αναλύθηκαν (60.0%) παρουσίασαν ανιχνεύσιμους πληθυσμούς ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (από 2.48 έως 6.89 log cfu/g), με μέση τιμή (\pm τυπική απόκλιση) ίση με 3.98 (\pm 1.85) log cfu/g. Επιπλέον, στην εταιρία Γ ανήκαν και τα δύο δείγματα, στο σύνολο των δειγμάτων που αναλύθηκαν από όλες τις εταιρίες) τα οποία και ανιχνεύθηκαν χαμηλοί πληθυσμοί *Bacillus* spp. (αλλά όχι *B. cereus*). Τέλος, αν και τα τέσσερα αναλυθέντα δείγματα της εταιρίας Δ επέδειξαν σημαντική μικροβιολογική σταθερότητα (ολική μεσόφιλη χλωρίδα ≤ 2.00 log cfu/g), ο μικρός αριθμός των δειγμάτων περιορίζει σημαντικά τη δυνατότητα εξαγωγής από μέρους μας ασφαλών συμπερασμάτων σε σχέση με τη μικροβιολογική ποιότητα των κρεμών της συγκεκριμένης εταιρίας παραγωγής.

Συνολικά, με βάση τα παραπάνω μικροβιολογικά δεδομένα, θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι αν και τα επιδόρπια κρεμών φαίνονται να είναι ένα σταθερό από μικροβιολογικής άποψης προϊόν στα πλαίσια της διάρκειας ζωής του και της ενδεικνυόμενης συντήρησής του, η ακριβής μικροβιολογική του ποιότητα ενδέχεται να διαφέρει σημαντικά μεταξύ διαφορετικών εταιριών παραγωγής.

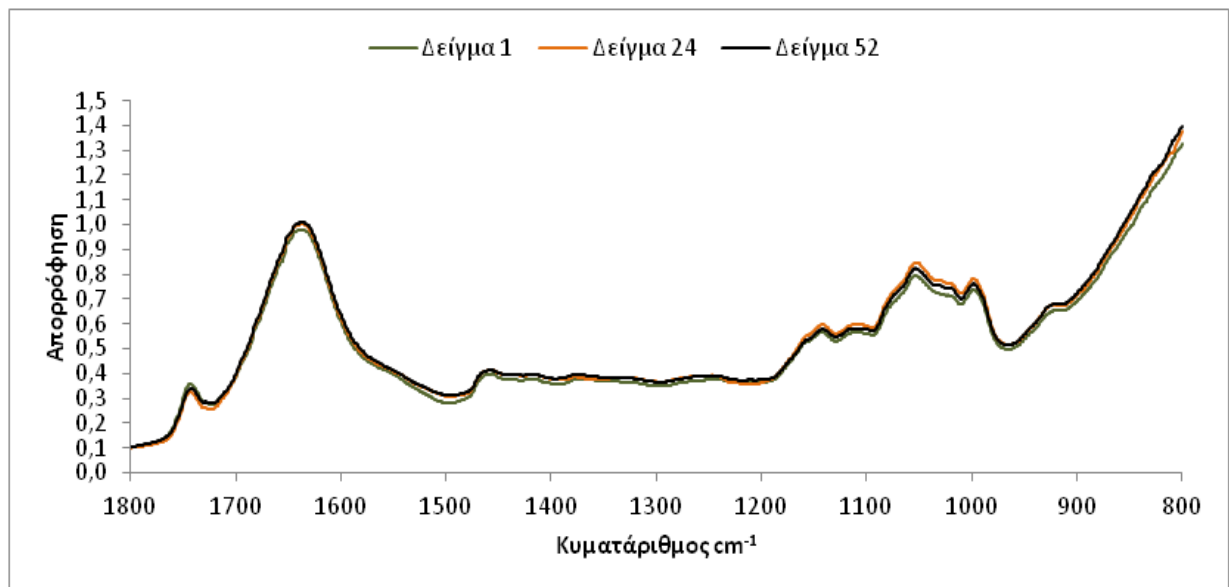
Β. Ανάλυση με την ταχεία, μη-επεμβατική μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR

Τα 66 δείγματα κρεμών εμπορίου αναλύθηκαν στο εργαστήριο με την ταχεία μέθοδο φασματοσκοπίας FT-IR και τα ληφθέντα φάσματα απεικονίζονται στο Διάγραμμα 3.2.1.



Διάγραμμα 3.2.1. Φάσματα FT-IR για 66 δείγματα κρεμών του εμπορίου

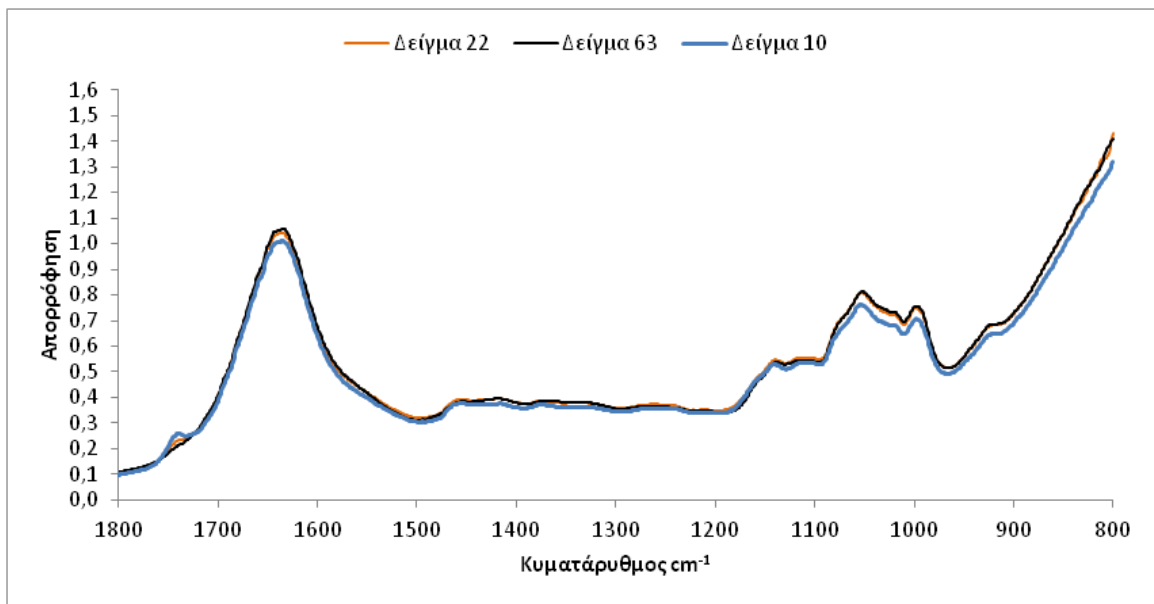
Από το διάγραμμα 3.2.1 παρατηρούνται διαφορές ανάμεσα στην απορρόφηση των διαφορετικών χημικών ομάδων του ίδιου δείγματος καθώς και οι μεταβολές που εμφανίζονται ανάμεσα στα δείγματα της ίδιας εταιρίας αλλά και δειγμάτων διαφορετικών εταιριών μεταξύ τους. Διαφοροποιήσεις στις κορυφές των φασμάτων υποδεικνύουν διαφορές μεταξύ των χημικών ομάδων των διαφορετικών δειγμάτων κρεμών, οι οποίες με τη σειρά τους ενδέχεται να είναι ενδεικτικές είτε μικροβιολογικής αλλοίωσης είτε διαφορών στη σύσταση των δειγμάτων κρέμας που προέρχονται από διαφορετικές εταιρίες παραγωγής. Κάποιες ενδεικτικές διαφοροποιήσεις των κορυφών φαίνονται: στα $1730-1760\text{ cm}^{-1}$ στα $1500-1600\text{ cm}^{-1}$.



Διάγραμμα 3.2.3. Τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων 1, 24 και 52 (Εταιρία Α).

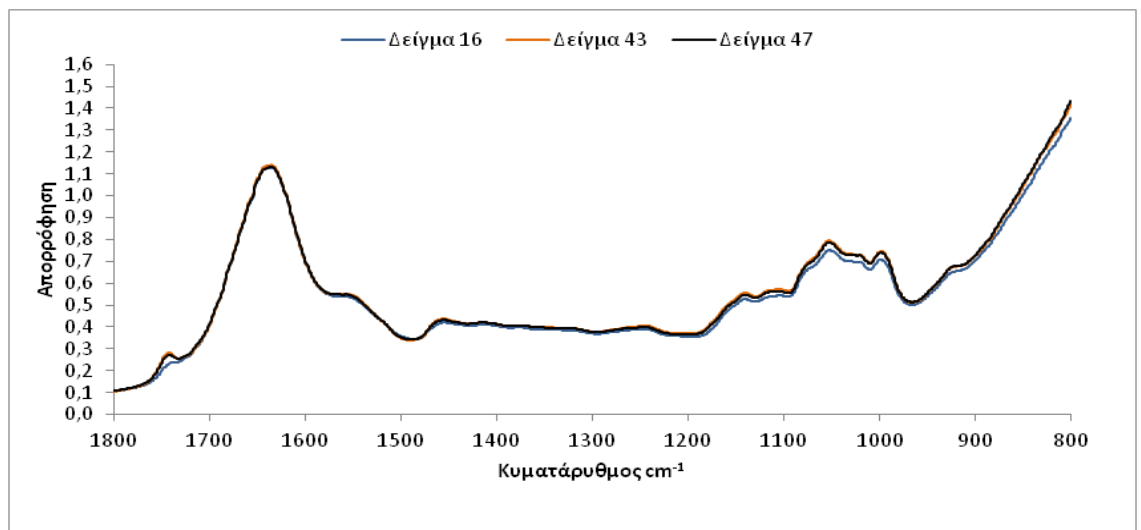
Στο Διάγραμμα 3.2.3 παρουσιάζονται τα φάσματα τριών δειγμάτων κρεμών από την Εταιρία Α. Το Δείγμα 24 δεν είχε ανιχνεύσιμα επίπεδα μικροοργανισμών ($<2.00\text{ log cfu/g}$), ενώ τα δείγματα 1 και 52 είχαν μικροβιακούς πληθυσμούς 2.95 και 2.70 log cfu/g , αντίστοιχα (Πίνακας 3.2.2). Παρατηρείται ότι η ομοιότητα των ληφθέντων φασμάτων των τριών αυτών δειγμάτων (Διάγραμμα 3.2.3) είναι σε συμφωνία και με την παρόμοια μικροβιολογική τους κατάσταση.

Στο Διάγραμμα 3.2.4 φαίνονται τα φάσματα τριών επιλεγμένων δειγμάτων από την Εταιρία Β: του δείγματος 10 με υψηλό μικροβιακό φορτίο (7.00 log cfu/g), του δείγματος 22 το οποίο δεν είχε ανιχνεύσιμα επίπεδα μικροοργανισμών ($<2.00\text{ log cfu/g}$), και του δείγματος 63 με ενδιάμεσα επίπεδα μικροοργανισμών (5.38 log cfu/g). Σε αντίθεση με το προηγούμενο διάγραμμα της Εταιρίας Α, εδώ παρατηρούμε διαφορές στις κορυφές των επιλεγμένων φασμάτων, και ειδικότερα στα μήκη κύματος $1730-1760\text{ cm}^{-1}$ και

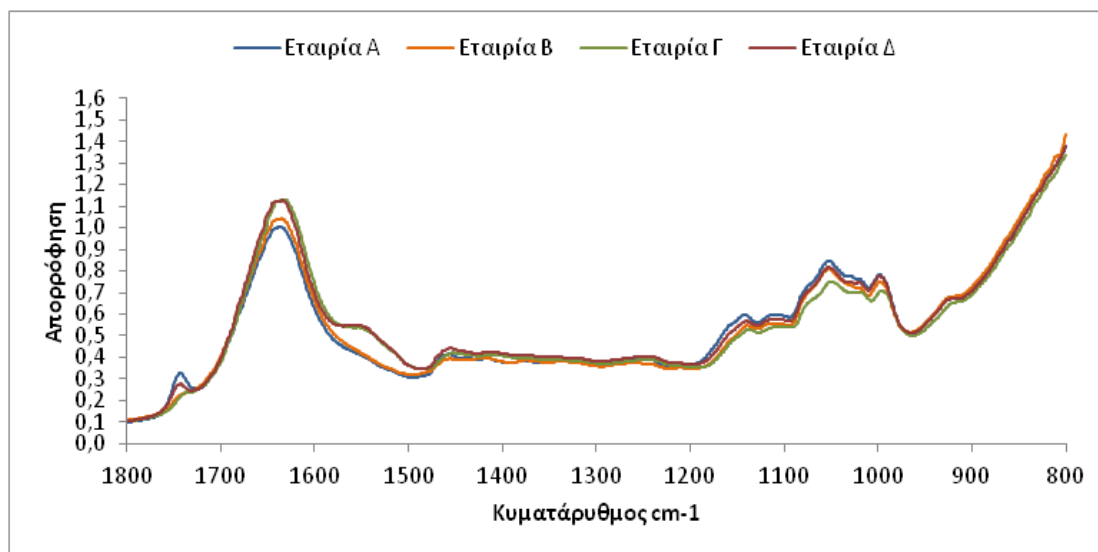


Διάγραμμα 3.2.4. Τα φάσματα FTIR των δειγμάτων 10, 22 και 65 (Εταιρία Β).

Παρόμοιες διαφοροποιήσεις φαίνονται και στο Διάγραμμα 3.2.5 στο οποίο απεικονίζονται τα φάσματα που αντιστοιχούν σε τρία δείγματα κρέμας της Εταιρίας Γ με διαφορετικό προφίλ μικροβιολογικής αλλοίωσης. Τα δείγματα 43 και 47 παρουσίασαν ολική μεσόφιλη χλωρίδα ίση με 2.48 και 6.89 log cfu/g, αντίστοιχα, ενώ στο δείγμα 16 το μικροβιακό φορτίο ήταν <2.00 log cfu/g (Πίνακας 3.2.2). Διαφοροποίηση του δείγματος 16 από τα άλλα δύο δείγματα κρέμας παρατηρείται και στα ληφθέντα φάσματα FT-IR, και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή 1720-1760 cm^{-1} (Διάγραμμα 3.2.5).



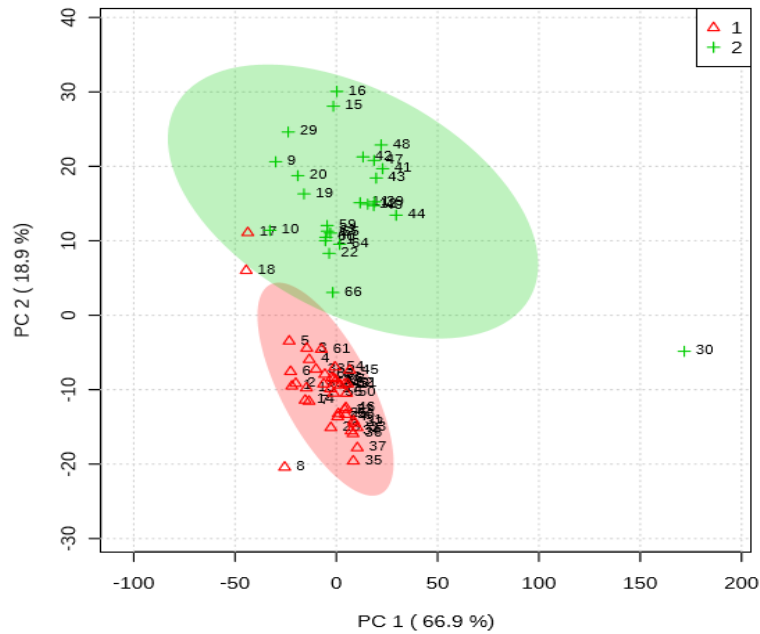
Διάγραμμα 3.2.5. Τα φάσματα FT-IR των δειγμάτων 16, 43 και 47 (Εταιρία Γ).



Διάγραμμα 3.2.6. Φάσματα FT-IR ενός δείγματος κρέμας από κάθε εταιρία.

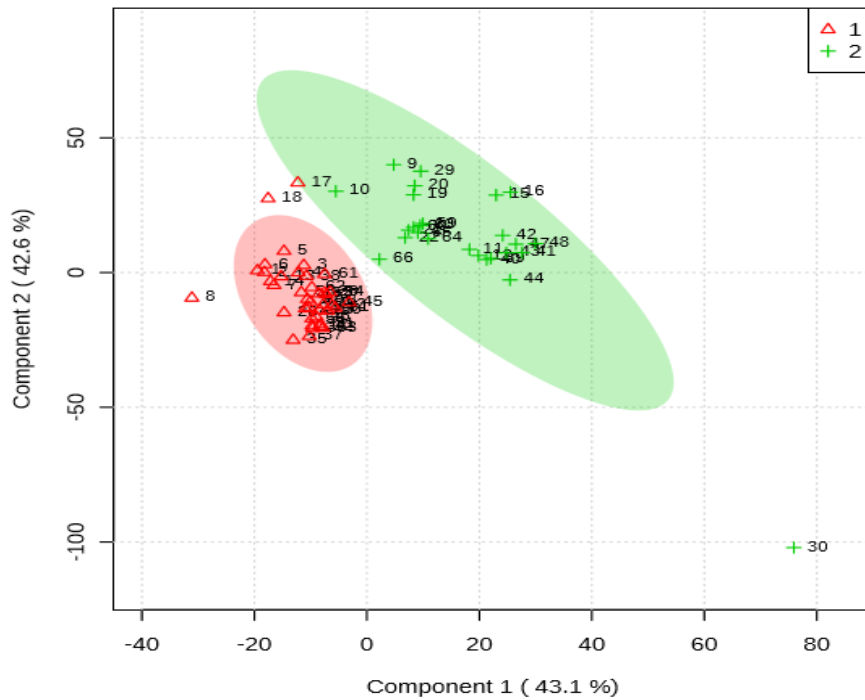
Τα αποτελέσματα που πήραμε από τη χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR αναλύθηκαν με τη βοήθεια του υπολογιστικού λογισμικού πρόγραμματος MetaboAnalyst 3.0, ώστε με τη χρήση της Χημειομετρίας να είναι πιο εύκολη η διαχείριση των δεδομένων και η συλλογή πληροφοριών με στόχο την ερμηνεία τους.

Σε πρώτη φάση, τα δεδομένα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες πριν την εισαγωγή τους στο πρόγραμμα ανάλυσης, και εφαρμόστηκε ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA). Ως κατηγορία 1 θεωρήσαμε όλα τα δείγματα της Εταιρίας Α (που ήταν και τα πολυπληθέστερα αναλυθέντα δείγματα) και ως κατηγορία 2 θεωρήθηκαν όλα τα δείγματα των υπόλοιπων εταιριών. Η μέθοδος PCA στοχεύει να βρει τις οδηγίες που εξηγούν καλύτερα την διακύμανση σε ένα σύνολο δεδομένων (X) χωρίς να αναφέρεται στις ετικέτες κατηγορίας (Y). Τα στοιχεία συνοψίζονται σε πολύ λιγότερες μεταβλητές που ονομάζονται βαθμολογίες και που είναι σταθμισμένες με το μέσο όρο των αρχικών μεταβλητών. Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της ανάλυσης αυτής για τις παραπάνω δύο κατηγορίες, τα οποία απεικονίζονται στην Εικόνα 3.2.1, μας δείχνουν ότι τα δείγματα της κατηγορίας 1 (δηλαδή της Εταιρίας Α) διαχωρίζονται πολύ καλά από τα δείγματα της κατηγορίας 2 (δηλαδή όλων των υπολοίπων Εταιριών). Αυτή η καλή κατηγοριοποίηση των δειγμάτων της Εταιρίας Α υποδεικνύει ότι ενδεχομένως οι κρέμες της συγκεκριμένης εταιρίας έχουν ένα διακριτό FT-IR «αποτύπωμα» σε σχέση με δείγματα παρόμοιων προϊόντων από άλλες εταιρίες. Αυτή η διακριτότητα μπορεί να αντανακλά διαφορές τόσο στη μικροβιολογική ποιότητα όσο και στη σύσταση των προϊόντων.



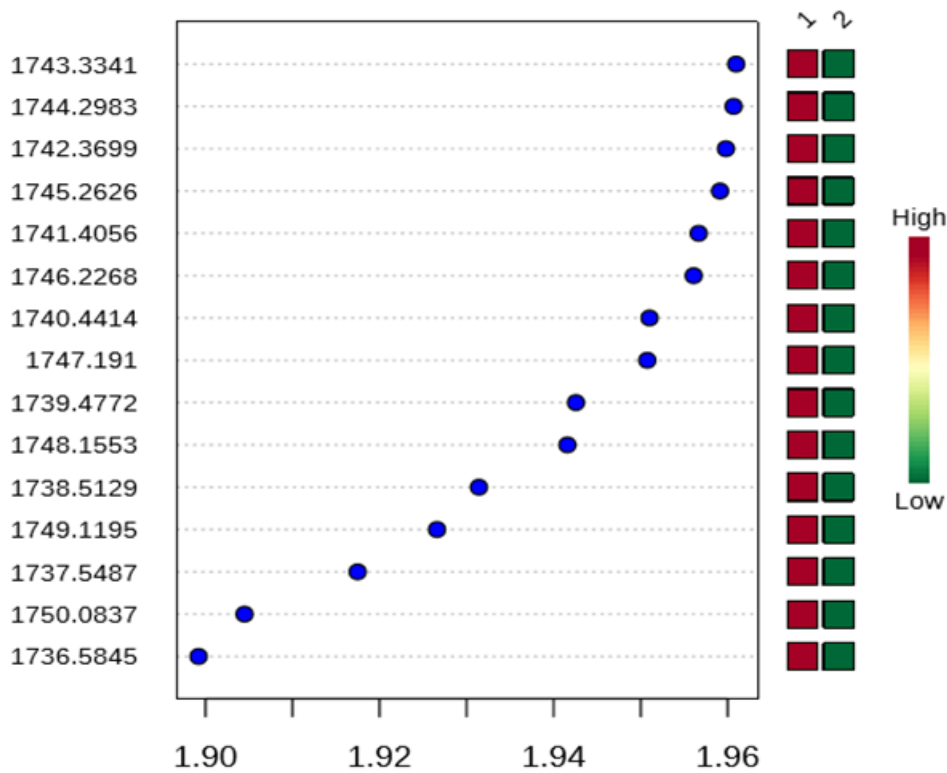
Εικόνα 3.2.1. Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα Εταιρίας Α) και 2 (δείγματα Εταιριών Β, Γ και Δ).

Η διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) είναι μια επιβλεπόμενη μέθοδος που χρησιμοποιεί πολυμεταβλητές τεχνικές παλινδρόμησης για να εξαγάγει μέσω γραμμικών συνδυασμών των αρχικών μεταβλητών (X) πληροφορίες που μπορούν να προβλέψουν την ένταξη στη κατηγορία (Y). Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με τη χρήση αυτής της τεχνικής ανάλυσης στα δείγματα κρεμών των παραπάνω δύο κατηγοριών φαίνονται στην Εικόνα 3.2.2, και επιβεβαιώνουν την ξεκάθαρη διαφοροποίηση της Εταιρίας Α από τις υπόλοιπες εταιρίες (Β, Γ και Δ).



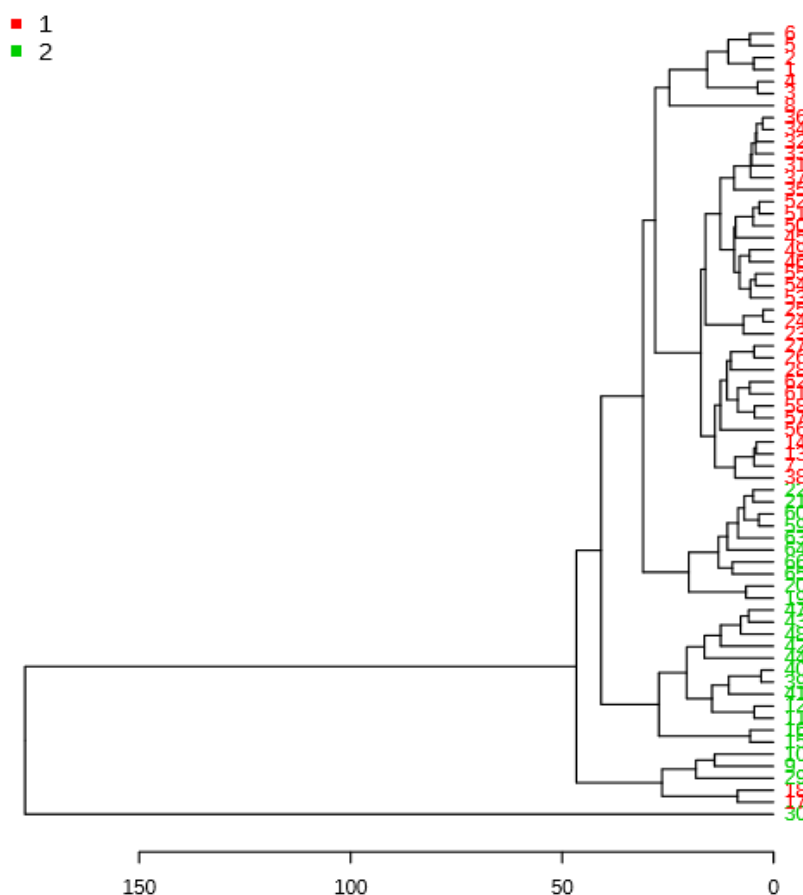
Εικόνα 3.2.2. Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα Εταιρίας Α) και 2 (δείγματα Εταιριών Β, Γ και Δ).

Αυτό που ήταν χαρακτηριστικό στα διαγράμματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω ήταν η έντονη κορυφή που παρουσίαζαν τα δείγματα της Εταιρίας Α μεταξύ $1720\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ σε σχέση με τα δείγματα των άλλων εταιριών. Αυτό φαίνεται και από την ανάλυση PLS-DA η οποία υποδεικνύει ότι αυτοί οι κυματαριθμοί έχουν σημασία για την κατηγορία 1 (δείγματα Εταιρίας Α), εν αντιθέσει με την κατηγορία 2 (δείγματα άλλων εταιριών) που είναι χαμηλότερης σημασίας (Εικόνα 3.2.3).



Εικόνα 3.2.3. Σημαντικά χαρακτηριστικά όπως προκύπτουν από την εφαρμογή διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για τις κατηγορίες 1 (Δείγματα Εταιρίας Α) και 2 (Δείγματα Εταιριών Β, Γ και Δ).

Τα δεδομένα αναλύθηκαν και με την τεχνική ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων, κατά την οποία κάθε δείγμα ξεκινά ως ένα ξεχωριστό σύμπλεγμα και ο αλγόριθμος προχωρά συνδυάζοντάς τα μέχρι όλα τα δείγματα να ανήκουν σε μία συστάδα. Από αυτή την ανάλυση, τα αποτελέσματα της οποίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.4, φαίνεται για ακόμα μία φορά η διακριτή ομαδοποίηση των δειγμάτων της κατηγορίας 1 από τα δείγματα της κατηγορίας 2.

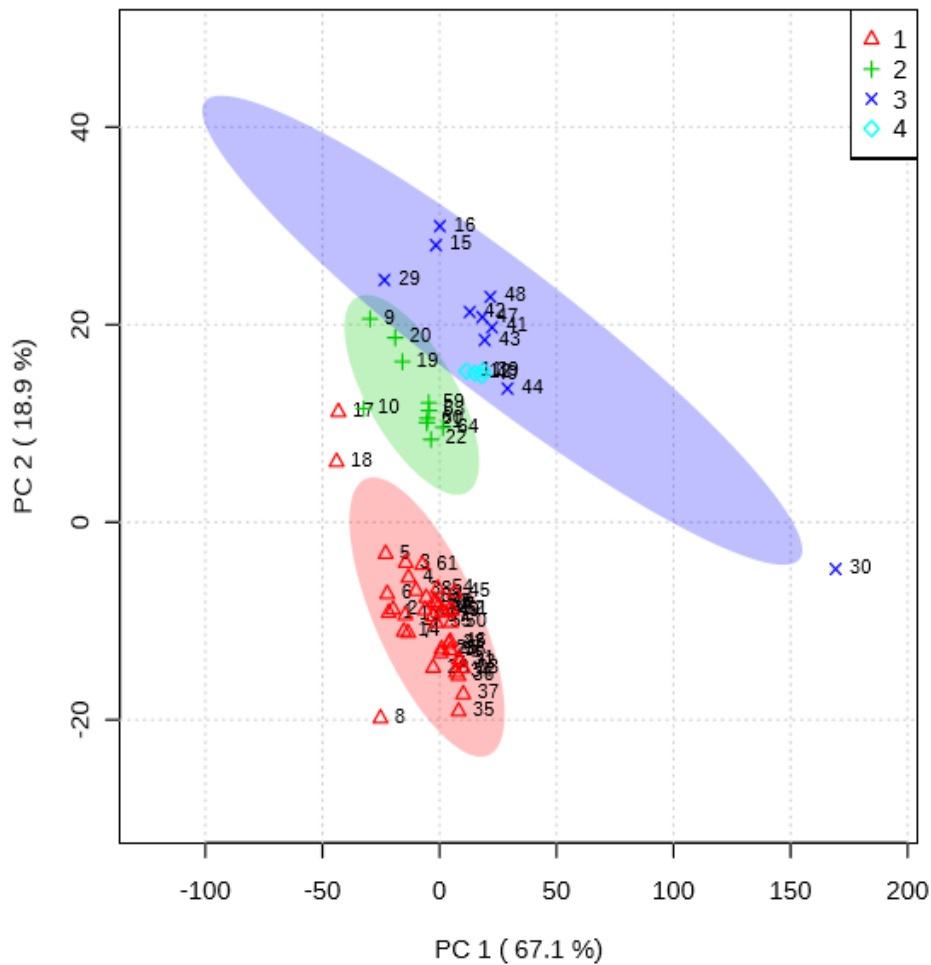


Εικόνα 3.2.4. Αποτελέσματα ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων με τη μορφή δενδρογράμματος για τις κατηγορίες 1 (Δείγματα Εταιρίας Α) και 2 (Δείγματα Εταιριών Β, Γ και Δ).

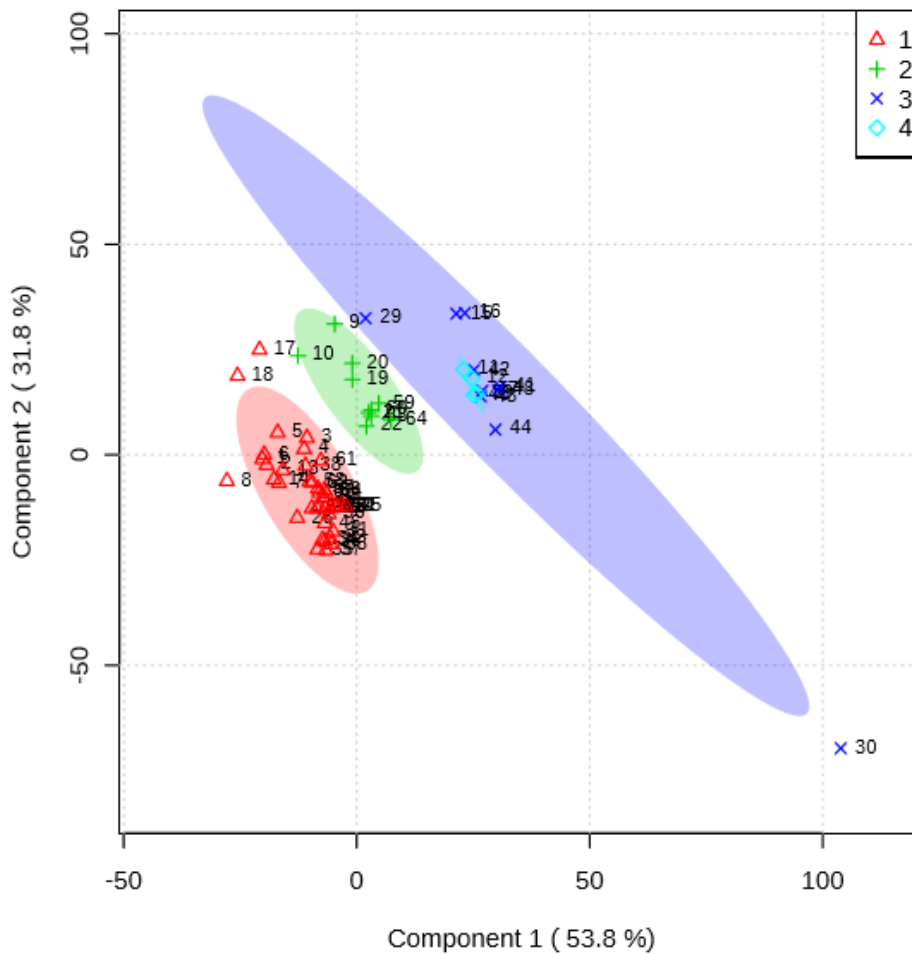
Στη συνέχεια, τα δεδομένα χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες πριν την εισαγωγή τους στο πρόγραμμα ανάλυσης (MetaboAnalyst 3.0). Ως κατηγορία 1 θεωρήθηκαν όλα τα δείγματα της Εταιρίας Α, ως κατηγορία 2 τα δείγματα της Εταιρίας Β, ως κατηγορία 3 τα δείγματα της Εταιρίας Γ και ως κατηγορία 4 τα δείγματα της Εταιρίας Δ. Οι τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν και σε αυτή τη περίπτωση για τα δεδομένα ήταν η PCA, PLS-DA και η ιεραρχική ανάλυση συστάδων.

Όπως φαίνεται από τις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 3.2.5, 3.2.6 και 3.2.8), ενώ τα δείγματα της Εταιρίας Α εξακολουθούν να ομαδοποιούνται πολύ καλά, αρκετά καλά επίσης διαχωρίζονται τα δείγματα της Εταιρίας Β, ενώ μια τρίτη ομάδα δειγμάτων επίσης φαίνεται να ξεχωρίζει και περιλαμβάνει τα δείγματα των Εταιριών Γ και Δ τα οποία δεν διαχωρίζονται μεταξύ τους. Αν και αυτά τα αποτελέσματα θα πρέπει να διαχειριστούν με προσοχή δεδομένου ότι δεν αξιολογήθηκαν ισάριθμα δείγματα από όλες τις εταιρίες (και ειδικά για την Εταιρία Δ αξιολογήθηκαν πολύ λίγα δείγματα), παρέχουν μια πρώτη ένδειξη πιθανού διαχωρισμού δειγμάτων κρέμας

διαφορετικής προέλευσης (παραγωγού εταιρίας) με βάση δεδομένα φασματοσκοπίας FT-IR.

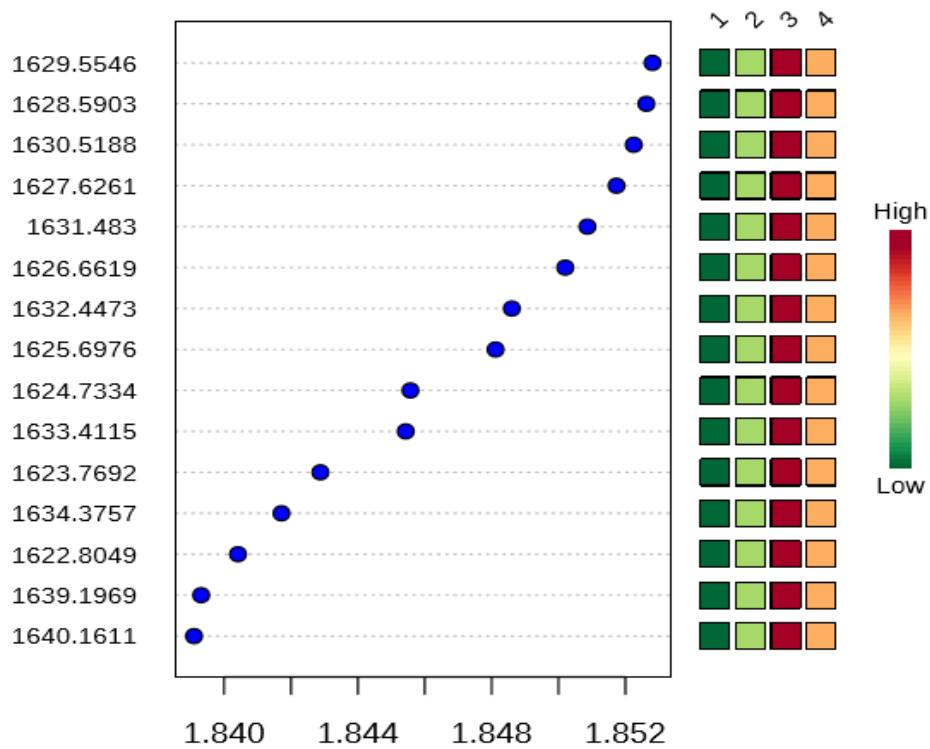


Εικόνα 3.2.5. Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για τις Εταιρίες Α (κατηγορία 1), Β (κατηγορία 2), Γ (κατηγορία 3) και Δ (κατηγορία 4).

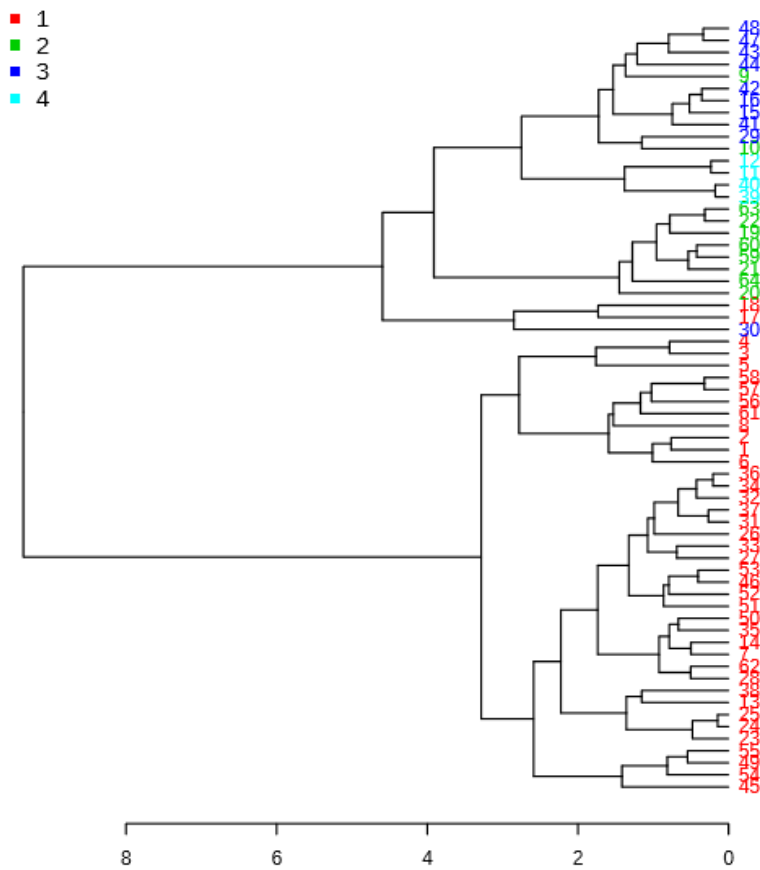


Εικόνα 3.2.6. Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για τις Εταιρίες Α (κατηγορία 1), Β (κατηγορία 2), Γ (κατηγορία 3) και Δ (κατηγορία 4).

Στα διαγράμματα των φασμάτων που παραθέσαμε παραπάνω και ειδικότερα στο Διάγραμμα 3.2.7 παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα των Εταιριών Α και Β δεν δίνουν κορυφή μεταξύ των $1500-1600\text{ cm}^{-1}$ εν αντιθέσει με τα φάσματα των δειγμάτων από τις Εταιρίες Γ και Δ που δίνουν χαρακτηριστική κορυφή σε αυτούς τους κυματαριθμούς. Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται και από την ανάλυση με την τεχνική PLS-DA (Εικόνα 3.2.7), όπου για τις κατηγορίες 1 και 2 αυτές οι τιμές κυματαριθμών δεν έχουν τόσο μεγάλη σημασία όσο για τις κατηγορίες 3 και 4.



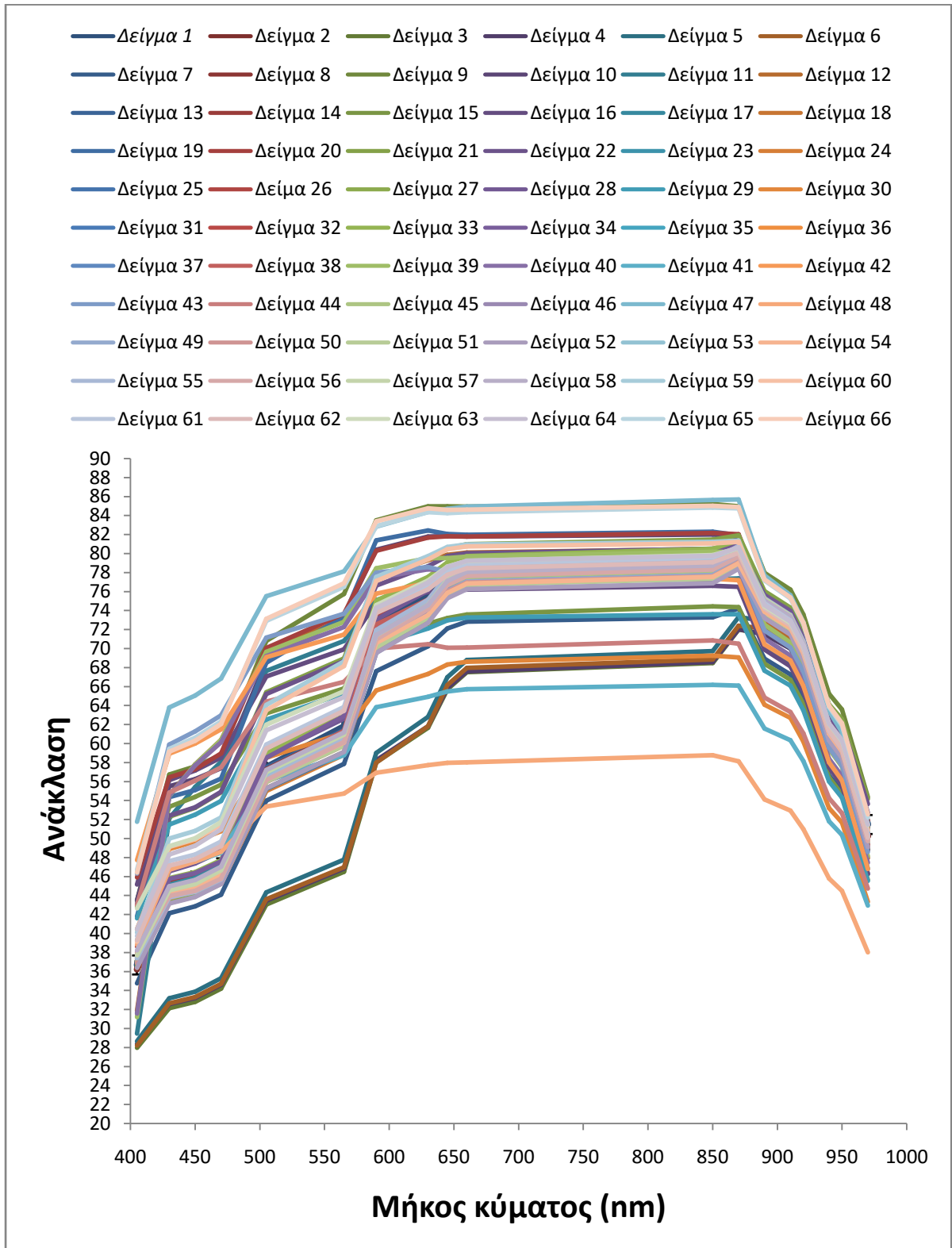
Εικόνα 3.2.7. Σημαντικά χαρακτηριστικά όπως προκύπτουν από την εφαρμογή διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για τις Εταιρίες Α (κατηγορία 1), Β (κατηγορία 2), Γ (κατηγορία 3) και Δ (κατηγορία 4).



Εικόνα 3.2.8. Αποτελέσματα ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων με τη μορφή δενδρογράμματος για τις Εταιρίες Α (κατηγορία 1), Β (κατηγορία 2), Γ (κατηγορία 3) και Δ (κατηγορία 4).

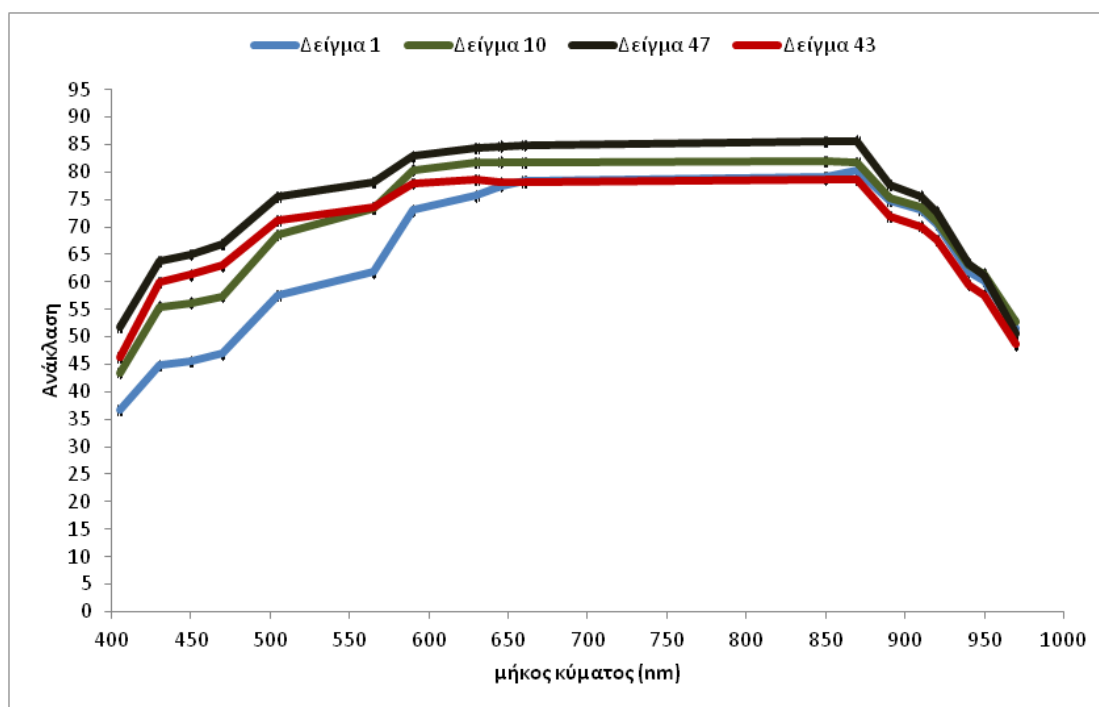
Γ. Ανάλυση Εικόνας (Videometer)

Στα 66 δείγματα κρεμών του εμπορίου που αγοράσθηκαν από διαφορετικούς εμπορικούς διανομείς τέτοιων προϊόντων, εφαρμόστηκε επίσης, ως ταχεία, μη-επεμβατική μέθοδος. Τα αποτελέσματα για όλα τα δείγματα των κρεμών παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.2.7.



Διάγραμμα 3.2.7. Φάσματα ανάκλασης (μέσες τιμές) 66 δειγμάτων κρέμας, ληφθέντα με το σύστημα VideometerLab.

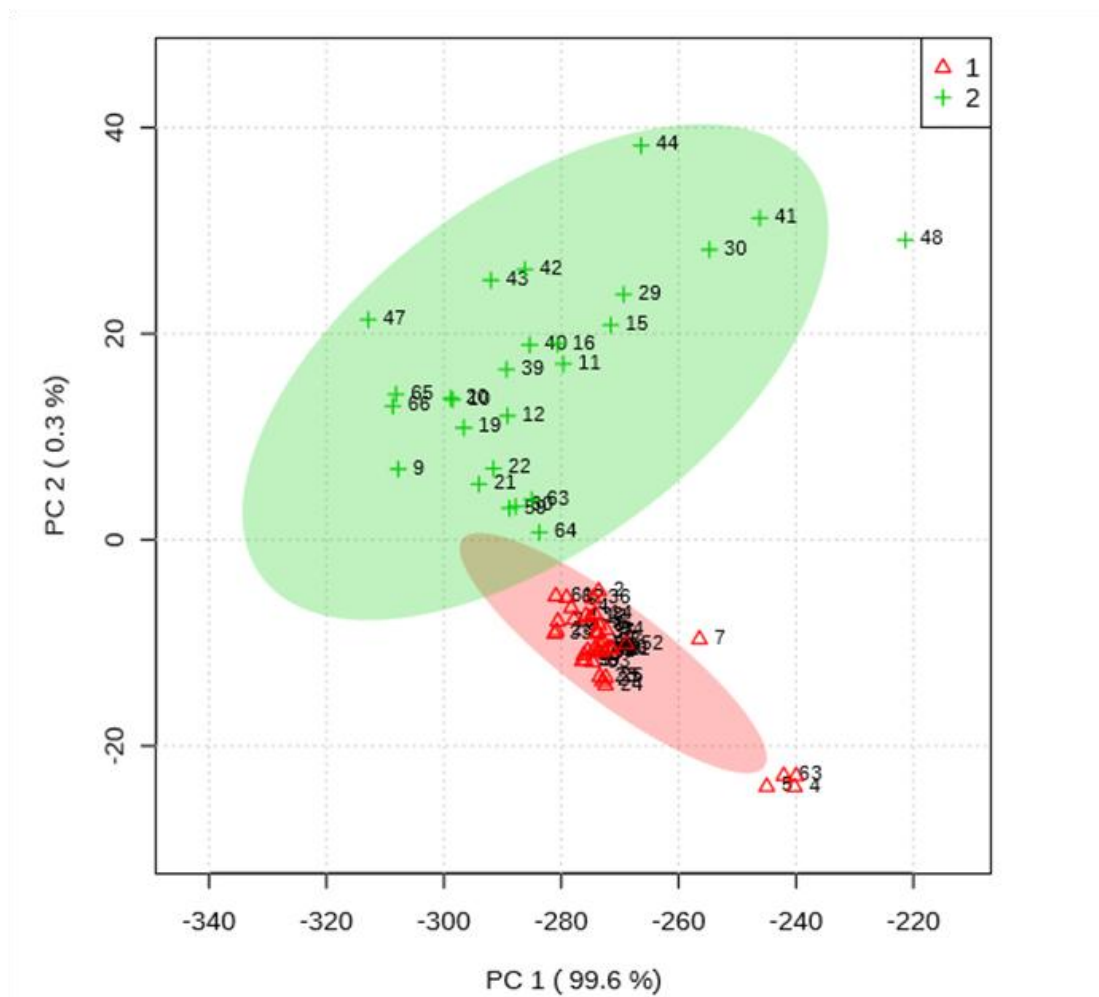
Στο διάγραμμα 3.2.8 παρουσιάζονται τα φάσματα ανάκλασης επιλεγμένων δειγμάτων κρέμας (1, 10, 43 και 47) στα οποία προσδιορίστηκαν, με τη βοήθεια των συμβατικών μικροβιολογικών αναλύσεων, διαφορετικά επίπεδα ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (Πίνακας 3.2.2).



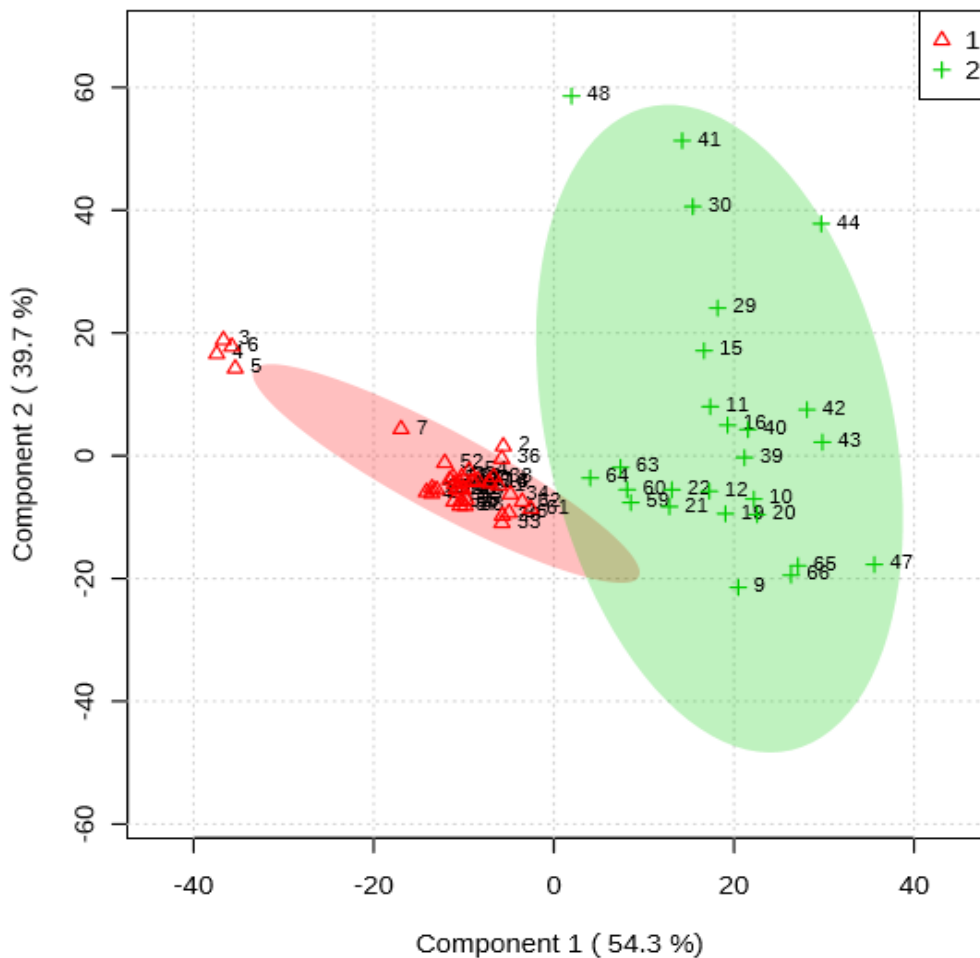
Διάγραμμα 3.2.8. Φάσματα ανάκλασης (μέσες τιμές) επιλεγμένων δειγμάτων κρέμας, ληφθέντα με το σύστημα VideometerLab.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε και σε αυτή τη περίπτωση με τη βοήθεια του λογισμικού προγράμματος MetaboAnalyst 3.0, το οποίο κάνοντας χρήση πολυμεταβλητών τεχνικών ανάλυσης επιτρέπει την μείωση του όγκου των δεδομένων και, κατά συνέπεια, την καλύτερη και αποτελεσματικότερη διαχείρισή τους.

Ομοίως και με τα δεδομένα FT-IR, τα δεδομένα ανάκλασης χωρίστηκαν αρχικά σε δύο κατηγορίες, στη κατηγορία 1 που αφορά στα δείγματα της Εταιρίας Α και στη κατηγορία 2 που αφορά τα δείγματα όλων των άλλων εμπορικών εταιριών παραγωγής κρεμών. Τα αποτελέσματα ανάλυσης των δεδομένων με τη μέθοδο PCA και PLS-DA απεικονίζονται στις Εικόνες 3.2.9 και 3.2.10, αντίστοιχα.

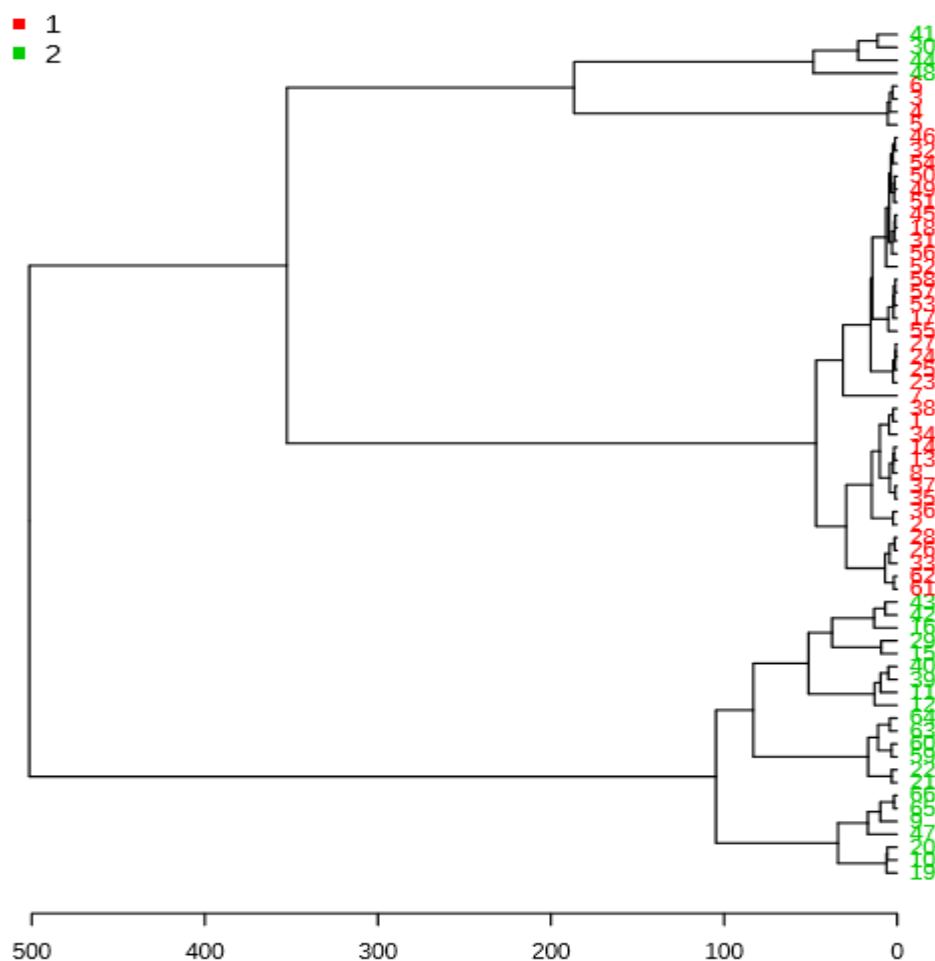


Εικόνα 3.2.9. Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα Εταιρίας Α) και 2 (δείγματα Εταιριών Β, Γ και Δ).



Εικόνα 3.2.10. Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για της κατηγορίες 1 (δείγματα Εταιρίας Α) και 2 (δείγματα Εταιριών Β, Γ και Δ).

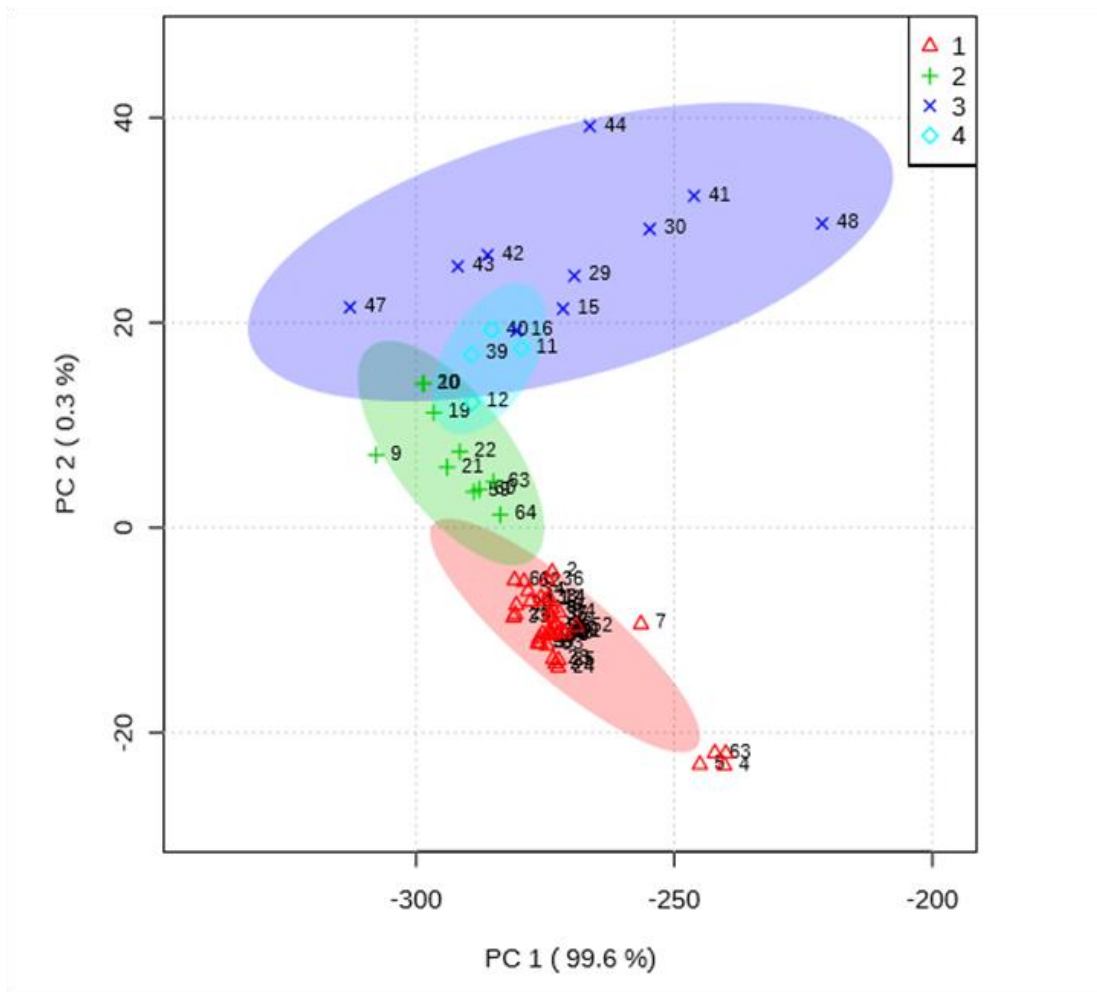
Από τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων ανάκλασης με τις μεθόδους PCA και PLS-DA, φαίνεται ότι οι δύο κατηγορίες διαχωρίζονται αρκετά καλά μεταξύ τους, ενισχύοντας τις παρόμοιες παρατηρήσεις που έγιναν και με τα δεδομένα φασμάτων FT-IR. Στο ίδιο συμπέρασμα οδηγεί και η εφαρμογή της τεχνικής ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων, κατά την οποία γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι τα δείγματα της κατηγορίας 1 (Εταιρία Α) δημιουργούν μία διακριτή συστάδα σε σχέση με τα δείγματα των άλλων τριών εταιριών (Εικόνα 3.2.11). Ωστόσο, θα πρέπει να αναγνωριστεί ότι ο διαχωρισμός των δειγμάτων κρέμας των δύο κατηγοριών ήταν καλύτερος στην περίπτωση των δεδομένων φασμάτων FT-IR σε σχέση με τα δεδομένα ανάκλασης (ανάλυσης εικόνας).



Εικόνα 3.2.11. Αποτελέσματα ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων με τη μορφή δενδρογράμματος για τις κατηγορίες 1 (Δείγματα Εταιρίας Α) και 2 (Δείγματα Εταιριών Β, Γ και Δ).

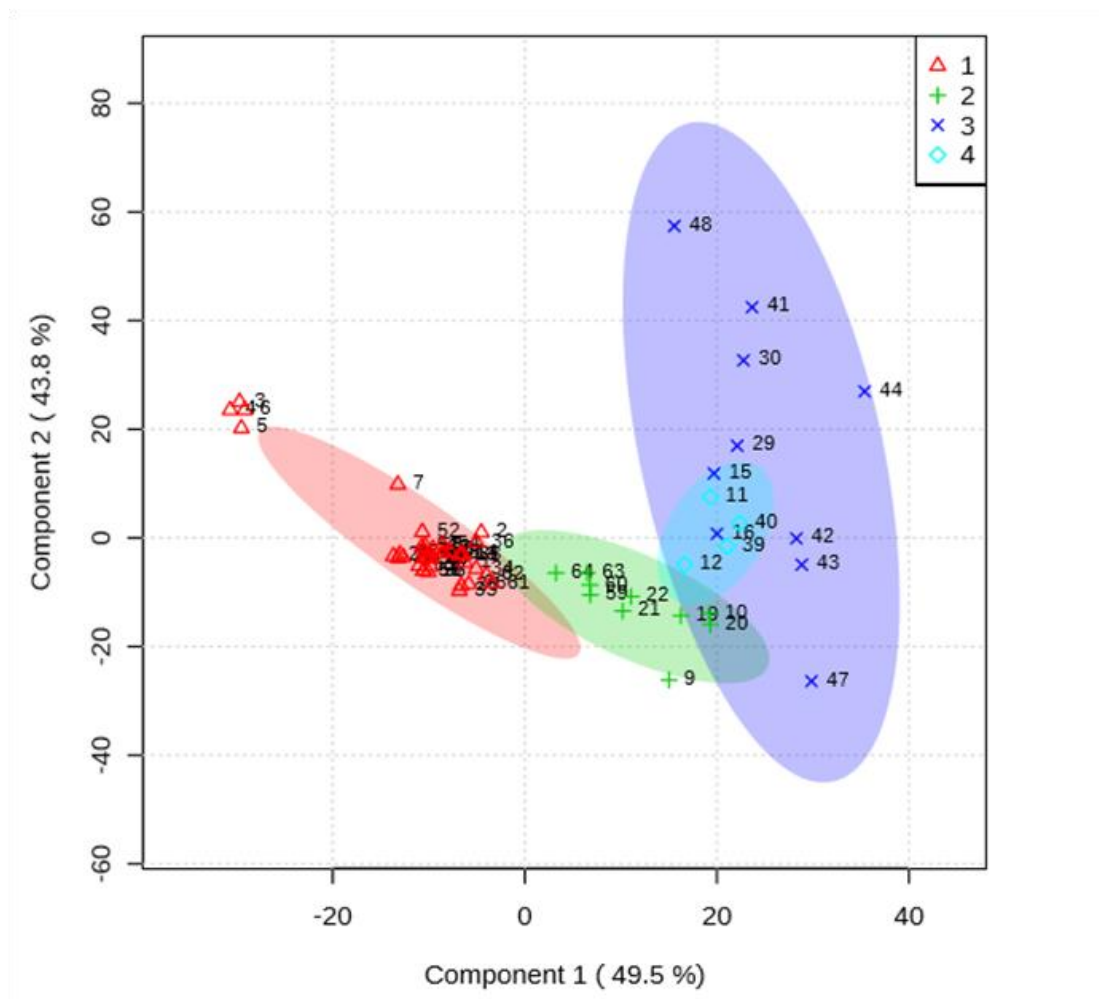
Κατά αντιστοιχία με τα όσα περιγράφηκαν παραπάνω, στη συνέχεια τα δεδομένα ανάκλασης χωρίστηκαν σε τέσσερις κατηγορίες, μία για κάθε εταιρία, και αναλύθηκαν εκ νέου με PCA, PLS-DA και ιεραρχική ανάλυση συστάδων.

Στην ανάλυση με PCA των αποτελεσμάτων για τις τέσσερις διαφορετικές κατηγορίες (Εικόνα 3.2.12), παρατηρούμε ένα διακριτό διαχωρισμό των κατηγοριών με τα δείγματα να πυκνώνουν σε μία συγκεκριμένη περιοχή ειδικότερα της κατηγορίας 1 (δείγματα εταιρίας Α). Επιπλέον αυτή η ανάλυση PCA (δεδομένα ανάκλασης για τις τέσσερις κατηγορίες) δίνει έναν λίγο καλύτερο διαχωρισμό των κατηγοριών, και κατά επέκταση των εταιριών, σε σχέση με την αντίστοιχη ανάλυση PCA για τα δεδομένα του FT-IR (Εικόνα 3.2.5).

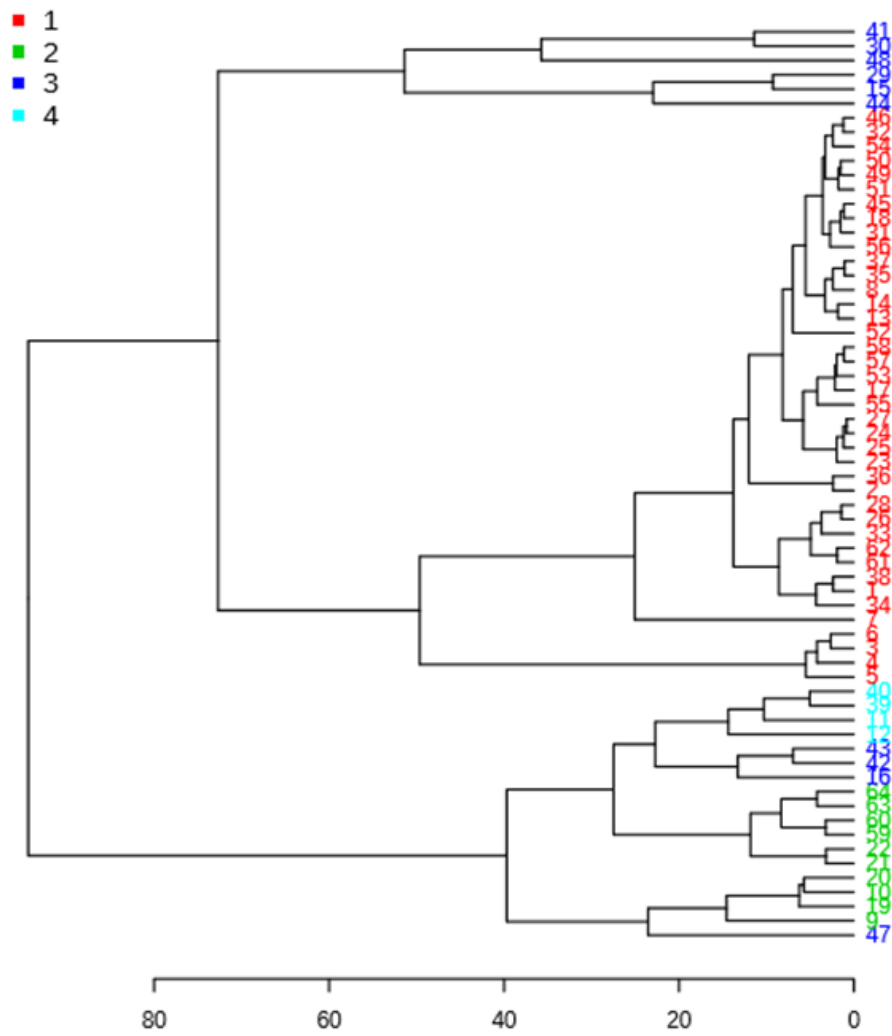


Εικόνα 3.2.12. Δισδιάστατα αποτελέσματα ανάλυσης σε κύριες συνιστώσες (Principal Components Analysis, PCA) για τις Εταιρίες Α (κατηγορία 1), Β (κατηγορία 2), Γ (κατηγορία 3) και Δ (κατηγορία 4).

Παρόμοιες είναι και οι παρατηρήσεις που γίνονται με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης PLS-DA (Εικόνα 3.2.13). Ωστόσο, με τη μέθοδο της ιεραρχικής ανάλυσης σε συστάδες (Εικόνα 3.2.14), οι κατηγορίες δε διαχωρίζονται τόσο καλά όπως όταν εφαρμόστηκε η ίδια τεχνική στα δεδομένα φασμάτων FT-IR. Η κατηγορία 1, δηλαδή η εταιρία Α, είναι διακριτή για ακόμα μία φορά στο σύνολο των κατηγοριών δημιουργώντας μία ευδιάκριτη συστάδα, όμως οι άλλες τρεις κατηγορίες δεν ομαδοποιούνται εμφανώς.



Εικόνα 3.2.13. Δισδιάστατα αποτελέσματα διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Discriminant Analysis, PLS-DA) για τις Εταιρίες Α (κατηγορία 1), Β (κατηγορία 2), Γ (κατηγορία 3) και Δ (κατηγορία 4).



Εικόνα 3.2.14. Αποτελέσματα ιεραρχικής ανάλυσης συστάδων με τη μορφή δενδρογράμματος για τις Εταιρίες Α (κατηγορία 1), Β (κατηγορία 2), Γ (κατηγορία 3) και Δ (κατηγορία 4).

Δ. Αξιολόγηση πολυμεταβλητού μοντέλου

Σε ένα τελευταίο στάδιο, τα δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν για τα 66 δείγματα κρεμών του εμπορίου, τόσο τα δεδομένα φασμάτων FT-IR όσο και τα δεδομένα ανάλυσης εικόνας (δεδομένα ανάκλασης), χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση ενός πολυμεταβλητού μοντέλου πρόβλεψης της μικροβιολογικής ποιότητας κρεμών το οποίο έχει αναπτυχθεί, σε προγενέστερο χρόνο, στα πλαίσια συγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι το συγκεκριμένο μοντέλο (πολυωνυμικό μοντέλο 2^{ου} βαθμού) έχει αναπτυχθεί με βάση ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων κρέμας από την Εταιρία Α, και επιτρέπει την πρόβλεψη της ποιότητας του συγκεκριμένου προϊόντος με βάση φάσματα FT-IR, δεδομένα ανάκλασης (δεδομένα ανάλυσης εικόνα από το σύστημα VideometerLab), ή κάνοντας συνδυασμένη χρήση (fusion model) και των δύο αυτών τύπων δεδομένων.

(I) Αξιολόγηση του μοντέλου με δεδομένα FT-IR

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκπαίδευση (training) του μοντέλου χρησιμοποιώντας δεδομένα φασμάτων FT-IR από συνολικά 422 δείγματα κρεμών (Εταιρία Α), τόσο κατά τη διάρκεια συντήρησης τους στο εργαστήριο σε διαφορετικές θερμοκρασίες όσο και από σημεία λιανικής πώλησης (προγενέστερα πειραματικά δεδομένα). Τα αποτελέσματα της εκπαίδευσης του μοντέλου φαίνονται στον Πίνακα 3.2.3.

Πίνακας 3.2.3 Εκπαίδευση (training) του πολυμεταβλητού μοντέλου.

Overall score	96%
Below-limit (<4.5 log cfu/g)	100% (344/345)
Above-limit (≥4.5 log cfu/g)	81% (62/77)

Μετά από τη διαδικασία της εκπαίδευσης, το μοντέλο αξιολογήθηκε με τα 66 δείγματα των κρεμών του εμπορίου τα οποία αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και τα αποτελέσματα της αξιολόγησης φαίνονται στον Πίνακα 3.2.4.

Πίνακας 3.2.4 Αξιολόγηση (testing) του πολυμεταβλητού μοντέλου με τα 66 δείγματα κρεμών.

Overall score	86%
Below-limit (<4.5 log cfu/g)	92% (57/62)
Above-limit (≥4.5 log cfu/g)	0 % (0/4)

(II) Αξιολόγηση του μοντέλου με δεδομένα FT-IR και VideometerLab (fusion)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε εκπαίδευση (training) του μοντέλου χρησιμοποιώντας δεδομένα φασμάτων FT-IR καθώς και δεδομένα ανάκλασης (VideometerLab) από συνολικά 347 δείγματα κρεμών (Εταιρία Α), τόσο κατά τη διάρκεια συντήρησης τους στο εργαστήριο σε διαφορετικές θερμοκρασίες όσο και από σημεία λιανικής πώλησης (προγενέστερα πειραματικά δεδομένα). Τα αποτελέσματα της εκπαίδευσης του μοντέλου φαίνονται στον Πίνακα 3.2.5.

Πίνακας 3.2.5 Εκπαίδευση (training) του πολυμεταβλητού μοντέλου (fusion).

Overall score	
Below-limit (<4.5 log cfu/g)	99% (279/281)
Above-limit (≥4.5 log cfu/g)	95% (63/66)

Μετά από τη διαδικασία της εκπαίδευσης, το μοντέλο αξιολογήθηκε με τα 66 δείγματα των κρεμών του εμπορίου τα οποία αναλύθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας και τα αποτελέσματα της αξιολόγησης φαίνονται στον Πίνακα 3.2.6.

Πίνακας 3.2.6 Αξιολόγηση (testing) του πολυμεταβλητού μοντέλου (fusion) με τα 66 δείγματα κρεμών.

Overall score	94%
Below-limit (<4.5 log cfu/g)	100% (66/66)
Above-limit (≥4.5 log cfu/g)	0 % (0/4)

4. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μικροβιολογικά από τις πρώτες ύλες των βρεφικών κρεμών, παρατηρήθηκε απουσία σχεδόν σε όλα τα υλικά στελεχών του *Bacillus ssp.* και *Enterobacteriaceae* με εξαίρεση τα άλευρα (ρυζάλευρο, αλεύρι). Η ολική μικροβιακή χλωρίδα παρουσιάστηκε χαμηλή. Γενικότερα τα αποτελέσματα από τη μικροβιολογική ανάλυση φάνηκαν να είναι χαμηλά και αυτό πιθανότατα να οφείλεται στη χαμηλή ενεργότητα νερού (a_w) των πρώτων υλών που μπορεί να κυμαίνεται από 0.11-0.23 καθώς η φυσική τους κατάσταση είναι στερεή σε μορφή σκόνης. Το χαμηλό ποσοστό υγρασίας που αντιστοιχεί σε ένα $a_w < 0.6$, τόσο στις πρώτες ύλες όσο και στα τελικά προϊόντα βρεφικών κρεμών σκόνης, φαίνεται αποτελεσματικό για την αποφυγή ανάπτυξης μικροοργανισμών. Ωστόσο σε τόσο χαμηλές ενεργότητες ύδατος δημιουργούνται χημικές και ενζυματικές αλλαγές στο τρόφιμο (Roos, 2001). Είναι σημαντικό για τη διάρκεια ζωής του βρεφικού σκευάσματος σκόνης να μην υπερβαίνεται το ποσοστό υγρασίας που αντιστοιχεί σε μία τέτοια ενεργότητα ύδατος στην οποία το ποσοστό της οξείδωσης των λιπών είναι το ελάχιστο (Robertson, 2006). Συνήθως αυτή η ενεργότητα νερού για τα γαλακτοκομικά προϊόντα σκόνης κυμαίνεται από 0.25 (χαμηλό) έως 0.35 (υψηλό) (Baechler *et al.*, 2005). Η ανάλυση FT-IR στις διαφορετικές συνταγές έδειξε διαφορές κυρίως στις περιοχές $1710-1750\text{ cm}^{-1}$ που οφείλονται σε δονήσεις τάσης της καρβονυλομάδας (C=O) που υπάρχει σε καρβονυλικές ενώσεις, καρβοξυλικά οξέα, ανυδρίτες οξέων, εστέρες. Οι ισχυρές ζώνες απορρόφησης λόγω του νερού μπορούν να θεωρηθούν μεταξύ $3800 - 2800$, $1700 - 1550$, και κάτω από 900 cm^{-1} . Στα φάσματα που πάρθηκαν από τις αναλύσεις στις συνταγές κρέμας το νερό φαίνεται στα $1590-1700\text{ cm}^{-1}$. Ωστόσο, την απορρόφηση από την γλυκόζη μπορεί να τη δει κανείς στην περιοχή δακτυλικού αποτυπώματος μεταξύ $1486-963\text{ cm}^{-1}$ (Clifford *et al.*, 2014). Εκεί μπορούν να εκτιμηθούν και οι διαφοροποιήσεις που κάναμε στη ποσότητα της ζάχαρης. Στα 1550 cm^{-1} όπου απορροφούν οι πρωτοταγείς αμίνες εντοπίστηκαν διαφορές στα φάσματα των συνταγών κρέμας που πιθανόν να οφείλονται στις διαφοροποιήσεις που κάναμε στο πλήρες, στο άπαχο γάλα καθώς και στον ορό. Οι έντονες κορυφές που παρατηρούνται μεταξύ 950 και 1153 cm^{-1} εκπροσωπούν το άμυλο και τα σάκχαρα. Σε αυτούς τους κυματοαριθμούς οι κορυφές που δημιουργούνται οφείλονται σε δονήσεις κάμψης του δεσμού O-H (Sivakesava & Irudayaraj, 2000). Οι διαφοροποιήσεις στα υλικά που δημιουργήθηκαν στην αρχική συνταγή είχαν ως στόχο την ανίχνευση των αλλαγών μέσω των δονήσεων των χημικών ομάδων στο FT-IR. Μετά από επεξεργασία των δεδομένων παρατηρήθηκε ότι από τις μεθόδους πολυμεταβλητής ανάλυσης διακριτή ομαδοποίηση έγινε με τη μέθοδο διακρίνουσας ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA). Σε μία μεταγενέστερη έρευνα θα μπορούσε η ανάλυση να γίνει σε πιο πολλά δείγματα βασικής συνταγής κρεμών καθώς φάνηκε από τα πρώτα αποτελέσματα να διακρίνονται οι διαφοροποιήσεις που έγιναν και συγκρίθηκαν με δείγματα που παρασκευάστηκαν από τη βασική συνταγή.

Στο δεύτερο πειραματικό κομμάτι όπου τα συνολικά 66 δείγματα του εμπορίου διαφορετικών εταιριών εξετάστηκαν ως προς τη μικροβιολογική τους αλλοίωση δε παρατηρήθηκε σημαντική μικροβιακή αύξηση ειδικότερα της εταιρίας Α από την οποία πάρθηκαν και τα περισσότερα δείγματα. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για σταθερά ως προς τη μικροβιολογία εμπορικά προϊόντα. Έτσι και το μοντέλο που εφαρμόστηκε πάνω σε αυτές τις κρέμες διαφορετικών εταιριών δεν έδειξε να λειτούργησε διότι είχε δημιουργηθεί εκλεκτικά για δείγματα της Εταιρίας Α . Σε ένα επόμενο πειραματικό στάδιο θα μπορούσε να φτιαχτεί μία βάση δεδομένων για το αντίστοιχο πρόγραμμα με δείγματα από όλες τις εταιρίες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την έρευνα και να μελετηθεί μετέπειτα πιθανή μικροβιολογική αλλοίωση από παρόμοια σκευάσματα. Τα δεδομένα που πάρθηκαν από το FT-IR και εισήχθησαν σε σύστημα πολυμεταβλητής ανάλυσης έδειξαν έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων διαφορετικών Εταιριών Α,Β,Γ,Δ. Από αυτό εξάγεται το συμπέρασμα ότι θα μπορούσε να δημιουργηθεί πιθανό μοντέλο που να εντοπίζει από το δείγμα για ποια Εταιρία πρόκειται.

5. Βιβλιογραφία

- Abubakar I, Irvine L, Aldus CF, Wyatt GM, Fordham R, Schelenz S, Shepstone L, Howe A, Peck M, Hunter PR (2007) A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food. *Health Technol Assess* 11:1–216
- Aguirre Leixuri, Frias Jeus Maria, Barry-Ryan Catherine, Grogan Helen, “Modelling browning and brown spotting of mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored in controlled environmental conditions using image analysis”, *Journal of food Engineering* 91,2009, 280-286
- Aldus CF, van Amerongen A, Ariens RMC, Peck MW, Wichers JH, Wyatt GM (2003) Principles of some novel rapid dipstick methods for detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 95:380–389.
- Almeida MBM, Almeida JAG, Moreira ME et al. Adequacy of human milk viscosity to respond to infants with dysphagia: experimental study. *J Appl Oral Sci* 2011; 19(6): 554-9
- Anjos Ofelia, Graca Campos Maria, Cntreras Ruiz Pablo, Antunes Paulo, “Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey”, *Food Chemistry Volume 169*, 15 February 2015, Pages 218–223
- Antolinos V., Munos-Cuevas. M. ,M.Ros-Chumillas, Periago P.M, Fernadez P.S, Le Marc Y., “Modelling the effects of temperature and osmotic shifts on the growth kinetics of *Bacillus weihenstephanensis* in broth and food products”, *International journal of Food microbiology*, 2012
- Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural toxins, 2012.
- Bentley Amy "Booming Baby Food: Infant Food and Feeding in Post-WWII America, 2006, *Michigan Historical Review*. 32 (2): 63–87
- Bjørn Skovlund Dissing & Olga S. Papadopoulou & Chrysoula Tassou & Bjarne Kjaer Ersbøll & Jens Michael Carstensen & Efstathios Z. Panagou & George-John Nychas, “Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat”, *Food Bioprocess Technol*, 2013
- Celestino, E.I.; Yier, M.; Roginski H., “The Effects of Refrigerated Storage of Raw Milk on the Quality of Whole Milk Powder Stored for Different Periods”, *International Dairy Journal*, 1997, 7(2-3).
- Chapman & Hall, *Modern Food Microbiology*, 4th edn., New York.
- Clifford R.I., Head Jeff, Kinyanjui John, Talbott Mark, “Quantification of Natural Sugars in Baby Food Products by MID FTIR Spectroscopy”, 2014, *Application News, spectrometric Analysis*.
- CODEX STAN 72-1981 - Standard for infant formula and formulas for special medical purposes intended for infants
- Dabrowski W.M. and Sikorski Z.E., "Toxins in Food" by CRC Press, 2004

- Deak Tibor, Handbook of Food spoilage Yeasts, second edition, CRP Press, 2008
- Fox P.F. and P. McSweeney, Birkhäuser, "Advanced Dairy Chemistry: Volume 2 - Lipids", 2006 ISBN 978-0-387-26364-9
- Frazier, W.C. (1958) Food Microbiology. McGraw-Hill Book Company, Inc, New York.
- Goldblith, S.A. (1971) The science and technology of thermal processing, Part 1. Food Technology, pp. 1256–1262.
- Goldblith, S.A. (1972) The science and technology of thermal processing, Part 2. Food Technology, pp. 64–69. Kay, J.M. (1992)
- Hammond Sean T., H. Brown James, Burger Joseph R., Flanagan Tatiana P., Fristoe Trevor S., Mercado-Silva Norman, C. Nekola Jeffrey and G. Okie Jordan, "Food Spoilage, Storage, and Transport: Implications for a Sustainable Future", Bioscience, Oxford journals, Vol 65, Issue 8, 2015
- Holmes, Wendy; Hoy, D; Lockley, A; Thammavongxay, K; Bounnaphol, S; Xeuatvongsa, A; Toole, M (2007), "Influences on maternal and child nutrition in the highlands of the northern Lao PDR", Asia Pac J Clin Nutr, 16 (3): 537–545
- Hubbard, RW; Ono, Y; Sanchez, A (1989). "Atherogenic effect of oxidized products of cholesterol". Progress in food & nutrition science. 13 (1): 17–44. PMID 2678267.
- Ioannou Irina, Ghouh Mohamed," PREVENTION OF ENZYMATIC BROWNING IN FRUIT AND VEGETABLES", European Scientific Journal, October 2013 edition vol.9
- Jun-Hu Cheng, Da-Wen Sun, "Recent Applications of Spectroscopic and Hyperspectral Imaging Techniques with Chemometric Analysis for Rapid Inspection of Microbial Spoilage in Muscle Foods", Comprehensive reviews in Food science and Food safety, Volume 14, Issue 4, July 2015, Pages 478–490
- Kahtani, H.A, Ahmed M.A, Abou-Arab A.A, Hayat.K, "Identification of lard in vegetable oil binary mixtures and commercial food products by FTIR", Wageningen Academic Publishers, Απρίλιος 29, 2016
- Kiwi sinks on milk-powder ban as most Asian stock futures climb The Associated Press, Aug 2013
- Labuza, T. P.; Saltmarch, M., "Kinetics of Browning and Protein Quality Loss in Whey Powders During Steady State and Nonsteady State Storage Conditions", Journal of Food Science, 1982, 47(1), 92–96.
- Lacombe Caroline, Untereiner Valérie, Gobinet Cyril, Zater Mokhtar, Sockalingum Ganesh D'and Garnote Roselyne, "Rapid screening of classic galactosemia patients: a proof-of-concept study using high-throughput FTIR analysis of plasma", Analyst Issue 7, 2017
- Ledenbach Loralyn H. and Marshall Robert T., "Microbiological Spoilage of Dairy Products", Springer, 2009
- Lianou, A., Moschonas, G., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.-E., 2014. "Assessment of the efficacy of Fourier transform infrared spectroscopy in estimating the

- microbiological quality of pasteurized vanilla cream” ,International Association for Food Protection’s European Symposium. 7-9 May, Budapest, Hungary. Abstract No. P2-19.
- Lianou, A., Moschonas, G., Triantafyllou, I., Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., 2015, “ Fourier transform infrared spectroscopy and multispectral image analysis as means of assessing the microbiological quality of vanilla cream”, 29th International Forum Process Analytical Technology, IFPAC 2015. 25th-28th January, Washington D.C., USA. Abstract No. I-096.
 - Liu Changhong, Liu Wei, Lu Xuzhong, Fei Ma, Wei Chen, Jianbo Yang, Lei Zheng, “Application of Multispectral Imaging to Determine Quality Attributes and Ripeness Stage in Strawberry Fruit”, Sara Amancio, ISA, Portugal, 2014
 - Lopez-Campos, G. Martinez- Suarez, J.V Aguado-Urda. M. Lopez-Alonso, “Microarray Detection and Characterization of Bacterial Foodborne Pathogens” ,Springer, 2012
 - Mohammad Kamal, Romdhane Karoui «Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products»,Trends in Food Science & Technology Volume 46, Issue 1, November 2015, Pages 27–48
 - Moschonas, G., Lianou, A., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J., Panagou, E., 2014, “Monitoring of microbial and chemical changes during storage of pasteurized vanilla cream”, 24th International ICFMH (International Committee on Food Microbiology and Hygiene) Conference, Food Micro 2014. 1st-4th September, Nantes, France. Abstract No. P265
 - Nur Fahana Jamahseri, Miradatul Najwa Mohd Rodhi, Nur Hidayah Zulkarnain, Nursyuhada Che Husain, Ahmad Fakhri Syahmi Masruddin , “FTIR ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUND AS PANCREATIC LIPASE INHIBITOR FROM INOCULATED AQUILARIA MALACCENSIS “ , The Malaysian Journal of Analytical Sciences, Vol 18 No 3 ,2014, 683 – 689
 - Nychas G-J E. , Scandamis P.N, Tassou C.C, koutsoumanis K.P, “Meat spoilage during distribution, Meat science 78, 2008, 77-79
 - Okamoto M. and Hayashi R. (1985) "Chemical and Nutritional Changes of Milk Powder Proteins under Various Water Activities" *Agric. Biol. Chem.*, Vol.49 (6), pp 1683-1687.
 - Panagou E. and Nychas G-J E, “Dynamic Modeling of *Listeria monocytogenes* Growth in Pasteurized Vanilla Cream after Postprocessing Contamination”, Journal of food protection, 2008,p.g 1828-1834
 - Pavia D.L , Lampman G.M, Kriz G.S, Vyvyan J.R, “Introduction to spectrometry”,Fourth edition, Department of Chemistry Western Washington University Bellingham, Washington,2009
 - Pflug, I.J. (2003) Selected Papers on the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes, 6th edn. Environmental Sterilization Laboratory, University of Minnesota, St. Paul, MN.

- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (1996) Microbiology, 3rd edn. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque.
- Rees, J.A.G. and Bettison, J. (1991) Processing and Packaging of Heat Preserved Foods. Blackie and Son Ltd, London.
- Pitt John I., Hocking Ailsa D. , “Fungi and Food Spoilage”, Springer, 2009
- Robertson G.L, “Food Packaging Principles and Practice”, 2nd edition, 2006, CRC press.
- Ropodi A.L, Pavlidis D.E, Mohareb F., Panagou E.Z , Nychas G-J.E, “ Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats”, Food research International, 2015
- Ropodi A.I., Panagou E.Z., Nychas G.-J.E., “Data mining derived from food analyses using non-invasive/nondestructive analytical techniques; determination of food authenticity, quality & safety in tandem with computer science disciplines”, Trends in Food Science and Thechnology, 2016
- Ross Y.H, “Water activity and plasticization, In: Food shelf stability Chemical Biochemical and Microbiological Changes”, 2001, Eskin M.N.A Robinson D.S (Eds). CRC press pp 4-36.
- Samour, Patricia; King, Kathy (2011-01-07). Pediatric Nutrition
- Seymour G.B, Taylor J.E and Tucker G.A, Biochemistry of fruit ripening, Springer 1993
- Sivakesava, S., Irudayaraj, J., “Analysis of potato chips using FTIR photoacoustic spectroscopy”, 2000, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1805–1810.
- Solanki A K , “PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTY OF PROBIOTIC MICROENCAPSULATED ENRICHED INFANT FORMULA”, Indian journal of dairy science, Vol 68, No 2, 2015
- Susheela Biranjia-Hurdoyal and Melissa Cathleen Latouche, “Factors Affecting Microbial Load and Profile of Potential Pathogens and Food Spoilage Bacteria from Household Kitchen Tables”, Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology Volume , 2016.
- Sun-Kyung Heo, Hee-Seok Lee, and Sang-Do Ha, “ A Predictive Model for the Growth Rate of Bacillus cereus in Broth by Response Surface Methodology”, Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansong 456-756, Korea, 2009
- Stephen A, Alles M, de Graaf C, et al. (July 2012). "The role and requirements of digestible dietary carbohydrates in infants and toddlers". Eur J Clin Nutr. 66 (7): 765–79.
- Stumbo, C.R. (1965) Thermo-Bacteriology in Food Processing. Academic Press Inc., New York.
- Valero M., Fernandez P.S., Salmero M.C. , “Influence of pH and temperature on growth of Bacillus cereus in vegetable substrates”, International Journal of Food Microbiology 82 , 2003, 71–79

- Valero M. and Giner M.J, “Effects of antimicrobial components of essential oils on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and the sensory quality of carrot broth”, International journal of Food Microbiology, 2006
- Van de Voort, F.R., “Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis”, 1992, Food Research International, 25, 397–403.
- Varmuza Kurt, Filzmoser Peter, “introduction to Multivariate Statistical Analysis in Chemometrics”, CRC Press, 2009
- Walker Ryan W. and Goran Michael I, “Laboratory Determined Sugar Content and Composition of Commercial Infant Formulas, Baby Foods and Common Grocery Items Targeted to Children”, Nutrients 2015
- World Health Organization. Infant and young child feeding: Model chapter for textbooks for medical students and allied health professionals. Washington, DC: Author, 2009.
- World Health Organization. Online Q&A: What is the recommended food for children in their very early years, accessed 2 August 2011.
- Zhenjie Xionga, Anguo Xiea, Da-Wen Sunab, Xin-An Zenga & Dan Liu, “Applications of Hyperspectral Imaging in Chicken Meat Safety and Quality Detection and Evaluation”, 2015
- <http://www.usdec.org/files/PDFs/FoodAid/FoodAidNutritionalFunctionalApplications.pdf>
- <http://usdec.files.cms-plus.com/PDFs/FoodAid/SMPStorageFactSheet.pdf>
- http://www.niro.com/niro/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndk_w6u9b6h
- <http://www.geap.com.au/gpau/cmsdoc.nsf/WebDoc/ndkw74aawr>
- <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/Infrared/infrared.htm>