

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Π.Μ.Σ. Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του
Ανθρώπου**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Αντικατάσταση μικροβιολογικών αναλύσεων χοιρινού κιμά με τη
χρήση αισθητήρων »**

ΕΥΓΕΝΙΑ Δ. ΣΠΥΡΕΛΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΝΥΧΑΣ Ε. ΓΕΩΡΓΙΟΣ- ΙΩΑΝΝΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

**Π.Μ.Σ. Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του
Ανθρώπου**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Αντικατάσταση μικροβιολογικών αναλύσεων χοιρινού κιμά με τη
χρήση αισθητήρων »**

ΕΥΓΕΝΙΑ Δ. ΣΠΥΡΕΛΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΝΥΧΑΣ Ε. ΓΕΩΡΓΙΟΣ- ΙΩΑΝΝΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Αντικατάσταση μικροβιολογικών αναλύσεων χοιρινού κιμά με τη
χρήση αισθητήρων »**

ΕΥΓΕΝΙΑ Δ. ΣΠΥΡΕΛΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΝΥΧΑΣ Ε. ΓΕΩΡΓΙΟΣ- ΙΩΑΝΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Νυχάς Γεώργιος- Ιωάννης Ε., Καθηγητής (επιβλέπων)

Πανάγου Ευστάθιος Ζ., Αν. Καθηγητής

Μαλλούχος Αθανάσιος, Λέκτορας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Την τελευταία δεκαετία, παρουσιάζεται ραγδαία αύξηση στην κατανάλωση αλλά και στην σπατάλη του κόκκινου κρέατος και ιδίως του χοιρινού. Για να αποφευχθεί η σπατάλη αυτή, κρίνεται αναγκαία η εύρεση σύγχρονων μεθόδων εκτίμησης του βαθμού αλλοίωσης και της διάρκειας ζωής του νωπού και επεξεργασμένου κρέατος. Μία μη επεμβατική και ταχεία μέθοδος που χρησιμοποιείται στον τομέα των τροφίμων είναι η πολυφασματική απεικόνιση. Βασικός στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων από πειράματα αλλοίωσης χοιρινού κιμά με τα δεδομένα που προέκυψαν από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης. Με βάση τα δεδομένα αυτά αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν μοντέλα εκμάθησης για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του βαθμού αλλοίωσης του κιμά. Επίσης, από τα μικροβιολογικά δεδομένα προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι της μικροβιακής ανάπτυξης της μικροχλωρίδας του χοιρινού κιμά και μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

Για τον σκοπό αυτό, διεξήχθησαν δύο ανεξάρτητα πειράματα συντήρησης χοιρινού κιμά σε διαφορετικές συνθήκες ατμόσφαιρας και θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκαν δύο διαφορετικοί τύποι συσκευασίας, αερόβιες και τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συσκευασίας (80% O₂- 20% CO₂), ενώ ο χοιρινός κιμάς συντηρήθηκε τόσο σε ισόθερμες συνθήκες (4, 8, 12 °C) όσο σε ένα δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ (περιοδική μεταξύ 4 °C, 8 °C και 12 °C), για συνολικό χρονικό διάστημα 15 ημερών. Δειγματοληψία πραγματοποιούταν σε τακτά χρονικά διαστήματα (14- 24 ώρες) σε δύο δείγματα ανά θερμοκρασιακό προφίλ, διεξάγονταν μικροβιολογικές αναλύσεις και εφαρμοζόταν η μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης.

Όσον αφορά στην δημιουργία των μοντέλων εκμάθησης, και για τις δύο περιπτώσεις συσκευασίας, τα δεδομένα που αξιοποιήθηκαν ως δείγματα εκπαίδευσης ήταν τα μικροβιολογικά και τα πολυφασματικά των 4, 8, 12 °C, ενώ ως δείγματα ελέγχου των μοντέλων ήταν αυτά του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ. Τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν σε κανονικές τυπικές μεταβλητές με μετασχηματισμό SNV. Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του μοντέλου εκτίμησης της ολικής μεσόφιλης μικροχλωρίδας (OMX) στον κιμά, ήταν η γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS- R). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές ορίστηκαν τα πολυφασματικά δεδομένα (n= 36) και ως εξαρτημένη ο πληθυσμός της OMX. Για την ποιοτική εκτίμηση της αλλοίωσης του χοιρινού κιμά, εφαρμόστηκε η διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS- DA) και η διακριτική ανάλυση

παραγόντων (DFA). Ορίστηκαν τρεις κλάσεις αλλοίωσης, βάσει της νομοθεσίας (ΕΚ 2073/2005), ως εξής: φρέσκο (κλάση 1) με OMX μικρότερη από 5.7 log CFU/g, οριακά φρέσκο (κλάση 2) με OMX μεταξύ 5.7 και 6.7 log CFU/g και αλλοιωμένο (κλάση 3) με OMX μεγαλύτερη από 6.7 log CFU/g. Επιπλέον, δημιουργήθηκε μοντέλο ταξινόμησης σε δύο κλάσεις, στο οποίο τα οριακά φρέσκα δείγματα ορίστηκαν ως φρέσκα ή αλλοιωμένα με γνώμονα την πιθανότητα ταξινόμησης στην αντίστοιχη κλάση (Bayesian prior). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές χρησιμοποιήθηκαν τα πολυφασματικά δεδομένα ($n=36$), και ως εξαρτημένες οι τρεις κλάσεις σε δυαδική μορφή (για το μοντέλο των τριών κλάσεων) και οι δύο κλάσεις (για το μοντέλο των δύο κλάσεων).

Από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και τα πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης φάνηκε ότι η θερμοκρασία και η ατμόσφαιρα επηρέασαν σε σημαντικό βαθμό τη μικροβιολογική αλλοίωση του χοιρινού κιμά. Στην περίπτωση της αερόβιας συσκευασίας, κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός στον κιμά ήταν βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, των οποίων η φάση προσαρμογής αυξήθηκε με την μείωση της θερμοκρασίας συντήρησης, με μεγαλύτερη τιμή τις 29.98 ώρες για τους 4 °C και μικρότερη τις 17.077 ώρες για τους 12 °C. Κατά την συντήρηση υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες κυριάρχησαν βακτήρια του είδους *Brochothrix thermosphacta* καθώς και τα οξυγαλακτικά βακτήρια ενώ η παρεμποδιστική δράση της θερμοκρασίας ήταν αυξημένη για τις θερμοκρασίες των 4 και 8 °C.

Τα μοντέλα PLS- R εμφάνισαν καλή επίδοση, καθώς κατά πρόβλεψη η τιμή του RME_p ήταν ίση με 1.017 και 0.892, για την αερόβια και την τροποποιημένη ατμόσφαιρα αντιστοίχως, ενώ οι αντίστοιχες τιμές του r_p ήταν 1.186 και 0.781. Από τους συντελεστές β φάνηκε ότι τα μήκη κύματος που επηρεάζουν την επίδοση του μοντέλου, και στις δύο συνθήκες συσκευασίας, ήταν αυτά που σχετίζονται με την μυογλοβίνη, την οξυμυογλοβίνη και τη μεταμυογλοβίνη.

Τα μοντέλα PLS- DA των τριών κατηγοριών αλλοίωσης πρόβλεψαν σε λιγότερο ικανοποιητικό βαθμό την κλάση του οριακά φρέσκου και η συνολική ακρίβεια κατά την πρόβλεψη ήταν 84.48 % για τον αέρα και 79.63 % για την τροποποιημένη ατμόσφαιρα. Ταυτόχρονα, τα μοντέλα διαχωρισμού των δύο κλάσεων παρουσίασαν συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 91.38 % για τον αέρα και 75.93 % για την τροποποιημένη ατμόσφαιρα, ενώ δεν αλληλοεπικαλύπτονταν οι δυο κλάσεις. Τέλος, τα μοντέλα DFA των τριών κλάσεων, εμφάνισαν κατά την πρόβλεψη συνολική ακρίβεια, 77.59 % για τον αέρα και 75.93 % για την τροποποιημένη ατμοσφαιρική συσκευασία και ταυτόχρονα μπόρεσαν να διαχωρίσουν σε καλύτερο βαθμό από τα μοντέλα PLS- DA την κλάση των οριακά φρέσκων από τις άλλες δύο.

Συμπερασματικά, φάνηκε ότι ο συνδυασμός της θερμοκρασίας ψύξης και των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών επηρέασε σε σημαντικό βαθμό στον ρυθμό αλλοίωσης των δειγμάτων χοιρινού κιμά κατά την συντήρηση του. Τα γραμμικά μοντέλα προσδιορισμού της OMX πρόβλεψαν σε ικανοποιητικό βαθμό τον πληθυσμό των μικροβίων, και ταυτόχρονα τα γραμμικά μοντέλα της ποιοτικής εκτίμησης της αλλοίωσης του κιμά διαχώρισαν ικανοποιητικά τις δύο κλάσεις. Περαιτέρω βελτίωση των μοντέλων πιθανόν να ήταν ορατή με αύξηση του αριθμού των δειγμάτων ενώ θα μπορούσε να γίνει διερεύνηση της σχέσης μικροβιακών και πολυφασματικών δεδομένων με τη χρήση μη- γραμμικών μοντέλων.

Λέξεις- κλειδιά: Χοιρινός κιμάς, αλλοίωση, πολυφασματική απεικόνιση, γραμμικά μοντέλα εκμάθησης.

ABSTRACT

In the last decade, the consumption and waste of fresh red meat, especially pork, have been rapidly increased. In an effort to avoid this massive foodwaste, food scientists are seeking for new rapid methods capable of accurately estimating the spoilage status and the shelf life of food products. Multispectral imaging is a promising, rapid, noninvasive optical technique, which is recently used in food science. The aim of this research was to investigate the correlation between conventional microbiological analysis and multi- spectral imaging in samples of stored minced pork. Qualitative and quantitative models based on multispectral imaging data were developed and evaluated, while growth kinetic parameters of the spoilage microorganisms were estimated and the effect of storage temperature on microbial growth rate was also assessed.

For this purpose, portions of minced pork were stored under isothermal (4, 8 and 12 °C) conditions and a dynamic temperature profile (periodic temperature changes from 4 to 12 °C) in aerobic and modified atmosphere packaging (80% O₂-20% CO₂). In each packaging type, two independent experiments were performed for a maximum time period of 15 days. At regular time intervals during storage, duplicate samples were subjected to microbiological analysis and MSI acquisition.

For the construction of all types of machine learning models, training samples were the microbiological and spectral data of 4, 8 and 12 °C, whereas model validation was performed using the data collected from the dynamic temperature profile. Data were pre- processed using Standard Normal Variate (SNV) transformation. The Partial Least Square- Regression (PLS-R) algorithm was used for the estimation of total viable counts (TVC) in pork samples. Independent and dependent variables were spectral data and TVC, respectively, in both types of packaging. In addition, for the qualitative assessing the deterioration of pork, Partial Least Square- Discriminant Analysis (PLS: DA) and Discriminant Factor Analysis (DFA) were performed. Three microbiological classes were defined according to the Commission Regulation (EC) No 2073/2005, as: fresh for TVC lower than 5.7 logCFU/g; semi- fresh for TVC between 5.7 and 6.7 log CFU/g; and spoiled for TVC higher than 6.7 log CFU/g. Moreover, models of two classes were built, in which semi- fresh class was classified in the class of fresh or spoiled based on Bayesian prior. Independent variables were spectral data (n= 36) and dependent variables (n=3) were the three classes of spoilage. For the model of two classes, dependent variables (n=2) were the two classes, fresh and spoiled.

Microbiological experiments and primary model results showed that storage and packaging conditions influenced the growth of microorganisms. In aerobic conditions, the specific spoilage organisms for the samples of stored pork were *Pseudomonas* spp., followed by *Brochothrix thermosphacta* and LAB. Additionally, the lag phase of *Pseudomonas* spp. was increased with decreasing temperature, with the longest lag time being 29.98 h during storage at 4 °C and the shortest being 17.077 h during storage at 12 °C. Reversibly, *Brochothrix thermosphacta* and LAB were dominant microorganisms in samples stored under MAP conditions and the impact of low temperatures (i.e. 4 and 8 °C) affected negatively the growth of those two bacterial groups.

PLS-R models exhibited good performance and the values of the correlation coefficient (r) and the root mean square error (RMSE) for the prediction were 0.892 and 1.017, for aerobic conditions, respectively, while for MAP conditions were 0.781 and 1.186, respectively. Furthermore, b-coefficients showed that the wavelengths with the highest effect on model performance, for both cases of packaging, corresponded to myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin.

PLS-DA models for the three classes exhibited poor performance with regard to the classification of semi-fresh samples, and the total accuracy of the prediction for aerobic conditions was 84.48 % and for MAP conditions 79.63 %. In contrast, total accuracy of prediction for the aerobic packaging model of two classes was increased to 91.38 %, whereas for MAP packaging was only 75.93 %. Meanwhile, DFA models of three classes exhibited good performance for all categories of spoilage, since total accuracy of performance determined to be 77.59 and 75.93% for aerobic and MAP storage, respectively.

In conclusion, the level of spoilage on pork samples was influenced by temperature and modified atmosphere packaging. Both linear models for qualitative and quantitative estimation of shelf life of minced pork were shown good performance. However, a higher number of training data could improve model performance and accuracy, while a non-linear algorithm could explain better the relation of microbiological to spectral data.

Keywords: Minced pork, spoilage, multispectral imaging (MSI), linear algorithms

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Γεώργιο- Ιωάννη Νυχά, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Επίσης, ιδιαίτερα ευχαριστώ τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου, του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για την καταλυτική συνεισφορά και την καθοδήγηση του κατά την επεξεργασία όλων των δεδομένων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες πρέπει να δοθούν στον λέκτορα κ. Αθανάσιο Μαλλούχο, του Εργαστηρίου Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, για τον χρόνο που αφιέρωσε για την μελέτη της εργασίας και τις συμβουλές του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερω την μετα- διδάκτορα κα Αλεξάνδρα Λιανού, του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, για την συνεργασία, την στήριξη και την καθοριστική βοήθεια καθ' όλο το διάστημα εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Δεν γίνεται να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και ιδίως την κα Πασχαλίτσα Τρυφινόπουλου, για την στήριξη και τις συμβουλές της.

Ευχαριστώ ιδιαίτερω την υποψήφια διδάκτορα Λεμονιά- Χριστίνα Φέγγου για τη συνεργασία, τη βοήθεια και την υπομονή που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων και της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία τις υποψήφιες διδάκτορες Ευανθία Μάνθου και Σταματούλα Μπονάτσου, καθώς και τους συμφοιτητές μου Ευάγγελο Δαγρέ και Λεωνίδα Σκαρλάτο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη (ελληνική και αγγλική)

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....I

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....III

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝVI

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....VIII

ΚΥΡΙΩΣ ΚΕΙΜΕΝΟ.....1

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....1

1.1. Σύσταση κρέατος και βασικά χαρακτηριστικά- ιδιότητες του1

1.2. Κατανάλωση χοιρινού κιμά και Νομοθεσία.....3

1.3. Αλλοίωση χοιρινού κιμά.....4

1.3.1. Μικροβιολογική αλλοίωση.....4

1.3.2. Χημική αλλοίωση.....9

1.4. Επίδραση εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την διαδικασία αλλοίωσης του κρέατος.....12

1.4.1. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του κρέατος κατά την συντήρηση και την διανομή του.....13

1.4.2. Επίδραση των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του κρέατος κατά την συντήρηση και την διανομή του16

1.5. Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας και μηχανική εκμάθηση.....19

1.6. Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis, MSI).....21

1.7. Σκοπός.....23

2. ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ.....24

2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.....24

2.2. Προετοιμασία δείγματος24

2.2.1. Συντήρηση χοιρινού κιμά υπό αερόβιες συνθήκες.....24

2.2.2. Συντήρηση χοιρινού κιμά υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες (Modified Atmosphere Packaging, MAP).....25

2.3.Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	25
2.4.Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων.....	26
2.5.Μέτρηση pH.....	27
2.6.Μέτρηση αερίων	27
2.7.Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (MultiSpectral Imaging,MSI)..	27
2.8.Ανάλυση δεδομένων.....	29
2.8.1. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης.....	29
2.8.2. Προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης.....	30
2.8.3. Μηχανική Εκμάθηση.....	31
2.8.3.1. Μοντέλα για εκτίμηση της OMX με τη γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square- Regression, PLS-R).....	31
2.8.3.2. Μοντέλα για εκτίμηση του βαθμού αλλοίωσης του χοιρινού κιμά με τη διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (Partial Least Square: Discriminant Analysis, PLS:DA).....	33
2.8.3.3. Μοντέλα για εκτίμηση του βαθμού αλλοίωσης του χοιρινού κιμά με τη χρήση της διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (Discriminant Function Analysis).....	35
2.8.3.4. Δείκτες αξιολόγησης.....	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	37
3.1.Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων	37
3.1.1. Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης.....	37
3.1.2. Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συντήρησης (MAP).....	40
3.2.Οργανοληπτικός έλεγχος	44
3.3.Αποτελέσματα μέτρησης pH	46
3.4.Αποτελέσματα μέτρησης αερίων.....	47
3.5.Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης	49
3.5.1. Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες.....	49
3.5.2. Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες	52

3.5.3. Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης της OMX	54
3.6. Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης.....	56
3.6.1. Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης.....	56
3.6.2. Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(Partial Least Square- Regression, PLS-R).....	57
3.6.3. Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).....	61
3.6.4. Αποτελέσματα από τη μέθοδο της διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (DFA).....	67
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	72
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<i>Σχήμα 1.1:</i> Παραγωγή χοιρινού κρέατος για το χρονικό διάστημα 2011- 2016, στον κόσμο (μπλε) και στην Ευρώπη (πορτοκαλί) (FAO, 2018).....	3
<i>Σχήμα 1.2:</i> Μεταβολή της θερμοκρασίας ψύξης μεταξύ της πρωτογενούς παραγωγής χοιρινού κρέατος και των σημείων πώλησης (Koutsoumanis and Taoukis, 2005).....	15
<i>Σχήμα 1.3:</i> Διάγραμμα αποφάσεων για το δίκτυο PAT (Nychas et al., 2016).....	20
<i>Σχήμα 1.4:</i> Μοντέλα μηχανικής εκμάθησης (MathWorks, 2016).....	21
<i>Σχήμα 2.1:</i> Απεικόνιση του εσωτερικού της σφαίρας του VideometerLab αριστερά) (Tsakanikas et al., 2015) και του εξωτερικού του.....	28
<i>Σχήμα 2.2:</i> Γεωμετρική απεικόνιση του νέου λανθάνοντα χώρου, όπως προκύπτει από την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων-γραμμικής παλινδρόμησης (Wold et al., 2001).....	31
<i>Σχήμα 2.3:</i> Απεικόνιση του διαχωρισμού δύο κλάσεων από μία γραμμική περιοχή με βάση τις νέες κύριες λανθάνουσες συνιστώσες (Brereton nad Lloyd, 2014).....	33
<i>Σχήμα 2.4:</i> Απεικόνιση υπό μορφή πίνακα των μεταβλητών X και Y κατά την διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)(Gromski et al., 2015).	34

- Σχήμα 3.1:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 4 °C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).37
- Σχήμα 3.2:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 8 °C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■)38
- Σχήμα 3.3:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX(●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).....38
- Σχήμα 3.4:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 12 °C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX(●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).....39
- Σχήμα 3.5:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 4 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).41
- Σχήμα 3.6:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 8 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).41
- Σχήμα 3.7:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες για την OMX(●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).....42
- Σχήμα 3.8:** Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 12 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).....42
- Σχήμα 3.9:** Μετρήσεις pH στα δείγματα συντήρησης χοιρινού κιμά υπό αερόβιες συνθήκες για τις θερμοκρασίες 4 (■), 8 (◆), 12 (●) °C και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (▲).....46
- Σχήμα 3.10:** Μετρήσεις pH στα δείγματα συντήρησης χοιρινού κιμά υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για τις θερμοκρασίες 4 (■), 8 (◆), 12 (●) °C και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (▲).....46
- Σχήμα 3.11:** Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στους 4 °C υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.....48
- Σχήμα 3.12:** Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στους 8 °C υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.....48
- Σχήμα 3.13:** Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.....49
- Σχήμα 3.14:** Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στους 12 °C υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.....49

- Σχήμα 3.15:** Παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994) (—) στα πειραματικά δεδομένα (♦) της OMX, για τα συντηρημένα δείγματα στους 4 °C (δεξιά καμπύλη) και στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (αριστερή καμπύλη) υπό αερόβιες συνθήκες.51
- Σχήμα 3.16.:** Παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994) (—) στα πειραματικά δεδομένα (♦) της OMX, για τα συντηρημένα δείγματα στους 4 οC (δεξιά καμπύλη) και στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (αριστερή καμπύλη) υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες.....54
- Σχήμα 3.17:** Επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{max} (h^{-1}), όπου (—) το δευτερογενές μοντέλο και (●) τα πειραματικά αποτελέσματα, για την συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες.....55
- Σχήμα 3.18:** Επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{max} (h^{-1}), όπου (—) το δευτερογενές μοντέλο και (●) τα πειραματικά αποτελέσματα, για την συντήρηση υπό τροποποιημένες συνθήκες συσκευασίας.....55
- Σχήμα 3.19:** Σύγκριση του φάσματος του φρέσκου δείγματος χοιρινού κιμά (—) με αυτό του αλλοιωμένου (—) για την περίπτωση συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες.....56
- Σχήμα 3.20:** Σύγκριση του φάσματος του φρέσκου δείγματος χοιρινού κιμά (—) με αυτό του αλλοιωμένου (—) για την περίπτωση συντήρησης υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας.57
- Σχήμα 3.21:** Διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων (—) με τις παρατηρούμενες (●) τιμές για την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες (αριστερά) και σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες (δεξιά). Οριοθέτηση ορίων αστοχίας πρόβλεψης στον ± 1 λογάριθμο (fail-safe:+1, fail-dangerous:-1).....58
- Σχήμα 3.22:** Οι συντελεστές β για τα δεδομένα των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων, για τα 18 φάσματα, στην περίπτωση των δειγμάτων που συντηρήθηκαν κάτω από αερόβιες συνθήκες (A) και από τροποποιημένη ατμόσφαιρα (B).....59
- Σχήμα 3.23:** Χωροταξική Απεικόνιση των 3 κλάσεων (φρέσκο:**F**, οριακά φρέσκο:**S-F**, αλλοιωμένο:**S**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των αερόβιων συνθηκών συντήρησης.....63
- Σχήμα 3.24:** Χωροταξική Απεικόνιση των 3 κλάσεων (φρέσκο:**F**, οριακά φρέσκο:**S-F**, αλλοιωμένο:**S**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συντήρησης.64
- Σχήμα 3.25:** Χωροταξική Απεικόνιση των 2 κλάσεων (φρέσκο:**F**, αλλοιωμένο: **S**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των αερόβιων συνθηκών συντήρησης.....66

Σχήμα 3.26: Χωροταξική Απεικόνιση των 2 κλάσεων (φρέσκο:**F**, αλλοιωμένο:**S**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συντήρησης.....66

Σχήμα 3.27: Απεικόνιση των 3 κλάσεων στα επίπεδα όπως ορίζονται από τους παράγοντες Fisher:1-2 κατά την ανάπτυξη και πρόβλεψη του μοντέλου, για τα δείγματα των αερόβιων συνθηκών συντήρησης, όπου φρέσκο ◦(ανάπτυξη), ●(πρόβλεψη), οριακά φρέσκο ◻(ανάπτυξη), ◼(πρόβλεψη), αλλοιωμένο ◊(ανάπτυξη), ◆(πρόβλεψη).....70

Σχήμα 3.28: Απεικόνιση των 3 κλάσεων στα επίπεδα όπως ορίζονται από τους παράγοντες Fisher:1-2 κατά την βαθμονόμηση και πρόβλεψη του μοντέλου, για τα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών, όπου φρέσκο ◦ (ανάπτυξη), ● (πρόβλεψη), οριακά φρέσκο ◻(ανάπτυξη), ◼ (πρόβλεψη), αλλοιωμένο ◊ (ανάπτυξη), ◆(πρόβλεψη).....70

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Χημική σύσταση του μυός ενός ενήλικου θηλαστικού μετά την κατάσταση της νεκρικής ακαμψίας (Nychas et al. 2007, Adams and Moss, 2008).....1

Πίνακας 1.2: Βακτήρια που συναντώνται σε φρέσκο κόκκινο κρέας και πουλερικά και υπό κενό. (Τροποποίηση από τους Nychas et al. 2007).....5

Πίνακας 1.3: Παράγωγα των *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* και LAB (Τροποποίηση από ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, 2013, Gram et al., 2002).....12

Πίνακας 1.4: Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί σε κόκκινο κρέας και πουλερικά, για του 0-4 °C, ανάλογα με το μίγμα αερίων της ατμόσφαιρας συσκευασίας. (Τροποποίηση από Nychas et al., 2007)17

Πίνακας 1.5: Συγκεντρωτικός πίνακας με υπάρχοντα μοντέλα μηχανικής εκμάθησης για το κόκκινο φρέσκο και επεξεργασμένο κρέας. (Τροποποίηση από Ropodi et al., 2016, Feng et al., 2018).....22

Πίνακας 3.1: Κινητικές παράμετροι μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες.....50

Πίνακας 3.2: Κινητικές παράμετροι μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες.52

Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) στα δείγματα του αέρα και των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών.....58

Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της εφαρμογή της διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα του αέρα για τις 3 κλάσεις αλλοίωσης.62

Πίνακας 3.5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας για τις 3 κλάσεις αλλοίωσης.....62

Πίνακας 3.6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα του αέρα για τις 2 κλάσεις αλλοίωσης.64

Πίνακας 3.7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας για τις 2 κλάσεις αλλοίωσης.....65

Πίνακας 3.8: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (DFA) στα δείγματα του αέρα για τις 3 κλάσεις αλλοίωσης.....67

Πίνακας 3.9: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (DFA) στα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας για τις 3 κλάσεις αλλοίωσης.....68

ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

λ : λανθάνουσα φάση προσαρμογής (lag phase) σε h

μ_{\max} : μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης σε h^{-1}

y_0 : αρχικός πληθυσμός μικροοργανισμού σε log CFU/g

y_{end} : τελικός πληθυσμός μικροοργανισμού σε log CFU/g

R^2 : τετραγωνικός συντελεστής παλινδρόμησης

T_{\min} : ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού σε $^{\circ}\text{C}$

h_0 : το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον

RMSE: Root Mean Square Error, ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος βαθμονόμησης

A_f : Accuracy factor, συντελεστής ακρίβειας

B_f : Bias factor, συντελεστής μεροληψίας

B : B- Coefficient, συντελεστής β

BW : B- Coefficient, συντελεστής β ισοσταθμισμένος

R : Reflectance, ανάκλαση σε nm

LVs: Latent Variables, Λανθάνουσες συνιστώσες

SD: Standard Deviation for samples

SNV: Standard Normal Variables

Θ : θερμοκρασία σε $^{\circ}\text{C}$

Δ -M: Δυναμικό θερμοκρασιακό μοντέλο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Σύσταση κρέατος και βασικά χαρακτηριστικά- ιδιότητες του

Ως κρέας ορίζεται η σάρκα και πιο συγκεκριμένα ο προς βρώση μυϊκός ιστός των θηλαστικών ζώων ή των πτηνών. Άλλοι ζωικοί ιστοί που καταναλώνονται, μετά από σχετική επεξεργασία, είναι το λίπος και ζωτικά όργανα, όπως το συκώτι, η καρδιά, η γλώσσα, το λεπτό έντερο και τα νεφρά (Adam and Moss, 2008, FAO, 2018). Θεωρείται βασική πηγή πρωτεΐνης για τον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελείται από 71% νερό, 22 % πρωτεΐνη, 6 % λίπος και 0.8 % τέφρα (δεδομένα για το χοιρινό άπαχο κρέας) (Nychas et al., 2007). Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα θρεπτικά συστατικά για την περίπτωση κρέατος- μυός που προέρχεται από ενήλικο θηλαστικό ζώο μετά το πέρας της φάσης της νεκρικής ακαμψίας (rigor mortis). Εκτός από τα απαραίτητα αμινοξέα, το μυϊκό κρέας εμπεριέχει βιταμίνες του συμπλόκου - Β(B1,B2,B6,B12), με μεγαλύτερη σε ποσοστό την θειαμίνη (B1) στο χοιρινό φιλέτο, ενώ ζωικά όργανα όπως το συκώτι και τα νεφρά, περιέχουν ένα μικρό αλλά σεβαστό ποσοστό σε Α, C, D και Ε βιταμίνες (FAO, 2018).

Πίνακας 1.1: Χημική σύσταση του μυός ενός ενήλικου θηλαστικού μετά την κατάσταση της νεκρικής ακαμψίας (Nychas et al., 2007, Adams and Moss, 2008).

<u>Συστατικό</u>	<u>% νωπού βάρους</u>
Νερό	75
Πρωτεΐνη	19
Ινώδης	11.5
Σαρκοπλασματικές	5.5
Συνδετικός ιστός και οργανίδια	2
Λίπος	2.5
Υδατάνθρακες και γαλακτικό οξύ	1.2
Γαλακτικό οξύ	0.90
Γλυκόζη 6-P	0.15
Γλυκογόνο	0.10
Γλυκόζη και ενδιάμεσα γλυκοζιτικής οδού	0.05
Διαλυτά μη πρωτεϊνούχα συστατικά	2.3
Άζωτο	1.65
Κρεατινίνη	0.55
Ινοσίνη	0.30
ATP, AMP	0.10
Αμινοξέα	0.35
Καρνοσίνη- Αρσενίνη	0.35

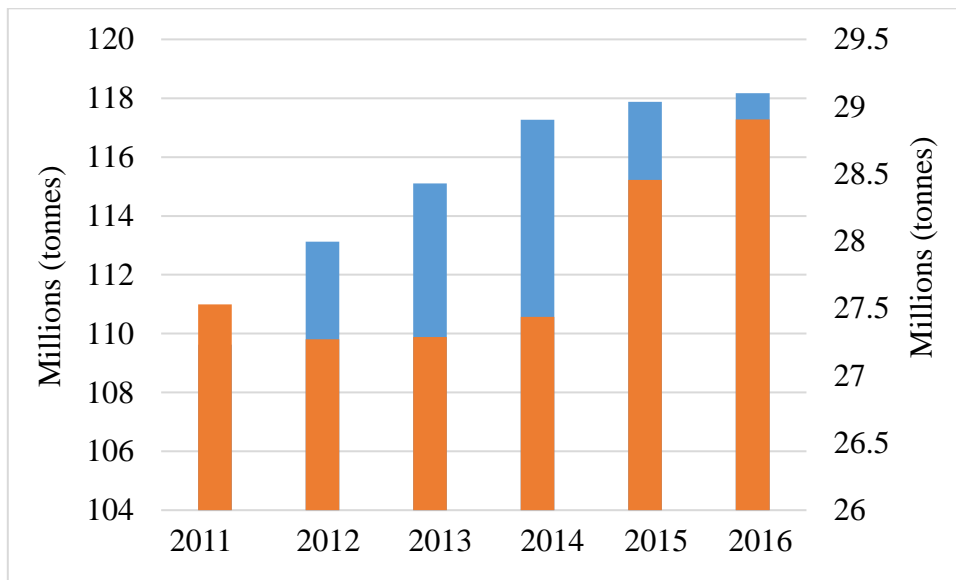
Ανόργανα στοιχεία	0.65
Ολικά διαλυτός φώσφορος	0.20
Κάλιο	0.35
Νάτριο	0.05
Μαγνήσιο	0.02
Άλλα μέταλλα (Σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος)	0.23
Βιταμίνες	Ίχνη-0.2

Όπως είναι γνωστό, η ενεργότητα του νερού στο νωπό κρέας είναι πολύ υψηλή, κοντά στο 0.99, κάτι που ευνοεί ιδιαίτερος την ανάπτυξη τόσο αλλοιωγόνων όσο και παθογόνων μικροοργανισμών (Russel and Gould, 1991, ICMSF, 2002). Ένα άλλο συστατικό, το οποίο ευθύνεται για το σκούρο κόκκινο χρώμα του νωπού κρέατος, είναι η πρωτεΐνη μυογλοβίνη. Παρουσία οξυγόνου η σαρκοπλασματική πρωτεΐνη αυτή παράγει την οξυμυογλοβίνη, η οποία προσδίδει στο κρέας το έντονο κόκκινο χρώμα (συνδεδεμένο με τον όρο του φρέσκου στο μυαλό των καταναλωτών) ενώ δεσμεύει και μεταφέρει τον σίδηρο Fe^{+2} . Επίσης, η οξειδωμένη μορφή των δύο πρωτεϊνών αυτών, η μεταμυογλοβίνη ευθύνεται για το καφέ χρώμα του κρέατος και οδηγεί στην απόρριψη του προϊόντος από το αγοραστικό κοινό (Nychas et al., 2007, Adams and Moss, 2008).

Με την πάροδο του πρώτου 24ώρου από την σφαγή του ζώου, το pH του κρέατος μειώνεται από το 7, τιμή αμέσως μετά την σφαγή, στο 5.6- 5.8. Η τελική τιμή του pH, εξαρτάται από την αρχική ποσότητα γλυκογόνου καθώς και της γλυκόζης, της 6-P-γλυκόζης, του γαλακτικού οξέος και των ενδιάμεσων της γλυκοζιτικής οδού. Πιο συγκεκριμένα, μέσω του γλυκολυτικού κύκλου, το υπάρχον γλυκογόνο διασπάται σε γαλακτικό οξύ, μειώνοντας αισθητά το pH (Dainty, 1996, Nychas et al., 2007). Η μείωση αυτή δρα συνεργιστικά με την ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος, όπως της γλυκόζης, ενισχύοντας την διαδικασία της πρωτεόλυσης και επομένως της αλλοίωσης του μυϊκού ιστού του κρέατος (Nychas and Tassou, 1997, Nychas et al., 2007). Όσον αφορά το δυναμικό οξειδοαναγωγής του κρέατος, υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ του εσωτερικού ενός κομματιού κρέατος (π.χ. φιλέτου) και της επιφάνειας επαφής του με τις ατμοσφαιρικές συνθήκες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το δυναμικό οξειδοαναγωγής του εσωτερικού ενός κρέατος με τιμή – 200 mV και αυτό του κιμά με τιμή + 225 mV (Adams and Moss, 2008).

1.2 Κατανάλωση χοιρινού κιμά και Νομοθεσία

Το χοιρινό κρέας κατέχει σημαντική θέση στη διατροφή των καταναλωτών, μαζί με άλλα είδη κρέατος, από αρχαιοτάτων χρόνων (Nam et al., 2010, Swatland, 2010). Θεωρείται δε το πιο διαδεδομένο είδος κρέατος στον κόσμο, με ποσοστό 36% σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωπονίας (FAO, 2012). Η συνεχής ζήτηση σε συνδυασμό με τον πληθυσμό της γης, εκτός από περιοχές που απέχουν από το χοιρινό για θρησκευτικούς ή πολιτιστικούς λόγους, έχει οδηγήσει την βιομηχανία παραγωγής χοιρινού κρέατος στην παραγωγή εκατομμυρίων τόνων με βάση το ακόλουθο γράφημα (FAO, 2018) (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1: Παραγωγή χοιρινού κρέατος για το χρονικό διάστημα 2011- 2016, στον κόσμο (μπλε) και στην Ευρώπη (πορτοκαλί) (FAO, 2018).

Λόγω της αυξημένης αυτής ζήτησης και κατανάλωσης τροφίμων, τόσο ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας όσο και η Ευρωπαϊκή Ένωση (μέσω της EFSA) έθεσαν τις κατευθυντήριες γραμμές σε παραγωγούς, διανομείς και εργαζόμενους σε χώρους εστίασης, με σκοπό να προστατέψουν τους πολίτες και να αποφευχθούν τροφογενείς επιδημίες (Nychas et al., 2016). Πιο συγκεκριμένα, μέσω των κανόνων υγιεινής στα τρόφιμα HACCP (EC 852/2004) και στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης (EC 853/2004), οι εμπλεκόμενοι με τον τομέα των Τροφίμων υποχρεούνται να τηρούν συγκεκριμένες απαιτήσεις ούτως ώστε να εξαιρεθούν πιθανοί φυσικοί, βιολογικοί (παθογόνοι μικροοργανισμοί, ιοί, παράσιτα) και χημικοί κίνδυνοι (μυκοτοξίνες, διοξίνες κ.α.) (EC 852/2004). Επιπλέον, τα μικροβιολογικά κριτήρια για τα τρόφιμα δίνονται στον κανονισμό EC 2073/2005, όπου για την OMX του κιμά είναι κάτω από $5 \cdot 10^5 \log \text{CFU/g}$ ικανοποιητική τιμή, μεταξύ $5 \cdot 10^5$

log CFU/g και $5 \cdot 10^6$ log CFU/g αποδεκτή, και πάνω από $5 \cdot 10^6$ log CFU/g μη ικανοποιητική (EC 2073/2005). Περαιτέρω, διερεύνηση έχει γίνει για τον τρόπο επίδρασης της θερμοκρασίας και του χρόνου συντήρησης στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, κατά την συντήρηση και διανομή των ζωικών τροφίμων (EFSA BIOHAZ Panel, 2014a) αλλά και μεταξύ σφαγής και τεμαχισμού προς παρασκευή κιμά (EFSA BIOHAZ Panel, 2014b). Ταυτόχρονα, πρόσφατα μελετήθηκε η ανάπτυξη των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε νωπό κρέας και κιμά για διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας αποθήκευσης- διανομής και χρόνου αποθήκευσης- διανομής (EFSA Journal, 2016), ώστε να αποφευχθεί η άσκοπη απόρριψη κρέατος και η οικονομική ζημία που αυτή αποφέρει στις βιομηχανίες κρέατος και παρασκευασμάτων (Nychas et al., 2008, Nychas et al., 2016).

1.3 Αλλοίωση χοιρινού κιμά

Ως αλλοιωμένο χαρακτηρίζεται το ζωικό τρόφιμο, του οποίου τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά έχουν αλλάξει κάνοντας το μη αποδεκτό από τους καταναλωτές. Η ανεπιθύμητη εμφάνιση και οσμή καθώς και η δημιουργία γλίτσας και άλλων χαρακτηριστικών, τα οποία αλλοιώνουν την γεύση και την δομή του κρέατος, αποτελούν τα βασικά κριτήρια για να κριθεί μη αποδεκτό προς κατανάλωση (Ellis and Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007). Η αλλοίωση του χοιρινού κιμά και γενικά των κρεάτων, οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη και δράση των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (Tsigarida and Nychas, 2001, Stopforth and Sofos et al., 2005) και στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μυϊκό ιστό του (Dainty 1996, Nychas and Tassou, 1997, Nychas et al., 2007).

1.3.1 Μικροβιολογική αλλοίωση

Ο ζωικός ιστός ενός ζώου και υγιούς θηλαστικού θεωρείται ότι είναι απαλλαγμένος από μικροοργανισμούς ή έστω ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο. Η επιμόλυνση του ιστού πραγματοποιείται κατά την σφαγή του ζώου, καθώς απουσιάζουν βασικοί παρεμποδιστικοί μηχανισμοί όπως το δέρμα, το τρίχωμα κ.α. (Nychas and Skandamis, 2005). Το μικροβιακό φορτίο των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, με τους οποίους επιμολύνεται ένας νωπός ζωικός μυϊκός ιστός, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την φυσική κατάσταση του ζώου, το είδος, την περίοδο σφαγής (EFSA Journal, 2016), τον τρόπο σφαγής, το επίπεδο υγιεινής, τον χώρο σφαγής και αποθήκευσης (GHPs), την θερμοκρασία ψύξης και την ατμόσφαιρα του σφαγείου κατά τις διαδικασίες αφαίρεσης κοκάλων, οργάνων και του τεμαχισμού (Gill C.O, 2005, Serraino et al., 2012, Stopforth and Sofos, 2005).

Από τον αρχικό μικροβιακό πληθυσμό αυτό, μόνο ένα μικρό ποσοστό, της τάξης του 10 % έχει την δυνατότητα να αναπτυχθεί υπό θερμοκρασία ψύξης και να φτάσει στο σημείο να αλλοιώσει επιτυχώς το ζωικό ιστό (Borch, 1996). Αν αυτό συμβεί τότε οι μικροοργανισμοί αυτοί θεωρείται ότι είναι οι ειδικοί ή κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί (SSO) στο συγκεκριμένο ζωικό ιστό (Gram et al. 2002, Nychas et al., 2008). Λόγω της χαμηλής θερμοκρασίας συντήρησης και διανομής, οι μικροοργανισμοί οι οποίοι συναντώνται στο νωπό κόκκινο κρέας είναι ψυχρόφιλα και ψυχοτροφικά βακτήρια. Πιο αναλυτικά, οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί αυτοί ανήκουν στα είδη *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactic Acid Bacteria* και *Enterobacteriaceae* (Πίνακας 1.2). Ωστόσο, η αλλοίωση του χοιρινού κιμά, συνήθως οφείλεται στους μικροοργανισμούς *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix thermosphacta* και LAB (Stopforth and Sofos, 2005, Adams and Moss, 2008, Nychas et al., 2008, Panagou et al, 2014).

Πίνακας 1.2: Βακτήρια που συναντώνται σε φρέσκο κόκκινο κρέας και πουλερικά υπό αερόβιες συνθήκες και υπό κενό.

<u>Βακτήρια</u>	<u>Gram αντίδραση</u>	<u>Φρέσκο</u>	<u>Συσκευασία υπό κενό</u>
<i>Achromobacter</i>	-	X	
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX	X
<i>Alcaligenes</i>	-	X	
<i>Alteromonas</i>	-	X	
<i>Arthrobacter</i>	-/+	X	
<i>Bacillus</i>	+	X	XX
<i>Brochothrix</i>	+	X	
<i>Campylobacter</i>	-	X	
<i>Carnobacterium</i>	+	X	XX
<i>Chromobacterium</i>	-	X	
<i>Citrobacter</i>	-	X	
<i>Clostridium</i>	+	X	
<i>Corynebactenum</i>	+	X	X

<i>Enterobacter</i>	-	X	X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	XX
<i>Escherichia</i>	-	X	
<i>Flavobacterium</i>	-	X	
<i>Hafnia</i>	-	X	
<i>Klebsiella</i>	-	X	
<i>Kluyvera</i>	-	X	
<i>Kocuria</i>	+	X	X
<i>Kurthia</i>	+	X	X
<i>Lactobacillus</i>	+	X	XX
<i>Lactococcus</i>	+	X	
<i>Leuconostoc</i>	+	X	X
<i>Listeria</i>	+	X	
<i>Microbacterium</i>	+	X	X
<i>Micrococcus</i>	+	X	X
<i>Moraxella</i>	-	XX	
<i>Paenibacillus</i>	+	X	
<i>Pantoea</i>	-	X	
<i>Proteus</i>	-	X	
<i>Providencia</i>	-	X	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX	
<i>Shewanella</i>	-	X	X
<i>Staphylococcus</i>	+	X	X
<i>Streptococcus</i>	+	X	
<i>Vibrio</i>	-	X	
<i>Weissella</i>	+	X	X
<i>Yersinia</i>	-	X	X

(Τροποποίηση από τους Nychas et al., 2007)

- *Pseudomonas* spp.:

Η ψευδομονάδα ανήκει στους ψυχρότροφους, αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς και έχει μορφολογία ραβδίων. Αποτελεί ένα ιδιαίτερα διαδεδομένο γένος βακτηρίων και είναι αερόβιο ή προαιρετικά αερόβιο μη σπορογόνο μικρόβιο. Τα πιο συνήθη είδη, που συναντώνται σε ζωικό ιστό και συνδέονται άμεσα με την αλλοίωση του, είναι οι *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. lundinensis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. cichorii*, *P. viridiflava* and *P. syringae* (Adams and Moss, 2008, Doulgeraki et al., 2012, Mohareb et al., 2015). Συνήθως, το στέλεχος που συναντάται στα πρώτα εικοσιτετράωρα αλλοίωσης ενός κόκκινου κρέατος είναι η *P. fluorescens*, ενώ κατά τα τελευταία στάδια αλλοίωσης του υπερτερεί η *P. fragi* (Lebert et al., 1998) ή οι *P. fragi* και *P. putida* (Doulgeraki and Nychas, 2013). Λόγω της ικανότητας του γένους *Pseudomonas* spp. να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες ψύξης, έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες προκειμένου να επιμηκυνθεί ο χρόνος ζωής του κρέατος, κατά την αποθήκευση του υπό ψύξη, σε αερόβιες (Li et al., 2006, Papadopoulou et al., 2011, Bruckner et al., 2012a) και σε αναερόβιες συνθήκες (Ammor et al., 2009, Dissing et al., 2013, Estelles-Lopez et al., 2017). Στην περίπτωση των αερόβιων συνθηκών, η *Pseudomonas* spp. φαίνεται να αποτελεί την ειδική- κυρίαρχο αλλοιωγόνο μικροχλωρίδα, με τελικό πληθυσμό μεγαλύτερο των 8 log CFU/g, σε χοιρινό κιμά (Papadopoulou et al., 2011, Dissing et al., 2013), χοιρινό φιλέτο (Koutsoumanis et al., 2006, Bruckner et al., 2012b) και σε άλλα είδη κόκκινου κρέατος, όπως το μοσχάρι (Ammor et al., 2009, Panagou et al., 2014), ακόμα και στις χαμηλές ισοθερμοκρασιακές συνθήκες (κάτω των 5 °C). Επίσης, αντίστοιχη συμπεριφορά ανάπτυξης της εμφανίζεται κατά την επώαση σε δυναμικά θερμοκρασιακά προφίλ, καθιστώντας την *Pseudomonas* spp. βασικό δείκτη αλλοίωσης για τον χοιρινό κιμά υπό αερόβιες συνθήκες (Bruckner et al., 2012b).

Βασική ένδειξη της αερόβιας αλλοίωσης ενός ζωικό ιστού από το γένος *Pseudomonas* είναι η δυσάρεστη μυρωδιά σήψης (putrid, sulphid), η δυσάρεστη γεύση και η εμφάνιση ενός πολυσακχαρίτη με γλοιώδη υφή στην εξωτερική επιφάνεια του ιστού (Ellis and Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007). Η υφή αυτή αποδίδεται στις μεταβολικές δραστηριότητες της *Pseudomonas* spp., όταν ο πληθυσμός της ξεπεράσει τους 7-8 log CFU/g (Nychas et al., 2008). Ταυτόχρονα, η δυσάρεστη οσμή στον αλλοιωμένο ιστό οφείλεται στην παραγωγή αιθυλεστέρων, αμμωνίας, θειούχων και δισουλφιδικών ενώσεων (Borch et al., 1996) από την *Pseudomonas* spp., λόγω του περιορισμού σε αμινοξέα και την έλλειψη ενώσεων μικρού μοριακού βάρους όπως η γλυκόζη (Nychas et al., 2007, 2008).

- *Brochothrix thermosphacta*:

Πρόκειται για ένα γένος Gram θετικών μη σπορογόνων ραβδίων, το οποίο βρέθηκε και απομονώθηκε από τον μυϊκό ιστό βοδινού και από τον περιβάλλοντα χώρο του σφαγείου, κατά την διαδικασία της αφαίρεσης των οστών, του δέρματος και της ψύξης του (Nychas et al., 2008). Η ανάπτυξη του κυρίως ευνοείται από την ύπαρξη τροποποιημένης ατμόσφαιρας ή κενού κατά την συντήρηση του κρέατος (Ercolini et al., 2006, Dissing et al., 2013, Remenant et al., 2015). Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι και στην περίπτωση της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες, ο ρυθμός ανάπτυξης του δεν παρεμποδίζεται σε χοιρινό και βόειο κρέας, ωστόσο δεν είναι όμοιος σε αυτόν της *Pseudomonas* spp. (Gill and Newton, 1977, Blixt and Borch, 2002, Koutsoumanis et al., 2006), η οποία θεωρείται όπως αναφέρθηκε παραπάνω η κύρια αλλοιωγόνος ομάδα για τις συγκεκριμένες συνθήκες συντήρησης. Επίσης, κατά την συντήρηση υπό κενό, δεν θεωρείται ως ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός λόγω της απότομης ανάπτυξης του γένους LAB (Jiang et al., 2010, Doulgeraki et al., 2012). Παρουσία υψηλού ποσοστού O₂ και χαμηλού CO₂, ο *Brochothrix thermosphacta* εμφανίζεται ως ο κύριος υπεύθυνος της αλλοίωσης κόκκινου κρέατος (Drosinos and Board, 1994, Lambropoulou et al., 1996, Estelles-Lopez et al., 2016) αλλά και κοτόπουλου (Höll et al., 2016). Ωστόσο, σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας χαμηλού ποσοστού O₂ και υψηλού CO₂, παρουσιάζονται τα LAB (*Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp.) ως κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός, (Kakouri and Nychas, 1994, Nychas et al., 2007).

Χαρακτηριστική οσμή αλλοιωμένου μυϊκού ιστού, από τον *Brochothrix thermosphacta*, είναι η υπόξινη ή οσμή χαλασμένου τυροκομικού προϊόντος, η οποία οφείλεται στην ακετοΐνη, στο διακετύλιο και στο οξικό οξύ. Κατά την συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες, μεταβολίζει ο μικροοργανισμός αυτός την γλυκόζη και την γαλακτόζη προς παραγωγή οργανικών οξέων, όπως οξικού, μυρμηκικού, ισοβουτυρικού οξέος, καθώς και αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα. Υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, και πιο συγκεκριμένα για υψηλό ποσοστό οξυγόνου, παράγεται από την γλυκόζη L- γαλακτικό και οξικό οξύ (Nychas et al., 2007, Dave and Ghaly, 2011).

- Οξύγαλακτικά βακτήρια, LAB:

Τα οξύγαλακτικά βακτήρια είναι θετικά κατά Gram, μη σπορογόνα, προαιρετικά αναερόβια και αυστηρά ζυμωτικά. Θεωρείται ετερογενής ομάδα μικροοργανισμών που απαρτίζεται από δύο βασικές υπο-ομάδες βακτηρίων, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά. Οι ομάδες αυτές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την μεταβολική οδό που ακολουθούν, καθώς η πρώτη μετατρέπει (μέσω του γλυκολυτικού σχήματος Embden- Meyerhof) την γλυκόζη σε γαλακτικό οξύ (90%) και

η δεύτερη την γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα (κύκλος φωσφοροπεντοζών) (Nychas et al., 2007, Παπαδοπούλου, 2013). Τα LAB αποτελούν βασική αλλοιωγόνο μικροχλωρίδα σε κόκκινο κρέας συντηρημένο, υπό κενό ή υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες με μεγάλο ποσοστό CO₂ (Dourgeraki et al., 2010, 2012, Pothakos et al., 2014). Τα γένη *Lactobacillus spp.*, *Carnobacterium spp.*, *Leuconostoc spp.* συναντώνται σε νωπό υπό ψύξη αλλοιωμένο κρέας (Labadie, 1999, Blixt and Borch, 2002, Mejlholm and Dalgaard, 2013), ωστόσο για κάθε στέλεχος τους η επίδραση της θερμοκρασίας και της τροποποιημένης ατμόσφαιρας φαίνεται να διαφοροποιείται (Johansson et al., 2011, Mejlholm and Dalgaard, 2013, Pothakos et al., 2015). Κατά την ψύξη χοιρινού μυϊκού ιστού υπό κενό, παρατηρείται απότομη αύξηση της ανάπτυξης των στελεχών *Carnobacterium sp./Car. divergens*, *Lactobacillus sakei* και *Lactococcus sp./Lc. piscium* (Jiang et al., 2010) καθώς και των *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus piscium* και *Lactobacillus algidus* (Pothakos et al., 2014). Επιπλέον, εμφανίζονται μεγάλοι πληθυσμοί των *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc spp.* υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα με χαμηλό ποσοστό οξυγόνου (Devlieghere et al., 1998, Ercolini et al., 2006, Doulgeraki et al., 2010), ενώ το στέλεχος *L.gasicomitatum* παρουσιάζει παραλλακτικότητα και κυριαρχεί έναντι των άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με υψηλό ποσοστό οξυγόνου (Björkroth et al., 2000, Vihavainen and Björkroth, 2009, Johansson et al., 2011, Pothakos et al., 2015).

Το οργανοληπτικό χαρακτηριστικό που μαρτυρά την επικράτηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, κατά την αλλοίωση μυϊκού κόκκινου κρέατος είναι η έντονη βουτυρώδης/ γλυκιά/ όξινη οσμή (Borch et al., 1996, Ellis and Goodacre, 2001). Η οσμή αυτή οφείλεται στην παραγωγή ακετοΐνης από τα οξυγαλακτικά βακτήρια και στην αυξημένη συγκέντρωση του οξικού οξέος κατά την στατική φάση ανάπτυξης τους (Blixt and Broch, 2002, Nychas et al., 2008). Σε ορισμένες περιπτώσεις συντήρησης υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα συσκευασίας, ανιχνεύονται και αλκοόλες σε δείγμα αλλοιωμένου κρέατος, όπως είναι η αιθανόλη και η προπανόλη (Freeman et al., 1976, Nychas et al., 2007, Dave and Ghaly, 2011).

1.3.2 Χημική αλλοίωση

Η χημική αλλοίωση ενός μυϊκού ιστού αποδίδεται κυρίως στην συνεργιστική δράση των ενδογενών ενζύμων του (πρωτεάσες, λιπάσες) με τα ένζυμα που προκύπτουν από τις μεταβολικές διαδικασίες των μικροοργανισμών, και ταυτόχρονα σε μη- ενζυμικές χημικές αντιδράσεις όπως η αυτοξείδωση των λιπαρών οξέων και η οξείδωση των πρωτεϊνών της αίμης (Dainty et al., 1996,

Belitz et al., 2009). Παρόλα αυτά, φαίνεται ότι η επίδραση των ενδογενών ενζύμων είναι αμελητέα συγκριτικά με την μεταβολική δράση των μικροοργανισμών (Nychas et al., 1998, Nychas et al., 2007), καθώς τα πρώτα συνεισφέρουν κυρίως στην πτώση του pH από το 7 στο 5.6-5.8 (γλυκόλυση) και στην παραγωγή ενώσεων μικρού μοριακού βάρους όπως η γλυκόζη (Dainty, 1996, Adams and Moss, 2008). Οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιούνται ως πρώτες ύλες για τις μεταβολικές διαδικασίες των μικροοργανισμών και διευκολύνουν την δράση των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων (Nychas and Tassou, 1997). Επίσης, κατά την συντήρηση του μυϊκού ιστού υπό αερόβιες συνθήκες, τα ακόρεστα λιπαρά οξέα του λιπώδους ιστού του κρέατος αντιδρούν με το οξυγόνο προς παραγωγή αλδευδών, κετονών και μικρής αλύσου λιπαρών οξέων, ενώσεων που προσδίδουν στον ιστό δυσάρεστη οσμή και γεύση (Nychas et al., 2007, Belitz et al., 2009, Dave and Ghaly, 2011). Παράλληλα, κατά την υδρόλυση οι πρωτεΐνες αίμης, όπως η μυογλοβίνη και η οξυμυογλοβίνη, οξειδώνονται προς σχηματισμό ενώσεων με Fe^{+3} , γεγονός που γίνεται αντιληπτό από την αλλαγή του χρωματισμού στον κόκκινο μυϊκό ιστό (Belitz et al., 2009).

- Μεταβολισμός αλλοιωγόνων μικροοργανισμών υπό αερόβιες συνθήκες:

Οι ενώσεις που συνδέονται ως επί το πλείστον με την αεροβική αλλοίωση του κόκκινου κρέατος από το γένος *Pseudomonas* spp., και προσδίδουν σ' αυτό την οσμή σήψης και το πράσινο στρώμα γλίτσας στην επιφάνεια του, είναι θειούχες ενώσεις όπως το υδρόθειο και το διμεθυλοσουλφίδιο (Freeman et al., 1976, Borch et al., 1996, Gram et al., 2002). Το δεύτερο σχηματίζεται απ' ευθείας από τα βακτήρια ενώ το υδρόθειο είναι αποτελέσματα του καταβολισμού της κυστεΐνης, προς πυροσταφυλικό οξύ (Nychas et al., 2007). Κατά την μεταβολική δραστηριότητα των *Pseudomonas* spp. στον ιστό, όταν η συγκέντρωση σε γλυκόζη, γλυκογόνο και γαλακτικό οξύ μειωθεί σημαντικά, προκύπτουν αμινοξέα, όπως η κυστεΐνη, η κυστίνη, η μεθειονίνη (Gill and Newton, 1977, Davis and Ghaly, 2011), αμίνες, με χαρακτηριστική την διαμίνη πουτρεσκίνη (Jay et al., 2005, Nychas et al., 2008) καθώς και αμμωνία (Schmitt and Schmidt-Lorenz, 1992, Drosinos and Board, 1994, Gram et al., 2002). Ταυτόχρονα, φαίνεται η προτίμηση των μικροοργανισμών αυτών στην κατανάλωση D- γλυκόζης και L- γαλακτικού οξέος κατά την συντήρηση μυϊκού ιστού σε αερόβιες συνθήκες ή σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας με υψηλό ποσοστό οξυγόνου (Gill and Newton, 1977, Drosinos et Board, 1994, Lambropoulou et al., 1996, Nychas and Tassou, 1997).

Κατά την ανάπτυξη του *Brochothrix thermosphacta* σε κόκκινο ή λευκό κρέας υπό αερόβιες συνθήκες, παρουσιάζεται αυξημένη συγκέντρωση ακετοΐνης, διακετυλίου (Dainty and Mackey, 1992, Dave and Ghaly, 2011) και οξικού οξέος (Borch et al., 1996, Gram et al., 2002), τα οποία

προσδίδουν στον αλλοιωμένο ιστό οσμή τυριού- όξινη. Επίσης, ως μεταβολικά προϊόντα του *Brochothrix thermosphacta* σε αλλοιωμένο κρέας καταγράφονται αλκοόλες, όπως είναι οι μεθανόλη, αιθανόλη, 3- μεθυλοβουτανόλη, καθώς και οξέα, π.χ. ισοβουτυρικό οξύ (Freeman et al., 1976, Nychas et al., 2007). Μυρωδιά όξινη και τυρώδης παρατηρείται και κατά την αύξηση του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων, λόγω των μεταβολικών παραγώγων ακετοΐνης και οξικού οξέος (Dainty and Mackey, 1992, Dainty et al., 1996, Gram et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι τα LAB, ιδίως οι *Leuconostoc*, παράγουν D- γαλακτικό οξύ και αμμωνία σε αλλοιωμένο δείγμα μοσχαρίσιου κιμά (Lambropoulou et al., 1996).

- Μεταβολισμός αλλοιωγόνων μικροοργανισμών υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες:

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, κατά την αλλοίωση κρέατος υπό τροποποιημένες συνθήκες, οι μικροοργανισμοί που ευνοούνται και κυριαρχούν στον μυϊκό ιστό είναι ο *Brochothrix thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Dainty, 1996, Doulgeraki et al., 2012). Το πρώτο γένος υπερिσχύει κατά την αλλοίωση μυϊκού ιστού σε συνθήκες υψηλού ποσοστού οξυγόνου- χαμηλού διοξειδίου του άνθρακα, παράγοντας ακετοΐνη, οξικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, μεθανόλη, αιθανόλη και L-γαλακτικό οξύ (Freeman et al., 1976, Kakouri and Nychas, 1994, Nychas et al., 2007). Αντίστροφα, σε συνθήκες κενού ή με χαμηλό ποσοστό οξυγόνου, οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται τάχιστα σε ζωικό ιστό είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, από τα οποία προκύπτουν L- και D- γαλακτικό οξύ καθώς και μία έντονη οσμή υπόξινη- χαλασμένου γαλακτοκομικού προϊόντος (Dainty and Mackey, 1992, Nychas et al., 2008). Επιπλέον, σε πειράματα αλλοίωσης σε μοσχαρίσιο ιστό υπό αναερόβιες συνθήκες, καταγράφηκε ότι το στέλεχος *Lactobacillus sake* L13, λόγω της περιορισμένης συγκέντρωσης γλυκόζης και του χαμηλού οξυγόνου, παρήγαγε υδρόθειο. Εν συνεχεία, η ένωση αυτή αντέδρασε με την μυογλοβίνη και προέκυψε η χημική ένωση σουλφομυογλοβίνη, η οποία προσδίδει στον ιστό το πράσινο χρώμα, κρίνοντας το μοσχαρίσιο κρέας οργανοληπτικά μη αποδεκτό από τους καταναλωτές (Borch et al. 1996, Ellis and Goodacre, 2001).

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 1.3), δίδονται επιγραμματικά ορισμένα από τα μεταβολικά προϊόντα για τις τρεις βασικές κατηγορίες αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε ζωικό μυϊκό ιστό, για αερόβιες και τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Πίνακας 1.3: Μεταβολίτες των *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* και LAB

Γένος	Μεταβολίτες	
	Αερόβιες	Τροποποιημένες ατμοσφαιρικές
<i>Pseudomonas</i> spp.	Διμεθυλοσουλφίδιο, Αμμωνία, Ακετοΐνη, Διακετύλιο, Αιθυλεστέρες, Μεθυλεστέρες, Πουτρεσκίνη, κυστεΐνη, κυστίνη, μεθειονίνη,	Γαλακτικό οξύ
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Γαλακτικό, οξικό, μυρμηκικό, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη, μεθανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη, βουτανάλη, βουτανοδιόλη	Γαλακτικό, οξικό, μυρμηκικό, ακετοΐνη, διακετύλιο, ισο-βουτανικό, ισοβαλερικό, μεθανόλη, 3-μεθυλοβουτανόλη, 3-μεθυλοβουτανάλη, 2,3-βουτανοδιόλη, λιπαρά οξέα
LAB	L-, D- γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη, υδρόθειο, λιπαρά οξέα	L-, D- γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ, ακετοΐνη, διακετύλιο, αιθανόλη, υδρόθειο, λιπαρά οξέα

(Τροποποίηση από Νυχάς, σημειώσεις Μικροβιολογίας Τροφίμων Ι).

1.4 Επίδραση εξωγενών παραγόντων στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών κατά την διαδικασία αλλοίωσης του κρέατος.

Για τον έλεγχο της ασφάλειας και της σταθερότητας των τροφίμων κατά την επεξεργασία τους στην βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιείται η θεωρία των εμποδίων (Hurdle technology) (Leistner et al., 1995), η οποία διατυπώθηκε από τον Leistner το 1978 (Leistner, 1978). Ως θεωρία εμποδίων ορίζεται ο βέλτιστος συνδυασμός εμποδίων- παραγόντων (ενδογενών, εξωτερικών, παραγωγικής διαδικασίας, συνδυαστικών παραγόντων) που αν εφαρμοστεί, εξασφαλίζει την μικροβιακή ασφάλεια και σταθερότητα των οργανοληπτικών, θρεπτικών χαρακτηριστικών του τροφίμου (Leistner, 2000) καθώς και τον χρόνο ημι- ζωής του (Kilcast and Subramaniam, 2000). Στόχος των μηχανισμών εμποδίων αυτών είναι η δημιουργία ενός εχθρικού περιβάλλοντος, βέλτιστη ένταση και χρονικό διάστημα εφαρμογής τους στο τρόφιμο, για τους μικροοργανισμούς (παθογόνους ή αλλοιωγόνους) ούτως ώστε να ανασταλεί η ανάπτυξη τους (μεγαλύτερος χρόνος προσαρμογής, lag- phase) ή να επιταχυνθεί ο ρυθμός θανάτωσης τους (Leistner, 2000).

Οι εξωγενείς παράγοντες που χρησιμοποιούνται μεμονωμένα, μεταξύ τους ή και συνδυαστικά με άλλους παράγοντες (όπως οι ενδογενείς: pH, ενεργότητα νερού, δυναμικό οξειδοαναγωγής, θρεπτικά συστατικά, αντιμικροβιακές ουσίες, βιολογικές δομές), είναι η θερμοκρασία, η παρουσία αερίων και η % σχετική υγρασία (Adams and Moss, 2008). Η δράση των δύο πρώτων παραγόντων έχει μελετηθεί επανειλημμένα, τόσο για την περίπτωση ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών,

όσο και για την αλλοίωση πολλών ειδών κρέατος (Gould, 1996, Labadie, 1999, Nychas et al., 2008, Dourgeraki et al., 2012, EFSA journal, 2016, Reid et al., 2017). Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης και της τροποποιημένης ατμόσφαιρας (O₂-CO₂:80-20) στην ανάπτυξη των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών του χοιρινού κιμά.

1.4.1 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη της μικρογλωρίδας του κρέατος κατά τη συντήρηση και την διανομή του

Η θερμοκρασία συντήρησης αποτελεί αναμφίβολα τον πιο σημαντικό εξωγενή παράγοντα παρεμπόδισης της ανάπτυξης παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε όλα τα είδη κρέατος Όπως προαναφέρθηκε, κατά την φάση αφαίρεσης του δέρματος, των οστών και των εσωτερικών οργάνων υπάρχει υψηλή πιθανότητα επιμόλυνσης του μυϊκού ιστού του κρέατος από μικροοργανισμούς (Borch et al., 1996, Koutsoumanis and Taoukis, 2005). Για να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανότητες επιμόλυνσης καθώς και η περαιτέρω αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* κ.α.), πρέπει σε όλα τα στάδια επεξεργασίας του νωπού κρέατος να τηρούνται οι κανόνες ορθής υγιεινής, όπως ορίζονται από τους 852/2004 και 853/2004 και να ελέγχεται διεξοδικά η θερμοκρασία του ιστού και του χώρου συντήρησης (Nychas et al., 2008, Mortimore and Wallace, 2013). Αντιστοίχως, για την παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ειδικών αλλοιωγόνων μικροοργανισμών (SSO) σε νωπό κρέατος υπό συντήρηση, υπάρχουν πολλές διαθέσιμες έρευνες (Nychas et al., 2008, Doulgeraki et al., 2012, EFSA journal, 2016) καθώς και νομοθεσία σχετικά με τα μικροβιολογικά κριτήρια, σε σφάγια και τεμαχισμένα είδη κρέατος (EC 2073/2005).

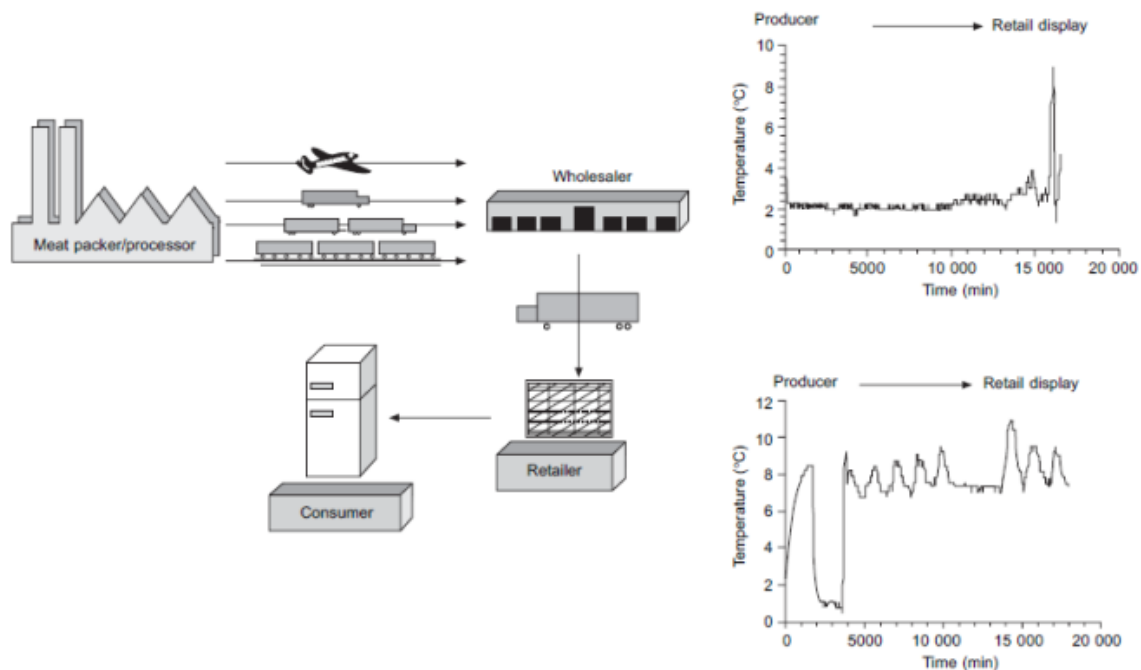
Σύμφωνα με τους Gill και Newton (1978), η φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών σε συνθήκες ψύξης κρέατος (θερμοκρασίας: -1 με 5 °C), επιμηκύνεται σε σημαντικό βαθμό, ενώ με την μετατροπή αυτή ευνοούνται περισσότερο οι ψυχρότροφοι και ψυχρόφιλοι μικροοργανισμοί. Συγκεκριμένα, στο συντηρημένο κρέας οι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί που συναντώνται είναι οι *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactic Acid Bacteria* και *Enterobacteriaceae* (Gill and Newton, 1978, Dainty, 1996, Gram et al., 2002). Σε συνθήκες αερόβιες, η *Pseudomonas* spp. είναι ο μικροοργανισμός που φαίνεται να κυριαρχεί έναντι των υπόλοιπων ψυχρότροφων σε μοσχαρίσιο και χοιρινό κρέας για θερμοκρασίες έως τους 20 °C (Lambert et al., 1991, Adams and Moss, 2008, Ammor et al., 2009, Papadopoulou et al., 2011, Panagou et al., 2014), ενώ για τιμές θερμοκρασίας

μεγαλύτερες των 30 °C ευνοείται σε μεγαλύτερο βαθμό η ανάπτυξη μεσόφιλων οργανισμών όπως οι *Acinetobacter* και *Enterobacteriaceae* (Gill and Newton, 1980). Επίσης, ανάπτυξη της *Pseudomonas* spp. παρουσιάζεται και στην περίπτωση ψύξης κρέατος, υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες, ωστόσο δεν θεωρείται ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός. Για τις συνθήκες συντήρησης αυτές, η αλλοίωση του κρέατος αποδίδεται στους *Brochothrix thermosphacta* και LAB, από τους οποίους αναπτύσσεται περισσότερο ο πρώτος όταν το ποσοστό του οξυγόνου είναι υψηλό και ο δεύτερος όταν είναι χαμηλό (Devlieghere et al., 1998, Ercolini et al., 2006, Esmer et al., 2011, Dissing et al., 2013).

Εκτός από τις συμβατικές μικροβιολογικές έρευνες, γίνεται μία προσπάθεια ερμηνείας της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αλλοίωση του κρέατος, κατά την συντήρηση και την διανομή του, με τη εφαρμογή της ποσοτικής μικροβιολογίας (McMeeking, 2007), Με βάση τα κινητικά μοντέλα κατά Arrhenius, Ratkowsky και των μοντέλων γ- παραγόντων (Zwietering et al., 1992), πολυωνυμικών και cardinal παραμέτρων (Ross and Dalgaard, 2003), μελετάται η επιρροή της θερμοκρασίας (ισοθερμοκρασιακά και δυναμικά) στην ανάπτυξη των κυριότερων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών σε πολλά είδη κρέατος (Koutsoumanis and Taoukis, 2005). Ο καθοριστικός ρόλος της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη της *Pseudomonas* spp. επιβεβαιώθηκε από την κατασκευή μοντέλου, που μελετούσε την επίδραση πολλών ενδογενών παραγόντων (pH, ενεργότητα νερού, περιεκτικότητα σε συστατικά) και της θερμοκρασίας για την αλλοίωση χοιρινού κρέατος και κοτόπουλου. Για την δημιουργία του μοντέλου αυτού χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από 5 ισοθερμοκρασιακά και 9 δυναμικά θερμοκρασιακά μοντέλα και η τελική πρόβλεψη για τον πληθυσμό της *Pseudomonas* spp. ($7.5 \log \text{CFU/g}$) στο χοιρινό συσχετιζόταν με τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρέατος (Bruckner, 2010, Bruckner et al., 2012, Bruckner et al., 2013). Επίσης, η καταλυτική δράση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*, LAB και *Enterobacteriaceae* σε μοσχαρίσιο και χοιρινό κρέας φαίνεται από το μοντέλο πρόβλεψης των Koutsoumanis et al. (2006). Το μοντέλο αυτό αποτελεί μία τροποποιημένη μορφή του Arrhenius (θερμοκρασία και pH), έχει δημιουργηθεί από δεδομένα για ισοθερμοκρασιακές συνθήκες και επιβεβαιωθεί με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και τον οργανοληπτικό έλεγχο από δυναμικά θερμοκρασιακά μοντέλα (Koutsoumanis et al., 2006). Μοντέλο έχει κατασκευαστεί και για την πρόβλεψη της ανάπτυξης στελεχών *P.fragi* και *P.fluorescens* συναρτήσει της θερμοκρασίας, του pH και της ενεργότητας νερού σε είδη κρέατος (Lebert et al., 1998). Συσχέτιση μεταξύ της θερμοκρασίας, που έχει εφαρμοστεί σε κοτόπουλο και πάπια, και του χρόνου ημι-ζώης του γίνεται μέσω ενός μοντέλου κατά Ratkowsky, όπου

προσδιορίζεται ο πληθυσμός των *Pseudomonas* spp. και *Enterobacteriaceae* (Pooni and Mead, 1984). Επιπλέον, έχει δημιουργηθεί μοντέλο πρόβλεψης της ανάπτυξης του *Brochothrix thermosphacta* βάσει της θερμοκρασίας, του pH και του % NaCl για διάφορα είδη νωπού και επεξεργασμένου κρέατος (McClure et al., 1993).

Με βάση τα παραπάνω, φαίνεται η αναγκαιότητα της τήρησης χαμηλών θερμοκρασιών κατά την πρώτη ψύξη του κρέατος (στο σφαγείο πριν την αφαίρεση του δέρματος), τον καθαρισμό και τεμαχισμό του, την αποθήκευση, την διανομή, την συντήρηση στα σημεία πώλησης και τέλος κατά την συντήρηση στο ψυγείο του καταναλωτή (Nychas et al., 2008). Για τον λόγο αυτό, η επιστημονική επιτροπή της EFSA κατασκεύασε μοντέλα πρόβλεψης της ανάπτυξης της *Pseudomonas* spp και των LAB σε μοσχαρίσιο, χοιρινό και κρέας κοτόπουλου, με απώτερο σκοπό να προσδιοριστεί ο βέλτιστος συνδυασμός θερμοκρασίας ψύξης- χρόνου αποθήκευσης και διανομής για την αποφυγή της σύντομης μικροβιακής αλλοίωσης του κρέατος (EFS Journal, 2016).



Σχήμα 1.2: Μεταβολή της θερμοκρασίας ψύξης μεταξύ της πρωτογενούς παραγωγής χοιρινού κρέατος και των σημείων πώλησης (Koutsoumanis and Taoukis, 2005).

1.4.2 Επίδραση των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας στην ανάπτυξη της μικρογλωρίδας του κρέατος κατά την συντήρηση και την διανομή του.

Ένας άλλος μηχανισμός εμποδίων, για την παρεμπόδιση της αλλοίωσης του υπό συντήρηση ζωικού ιστού, είναι η συσκευασία υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες. Με τον όρο αυτό, εννοείται οποιαδήποτε αλλαγή της ατμοσφαιρικής σύστασης αερίων (N_2 :78%, O_2 :21%, CO_2 :0.03%, ίχνη ευγενών αερίων), είτε αυτή δημιουργείται μηχανικά (active) είτε έμμεσα (passive), μέσω της χρήσης συσκευασίας με χαμηλή διαπερατότητα (Nychas and Skandamis, 2005, Zhou et al., 2010). Τα αέρια που χρησιμοποιούνται κατά κόρον, με διάφορους συνδυασμούς και συστάσεις, είναι το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το άζωτο (Kerry et al., 2006, Singh et al., 2011), ενώ αέριο μονοξείδιο του άνθρακα, διοξείδιο του θείου και χλωρίνη χρησιμοποιούνται μόνο σε πειραματικό στάδιο (Nychas and Skandamis, 2005). Κατάλληλο θεωρείται το μίγμα όπου μπορεί ταυτόχρονα, να προσφέρει μία εικόνα δελεαστική στον καταναλωτή, όπου για το μοσχαρίσιο και χοιρινό κρέας είναι το έντονο κόκκινο χρώμα (παρουσία οξυμυογλοβίνης), να έχει μεγάλη διάρκεια ημι-ζωής και να είναι ασφαλές (απουσία παθογόνων μικροοργανισμών) (Dixon and Kell, 1989, Labert et al., 1991, Labadie, 1999).

Η ύπαρξη οξυγόνου στην συσκευασία ενός νωπού κρέατος, υπό ψύξη, ευνοεί την ανάπτυξη των ψυχρόφιλων και αερόβιων μικροοργανισμών, όπως η *Pseudomonas* spp., και παράλληλα την διατήρηση του έντονου κόκκινου χρώματος του ιστού, μέσω της συνεχούς οξυγόνωσης του και την υψηλή συγκέντρωση οξυμυογλοβίνης (Nychas et al., 2008). Από την άλλη μεριά, αν η ατμόσφαιρα γύρω από τον ιστό περιέχει υψηλό ποσοστό οξυγόνου, ο ρυθμός της οξειδωσης των ακόρεστων λιπαρών οξέων του κρέατος είναι τάχιστος καθώς και ο ρυθμός της χημικής του αλλοίωσης (Belitz, 2009, Singh et al., 2011). Επίσης, με την μείωση του οξυγόνου μπορεί να επιμηκύνεται ο χρόνος ημι-ζωής του νωπού κρέατος, παρόλα αυτά διευκολύνονται οι μεταβολικές διαδικασίες των αναερόβιων μικροοργανισμών, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια και οι *Enterobacteriaceae* (Blixt and Borch, 2002, Doulgeraki et al., 2012).

Το διοξείδιο του άνθρακα έχει αποδειχθεί ότι επιβραδύνει τον ρυθμό ανάπτυξης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όπως είναι η *Pseudomonas* spp., και ταυτόχρονα ευνοεί την ανάπτυξη αναερόβιων μικροοργανισμών, όπως είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Το γεγονός αυτό είναι επιθυμητό καθόσον τα οξυγαλακτικά δρουν ανταγωνιστικά έναντι άλλων μικροοργανισμών και εμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, μέσω της παραγωγής νισίνης (Spelhaug and Harlander, 1989). Έχει βρεθεί ότι η παρεμποδιστική δράση του διοξειδίου του άνθρακα σε

μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται υπό αερόβιες συνθήκες, διαφέρει από αυτήν που έχει σε αναερόβιες, με χαρακτηριστικά παράδειγμα τους *Brochothrix thermosphacta* και *Enterobacteriaceae* (Nychas et al., 2007). Πολλοί αποδίδουν την αποτελεσματικότητα του διοξειδίου στο ότι είναι υδατοδιαλυτό και λιποδιαλυτό (Devlieghere and Debevere, 2000, Singh et al., 2011), γεγονός που του επιτρέπει να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να παρεμποδίσει τις μεταβολικές λειτουργίες των μικροοργανισμών (Lambert, 1999). Ένα μειονέκτημα της χρήσης του ως αέριο συσκευασίας, είναι ότι μεταβάλλεται εύκολα παρουσία του το έντονο κόκκινο χρώμα του νωπού κρέατος σε καφέ, κάνοντας το μη αποδεκτό για το αγοραστικό κοινό (Nychas and Skandamis, 2005).

Σε ότι αφορά το άζωτο, αυτό χρησιμοποιείται κυρίως για να αντικαταστήσει το οξυγόνο, με σκοπό να επιβραδυνθεί η οξείδωση των λιπών και παράλληλα να παραμορφωθούν οι συσκευασίες λόγω της υψηλής υγρασίας ή των πολλών λιπαρών στο κρέας. Το μίγμα που επιλέγεται ως εμπόδιο για την ανάπτυξη των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών, και κατ' επέκταση για την αλλοίωση του νωπού κρέατος, εξαρτάται και από τον είδος της συσκευασίας που χρησιμοποιείται, διότι η διαπερατότητα της επηρεάζει σημαντικά τις μεταβολικές διαδικασίες των μικροοργανισμών και επομένως την αλλοίωση του κρέατος (Koutsoumanis et al., 2008, McMillin, 2017) (Πίνακας 1.4). Επιπρόσθετα, καθοριστική είναι η εφαρμογή της τροποποιημένης ατμόσφαιρας συνδυαστικά με την θερμοκρασία, καθώς η χρήση πολλών μηχανισμών εμποδίων με μικρή ένταση μειώνει τις πιθανότητες ανάπτυξης μικροοργανισμών σε οποιοδήποτε τρόφιμο (Leistner, 1978).

Πίνακας 1.4: Ειδικοί αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί σε κόκκινο κρέας και πουλερικά, για του 0-4 °C, ανάλογα με το μίγμα αερίων της ατμόσφαιρας συσκευασίας.

<u><i>Μίγμα αερίων</i></u>	<u><i>Μικροοργανισμοί</i></u>
Αέρας	<i>Pseudomonas</i> spp.
<50 % CO₂ με O₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , LAB
50% CO₂	<i>Enterobacteriaceae</i> , LAB
>50 % CO₂ με O₂	<i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
100 % CO₂	LAB
Κενό	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Brochothrix thermosphacta</i>

(Τροποποίηση από Nychas et al., 2007)

Εκτός από την αλλαγή της υπάρχουσας ατμόσφαιρας, ευρέως διαδεδομένη είναι η συσκευασία νωπών κρεάτων υπό κενό (McMillin, 2017). Με την αφαίρεση του περιεχόμενου αέρα από την συσκευασία και το ερμητικό κλείσιμο της, επιτυγχάνονται εντός της σακούλας συνθήκες οξυγόνου μικρότερες του 1 % και διοξειδίου του άνθρακα 10- 20 %, οι οποίες αποδίδονται στην μεταβολική δραστηριότητα των μικροοργανισμών στον ιστό. Όπως στις τροποποιημένες ατμόσφαιρες, έτσι και στην συσκευασία υπό κενό δίνεται μεγάλη σημασία στην διαπερατότητα της μεμβράνης, η οποία πρέπει να είναι κάτω από $5 \text{ cc m}^{-2} \text{ day}^{-1} \text{ atm}^{-1}$ (Lambert, 1999).

Η συνεργιστική δράση της θερμοκρασίας και της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στην επιμήκυνση του χρόνου ημι- ζωής ενός νωπού κρέατος, επιβεβαιώνεται από την μείωση του πληθυσμού της *Pseudomonas* spp. και την απότομη αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων, κατά την συντήρηση κόκκινου κρέατος και κοτόπουλου σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ψύξης υπό αερόβιες, κενού, και με χαμηλή περιεκτικότητα σε O_2 (Adams and Huffman, 1972, Nychas and Tassou, 1997, Ercolini et al., 2006, Pothakos et al., 2014). Επιπλέον παρεμπόδιση της ανάπτυξης των αερόβιων πληθυσμών εμφανίζεται με την προσθήκη αιθέριων ελαίων, τα οποία δρουν ως αντιμικροβιακές ενώσεις, κατά την επώαση μοσχαρίσιου κρέατος σε διαφορετικές θερμοκρασίες υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες (Skandamis and Nychas, 2002, Ammor et al., 2009, Doulgeraki et al., 2010). Σύμφωνα με τους Skandamis και Nychas (2002), ο χρόνος ημι- ζωής του μοσχαρίσιου κιμά, με την εφαρμογή διαφορετικής θερμοκρασίας και την προσθήκη αιθέριων ελαίων, είναι ο ελάχιστος δυνατός στις αερόβιες και ο μέγιστος σε συνθήκες με 100% διοξείδιο του άνθρακα.

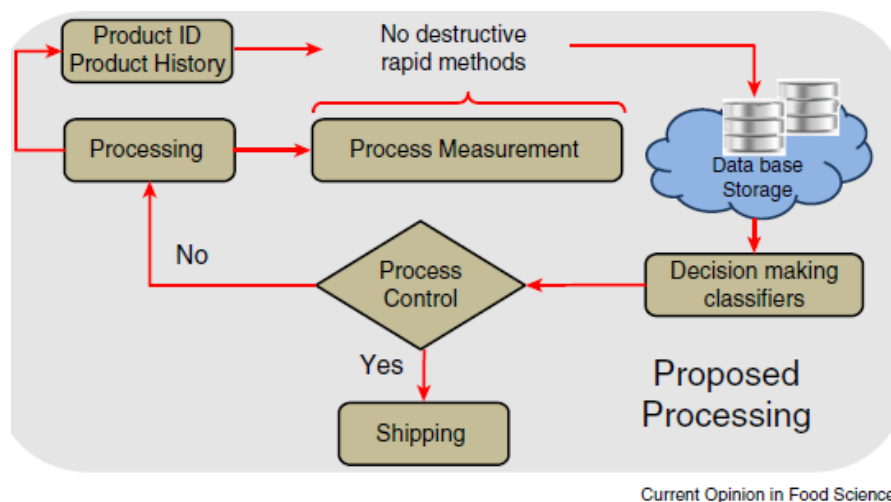
Στον αντίποδα, η παρεμπόδιση των αερόβιων αλλοιωγόνων μικροοργανισμών διευκολύνει ιδιαίτερος την ανάπτυξη ψυχότροφων παθογόνων μικροοργανισμών (*Listeria monocytogenes*, *Y. Enterocolitica*, *A. hydrophila*, *Clostridium* spp.), οι οποίοι θέτουν σε κίνδυνο την ασφάλεια των καταναλωτών (Mano, 2000, Nychas and Skandamis., 2005, Doulgeraki et al., 2012). Πιο αναλυτικά, η συντήρηση νωπού μυϊκού ιστού σε ατμόσφαιρα με μικρό ποσοστό οξυγόνου, ακόμα και για την θερμοκρασία των 3- 4 °C, επηρεάζει θετικά την ανάπτυξη και επικράτηση της *Y. enterocolitica* (Gill and Tan, 1980, Höll et al., 2016). Επίσης, δυνατή είναι η ανάπτυξη της *Aeromonas hydrophila* σε χοιρινό κρέας, το οποίο συντηρείται στον 1 °C και στους 7 °C, υπό συσκευασία με 100 % N_2 και με αέρα, κάτι που δεν συμβαίνει κατά την χρήση συσκευασίας με διοξείδιο του άνθρακα (Mano et al., 2000).

1.5 Σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης στο κρέας και μηχανική εκμάθηση

Όπως παρουσιάζεται και στο υπο- κεφάλαιο 1.2, η ζήτηση και η παραγωγή χοιρινού κρέατος ανέρχεται σε εκατομμύρια τόνους, ενώ ταυτόχρονα η Ευρωπαϊκή Επιτροπή της SANTE δηλώνει ότι η σπατάλη σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης ανά τον κόσμο αγγίζει τους 88 εκατομμύρια τόνους (FUSIONS- EU, 2016). Για να αποφευχθεί η άσκοπη σπατάλη κρέατος λόγω της γρήγορης αλλοίωσης του, κρίνεται αναγκαία η εύρεση σύγχρονων μεθόδων προσδιορισμού του μικροβιακού πληθυσμού, οι οποίες να είναι ταχείες, μη- επεμβατικές στο προς εξέταση κρέας και οικονομικές.

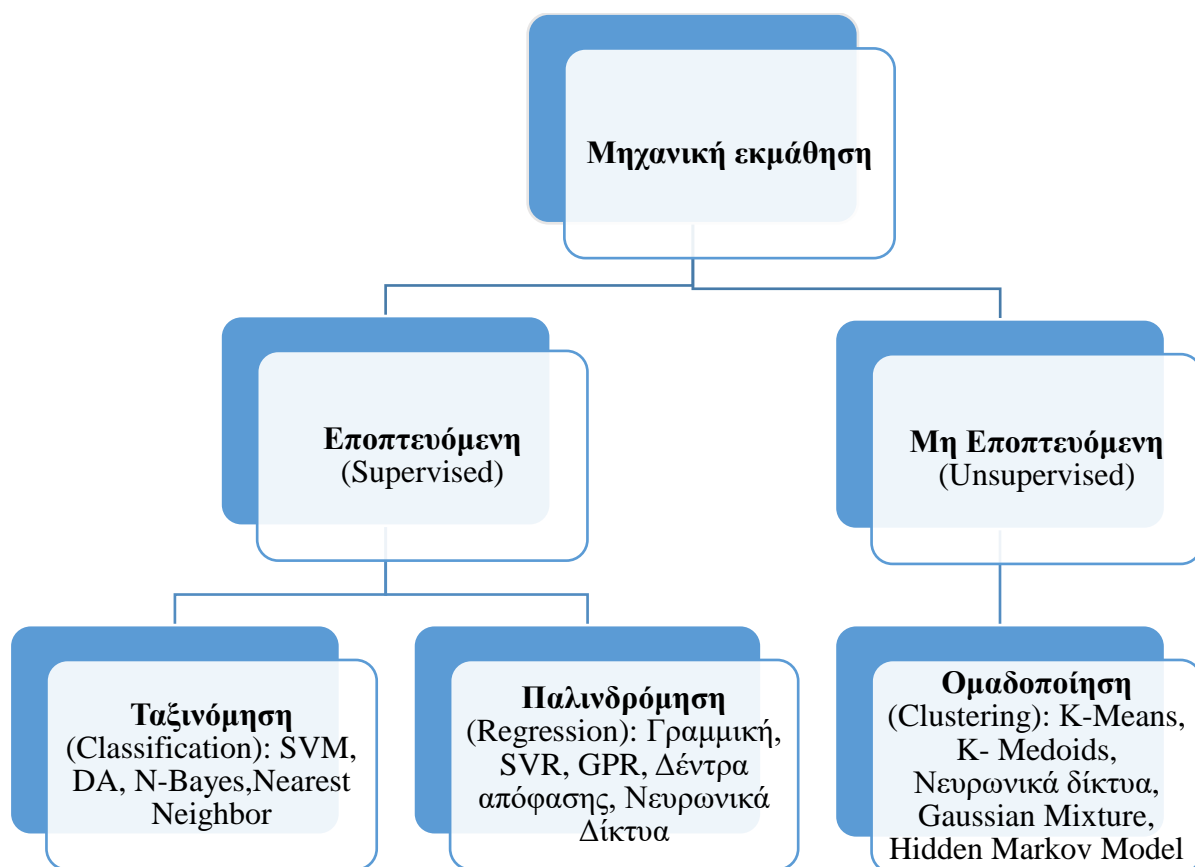
Το ισχύον σύστημα διαχείρισης ασφάλειας τροφίμων εστιάζει κυρίως στην επιθεώρηση και τον έλεγχο των πρώτων υλών και των τελικών τροφίμων μέσω χημικών και μικροβιολογικών αναλύσεων (Nychas et al., 2016). Οι αναλύσεις αυτές αποτελούνται κυρίως από συμβατικές μικροβιολογικές αναλύσεις, μοριακές τεχνικές (Multiplex PCR, Real- time PCR, NASBA), χημικές αναλύσεις και βιοχημικά τεστ (ELIZA, ATP- φωτομετρία κ.α.) (Mandal et al., 2011, Law et al., 2015). Όπως είναι αντιληπτό, πρόκειται για χρονοβόρες διαδικασίες, με υψηλό κόστος, οι οποίες απαιτούν εξειδικευμένο και έμπειρο προσωπικό και δεν είναι δυνατή η χρήση τους πάνω στην γραμμή παραγωγής (Papadopoulou et al., 2011, Nychas et al., 2016). Ειδικά για κάποιες μεθόδους, όπως είναι οι μοριακές τεχνικές, τα αποτελέσματα μπορεί να μην είναι αξιόπιστα, καθώς εστιάζουν στην ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών (Doulgeraki et al., 2012, Ropodi et al., 2016).

Για τους παραπάνω λόγους, μελετάται η δημιουργία ενός δικτύου PAT (Process Analytical Technology) (Σχήμα 1.3), το οποίο χρησιμοποιώντας αλγορίθμους- μοντέλα και βάσεις δεδομένων (χημικών, βιοχημικών, μικροβιολογικών) για τα αντίστοιχα τρόφιμα, θα μπορεί να μειώνει τον χρόνο αποδέσμευσης του προϊόντος, να καθοδηγεί- συμβουλεύει την ομάδα ασφάλειας τροφίμων και να ελέγχει το σύστημα διαχείρισης ασφάλειας, με προληπτικών ελέγχους (Nychas et al., 2016). Για την συλλογή δεδομένων και επομένως την κατασκευή του δικτύου, μέχρι στιγμής αξιοποιούνται μη επεμβατικές μέθοδοι φασματοσκοπίας (Sun, 2009, Ropodi, 2016), όπως είναι η φασματοσκοπία δονήσεων, (NIR- φθορισμού, Raman, FTIR) (Ellis et al., 2002, 2004, Ammor et al., 2009, Papadopoulou et al., 2011, Argyri et al., 2013, 2014), η υπερ- φασματική και η πολυφασματική απεικόνιση (Daugaard et al., 2010, Tsakanikas et al., 2016, Feng et al., 2018) και βιομημητικοί αισθητήρες οσμής και γεύσης (Limbo et al., 2010, Ropodi et al., 2016).



Σχήμα 1.3: Διάγραμμα αποφάσεων για το δίκτυο PAT (Nychas et al., 2016).

Με βάση τις συνδυαστικές βιβλιοθήκες δεδομένων, οι οποίες προκύπτουν από τις αναλυτικές μεθόδους που αναφέρθηκαν, κατασκευάζονται μηχανικοί αλγόριθμοι εκμάθησης (Brereton and Loyd, 2014, Gromski et al., 2015, MathWorks, 2016), που καθοδηγούν τον αισθητήρα ή το όργανο (Μηχανική εκμάθηση) στο να αποφασίσει αν μία παρτίδα τροφίμου είναι η αποδεκτή, είτε βάσει των απαιτήσεων της νομοθεσίας ή του αγοραστή (Ropodi et al., 2016). Οι βασικές κατηγορίες αλγορίθμων, που μπορούν να προκύψουν κατά την επεξεργασία των δεδομένων, φαίνονται στο ακόλουθο σχήμα και η επιλογή του κατάλληλου γίνεται ανάλογα με τον αριθμό των δεδομένων, την τάση τους και την περιττή πληροφορία που αυτά μπορεί να περιέχουν (MathWorks, 2016). Αξίζει να αναφερθεί ότι ήδη υπάρχουν στην βιβλιογραφία μελέτες με αλγορίθμους και για την αλλοίωση κρέατος, που έχουν προκύψει από, συνδυαστικά και μη, δεδομένα φασματοσκοπίας (Papadopoulou et al., 2011, Barbin et al., 2013, Panagou et al., 2014, Tsakanikas et al., 2015, Estelles-Lopez et al., 2016). Στόχος είναι τα επικυρωμένα μοντέλα να συμπεριληφθούν στο δίκτυο PAT ώστε να χρησιμοποιούνται από τον χρήστη του δικτύου για την ασφάλεια και την ποιότητα του προϊόντος, στην προκειμένη περίπτωση του κρέατος.



Σχήμα 1.4: Μοντέλα μηχανικής εκμάθησης (MathWorks, 2016).

1.6 Μέθοδος πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging Analysis, MSI)

Η πολυφασματική απεικόνιση αποτελεί ένα συνδυασμό της φασματοσκοπίας του ορατού, της φασματοσκοπίας δονήσεων (Vibrational spectroscopy) και της υπολογιστικής όρασης (Computer vision) (Rorodi et al., 2016). Κατά την εφαρμογή της φασματοσκοπίας του ορατού, η ενέργεια της δέσμης φωτός που απορροφάται από την επιφάνεια του τροφίμου έχει ως αποτέλεσμα τις μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων στα ενεργειακά επίπεδα του ατόμου (Ebbing and Gammon, 2002). Με τον όρο της φασματοσκοπίας δονήσεων εννοείται η αναλυτική μέθοδος που προσδιορίζει την ενέργεια, που απορροφάται από τα δονούμενα- περιστρεφόμενα μόρια, κατά την εφαρμογή μίας δέσμης φωτός πάνω στο υπό εξέταση δείγμα (Dufour, 2009). Η υπολογιστική όραση πρακτικά αξιοποιεί το φάσμα του ορατού φωτός (350- 800 nm) για να αναπαρασταθεί το σχήμα, το χρώμα, η υφή και το μέγεθος του δείγματος τροφίμου. Λόγω του ότι οι δεσμοί των ενώσεων, που συναντώνται στα τρόφιμα, είναι ως επί το πλείστον δεσμοί C- H (οργανικές ενώσεις), N- H (πρωτεΐνες, αμινοξέα) και O-H (νερό, λίπος, υδατάνθρακες), το εύρος του φάσματος που

χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των τροφίμων είναι τα 380-1000 nm (Dufour, 2009, Sun, 2009, Elmascry et al., 2012, Gowen et al., 2015). Η οπτική μέθοδος αυτή θεωρείται μία φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, μη καταστροφική ως προς το προϊόν, ταχεία και μη τοξική. Μπορεί να ενσωματωθεί εύκολα στο τέλος της συνεχούς γραμμής παραγωγής μίας μονάδας επεξεργασίας κρέατων και συμφέρει οικονομικά, καθώς σε βάθος χρόνου μειώνει τα κόστη που αφορούν την εκμάθηση του προσωπικού, τα δείγματα που εξετάζονται, τις παρτίδες που αποσύρονται ή δεσμεύονται κ.α. (Nychas et al., 2016, Feng et al., 2018).

Η διάταξη ενός οργάνου πολυφασματικής απεικόνισης (Σχήμα 2.1) περιλαμβάνει μία φωτεινή πηγή (δέσμη φωτός), ένα αισθητήρα φωτός, ένα φασματογράφο, μία φωτογραφική μηχανή (συνήθως κάμερα μεγάλης ευκρίνειας), ένα μετατροπέα σήματος καθώς και έναν υπολογιστή με εγκατεστημένο λογισμικό για επεξεργασία της εικόνας (Tsakanikas et al., 2016, Feng et al., 2018). Μετά από την απεικόνιση του τροφίμου πρέπει να γίνει επεξεργασία της εικόνας και να οριστεί η περιοχή ενδιαφέροντος του (ROI), καθώς η εικόνα μπορεί να περιέχει τμήματα από τον περιβάλλοντα χώρο, το τρυβλίο, λίπος κ.α. (Carstensen et al., 2006, Daugaard et al., 2010, Carstensen et al. 2013). Τα τελικά δεδομένα που προκύπτουν από την μέθοδο αυτή, περιέχουν πληροφορία από κάθε φάσμα και αξιοποιούνται αντίστοιχα με άλλα δεδομένα φασματοσκοπίας, δημιουργώντας μοντέλα πρόβλεψης αλλοίωσης ή νοθείας διαφόρων ειδών κρέατος μέσω της χημειομετρίας (Σχήμα 1.4), με τα οποία μπορεί να εκπαιδευτεί το όργανο. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν διαθέσιμα πολλά μοντέλα εκτίμησης της αλλοίωσης, της OMX, της περιεκτικότητας σε νερό, λίπος κ.α. για κόκκινο φρέσκο και επεξεργασμένο κρέας, τα οποία προήλθαν από δεδομένα υπερ- και πολυφασματικής απεικόνισης (Huang et al., 2014, Ropodi et al., 2015, Feng et al., 2018)(Πίνακας 1.5).

Πίνακας 1.5: Συγκεντρωτικός πίνακας με υπάρχοντα μοντέλα μηχανικής εκμάθησης για το κόκκινο φρέσκο και επεξεργασμένο κρέας.

<u>Είδος κρέατος</u>	<u>Εφαρμογή Πρόβλεψης</u>	<u>Εύρος μήκους κύματος (nm)</u>	<u>Αλγόριθμος</u>	<u>Ακρίβεια</u>	<u>Πηγή</u>
Μοσχάρι	OMX	405-970	PLSR	$R^2 = 0.78$	Panagou et al., 2014
	OMX	405-970	SVR	$R^2 = 0.98$	Tsakanikas et al., 2016

	Αφαίρεση λίπους	405-970	Linear Regression	$R^2=0.95$	Tsakanikas et al., 2015
Μοσχαρίσιο κιμάς	Νοθεία με κρέας αλόγου	405- 970	Two step SVM	95.31%	Ropodi et al., 2017
Χοιρινός κιμάς	ΟΜΧ	405-970	PLSR	$R^2=0.83$	Dissing et al., 2013
	Νοθεία με μοσχαρίσιο κιμά	405- 970	PLS-DA	98.48 %	Ropodi et al., 2015
Λουκάνικο	APCA	405-970	PLSR	$R^2= 0.89$	Ma et al., 2014
Χοιρινό	Βαθμός φρεσκάδας	430-960	Bp-AdaBoost	$R^2=0.93$	Li et al., 2015
	Αφαίρεση λίπους	405-970	Linear Regression	$R^2= 0.97$	Tsakanikas et al., 2015
Κόκκινο κρέας (πολλά διαφορετικά είδη)	Κόκκινο Χρώμα	430–970	PCA vs. ANNs, SVM	-	Sharifzadeh et al., 2014

(Τροποποίηση από Ropodi et al., 2016, Feng et al., 2018).

1.7 Σκοπός.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία γίνεται μία προσπάθεια συσχέτισης των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων, από πειράματα αλλοίωσης χοιρινού κιμά, με τα δεδομένα που προκύπτουν από την σύγχρονη μέθοδο πολυφασματικής απεικόνισης, με κύριο στόχο την έγκαιρη ανίχνευση της αλλοίωσης του κιμά υπό αερόβιες και τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των συμβατικών μικροβιολογικών αναλύσεων αξιοποιούνται για την δημιουργία πρωτογενών κινητικών μοντέλων ανάπτυξης και τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων της ενδογενούς μικροχλωρίδας του υπό συντήρηση χοιρινού κιμά.

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ:

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Η συντήρηση του χοιρινού κιμά πραγματοποιήθηκε σε αερόβιες συνθήκες καθώς και σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας, όπου η τροποποιημένη ατμόσφαιρα αποτελούταν από 80% O₂ και 20% CO₂. Για να εξετασθεί η συμπεριφορά των μικροοργανισμών του χοιρινού κιμά σε αερόβιες και τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις πειραμάτων σε κάθε μία από τις δύο περιπτώσεις συσκευασίας. Ως θερμοκρασίες επώασης των δειγμάτων επιλέχθηκαν οι 4, 8 και 12 °C καθώς και ένα μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (4 °C για 8 ώρες, 8 °C για 8 ώρες και 12 °C για 8 ώρες). Τα πειράματα συντήρησης χοιρινού κιμά στις αερόβιες συνθήκες διήρκησαν 302 ώρες ενώ αυτά στις τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες 328 ώρες.

Τις πρώτες τέσσερις μέρες του κάθε πειράματος, η δειγματοληψία γινόταν κάθε 10 και 14 ώρες, ενώ στη συνέχεια ανά 24ώρο. Για να εφαρμοστεί στο δείγμα η σύγχρονη ταχεία μέθοδος της πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging) τοποθετούταν μέρος του αρχικού δείγματος σε ένα τρυβλίο. Επίσης, κατά την δειγματοληψία εξετάζονταν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (οσμή και όψη) του συντηρημένου χοιρινού κιμά. Στα πειράματα με την συντήρηση χοιρινού κιμά υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες πριν ανοιχθεί η συσκευασία γινόταν μέτρηση των αερίων στο κάθε δείγμα. Παράλληλα με την μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων λαμβάνονταν οι απεικονίσεις από το όργανο Videometer σε 18 μήκη κύματος και μετριόταν το pH του αραιωμένου δείγματος.

2.2 Προετοιμασία δείγματος

Χοιρινός κιμάς ελληνικής προέλευσης παραλήφθηκε αμέσως μετά από τον τεμαχισμό στην αλεστική μηχανή του κρεοπώλη (Νάξια Επιλογή, Αρτέμης Περιστεράκης, Κ.Πετράλωνα, Αθήνα) και μεταφέρθηκε εντός 15 λεπτών στον χώρο του εργαστηρίου. Πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε πείραμα το χοιρινό κρέας προερχόταν από διαφορετικό σφαγείο και ότι η σφαγή του χοίρου είχε πραγματοποιηθεί την προηγούμενη μέρα.

2.2.1 Συντήρηση χοιρινού κιμά υπό αερόβιες συνθήκες

Μετά την παραλαβή του κιμά, ζυγίζονταν σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας ± 0.001 (BEL ENGINEERING, EiB, Italy) μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Telstar Bio II-Advance 4, AZBIL

TELSTAR Technologies S.L.U., Spain) ποσότητα χοιρινού κιμά ίση με 100 g και ετοιμάζονταν μπιφτέκια. Τα χοιρινά μπιφτέκια των 100 g τοποθετούνταν ανά δύο σε δίσκο πολυστυρενίου, ο οποίος συσκευαζόταν με διάφανη μεμβράνη πολυαιθυλενίου οικιακής χρήσης διαπερατή στο O₂, κάτω από ασηπτικές συνθήκες και τοποθετούνταν στον αντίστοιχους κλιβάνους επώασης (MIR-153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan).

2.2.2 Συντήρηση χοιρινού κιμά υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες (Modified Atmosphere Packaging, MAP)

Στην περίπτωση της συσκευασίας υπό τροποποιημένες ατμόσφαιρες, ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία ζύγισης και αποθήκευσης με αυτή της υποενότητας 2.2.1. Για την συσκευασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι πολυστυρενίου και σακούλες διπλής όψεως πλάτος 25cm, πάχος 90 μm, διαπερατότητα στους 20°C και 50% rH, ca. 25, 90, and 6 cm³ m⁻² day⁻¹ bar⁻¹ [1 bar= 10⁵ Pa] for CO₂, O₂, και N₂ (Flexopack S.A., Athens). Για την τροποποίηση του αέρα στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα συσκευασίας Henkovac 1900 (Howden Food Equipment B.V., The Netherlands) και η φιάλη αερίου μίγματος 80% O₂ και 20% CO₂ (Freshmix Co., BUSE GAS A.E., Σχηματάρι, Αττική). Τα δείγματα τοποθετούνταν ανά 2 σε κάθε δίσκο, ο δίσκος μέσα στην σακούλα και εν συνεχεία η σακούλα μέσα στο Henkovac 1900 όπου γινόταν συσκευασία υπό κενό και ακολούθως μεταγγίζονταν αυτομάτως στην σακούλα το μίγμα αερίων O₂-CO₂ (80/20).

2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Κατά τις μικροβιολογικές αναλύσεις, παραλαμβάνονταν 25 g από κάθε δείγμα ασηπτικώς, τοποθετούνταν σε ειδική σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, France) και προστίθεντο 225 ml αλατούχου διαλύματος Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K.). Η σακούλα με το αραιωμένο δείγμα τοποθετούταν στο Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) και μετά από 60 δευτερόλεπτα παραλαμβάνονταν για να γίνουν στην συνέχεια οι διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και ο εμβολιασμός των τριβλίων με τα αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα. Οι μικροοργανισμοί που προσδιορίστηκαν στα δείγματα χοιρινού κιμά ήταν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), είδη του γένους *Pseudomonas* (*Pseudomonas* spp.), το βακτήριο *Brochothrix thermosphacta* και τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB). Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τους ενδογενείς πληθυσμούς μικροοργανισμών στον χοιρινό κιμά (Koutsoumanis et al., 2008, Papadopoulou et al., 2011, Doulgeraki et al., 2012, Dissing et al., 2013, Παπαδοπούλου, 2013) και μετά από μία σειρά προ-πειραμάτων επιλέχθηκαν για την καταμέτρηση

των μικροοργανισμών στα δείγματα του συντηρημένου χοιρινού κιμά σε κάθε δειγματοληψία, τα εξής θρεπτικά υλικά:

- Plate Count Agar (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση της OMX. Η επώαση γινόταν στους 25 °C για 3 ημέρες.
- *Pseudomonas* Agar Base (LAB108, LAB M., U.K.) με την προσθήκη του επιλεκτικού αντιβιοτικού Cetrимide-Fusidin-Cephaloridine (Modified C.F.C X108, LAB M, UK), για την καταμέτρηση των *Pseudomonas* spp.. Η επώαση γινόταν στους 25 °C για 2 ημέρες.
- Streptomycin Thallous Acetate-Actidione Agar Base, STAA (Ref. 4020792, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy) με την προσθήκη αντιβιοτικού (Ref. 4240052, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση του *Br. thermosphacta*. Η επώαση γινόταν στους 25 °C για 2 ημέρες.
- Επιλεκτικό υπόστρωμα de Man, Rogosa and Sharpe agar, MRS (Ref.401728S2, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy), για την καταμέτρηση των LAB. Η επώαση γινόταν στους 30 °C για 3 ημέρες.

Κατά την επιφανειακή επίστρωση, στα τρυβλία με τα αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα PCA, CFC και STAA γινόταν εμβολιασμός με 100 μl αραιωμένου δείγματος ενώ κατά την ενσωμάτωση, στα τρυβλία με MRS θρεπτικό μέσο το εμβόλιο ήταν στα 1000 μl. Μετά τον εμβολιασμό, τα τρυβλία τοποθετούνταν στους επωαστικούς κλιβάνους και μετά το πέρας του διαστήματος επώασης γινόταν καταμέτρηση των αποικιών.

2.4 Οργανοληπτικός έλεγχος δειγμάτων

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των δειγμάτων γινόταν σε κάθε πείραμα, στην αρχή της κάθε δειγματοληψίας, από πάνελ δύο ατόμων (άτομα του εργαστηρίου), βάσει των Gill και Jeremiah (1991). Ο σκοπός διεξαγωγής του ελέγχου αυτού ήταν εκπαιδευτικός και για τον λόγο αυτό δεν συγκροτήθηκε μεγάλη κλίμακας εκπαιδευμένο πάνελ. Ο χώρος διεξαγωγής των ελέγχων είχε σταθερή θερμοκρασία, κοντά στους 20 °C, ο φωτισμός ήταν τεχνητός και η υγρασία σε ελεγχόμενα επίπεδα (Papadopoulou et al., 2011). Τα δείγματα αξιολογούνται από το ίδιο πάνελ κάθε φορά, με γνώμονα την εμφάνιση τους (χρώμα) και την οσμή. Ως φρέσκα- αποδεκτά θεωρούνταν τα δείγματα

με χρώμα έντονο κόκκινο και χωρίς οσμή, ενώ ως αλλοιωμένα- μη αποδεκτά τα δείγματα με χρώμα σκούρο κόκκινο-καφέ και οσμή υπόξινη, γλυκιά ή χαλασμένου τροφίμου- γαλακτοκομικού προϊόντος (putrid- cheesy) (Ammor et al., 2009, Argyri et al., 2010, Papadopoulou et al., 2011). Πιο συγκεκριμένα, η κλίμακα αξιολόγησης των δειγμάτων συντηρημένου χοιρινού κιμά ήταν η ακόλουθη: 1=φρέσκο- αποδεκτό, 2=οριακά φρέσκο- αποδεκτό, 3=αλλοιωμένο- μη αποδεκτό (Argyri et al., 2010).

2.5 Μέτρηση pH

Για την μέτρηση του pH κάθε δείγματος, χρησιμοποιήθηκε το μετρητικό όργανο Russell RL150 (Russell Inc, Boston, U.S.A). Πριν από τις μετρήσεις γινόταν βαθμονόμηση του οργάνου και ακολούθως μετριόταν το pH του αραιωμένου ομογενοποιημένου δείγματος (μετά την ολοκλήρωση των μικροβιολογικών αναλύσεων). Η ακρίβεια του συγκεκριμένου μετρικού οργάνου είναι ± 0.2 .

2.6 Μέτρηση αερίων

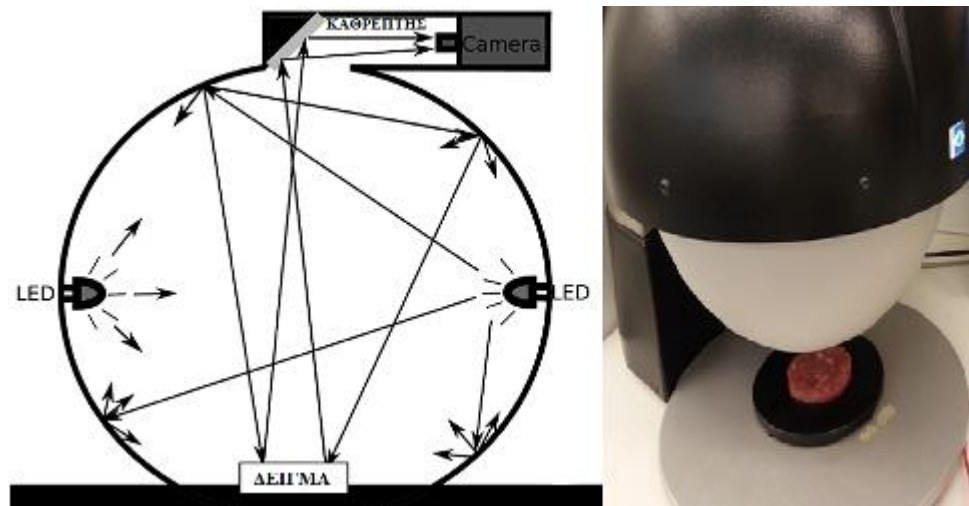
Η μέτρηση αερίων στα δείγματα υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας πραγματοποιήθηκε με το μετρητικό όργανο Dansensor CheckMate 9900 O₂/CO₂ (PBI-Dansensor A/S, Denmark) με ακρίβεια ± 0.1 . Μέτρηση γινόταν πριν από κάθε δειγματοληψία αλλά και κατά την συσκευασία των δειγμάτων (ώρα μηδέν) ούτως ώστε να διασφαλιστεί αν η αναλογία του μίγματος αερίων ήταν η επιθυμητή. Επίσης, εκτός από τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη δειγματοληψία, γινόταν μέτρηση αερίων και σε ένα σταθερό δείγμα (πρότυπο), με σκοπό να μελετηθεί η αναλογία αερίων ανά δείγμα και τυχόν αυξομειώσεις που μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

2.7 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (MultiSpectral Imaging,MSI)

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης είναι το Videometer- Lab της Videometer A/S (Videometer, 2018), με τη βοήθεια του οποίου παραλαμβάνονται πολυφασματικές εικόνες σε 18 διαφορετικά και μη ομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος με εύρος 405-970 nm, και πιο συγκεκριμένα στα 405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm (Carstensen and Hansen, 2003, Panagou et al., 2014). Η καταγραφή της ανάκλασης από την επιφάνεια του δείγματος πραγματοποιείται από μία τυπική μονοχρωματική συσκευή συζευγμένου φορτίου (charge coupled device chip, CCD chip), η οποία είναι τοποθετημένη μέσα σε μία κάμερα τύπου Point Grey Scorpion. Το υπό εξέταση δείγμα εσωκλείεται εντός μίας σφαίρας Ulbricht (σχήμα 2.1), η οποία

έχει εσωτερικά μία επίστρωση ματ και στην οροφή της την κάμερα. Η επίστρωση σε συνδυασμό με το σφαιρικό σχήμα του οργάνου εξασφαλίζουν ομοιογενή ανάκλαση του φωτός εντός της σφαίρας. Περιμετρικά της σφαίρας και αντιδιαμετρικά μεταξύ τους, είναι τοποθετημένες, με ομοιόμορφη κατανομή, οι δίοδοι εκπομπής φωτός (Light emitting diodes, LEDs) των 18 μηκών κύματος. Όταν παραλαμβάνεται μία εικόνα, οι δίοδοι εκπομπής φωτός ανάβουν διαδοχικά και η ανάκλαση του συγκεκριμένου μήκους κύματος καταγράφεται από την κάμερα μέσα στην σφαίρα. Τα δεδομένα που προκύπτουν είναι μία μονόχρωμη εικόνα με 32-bit ακρίβεια για κάθε LED τύπο, καταλήγοντας σε έναν υπερ-φασματικό κύβο με διαστάσεις $1280 \times 960 \times 19$ (Dissing et al., 2013, Tsakanikas et al., 2015).

Πριν την χρήση του Videometer- Lab για την καταγραφή πολυφασματικών εικόνων, πρέπει να γίνεται η διαδικασία του light set up, έτσι ώστε να προετοιμάζονται οι δίοδοι εκπομπής φωτός με βάση τον τύπο του αντικειμένου προς απεικόνιση. Η προετοιμασία αυτή προϋποθέτει ότι κατά την πρώτη χρήση του VideometerLab για το συγκεκριμένο αντικείμενο δημιουργείται ένα αρχείο με την πρώτη απεικόνιση του αντικειμένου (διαδικασία του autolight), το οποίο ανακαλείται κατά το light set up. Μετά την διαδικασία του light set up, πρέπει να γίνει γεωμετρική και ραδιομετρική βαθμονόμηση του οργάνου με τη χρήση πρότυπων στόχων. Με τις παραπάνω διαδικασίες διασφαλίζεται ένα μέσο δυναμικό εύρος φωτός και ελαχιστοποιούνται φαινόμενα όπως οι σκιές, η παραμόρφωση των ειδώλων κ.α. (Panagou et al., 2014).



Σχήμα 2.1: Απεικόνιση του εσωτερικού της σφαίρας του VideometerLab αριστερά) (Tsakanikas et al., 2015) και του εξωτερικού του.

Στις απεικονίσεις που προκύπτουν πρέπει να γίνει επεξεργασία, ούτως ώστε να απομονωθεί το προς εξέταση δείγμα (main region of interest, ROI) από το περίγραμμα του τρυβλίου, τον περιβάλλοντα χώρο του τρυβλίου και πιθανό λίπος που υπάρχει στο ιστό του κρέατος (Ropodi et al., 2013, Tsakanikas et al., 2015). Η επεξεργασία αυτή πραγματοποιείται από το λογισμικό πρόγραμμα του Videometer- Lab (Videometer- Lab version 2.12.39, Videometer A/S, Denmark) και η αρχή στην οποία βασίζεται είναι η κανονική διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminal Analysis, CDA). Η μέθοδος ανάλυσης αυτή, γνωστή και ως διακριτική ανάλυση κατά Fisher (Fisher's discriminant analysis) διαχωρίζει τις απεικονίσεις με βάση τις περιοχές ενδιαφέροντος.. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίζει το μέγιστο δυνατό διαχωρισμό δύο ή περισσότερων κλάσεων σύμφωνα με τον αριθμό των ανεξάρτητων μεταβλητών (εξίσωση 2.1) (Daugaard et al., 2010).

$$R(a) = \frac{a^T \Sigma_S a}{a^T \Sigma_N a} \quad \text{(Εξίσωση 2.1)} \quad \text{(Carstensen et al., 2013)}$$

όπου $\Sigma_S = A$: η διασπορά μεταξύ των κλάσεων, $\Sigma_N = W$: η διασπορά μέσα στις κλάσεις .

Μετά τον διαχωρισμό αυτό, υπολογίζεται για κάθε εικόνα η μέση φασματοσκοπική ανάκλαση σε κάθε μήκος κύματος, όπως αυτή προκύπτει από τον υπολογισμό του μέσου όρου έντασης των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI). Παράλληλα, υπολογίζεται και η τυπική απόκλιση της έντασης των εικονοστοιχείων ανά μήκος κύματος. Τα τελικά δεδομένα που προκύπτουν από τους δύο παραπάνω υπολογισμούς είναι 18 μέσοι όροι ανάκλασης, 18 τυπικές αποκλίσεις ανάκλασης και τα αντίστοιχα 18 μήκη κύματος (Estelles-Lopez et al., 2017) τα οποία χρησιμοποιούνται για την κατασκευή μοντέλων για μηχανική εκμάθηση του οργάνου Videometer- Lab (Videometer A/S, Denmark).

2.8 Ανάλυση δεδομένων

2.8.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων μικροβιακής ανάπτυξης

Με βάση τα μικροβιολογικά αποτελέσματα των πειραμάτων αλλοίωσης του χοιρινού κιμά, προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι αύξησης για την OMX και τις επιμέρους μικροβιακές ομάδες των *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* και LAB (εξίσωση 2.2) σύμφωνα με το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994). Πιο συγκεκριμένα, με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος DMFit (Institute of Food Research, Reading, UK; διαθέσιμο στο www.combase.cc) έγινε προσδιορισμός του χρόνου της φάση προσαρμογής λ (lag phase), του μέγιστου ειδικού ρυθμού αύξησης μ_{\max} , του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού y_0 και του τελικού μικροβιακού πληθυσμού y_{end} .

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{e^{m\mu_{max}A(t)} - 1}{e^{m(y_{end} - y_0)}}\right) \quad \text{Εξίσωση (2.2)} \quad (\text{Baranyi and Roberts, 1994})$$

$$\text{όπου } A(t) = t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max}t} + e^{-h_0} + e^{-\mu_{max}t - h_0}),$$

μ_{max} : ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (h^{-1}), y_{end} : ο φυσικός λογάριθμος του μέγιστου πληθυσμού του μικροοργανισμού (\ln CFU/g), y_0 : ο φυσικός λογάριθμος του αρχικού πληθυσμού του μικροοργανισμού, m : η παράμετρος καμπυλότητας για την μετάβαση από την εκθετική στην στατική φάση της καμπύλης ανάπτυξης και h_0 : παράμετρος που χαρακτηρίζει το έργο που απαιτείται για να προσαρμοστούν οι μικροοργανισμοί στο νέο περιβάλλον (Baranyi and Roberts, 1994, McKellar and Lu, 2003).

2.8.2 Προσδιορισμός της επίδρασης της θερμοκρασίας στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης

Για εκπαιδευτικούς λόγους αποφασίστηκε να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στον ρυθμό ανάπτυξης της OMX των δειγμάτων χοιρινού κιμά, παρότι ο αρχικός σχεδιασμός του πειράματος δεν περιελάμβανε τουλάχιστον τέσσερις ισόθερμες συνθήκες συντήρησης. Με βάση τα αποτελέσματα του μ_{max} για την OMX (Υποενότητα 2.8.1), για τις ισόθερμες συνθήκες των 4,8 και 12 °C, υπολογίστηκε η ρίζα του μ_{max} (χωριστά για κάθε επανάληψη και δείγμα), ώστε να χρησιμοποιηθεί η εξίσωση του δευτερογενούς μοντέλου του Ratkowsky (1982) (εξίσωση 2.3) και να προσδιοριστούν οι παράμετροι b καθώς και η ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία ανάπτυξης T_{min} (Ratkowsky et al., 1982, Ross and Dalgaard, 2003) της OMX, σε δείγμα συντηρημένου κιμά, υπό αεροβικές αλλά και υπό τροποποιημένες συνθήκες συσκευασίας. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων b και T_{min} έγινε με την χρήση του λογισμικού προγράμματος USDA Integrated Predictive Modeling Program Tools version 2013 (Developed by Dr. Lihan Huang, USDA Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center, Wyndmoor, PA; διαθέσιμο στο <https://www.ars.usda.gov/northeast-area/wyndmoor-pa/eastern-regional-research-center/docs/ipmp-2013/>).

$$\sqrt{\mu_{max}} = b * (T - T_{min}) \quad (\text{Εξίσωση 2.3}) \quad (\text{Ratkowsky et al. 1982})$$

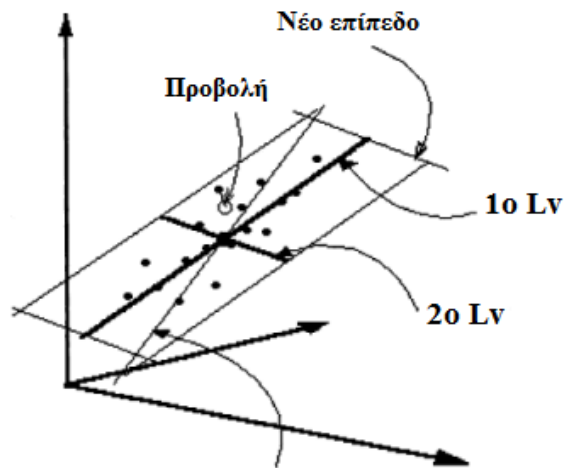
Όπου: μ_{max} =ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης (h^{-1}), b = παράμετρος, συντελεστής συσχέτισης-παλινδρόμησης, T_{min} = η ελάχιστη θεωρητική θερμοκρασία για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού (°C), και T = θερμοκρασία που αντιστοιχεί στο εκάστοτε μ_{max} (°C).

2.8.3 Μηχανική Εκμάθηση

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την εφαρμογή της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI), με τη βοήθεια του Videometer- Lab, χρησιμοποιήθηκαν για την μηχανική εκμάθηση του οργάνου, με απώτερο σκοπό στο μέλλον να μπορεί από τις απεικονίσεις να προσδιοριστεί ποιοτικά (φρέσκο, οριακά φρέσκο, αλλοιωμένο) και ποσοτικά (ως προς την OMX) δείγμα χοιρινού κιμά.

2.8.3.1 Μοντέλα για εκτίμηση της OMX με γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων(Partial Least Square- Regression, PLS-R)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της OMX, κατασκευάστηκαν μοντέλα βάσει της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για κάθε τρόπο συσκευασίας χωριστά. Η μέθοδος αυτή συσχετίζει δύο σύνολα δεδομένων X (ανεξάρτητη μεταβλητή) και Y (εξαρτημένη μεταβλητή), γραμμικώς, βρίσκοντας ένα νέο σύνολο-χώρο ανεξάρτητων και εξαρτημένων μεταβλητών (X -scores), με ορθογώνια διάταξη (σχήμα 2.2), καθώς και ορίζει έναν αριθμό κύριων συνιστωσών (Latent variables, LVs) για τον νέο χώρο αυτό (Wold et al., 2001, Romia and Bernardez, 2009, Panagou et al., 2014).



Σχήμα 2.2: Γεωμετρική απεικόνιση του νέου λανθάνοντα χώρου, όπως προκύπτει από τη γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Wold et al., 2001).

Επιλέχτηκε η συγκεκριμένη μέθοδος καθώς μπορούν να αναλυθούν με αυτήν, δεδομένα με πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές X και με πολύ «θόρυβο»(Wold et al., 2001,Abdi, H., 2018). Επιπλέον,

αντίθετα με άλλες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης, με την PLS-R διατηρείται η ασυμμετρία μεταξύ των προβλεπόμενων και των εξαρτημένων μεταβλητών (Abdi, H., 2018).

Για την εφαρμογή της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα The Unscrambler© ver.9.7 (CAMO Software AS, Oslo, Norway) και κατασκευάστηκαν μοντέλα για τις αερόβιες και τις τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας με διαφορετική προ-επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων (18 Mean και 18 SD), όπως αυτά προκύπτουν από το Videometer- Lab version 2.12.39 (Videometer A/S, Denmark).

Στην περίπτωση του αέρα, ως δείγματα (n=170) για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation), θεωρήθηκαν αυτά που συντηρήθηκαν (και των δύο επαναλήψεων) στους 4, 8 και 12 °C. Για την επιβεβαίωση της πρόβλεψης του μοντέλου (prediction), χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα (n=58) από το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας και από τις δύο επαναλήψεις. Επίσης, ως X μεταβλητές ορίστηκαν τα δεδομένα (n=36), των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων, από τα 18 φάσματα, αφού πρώτα διαιρέθηκαν με την τυπική απόκλιση τους (Stdev). Ως Y μεταβλητές (n=1) ορίστηκαν τα μικροβιολογικά αποτελέσματα (μέσοι όροι) από την OMX. Επίσης, δεν συμπεριλήφθηκαν τα δεδομένα για το δείγμα 95 καθώς μετά από δοκιμές κρίθηκε ότι ως σημείο αποκλίνει κατά πολύ από το μοντέλο (outlier).

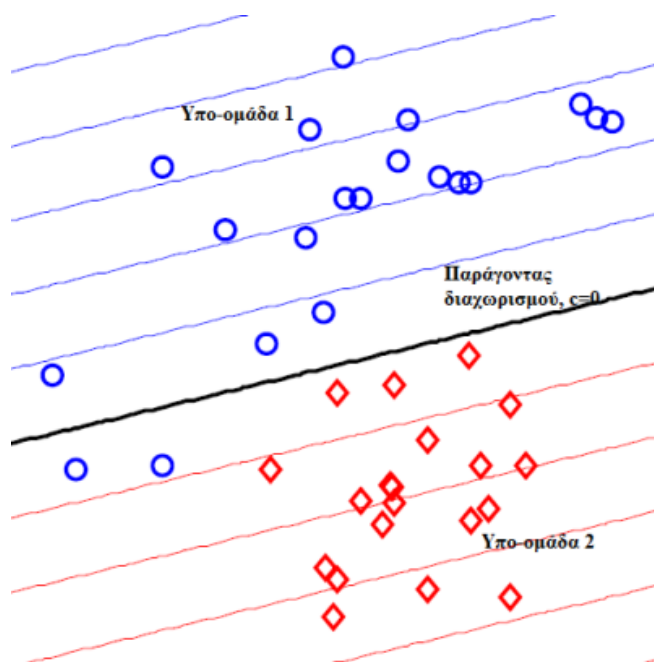
Για το μοντέλο των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας (MAP), τα δείγματα (n=178) για την ανάπτυξη (calibration) και την επικύρωση (cross-validation) ήταν όσα συντηρήθηκαν (και των δύο επαναλήψεων) στους 4,8 και 12 °C, ενώ για την πρόβλεψη του μοντέλου (prediction), χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα (n= 54) από το δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ και από τις δύο επαναλήψεις. Οι μεταβλητές X που επιλέχθηκαν, σε αυτή την περίπτωση ήταν τα δεδομένα (n=36), των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων, από τα 18 φάσματα, αφού πρώτα αυτά μετασχηματίστηκαν με τον μετασχηματισμό τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV)(εξίσωση 2.4). Ο μετασχηματισμός αυτός χρησιμοποιείται συχνά σε φασματοσκοπικά δεδομένα καθώς μειώνει την αλληλοεπικάλυψη των πληροφοριών μεταξύ των φασμάτων και ελαχιστοποιεί τον «θόρυβο» (Chen et al., 2011, Panagou et al., 2014, Tsakanikas et al., 2016). Ως Y μεταβλητές (n=1) θεωρήθηκαν τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα της OMX.

$$S_I^{SNV} = \frac{S_I - \text{mean}(S)}{\text{stdev}(S)} \text{ (Εξίσωση 2.4) (Rinnan et al., 2009, Chen et al., 2011)}$$

Όπου: S : το σύνολο των εικονοστοιχείων (pixels) για τα φάσματα (pixel-wise spectra), S_i : η πληροφορία του συγκεκριμένου φάσματος και S_i^{SNV} : η πληροφορία του μετασχηματισμένου φάσματος (Tsakanikas et al., 2016).

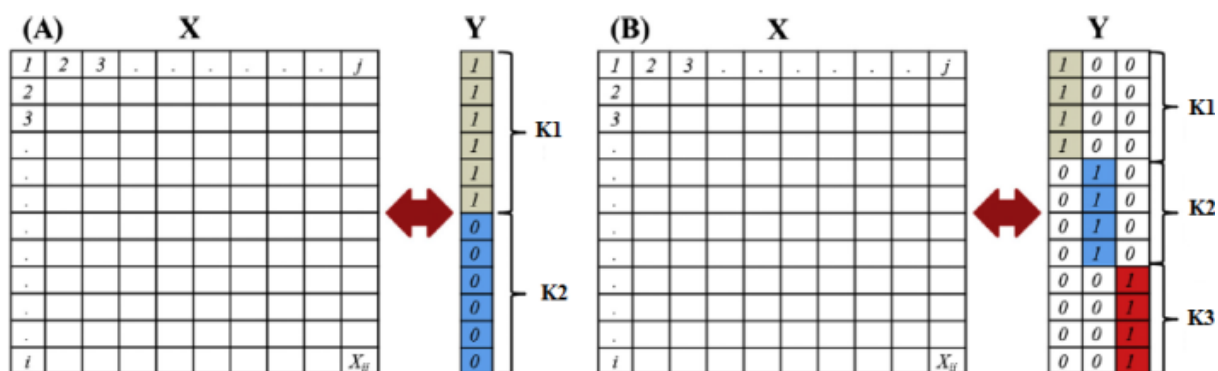
2.8.3.2 Μοντέλα για εκτίμηση του βαθμού αλλοίωσης του χοιρινού κιμά με τη διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών τετραγώνων (Partial Least Square: Discriminant Analysis, PLS:DA)

Η εξαγωγή των μοντέλων για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό ενός δείγματος χοιρινού κιμά, σε αερόβιες συνθήκες και σε τροποποιημένης ατμοσφαιρικής συσκευασίας, πραγματοποιήθηκε με διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια ως χημειομετρική τεχνική και η αρχή της βασίζεται στον διαχωρισμό διαφορετικών συνόλων δειγμάτων σε δύο ή περισσότερες κλάσεις. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος προσδιορίζει μία νέα νοητή γραμμική περιοχή (περιοχή X και Y μεταβλητών), η οποία διαχωρίζει τις κλάσεις μεταξύ τους (σχήμα 2.3), και ταυτόχρονα ανιχνεύει τον αριθμό των κύριων λανθανουσών συνιστωσών (LVs,Υποενότητα 2.8.2.1), οι οποίες επιτρέπουν την πρόβλεψη των Y εξαρτημένων μεταβλητών και την θέση στο νέο χώρο των X ανεξάρτητων μεταβλητών (Ballabio and Todeschini, 2009, Brereton and Lloyd, 2014, Gromski et al, 2015).



Σχήμα 2.3: Απεικόνιση του διαχωρισμού δύο κλάσεων από μία γραμμική περιοχή με βάση τις νέες κύριες λανθάνουσες συνιστώσες (Brereton and Lloyd, 2014).

Για την εφαρμογή του συγκεκριμένου αλγορίθμου πρέπει να μετατραπούν οι μεταβλητές Y σε κατηγορικές και εν συνεχεία με βάση το δυαδικό σύστημα. Παραδείγματος χάρη, αν επιλεγεί να γίνει διαχωρισμός των δεδομένων σε 3 κλάσεις τότε η πρώτη μεταβλητή Y (κλάση 1) θα μετατραπεί στο διάνυσμα [1 0 0], η δεύτερη στο [0 1 0] και η τρίτη στο [0 0 1]. Αντίστοιχα, αν πρόκειται για 2 κλάσεις, η μετατροπή των κατηγορικών μεταβλητών θα είναι στην κλάση 1 το 1 και στην 2 το 0 (σχήμα 2.4)(Gromski et al., 2015).



Σχήμα 2.4: Απεικόνιση υπό μορφή πίνακα των μεταβλητών X και Y κατά την διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)(Gromski et al., 2015).

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας, επιλέχθηκαν αρχικά 3 κλάσεις για τον διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση την ισχύουσα νομοθεσία (ΕΚ 2073/2005) για τα μικροβιολογικά όρια, όσον αφορά την OMX, στον χοιρινό κιμά. Πιο συγκεκριμένα, ως φρέσκα-αποδεκτά (κλάση 1) δείγματα ορίστηκαν αυτά που είχαν μικρότερο πληθυσμό OMX από 5.7 log CFU/g, ως οριακά αποδεκτά αν η OMX ήταν μεταξύ 5.7 και 6.7 log CFU/g (κλάση 2) και ως αλλοιωμένα- μη αποδεκτά αν ήταν πάνω από 6.7 log CFU/g (κλάση 3).

Τα λογισμικά που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των μοντέλων είναι το The Unscrambler© ver.9.7(CAMO Software AS, Oslo, Norway) και το πρόσθετο του Microsoft Excel XLstat 2015. Τα δεδομένα από την πολυφασματική απεικόνιση (18 mean και 18 std ανά δείγμα) προεπεξεργάστηκαν διαφορετικά στην περίπτωση των δειγμάτων συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες απ' αυτών που συντηρήθηκαν υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Πιο αναλυτικά, για την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες, για την ανάπτυξη (calibration) και την «εσωτερική» επικύρωση (cross-validation) αξιοποιήθηκαν τα δείγματα (n=170) που συντηρήθηκαν στους 4, 8 και 12 °C (και από τις δύο επαναλήψεις). Για τον έλεγχο της πρόβλεψης του μοντέλου (prediction), χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα (n=58) από το δυναμικό προφίλ

θερμοκρασίας και των δύο επαναλήψεων. Επιπλέον, ως X μεταβλητές ορίστηκαν τα δεδομένα ($n=36$), των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων, από τα 18 φάσματα, αφού πρώτα εφαρμόστηκε μετασχηματισμός τυπικής κανονικής μεταβλητής (Standard Normal Variate, SNV)(εξίσωση 2.4). Ως Y μεταβλητές ($n=3$) ορίστηκαν οι τρεις κλάσεις $[1\ 0\ 0]$, $[0\ 1\ 0]$ και $[0\ 0\ 1]$. Στην ανάλυση, δεν συμπεριλήφθηκαν τα δεδομένα για το δείγμα 95 και 133 καθώς μετά από δοκιμές κρίθηκαν ως αποκλίνοντα σημεία (outliers).

Στην περίπτωση του μοντέλου για τις τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, η ανάπτυξη (calibration) και η επικύρωση (cross-validation) έγινε με τα δείγματα ($n=178$) των 4,8 και 12 °C (και των δύο επαναλήψεων), η πρόβλεψη του μοντέλου (prediction) με τα δείγματα ($n=54$) από το δυναμικό θερμοκρασιακό προφίλ των δύο επαναλήψεων. Οι μεταβλητές X του μοντέλου ήταν τα δεδομένα των μέσων όρων και των τυπικών αποκλίσεων ($n=36$), χωρίς κάποιο μετασχηματισμό ή προ-επεξεργασία. Τέλος, οι Y μεταβλητές ($n=3$) που επιλέχθηκαν είναι ομοίως με την περίπτωση του μοντέλου για τον αέρα, οι 3 κλάσεις $[1\ 0\ 0]$, $[0\ 1\ 0]$ και $[0\ 0\ 1]$.

Εν συνεχεία, αποφασίστηκε να κατασκευαστούν αντίστοιχα μοντέλα που να διαχωρίζουν μόνο τα φρέσκα δείγματα (κλάση 1) και τα αλλοιωμένα (κλάση 2). Τα οριακά αλλοιωμένα, ανάλογα με το μικροβιακό τους φορτίο (αλλοιωμένο: πάνω από 6 log CFU/g, φρέσκο: κάτω από 6 log CFU/g), ταξινομήθηκαν είτε στην κλάση 1 είτε στην 2 (μεταβλητές $Y=1,0$). Όσον αφορά τις μεταβλητές X , ήταν αντίστοιχες με αυτές στην περίπτωση των 3 κλάσεων.

2.8.3.3 Μοντέλα για εκτίμηση του βαθμού αλλοίωσης του χοιρινού κιμά με τη χρήση της διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (Discriminant Function Analysis)

Μια άλλη μέθοδος που εφαρμόστηκε για την δημιουργία των μοντέλων κατηγοριοποίησης του χοιρινού κιμά σε φρέσκο, οριακά αλλοιωμένο και αλλοιωμένο είναι η διακριτική ανάλυση παραγόντων (DFA), γνωστής και ως ανάλυση κανονικών μεταβλητών (Canonical Variates Analysis, CVA)(Everitt and Rabe-Hesketh, 2001, Gromski et al., 2015). Με βάση την μέθοδο αυτή, ένα σύνολο δεδομένων διαχωρίζεται σε διαφορετικές ομάδες- κλάσεις ή υπο- περιοχές, μέσω ενός γραμμικού συνδυασμού (παραγόντων) των μεταβλητών X και Y . Ο συνδυασμός αυτός (διακριτικές συναρτήσεις) υπολογίζεται έτσι ώστε η απόσταση μεταξύ των διαφορετικών υπο-περιοχών να είναι η μέγιστη, ενώ ταυτόχρονα η απόσταση μεταξύ των σημείων μίας υπο-περιοχής να είναι η ελάχιστη δυνατή (Berrueta et al., 2007, Παπαδοπούλου, 2013, Gromski et al., 2015).

Τα μοντέλα DFA κατασκευάστηκαν με το λογισμικό, πρόσθετο πρόγραμμα XLstat του Microsoft Excel 2013. Ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία επιλογής δειγμάτων και μεταβλητών X (για την εκπαίδευση, την επιβεβαίωση και τον έλεγχο της πρόβλεψης), με αυτή που ίσχυσε για τα μοντέλα PLS-DA (Υποκεφάλαιο 2.8.2.2). Οι μεταβλητές Y (n=3) αποτελούνταν από τις 3 κλάσεις 1,2,3 και δεν έγινε κάποια επεξεργασία των μεταβλητών X για να εφαρμοστεί η μέθοδος διακριτικής ανάλυσης παραγόντων.

2.8.3.4 Δείκτες αξιολόγησης

Η επίδοση των πρωτογενών κινητικών μοντέλων ανάπτυξης ελέγχεται με βάση το συντελεστή προσδιορισμού R^2 και το τυπικό σφάλμα της προσαρμογής (standard error of fitting) του μοντέλου. Τα ποιοτικά μοντέλα ταξινόμησης PLS-DA και DFA αξιολογήθηκαν βάσει των ποσοστών ευαισθησίας (% sensitivity) του αλγορίθμου για κάθε κλάση δείγματος κιμά (φρέσκο σε φρέσκο, οριακά φρέσκο- οριακά φρέσκο, αλλοιωμένο σε αλλοιωμένο) καθώς και το συνολικό ποσοστό επιτυχούς ταξινόμησης (% accuracy) των δειγμάτων στις αντίστοιχες κλάσεις (Ballabio and Todeschini, 2009, Sokolova and Lapalme, 2009, Ropodi et al., 2016), ξεχωριστά για την βαθμονόμηση, την επικύρωση και τον έλεγχο πρόβλεψης. Επίσης, για τα μοντέλα προσδιορισμού της OMX με την μέθοδο PLS- R, υπολογίστηκαν και λήφθηκαν υπόψη, η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος ανάπτυξης (Root Error, $RMSE_C$), επικύρωσης ($RMSE_V$), πρόβλεψης ($RMSE_P$)(Romia and Bernardez, 2009, Bi et al., 2016), οι συντελεστές συσχέτισης για την ανάπτυξη r_c (correlation coefficient in calibration), επικύρωση (r_v), και πρόβλεψης (r_p)(Dissing et al., 2013, Panagou et al., 2014, Ropodi et al., 2016). Υπολογίστηκε ο συντελεστής μεροληψίας (Bias factor, B_f) και ο συντελεστής ακριβείας (Accuracy factor, A_f) (Ross, 1996). Οι παράγοντες συσχέτισης r και το RMSE υπολογίζονται αυτόματα κατά την εφαρμογή των λογισμικών που χρησιμοποιούνται ενώ ο συντελεστής μεροληψίας και ο συντελεστής ακριβείας σύμφωνα με τις εξισώσεις 2.5 και 2.6.

$$B_f = 10^{(\sum \log(\frac{P}{O})/n)} \quad \text{Εξίσωση 2.5 (Ross,1996)}$$

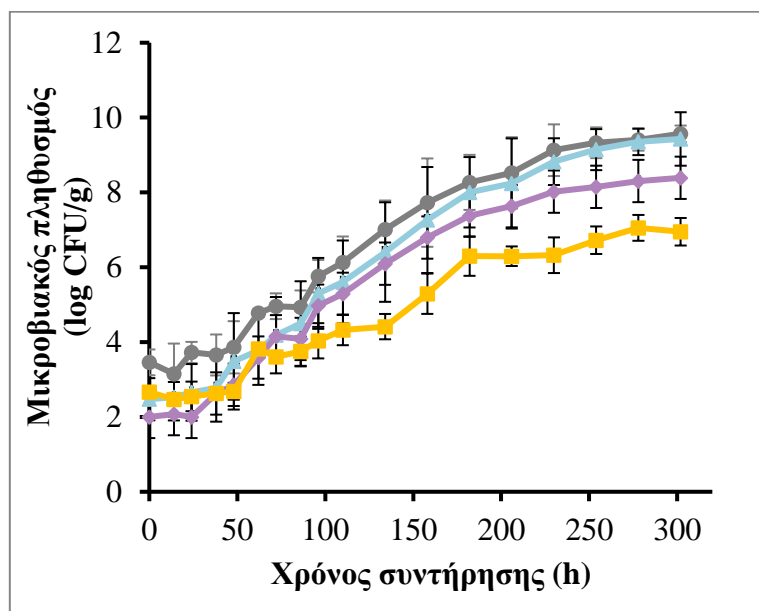
$$A_f = 10^{(|\sum \log(\frac{P}{O})|/n)} \quad \text{Εξίσωση 2.6 (Ross,1996)}$$

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

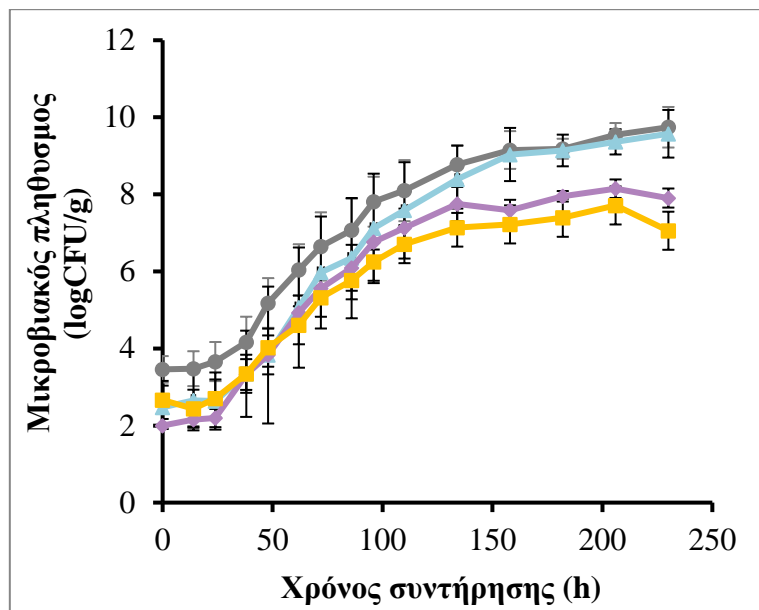
3.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων

3.1.1 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων σε αερόβιες συνθήκες συντήρησης

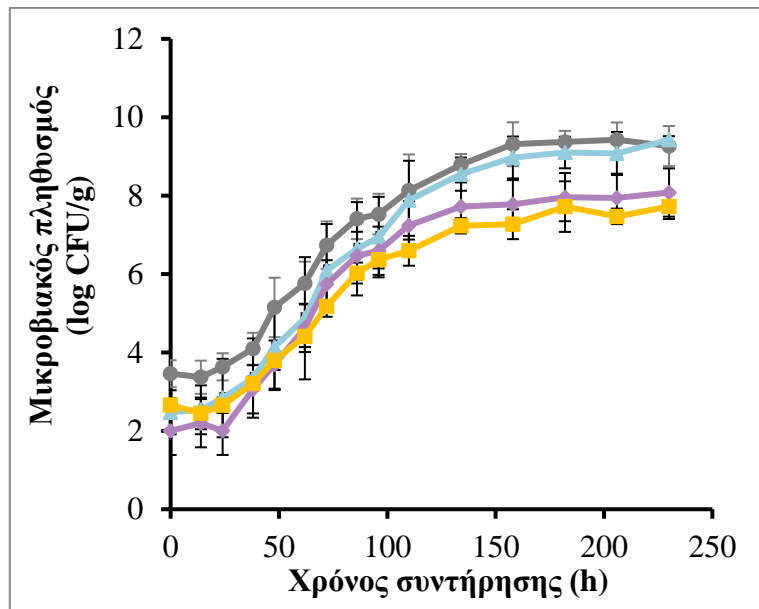
Για την ανίχνευση των μικροοργανισμών στο αρχικό δείγμα, έγινε καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε αραιώση και αναγωγή στο αντίστοιχο αρχικό δείγμα. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζεται η ανάπτυξη της OMX, της *Pseudomonas* spp., του *Brochothrix thermosphacta* και των LAB κατά το διάστημα συντήρησης τους υπό αερόβιες συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, για την κατασκευή των διαγραμμάτων ανάπτυξης των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν οι μέσοι όροι των log CFU/g και οι τυπικές αποκλίσεις (των δύο δειγμάτων), των δύο επαναλήψεων συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες (n= 4).



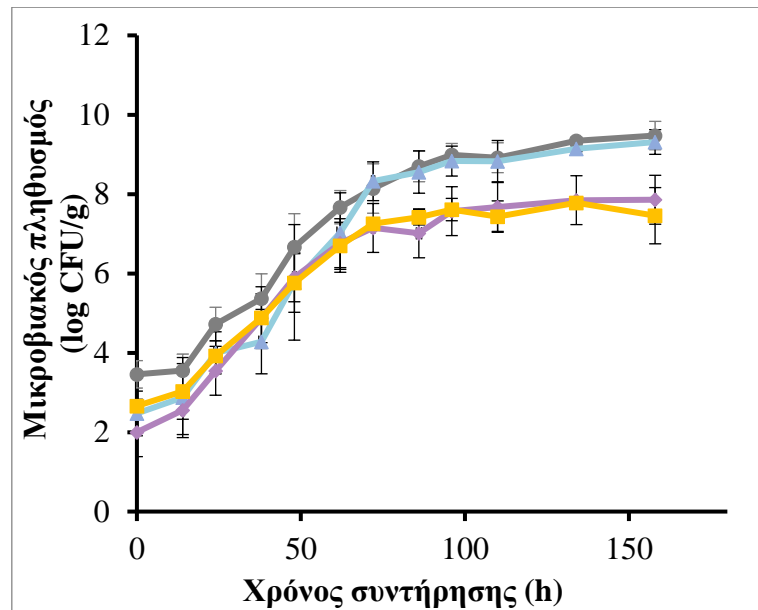
Σχήμα 3.1: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 4 °C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (•) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).



Σχήμα 3.2: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 8 °C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp. (▲), *Brochothrix thermosphacta* (◆), LAB (■).



Σχήμα 3.3: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp. (▲), *Brochothrix thermosphacta* (◆), LAB (■).



Σχήμα 3.4: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 12 °C υπό αερόβιες συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp. (▲), *Brochothrix thermosphacta* (◆), LAB (■).

Με βάση τα παραπάνω διαγράμματα ανάπτυξης, το αρχικό επίπεδο της OMX (στις 0 ώρες), στα προς συντήρηση δείγματα, ήταν στους 3.5 λογαριθμικούς κύκλους. Ο κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός, για όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες, είναι η *Pseudomonas* spp., καθώς η ανάπτυξη της, για το διάστημα συντήρησης, ακολουθεί παρόμοια πορεία με την ανάπτυξη της OMX, επιβεβαιώνοντας την μέχρι πρότείνως βιβλιογραφία (Nychas et al., 2008, Papadopoulou et al., 2011, Doulgeraki et al. 2012, Mohareb et al. 2015).

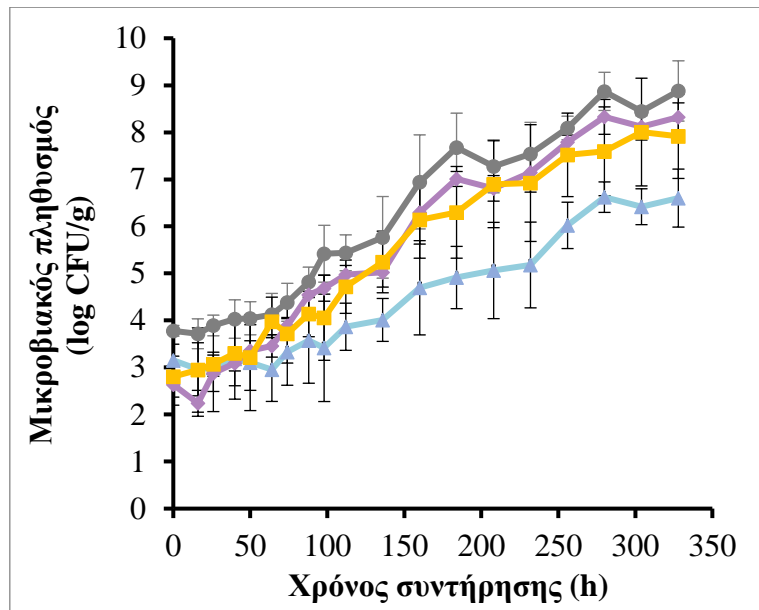
Συγκρίνοντας τα διαγράμματα ανάπτυξης κάθε θερμοκρασίας, προκύπτει ότι στους 4 °C παρουσίαζαν μικρότερη μικροβιακή ανάπτυξη για όλα τα είδη μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα, από το σχήμα 3.1 φάνηκε ότι οι μικροοργανισμοί στις 48 ώρες συντήρησης είχαν πληθυσμούς: OMX: 3.86 log CFU/g, *Pseudomonas* spp.: 3.49 log CFU/g, *Brochothrix thermosphacta* και LAB: 2.69 log CFU/g. Τα δύο ανεξάρτητα πειράματα συντήρησης διήρκισαν 302 ώρες (με τελικό μικροβιακό φορτίο της OMX και της *Pseudomonas* spp.: 9.43 log CFU/g). Αντίθετα, τα δείγματα των 12 °C αλλοιώνονται από τις 24 ώρες (OMX: 4.73 log CFU/g), ενώ στις 86 ώρες η OMX και η *Pseudomonas* spp. είναι 8.56 log CFU/g, ο *Brochothrix thermosphacta* 7.06 log CFU/g και τα LAB 7.42 log CFU/g (Σχήμα 3.4), γεγονός που επιβεβαιώνεται από την υπάρχουσα βιβλιογραφία (Papadopoulou et al., 2011, Panagou et al., 2014, EFSA journal, 2016). Στην περίπτωση των δειγμάτων των 8 °C και του δυναμικού προφίλ θερμοκρασίας, όλοι οι

μικροοργανισμοί συμπεριφέρονται παρόμοια κατά την αύξηση τους, με αποτέλεσμα η συντήρηση τους να διαρκέσει τον ίδιο αριθμό ωρών (230 ώρες), με τελικό μικροβιακό φορτίο 9.57 και 9.43 log CFU/g αντιστοίχως (Σχήματα 3.2 και 3.3).

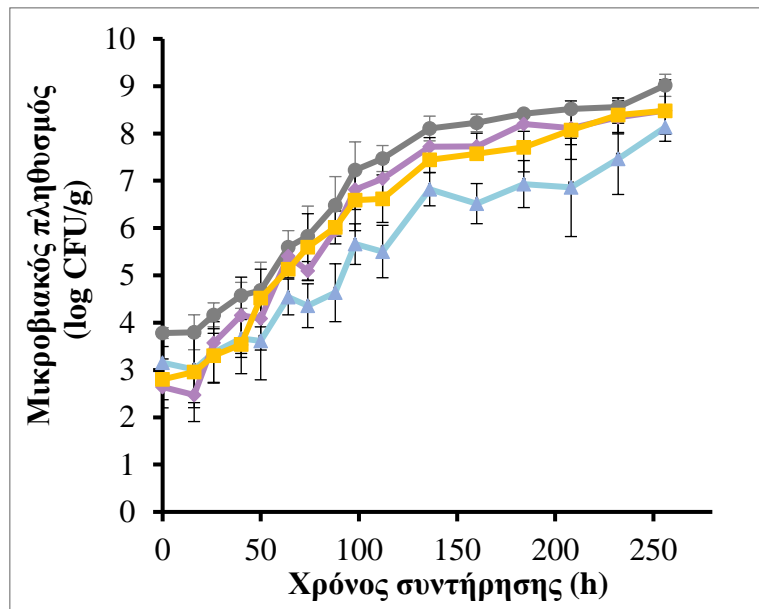
3.1.2 Αποτελέσματα κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συντήρησης (MAP).

Ακολούθως παρατίθενται οι καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση των δειγμάτων στους 4, 8, 12 °C και του δυναμικού προφίλ θερμοκρασίας για την OMX, την *Pseudomonas* spp., τον *Brochothrix thermosphacta* και τα LAB υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας (80 % O₂- 20% CO₂) και από τις δύο επαναλήψεις. Αντίστοιχα με την συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες, οι καμπύλες ανάπτυξης προέκυψαν από τους μέσους όρους log CFU/g και τις τυπικές αποκλίσεις (των δύο δειγμάτων), των δύο επαναλήψεων συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες (n= 4).

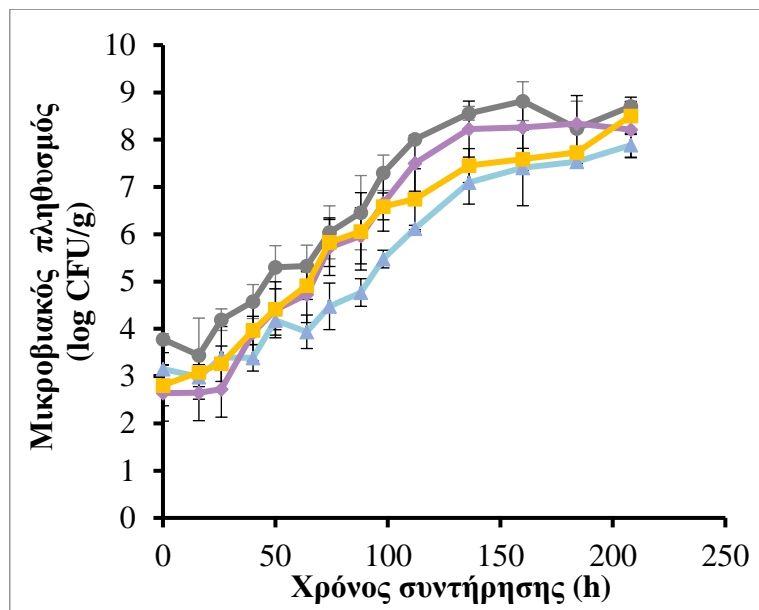
Σύμφωνα με τα σχήματα 3.5, 3.6, 3.7 και 3.8, τα αρχικά δείγματα του προς συντήρηση χοιρινού κιμά είχαν αρχικό φορτίο της OMX ίσο με 3.78 log CFU/g. Επίσης, από τα σχήματα φαίνεται ότι κυρίαρχοι αλλοιωγόνοι μικροοργανισμοί, για τη συντήρηση σε όλες τις θερμοκρασίες υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας, είναι οι *Brochothrix thermosphacta* και LAB εφόσον η ανάπτυξη τους συμβαδίζει με αυτή της OMX. Η ανάπτυξη της *Pseudomonas* spp. είναι κατά 2 λογαριθμικού κύκλους μικρότερη από αυτήν της OMX και των *Brochothrix thermosphacta* και LAB καθώς οι δύο τελευταίες κατηγορίες μικροοργανισμών ευνοούνται από την ύπαρξη αερίων με ποσοστό CO₂ μικρότερο του 50% και παρουσία O₂ (Borch et al., 1996, Nychas et al., 2008, Estelles-Lopez et al., 2017).



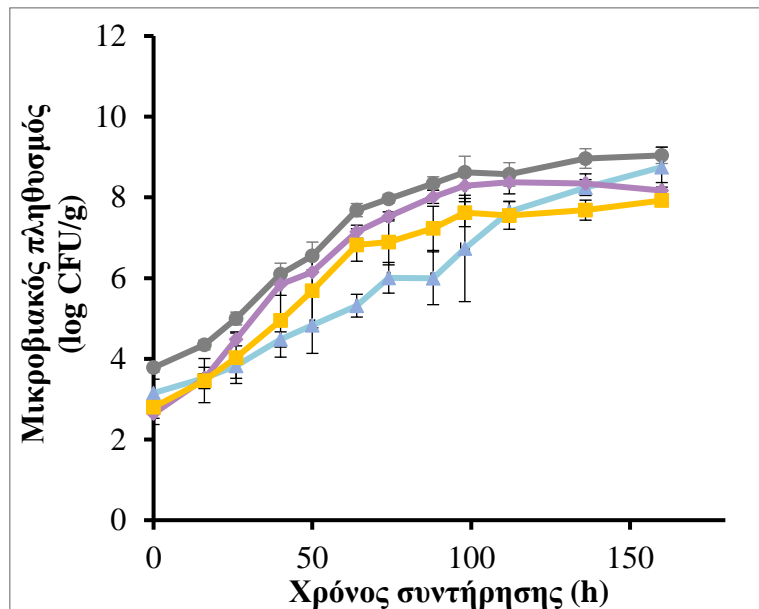
Σχήμα 3.5: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 4 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).



Σχήμα 3.6: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 8 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp.(▲), *Brochothrix thermosphacta*(◆), LAB(■).



Σχήμα 3.7: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp. (▲), *Brochothrix thermosphacta* (◆), LAB (■).



Σχήμα 3.8: Καμπύλες ανάπτυξης για την συντήρηση χοιρινού κιμά στους 12 °C υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για την OMX (●) και τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas* spp. (▲), *Brochothrix thermosphacta* (◆), LAB (■).

Από το Σχήμα 3.5, παρατηρείται ότι παρεμποδίζεται η ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών, για το χρονικό διάστημα των 64 ωρών στα δείγματα όπου συντηρήθηκαν στους 4 °C (OMX: 4.39 log CFU/g, *Pseudomonas* spp.: 2.96 log CFU/g, *Brochothrix thermosphacta* και LAB: 3.5 log CFU/g).

καθώς και ότι η συντήρησή τους διήρκεσε 328 ώρες (τελικό μικροβιακό φορτίο OMX: 8.88 log CFU/g, *Brochothrix thermosphacta*: 8.32 log CFU/g και LAB: 7.92 log CFU/g). Επιπλέον, ο πληθυσμός της OMX για τις 304 ώρες ήταν στους 8.45 λογαρίθμους, ενός λογαρίθμου λιγότερου σε σχέση με τον πληθυσμό της OMX για τις 302 ώρες των δειγμάτων υπό αερόβιες συνθήκες που ήταν ίσος με 9.43 log CFU/g (Σχήμα 3.1). Παράλληλα, από τα σχήματα 3.1 και 3.5 προκύπτει ότι τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta* και LAB, για την περίπτωση των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών, επωφελήθηκαν από την αλλαγή στην ατμόσφαιρα (Borch et al., 1996, Mejlholm and Dalgaard, 2013) και αναπτύχθηκαν περισσότερο από τα *Pseudomonas* spp., των οποίων η ανάπτυξη εμποδίστηκε και ήταν μικρότερη από την περίπτωση της αερόβιας συσκευασίας (Kakouri and Nychas, 1994, Nychas et al. 2007, Adams and Moss, 2008, Dissing et al. 2013).

Τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 12 °C (Σχήμα 3.8) δεν φάνηκε να επηρεάζονται από το διαφορετικό τρόπο συσκευασίας, διότι η ανάπτυξη της OMX (9.06 log CFU/g στις 160 ώρες) ήταν παρόμοια με αυτή της OMX (9.31 log CFU/g στις 158 ώρες) για την περίπτωση της αερόβιας συσκευασίας. Η εξέλιξη αυτή είναι αναμενόμενη καθώς για τέτοια θερμοκρασία δεν παρατηρείται επιβράδυνση της ανάπτυξης λόγω της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στην συσκευασία (Koutsoumanis et al., 2008, Παπαδοπούλου, 2013). Ωστόσο, για τους *Brochothrix thermosphacta* και LAB, η ανάπτυξη τους ευνοήθηκε από την τροποποιημένη ατμόσφαιρα, καθώς ο πληθυσμός για τις 304 ώρες ήταν κατά 1 λογαριθμικό κύκλο μεγαλύτερος από τον πληθυσμό των *Brochothrix thermosphacta* και LAB στην συντήρηση υπό αερόβια συσκευασία (Σχήμα 3.4). Επίσης, η διαφορετική συσκευασία επίδρασε παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη της *Pseudomonas* spp. (Ercolini et al., 2006, Koutsoumanis et al., 2006, Nychas et al., 2007) καθώς ο πληθυσμός στις 160 ώρες ήταν μικρότερος (8.75 log CFU/g) από αυτόν για τις αερόβιες συνθήκες συσκευασίας (9.31 log CFU/g).

Στην περίπτωση της συντήρησης στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (Σχήμα 3.7), η συμπεριφορά των μικροοργανισμών είναι διαφορετική από αυτή της συντήρησης στους 8 °C (Σχήμα 3.6). Στην πρώτη περίπτωση, η επιρροή της τροποποιημένης ατμοσφαιρικής συσκευασίας ήταν πολύ μικρή σε σχέση με τις αερόβιες συνθήκες εφόσον η συντήρηση για τις τροποποιημένες ατμόσφαιρες είχε διάρκεια 208 ώρες (με τελική OMX: 8.7 log CFU/g) ενώ για τις αερόβιες συνθήκες 230 ώρες (OMX: 9.43 log CFU/g) (Σχήμα 3.3). Επίσης, φαίνεται ότι οι μικροοργανισμοί *Brochothrix thermosphacta* και LAB αναπτύσσονται περισσότερο στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα (8.50 log CFU/g στις 208 ώρες) (Σχήμα 3.7) απ' ό,τι στην συντήρηση κάτω από αερόβιες συνθήκες (8.00 log

CFU/g στις 230 ώρες)(Σχήμα 3.3), ενώ αντίστροφα η ανάπτυξη της *Pseudomonas* spp. ήταν μικρότερη στην τροποποιημένη ατμόσφαιρα (7.88 log CFU/g στις 208 ώρες) συγκριτικά μ' αυτήν της αερόβιας συσκευασίας (9.00 log CFU/g στις 206 ώρες).

Αντιθέτως, τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 8 °C υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Σχήμα 3.6), επηρεάστηκαν από τον διαφορετικό τρόπο συσκευασίας, καθώς η συντήρησή τους διήρκησε 24 ώρες περισσότερες από αυτήν των συντηρημένων δειγμάτων υπό αερόβιες συνθήκες (3.2). Όσον αφορά την ανάπτυξη των μικροοργανισμών *Brochothrix thermosphacta* και LAB, παρουσιάζεται εικόνα παρόμοια με τις άλλες περιπτώσεις συντήρησης υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας καθώς βρίσκονται στα ίδια πληθυσμιακά επίπεδα με την OMX (OMX: 9.00 log CFU/g, *Brochothrix thermosphacta* και LAB: 8.50 log CFU/g). Ταυτόχρονα, φαίνεται ότι η *Pseudomonas* spp. παρεμποδίζεται σε σημαντικό βαθμό από την αλλαγή των ατμοσφαιρικών συνθηκών (8.13 log CFU/g για τις τροποποιημένες και 9.57 log CFU/g για τις αερόβιες) καθώς πρόκειται για έναν μικροοργανισμό αερόβιο (Nychas et al., 2007, Doulgeraki et al., 2012, Mohareb et al., 2015).

3.2 Οργανοληπτικός έλεγχος

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά, φαίνεται ότι δεν υπάρχει σύγκλιση μεταξύ τους σε πολλές περιπτώσεις δειγμάτων. Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση του αέρα, τα δείγματα χαρακτηρίστηκαν ως αλλοιωμένα (n=38), ως προς το χαρακτηριστικό της οσμής, όταν ο πληθυσμός της OMX ήταν μεταξύ 7.49 και 9.31 log CFU/g, ενώ ως φρέσκα (n=40) όταν η OMX είχε φτάσει τους 4.90- 5.00 λογαριθμικούς κύκλους. Ειδικά, για τα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 12 °C, ως φρέσκα (n=10) χαρακτηρίστηκαν αυτά με OMX μικρότερη από 3.65 log CFU/g. Επίσης, ως οριακά φρέσκα (n= 42) θεωρήθηκαν τα δείγματα με OMX από 5.00 έως 9.00 λογαρίθμους. Με κριτήριο την εμφάνιση του δείγματος χοιρινού κιμά, τα αλλοιωμένα δείγματα (n=42) είχαν μεσόφιλο μικροβιακό φορτίο μεγαλύτερο από 8.80 log CFU/g, σε αντίθεση με τα φρέσκα (n=49) τα οποία είχαν OMX μικρότερη από 6.98 log CFU/g. Οριακά φρέσκα (n=29) ως προς την εμφάνιση χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα με OMX για το εύρος 5.99- 8.10 log CFU/g.

Για τα συντηρημένα δείγματα υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, ο χαρακτηρισμός του αλλοιωμένου, ως προς την οσμή, δόθηκε σε δείγματα (n=28) με μικροβιακό φορτίο μεσόφιλης μεγαλύτερο από 7.90 log CFU/g και του φρέσκου (n=54) σ' αυτά με OMX μικρότερη του 6.80 log

CFU/g. Ως οριακά φρέσκα (n=40) θεωρήθηκαν τα δείγματα με OMX για το εύρος 5.62-8.60 log CFU/g. Επιπρόσθετα, με βάση την εμφάνιση των χοιρινών δειγμάτων, αλλοίωση παρατηρήθηκε σε δείγματα (n=28) με OMX μεγαλύτερη από 8.48 log CFU/g ενώ για πληθυσμό μικρότερο των 6.9 λογαριθμικών κύκλων θεωρήθηκε από το πάνελ ως φρέσκο (n= 74). Στην περίπτωση της αλλοίωσης στους 4 °C, δεν έγινε αντιληπτή η αλλοίωση έγκαιρα (OMX=7.98 log CFU/g) λόγω της τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Επίσης, οριακά φρέσκα (n=20) ήταν τα δείγματα με OMX μεταξύ 7.59 και 8.60 log CFU/g.

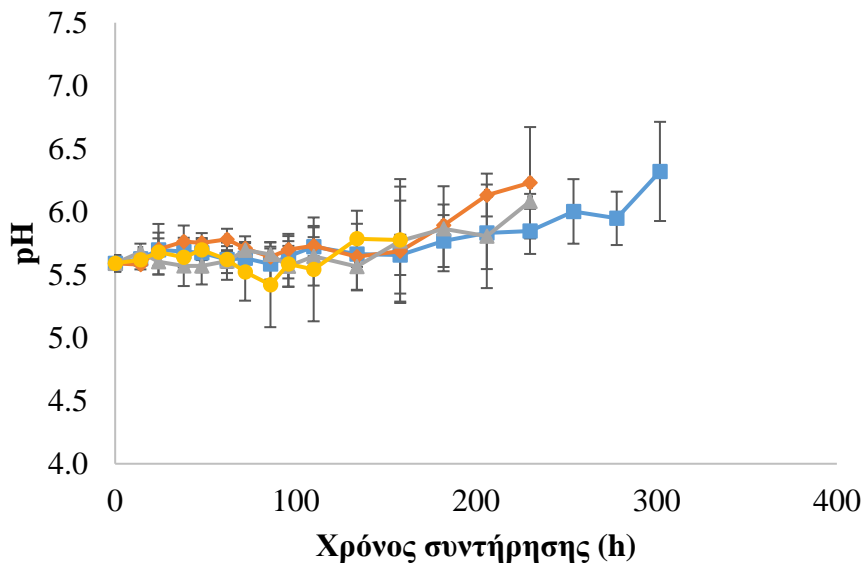
Επιπλέον, στα αλλοιωμένα δείγματα των αερόβιων συνθηκών συσκευασίας, ιδιαίτερα αισθητή ήταν η μυρωδιά της αποσύνθεσης (οσμή σήψης) και η ύπαρξη μίας κολλοειδούς επιφάνειας-γλοιού, υποδηλώνοντας ότι ο μικροβιακός πληθυσμός ήταν της τάξης των 10^9 CFU/g (Ellis and Goodacre, 2001, Adams and Moss, 2008). Η υπόθεση αυτή συμπίπτει με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα (Υποενότητα 3.1) και με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, εφόσον τα *Pseudomonas* spp. παράγουν δύσοσμες ενώσεις, όπως θειούχες ενώσεις, αμίνες και αμμωνία (Nychas et al., 1998, Gram et al., 2002, Nychas et al., 2008), και πολυσακχαρίτες, δημιουργώντας ένα στρώμα γλοιού (Ellis and Goodacre, 2001, Adams and Moss, 2008).

Κατά τον οργανοληπτικό έλεγχο των δειγμάτων συντήρησης υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, η αλλοίωση γινόταν αντιληπτή με βάση την υπόξινη οσμή ή οσμή χαλασμένου τυριού, η οποία παρατηρήθηκε για μικροβιακό φορτίο μεγαλύτερων των 7 log CFU/g (Adams and Moss, 2008), κάτι που συμβαδίζει με τα αντίστοιχα μικροβιολογικά αποτελέσματα. Η υπόξινη οσμή μαρτυρά επίσης την ύπαρξη μεγάλου πληθυσμού LAB και *Brochothrix thermosphacta* (Nychas et al., 2007), συμφωνώντας με το γεγονός ότι για την συντήρηση χοιρινού κιμά υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα είναι οι κύριοι αλλοιωγόνι μικροοργανισμοί (Nychas et al., 2007, Koutosoumanis et al., 2008, Adams and Moss, 2008, Doulgeraki et al., 2012).

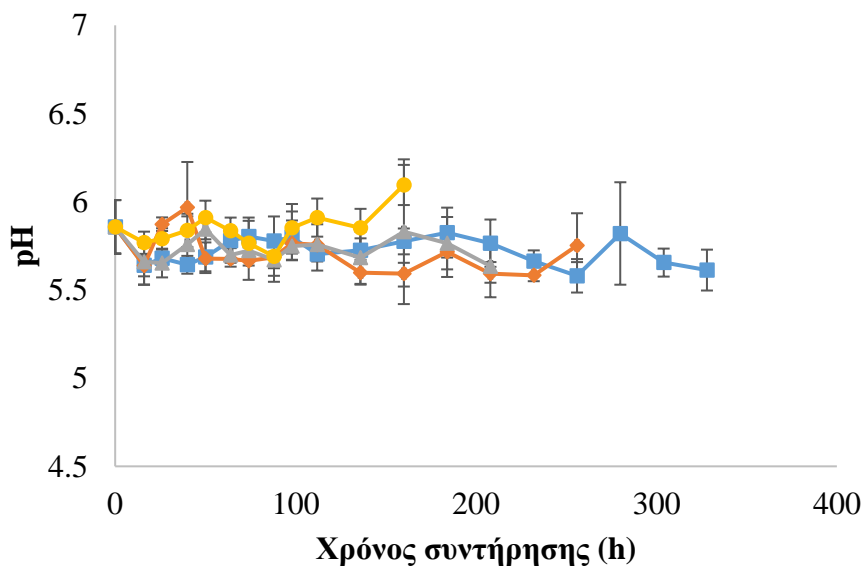
Η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των τριών κατηγοριών αλλοίωσης είναι μεγάλη, όπως φαίνεται και από όσα προαναφέρθηκαν, ενώ ταυτόχρονα τα αποτελέσματα αυτά αποκλίνουν κατά πολύ από τους κανονισμούς υγιεινής της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ 2073/2005) και από το κρίσιμο μικροβιακό φορτίο των 7.8- 8 log CFU/g, στο οποίο γίνεται αντιληπτή οργανοληπτικά η αλλοίωση του κρέατος λόγω της πρωτεόλυσης (Nychas and Tassou, 1997, Ellis and Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007). Το γεγονός αυτό ενδεχομένως οφείλεται στο ότι πρόκειται για αποτελέσματα ενός οργανοληπτικού ελέγχου μικρής κλίμακας, από άτομα στα οποία δεν είχε γίνει ειδική εκπαίδευση για τον οργανοληπτικό έλεγχο χοιρινού κιμά.

3.3 Αποτελέσματα μέτρησης pH

Η μεταβολή του pH στα δείγματα του χοιρινού κιμά, που συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες και τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, παρουσιάζεται στα παρακάτω σχήματα 3.9 και 3.10.



Σχήμα 3.9: Μετρήσεις pH στα δείγματα συντήρησης χοιρινού κιμά υπό αερόβιες συνθήκες για τις θερμοκρασίες 4(■), 8(◆), 12(●)°C και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (▲).



Σχήμα 3.10: Μετρήσεις pH στα δείγματα συντήρησης χοιρινού κιμά υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας για τις θερμοκρασίες 4(■), 8(◆), 12(●) °C και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (▲).

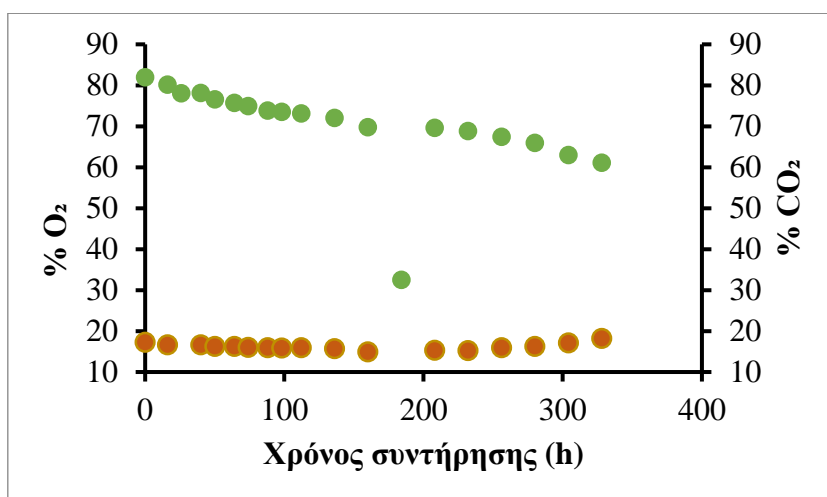
Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.9, σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης, το pH με την πάροδο του χρόνου αυξήθηκε στα δείγματα του συντηρημένου, χοιρινού κιμά. Το pH των αρχικών δειγμάτων ήταν 5.6 ενώ η τελική ένδειξη για τους 4, 8, 12 °C και το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας ήταν 6.3, 6.2, 5.8 και 6.1 αντιστοίχως. Με γνώμονα την αλλαγή του pH μπορεί να προσδιοριστεί ο βαθμός αλλοίωσης του κρέατος καθώς οι μεταβολίτες που παράγονται από την ενδογενή μικροχλωρίδα του τροφίμου είναι κυρίως υπεύθυνοι για την αλλαγή αυτή (Ellis and Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007). Συνδυάζοντας τα μικροβιολογικά αποτελέσματα με αυτά του pH, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση του τελευταίου στα δείγματα όπου συντηρήθηκαν υπό αερόβιες συνθήκες πιθανών να οφείλεται στην παραγωγή μεταβολιτών από τα *Pseudomonas* spp. Τα παράγωγα αυτά είναι κυρίως αμίνες, αμμωνία και σουλφίδια (Nychas et al., 2007, Koutsoumanis et al., 2008), τα οποία ευθύνονται για την άνοδο του pH στα δείγματα.

Αντίθετα, στα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρών, η τιμή του pH σταδιακά μειώθηκε από το 5.85 (αρχικό δείγμα) σε 5.61 (4 °C), 5.75 (8 °C) και 5.63 (δυναμικό προφίλ) (Σχήμα 3.10). Η μείωση αυτή οφείλεται στην ανάπτυξη του *Brochothrix thermosphacta* και των LAB και πιο συγκεκριμένα στον σχηματισμό οργανικών οξέων κατά τον μεταβολισμό της γλυκόζης από τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς (Ellis and Goodacre, 2001, Nychas et al., 2007, Koutsoumanis et al., 2008). Ταυτόχρονα, αύξηση του pH εμφανίστηκε μόνο στην περίπτωση των δειγμάτων που συντηρήθηκαν στους 12 °C (Σχήμα 3.10), γεγονός που συμφωνεί με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα των 12 °C και επιβεβαιώνει ότι η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην θερμοκρασία αυτή δεν επηρεάστηκε από την τροποποίηση των ατμοσφαιρικών συνθηκών στη συσκευασία.

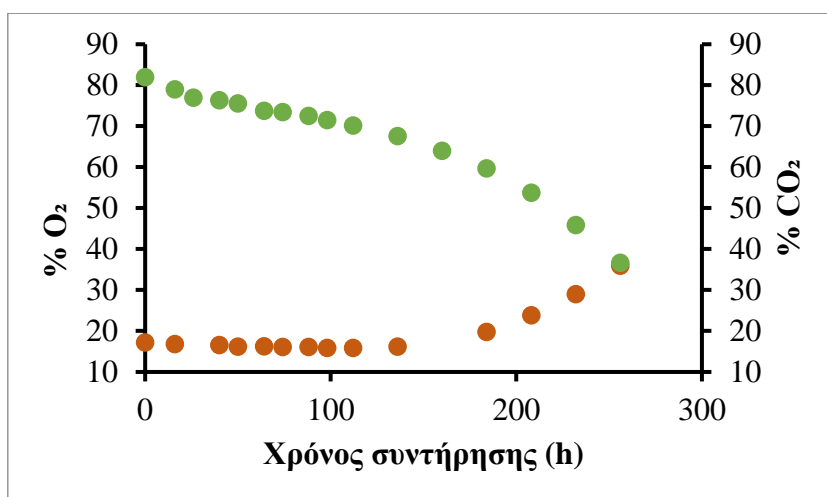
3.4 Αποτελέσματα μέτρησης αερίων

Από τις μετρήσεις αερίων, στα συντηρημένα δείγματα υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, προκύπτουν τα ακόλουθα διαγράμματα ποσοστών O₂-CO₂ % συναρτήσει του χρόνου (Σχήματα 3.11-3.14). Τα ποσοστά CO₂ %, για τα δείγματα των 4 °C (Σχήμα 3.11) και του δυναμικού προφίλ (Σχήμα 3.13), δεν διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από τα αρχικά ποσοστά ενώ για τα δείγματα των 8 °C (Σχήμα 3.12) και 12 °C (Σχήμα 3.14) αυξήθηκε το ποσοστό κατά 16.1 και 25.1 αντιστοίχως. Παράλληλα, σε όλες τις θερμοκρασιακές συνθήκες, παρατηρήθηκε κατανάλωση O₂ με μεγαλύτερη αυτή των 8 °C (Σχήμα 3.12), 12 °C (Σχήμα 3.14) και του δυναμικού προφίλ (Σχήμα 3.13). Συγκρίνοντας το σχήμα 3.14 με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την

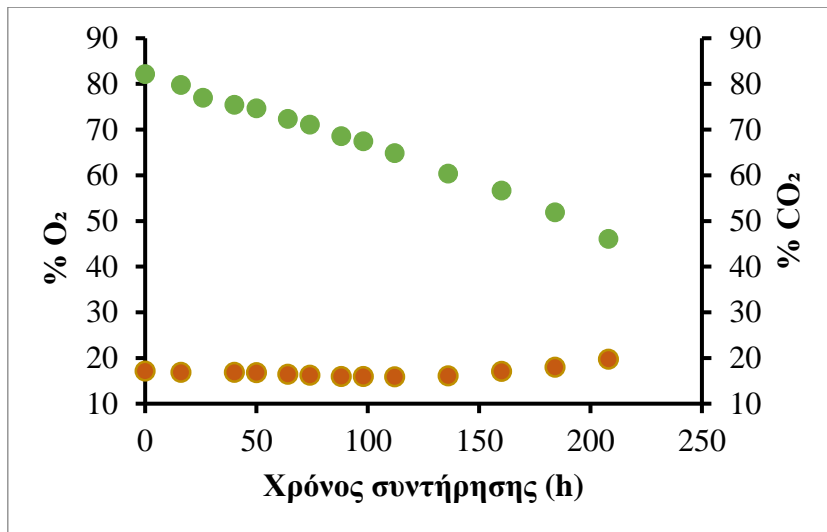
θερμοκρασία των 12 °C (Σχήμα 3.8), φαίνεται ότι η αντιστροφή του ποσοστού του O₂ με του CO₂ % πιθανόν να οφειλόταν στο αυξημένο πληθυσμιακό φορτίο για τις 160 ώρες. Όμοια, η εξίσωση των ποσοστών O₂- CO₂ στην περίπτωση των 8 °C (Σχήμα 3.12) συνδέεται με την ανάπτυξη των μικροοργανισμών για τις 256 ώρες. Οι παραπάνω μεταβολές στα ποσοστά αερίων της συσκευασίας με την πάροδο του χρόνου, αποδίδονται κυρίως στην αναπνευστική λειτουργία των ενδογενών μικροοργανισμών του δείγματος (Ercolini et al., 2006, Koutsoumanis et al., 2008). Η αυξημένη συγκέντρωση του CO₂ ενδεχομένως να οφείλεται στον μεταβολισμό της γλυκόζης από τον *Brochothrix thermosphacta* μέσω δύο βασικών μεταβολικών μονοπατιών (Borch et al., 1996, Nychas et al., 2007).



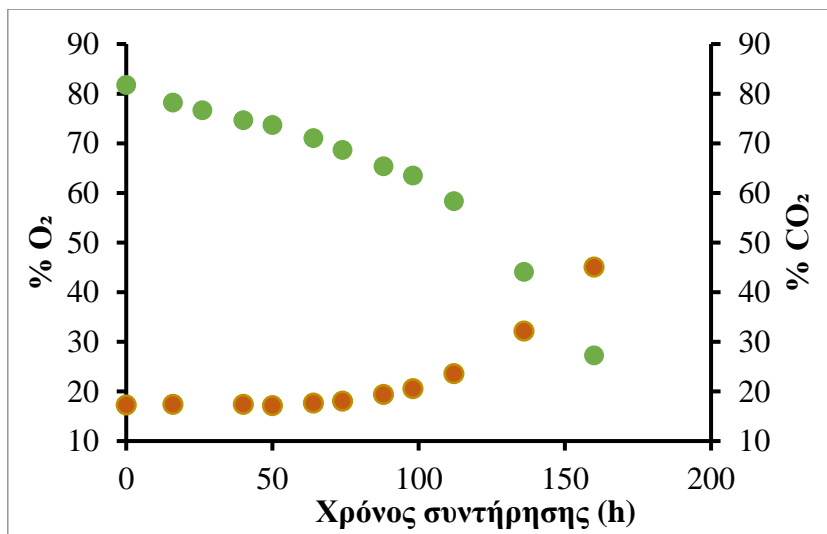
Σχήμα 3.11: Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στους 4 °C υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.



Σχήμα 3.12: Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στους 8 °C υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.



Σχήμα 3.13: Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.



Σχήμα 3.14: Μετρήσεις αερίων O₂ (●) και CO₂ (●) για το πρότυπο δείγμα που συντηρήθηκε στους 12 °C υπό συσκευασία O₂-CO₂: 80-20%.

3.5 Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης

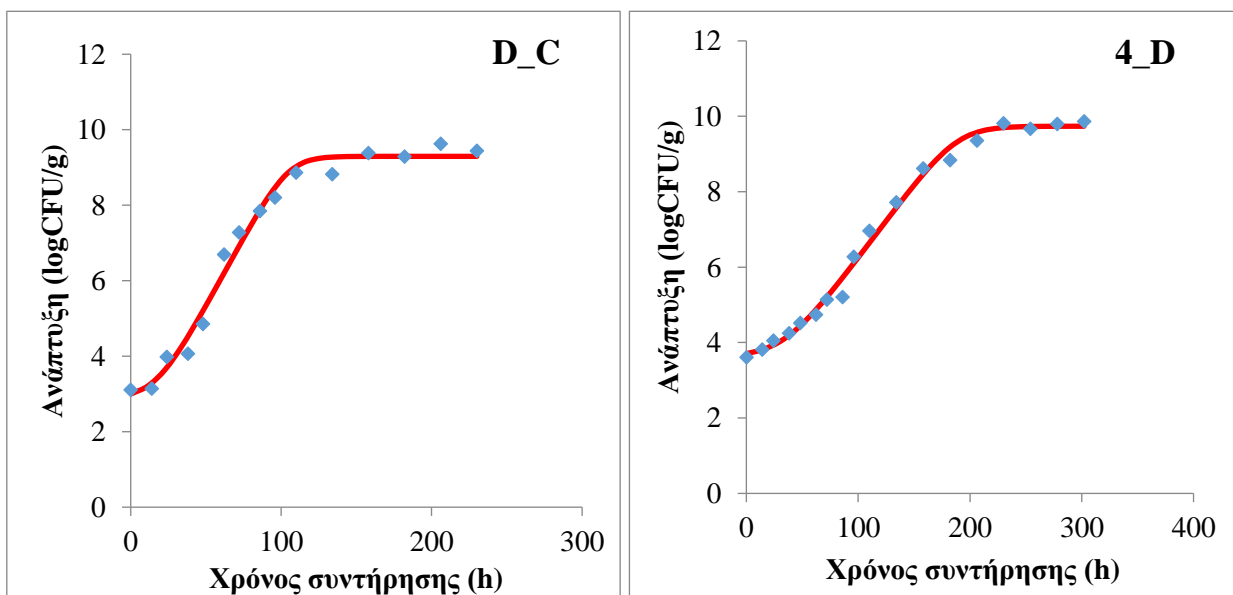
3.5.1. Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση υπό ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Πίνακας 3.1: Κινητικές παράμετροι μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες.

Μικροοργανισμός	Θ (°C)	λ (lag-phase, h)	y ₀ (log CFU/g)	y _{end} (log CFU/g)	Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης, μ _{max} (h ⁻¹)	R ² (Ελάχιστο-Μέγιστο)	Τυπικό Σφάλμα Προσαρμογής (Ελάχιστο-Μέγιστο)
OMX	4	33.232	3.475	9.518	0.079	0.971-0.993	0.199-0.381
<i>Pseudomonas</i> spp.		29.988	2.320	9.340	0.084	0.972- 0.995	0.179-0.424
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		18.605	1.945	8.055	0.083	0.981-0.994	0.178-0.326
LAB		28.551	2.472	6.958	0.051	0.940-0.962	0.314-0.404
OMX	8	18.201	3.410	9.377	0.127	0.981-0.993	0.190-0.33
<i>Pseudomonas</i> spp.		21.943	2.338	9.284	0.146	0.981-0.99	0.279-0.362
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		16.195	1.930	7.873	0.141	0.979-0.99	0.23-0.294
LAB		17.522	2.389	7.334	0.115	0.911-0.988	0.221-0.555
OMX	12	16.100	3.372	9.125	0.222	0.981-0.988	0.265-0.363
<i>Pseudomonas</i> spp.		17.077	2.333	9.067	0.212	0.961-0.991	0.226-0.549
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		8.847	1.890	7.698	0.201	0.985-0.995	0.155-0.269
LAB		11.954	2.621	7.567	0.193	0.947-0.985	0.242-0.45
OMX	Δ-M	17.328	3.246	9.297	0.131	0.976-0.985	0.288-0.339
<i>Pseudomonas</i> spp.		22.698	2.395	9.110	0.154	0.981-0.989	0.277-0.348
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		20.726	1.867	7.881	0.158	0.978-0.99	0.24-0.339
LAB		22.935	2.410	7.447	0.124	0.973-0.989	0.206-0.326

Κατά την εφαρμογή των πρωτογενών κινητικών μοντέλων ανάπτυξης για τους OMX, *Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta* και LAB προέκυψαν οι παραπάνω κινητικές παράμετροι (Πίνακας 3.2). Από τα αποτελέσματα της φάσης προσαρμογής λ και του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης, παρουσιάστηκε μεγαλύτερη παρεμπόδιση της ανάπτυξης, όλων των

μικροοργανισμών, κατά την συντήρηση του χοιρινού κιμά στους 4 °C ενώ ακολούθησαν το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας και οι 8 °C. Αντιθέτως, οι τιμές του λ ήταν χαμηλές ενώ του μ_{\max} ήταν αυξημένες, για την περίπτωση συντήρησης στους 12 °C, γεγονός που συμφωνεί με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την συγκεκριμένη θερμοκρασία (Σχήμα 3.4) και επιβεβαιώνει ότι η συντήρηση των δειγμάτων σ αυτή την θερμοκρασία δεν επιδρά παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Παπαδοπούλου, 2013, Panagou et al., 2014). Παρόμοια συμπεριφορά προσαρμογής παρουσίασαν οι μικροοργανισμοί των δειγμάτων που επωάστηκαν στους 8 °C και στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας. Επιπλέον, παρατηρώντας τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης για την *Pseudomonas* spp. φάνηκε ότι υπερτερεί των αντίστοιχων ρυθμών ανάπτυξης για τους άλλους μικροοργανισμών, καθώς και ότι κατά την συντήρηση στο 4 °C ευνοείται η ανάπτυξη της (Nychas et al., 2007, Ercolini et al., 2010). Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα μικροβιακής ανάπτυξης, το τυπικό σφάλμα προσαρμογής ήταν κατά πολύ μικρότερο του 1 (η ανώτερη τιμή ήταν 0.54), και ο συντελεστής προσδιορισμού έφτασε κοντά στο 0.99, όπως στην περίπτωση του *Brochothrix thermosphacta* και του δυναμικού προφίλ. Ακολούθως, δίνονται δύο παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου στα πειραματικά μικροβιολογικά δεδομένα.



Σχήμα 3.15: Παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994) (—) στα πειραματικά δεδομένα (♦) της OMX, για τα συντηρημένα δείγματα στους 4 °C (δεξιά καμπύλη) και στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (αριστερή καμπύλη) υπό αερόβιες συνθήκες.

3.5.2. Πρωτογενή μοντέλα μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες

Πίνακας 3.2: Κινητικές παράμετροι μικροβιακής ανάπτυξης για την συντήρηση σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες.

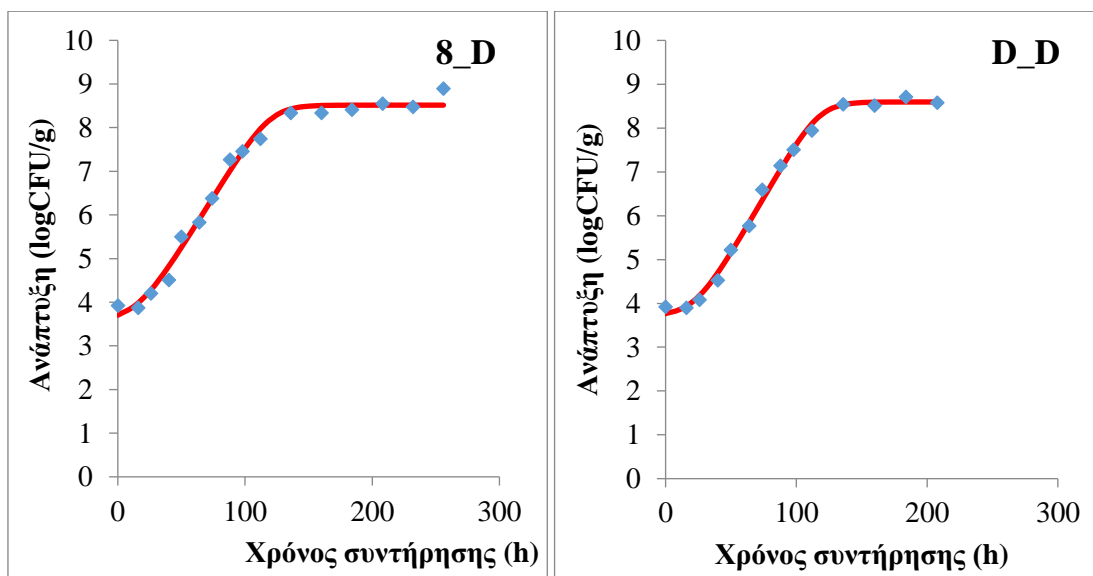
Μικροοργανισμός	Θ (°C)	λ (lag-phase, h)	y_0 (log CFU/g)	y_{end} (log CFU/g)	Μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης, μ_{max} (h^{-1})	R^2 (Ελάχιστο-Μέγιστο)	Τυπικό Σφάλμα Προσαρμογής (Ελάχιστο-Μέγιστο)
OMX	4	45.827	3.739	8.823	0.058	0.956-0.980	0.259-0.414
<i>Pseudomonas</i> spp.		73.661	2.995	6.691	0.039	0.941-0.958	0.242-0.371
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		-	2.215	8.347	0.055	0.969-0.982	0.279-0.373
LAB		24.309	2.775	7.928	0.052	0.972-0.991	0.193-0.292
OMX	8	26.152	3.789	8.582	0.103	0.959-0.987	0.213-0.383
<i>Pseudomonas</i> spp.		21.184	3.073	7.827	0.063	0.949-0.953	0.348-0.423
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		-	2.309	8.240	0.098	0.957-0.979	0.306-0.441
LAB		-	2.487	8.107	0.090	0.968-0.974	0.336-0.341
OMX	12	-	3.567	8.821	0.141	0.957-0.99	0.199-0.378
<i>Pseudomonas</i> spp.			3.016	8.751	0.087	0.972-0.987	0.225-0.316
<i>Brochothrix thermosphacta</i>			2.590	8.270	0.167	0.979-0.994	0.151-0.296
LAB			2.601	7.717	0.142	0.972-0.994	0.135-0.322
OMX	Δ -M	30.673	3.822	8.611	0.121	0.933-0.995	0.136-0.531
<i>Pseudomonas</i> spp.		47.041	3.302	7.891	0.104	0.95-0.983	0.207-0.432
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		20.944	2.444	8.296	0.131	0.977-0.986	0.249-0.365
LAB		-	2.564	8.005	0.092	0.962-0.984	0.243-0.369

Στον παραπάνω πίνακα παρατίθενται οι κινητικές παράμετροι ανάπτυξης των μικροοργανισμών κατά την συντήρηση τους υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί η φάση προσαρμογής των μικροοργανισμών, παρά το χαμηλό αρχικό μικροβιακό φορτίο, διότι η ανάπτυξη τους βρισκόταν στην εκθετική φάση.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, στα δείγματα των 4 °C, η ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρεμποδίστηκε επιτυχώς από την χαμηλή θερμοκρασία και την διαφορετική ατμόσφαιρα (μεγάλη τιμή λ και χαμηλή τιμή μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης), εκτός από τους *Brochothrix thermosphacta* και LAB οι οποίοι ευνοήθηκαν από τις αλλαγές αυτές (Dainty, 1996, Nychas et al., 2007, 2008, Dourgeraki et al., 2012). Παρόμοια, στα δείγματα του δυναμικού προφίλ συντήρησης, η φάση προσαρμογής της *Pseudomonas* spp. στις νέες συνθήκες ήταν αυξημένη, υποδηλώνοντας την ανασταλτική δράση της τροποποιημένης ατμόσφαιρας στην ανάπτυξη της (Koustoumanis et al., 2008, Ercolini et al., 2010). Επίσης, κατά την συντήρηση στους 8 °C, ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης της OMX ήταν παρόμοιος με αυτόν του *Brochothrix thermosphacta* και των LAB, γεγονός που επιβεβαιώνει τα μικροβιολογικά αποτελέσματα καθώς και ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι οι κυρίαρχοι αλλοιωγόνους για τις συνθήκες συντήρησης αυτές (Labadie, 1999).

Στα δείγματα των 12 °C δεν ήταν δυνατό να προσδιοριστεί η φάση προσαρμογής και επομένως η αξιολόγηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών έγινε με γνώμονα τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Συγκρίνοντας το μ_{max} των δειγμάτων συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες (Πίνακας 3.1) με αυτό των τροποποιημένων ατμοσφαιρών (Πίνακας 3.2), φάνηκε ότι υπήρξε μικρή επίδραση της νέας ατμόσφαιρας στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Επιπρόσθετα, οι τιμές του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για τους *Brochothrix thermosphacta* και LAB ήταν υψηλότερες από αυτή των *Pseudomonas* spp. και παρόμοιες με την τιμή της OMX, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για τους κύριους αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς (Nychas et al., 2007, Dourgeraki et al., 2012).

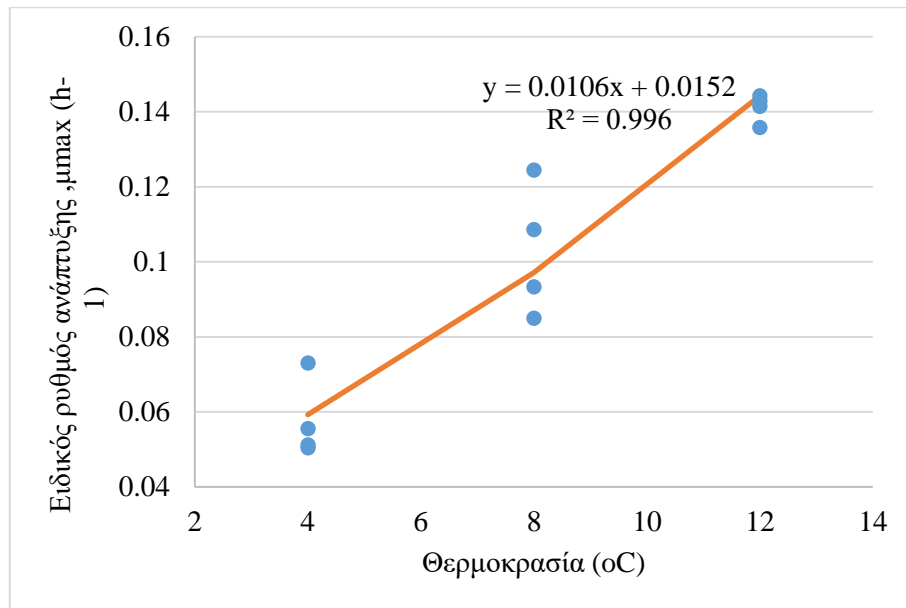
Αξίζει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο τυπικό σφάλμα προσαρμογής, κατά την δημιουργία των πρωτογενών καμπύλων ανάπτυξης, ήταν ίσο με 0.432 και ο τετραγωνικός συντελεστής συσχέτισης προσέγγιζε το 1. Στο παρακάτω σχήμα δίνονται δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα από την προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα.



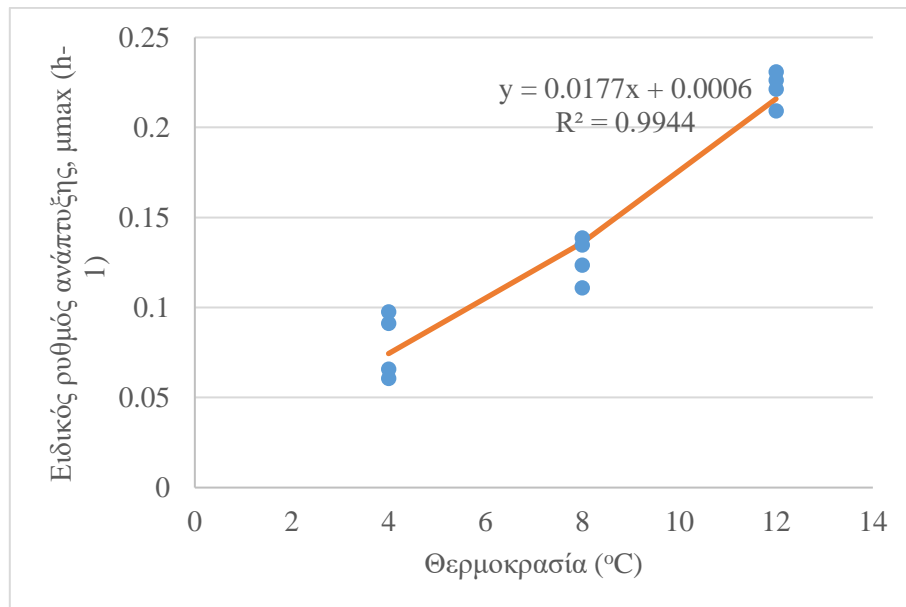
Σχήμα 3.16.: Παραδείγματα από την προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου των Baranyi και Roberts (1994) (—) στα πειραματικά δεδομένα (♦) της OMX, για τα συντηρημένα δείγματα στους 4 οC (δεξιά καμπύλη) και στο δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας (αριστερή καμπύλη) υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες.

3.5.3 Επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης της OMX

Όπως αναφέρθηκε και στο Υποκεφάλαιο 2.8.2 χρησιμοποιήθηκαν οι τετραγωνικές ρίζες του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης ($n=12$ ανά τύπο συσκευασίας: 4 σε κάθε θερμοκρασία) και με τη βοήθεια του δευτερογενούς μοντέλου του Ratkowsky (Ratkowsky et al., 1982) προέκυψαν οι τιμές των $b= 0.017$ και του $T_{\min}= -10.28$ °C με $RMSE= 0.021$ για τα δείγματα υπό αερόβιες συνθήκες, και οι $b= 0.024$ και του $T_{\min}= -7.38$ °C με $RMSE= 0.023$ για τα δείγματα υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες. Από τα δευτερογενή μοντέλα που προέκυψαν, κατασκευάστηκαν τα ακόλουθα σχήματα 3.17- 3.18, τα οποία περιγράφουν την συσχέτιση μεταξύ του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης και της εξωγενούς θερμοκρασίας. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα πειραματικά δεδομένα αποκλίνουν από το μοντέλο, και στις δύο περιπτώσεις συσκευασίας, εφόσον στόχος του πειράματος ήταν η διεξαγωγή μοντέλων για την εκτίμηση της αλλοίωσης του κιμά.



Σχήμα 3.17: Επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{\max} (h^{-1}), όπου (—) το δευτερογενές μοντέλο και (•) τα πειραματικά αποτελέσματα, για την συντήρηση υπό αερόβιες συνθήκες.

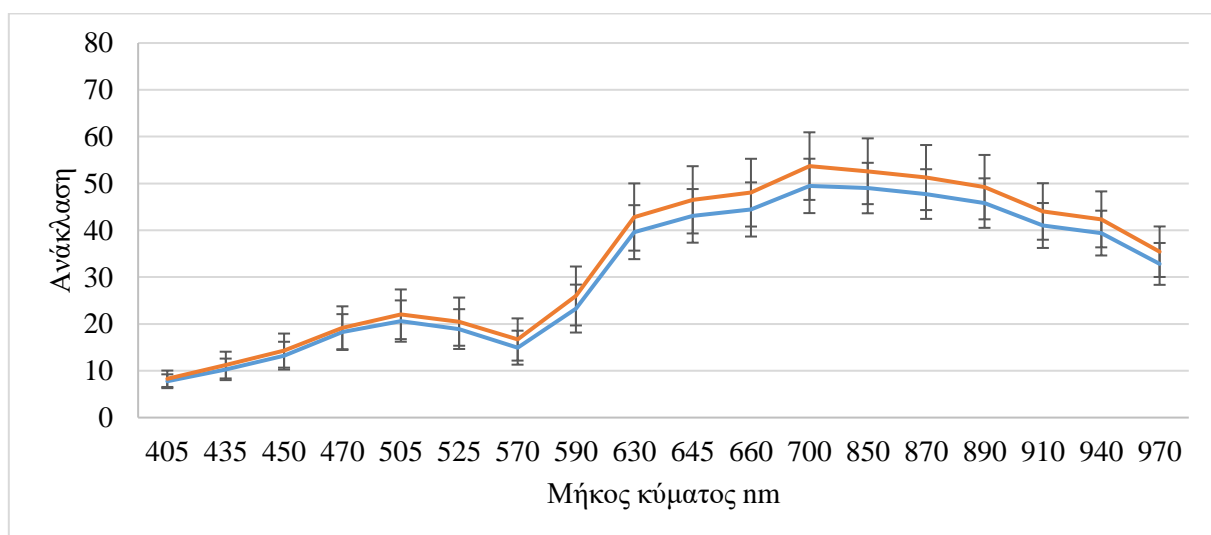


Σχήμα 3.18: Επίδραση της θερμοκρασίας στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης μ_{\max} (h^{-1}), όπου (—) το δευτερογενές μοντέλο και (•) τα πειραματικά αποτελέσματα, για την συντήρηση υπό τροποποιημένες συνθήκες συσκευασίας.

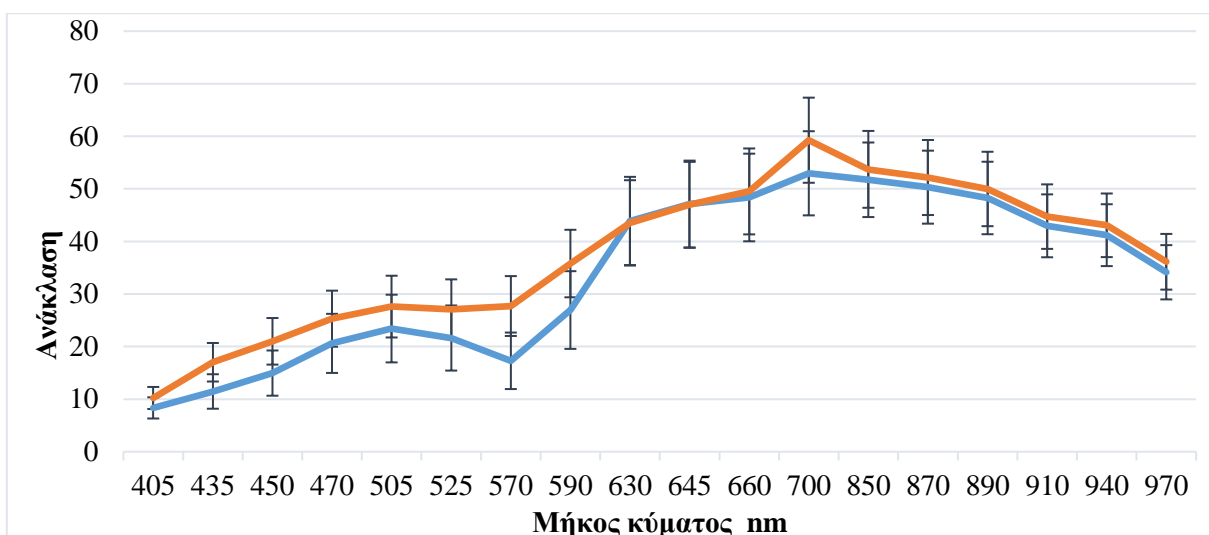
3.6 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης.

3.6.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης.

Στα ακόλουθα σχήματα 3.19-3.20 δίνονται τα φάσματα των δειγμάτων (φρέσκου και αλλοιωμένου) όπως προκύπτουν για τα 18 μήκη κύματος του Videometer- Lab. Για την περίπτωση των δειγμάτων που συντηρήθηκαν κάτω από αερόβιες συνθήκες, φαίνεται ότι η διαφοροποίηση των φρέσκων από τα αλλοιωμένα οφείλεται κυρίως στις χημικές ουσίες που αντανακλούν στα μήκη κύματος 570 έως 970 nm (Σχήμα 3.19). Οι ενώσεις που αντιστοιχούν σ' αυτά τα μήκη κύματος, και σχετίζονται άμεσα με την αλλοίωση του χοιρινού κρέατος, είναι η μυογλοβίνη (570 nm), η οξυμυογλοβίνη (590 nm) και η μεταμυογλοβίνη (630 nm), ενώ τα φάσματα των 700, 890, 910, 940 και 970 nm μαρτυρούν την ύπαρξη οξείδωσης (700 nm), λίπους (890, 940 nm), πρωτεϊνών (910 nm) και νερού (970 nm) (ElMasry et al., 2012, Dissing et al., 2013, Ropodi et al., 2013). Αντιθέτως, ο διαχωρισμός του φρέσκου από το αλλοιωμένο για τα δείγματα με την τροποποιημένη ατμόσφαιρα γίνεται κυρίως από τα μήκη κύματος 570, 590, 660 και 700 nm (Σχήμα 3.20) που υποδεικνύουν την ύπαρξη μυογλοβίνης, οξυμυογλοβίνης και της διαδικασίας της οξείδωσης (Ropodi et al., 2013, 2017, Panagou et al., 2014).



Σχήμα 3.19: Σύγκριση του φάσματος του φρέσκου δείγματος χοιρινού κρέατος (—) με αυτό του αλλοιωμένου (—) για την περίπτωση συντήρησης σε αερόβιες συνθήκες.



Σχήμα 3.20: Σύγκριση του φάσματος του φρέσκου δείγματος χοιρινού κιμά (—) με αυτό του αλλοιωμένου (—) για την περίπτωση συντήρησης υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας.

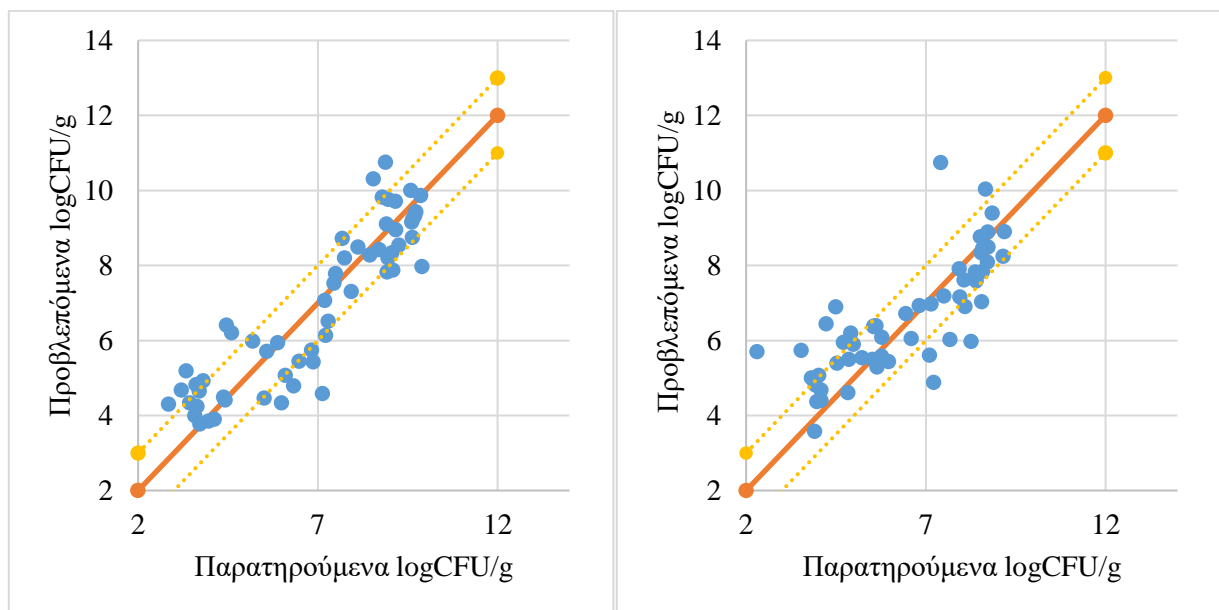
3.6.2 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαγίστων τετραγώνων (Partial Least Square- Regression, PLS-R)

Για την αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού της OMX σε χοιρινού κιμά, παρατίθενται στον Πίνακα 3.4, οι δείκτες απόδοσης για την εκπαίδευση, την επικύρωση και την πρόβλεψη του μοντέλου. Να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι η πρόβλεψη του μοντέλου πραγματοποιήθηκε με τα δεδομένα του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ αποκλειστικά, για εύρος πληθυσμού της OMX αντίστοιχο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκπαίδευση του μοντέλου (Πίνακας 3.4). Οι συντελεστές συσχέτισης r_c , r_{cv} , r_p , και για τις δύο περιπτώσεις συσκευασίας, είναι κοντά στο 0.9, εκτός από τον r_p για την τροποποιημένη ατμόσφαιρα όπου είναι κοντά στο 0.8. Οι τιμές αυτές, συνδυαστικά με τα $RMSE_C$, $RMSE_{CV}$ και $RMSE_P$ όπου είναι μεταξύ 0.838 και 1.017, δείχνουν ότι τα δεδομένα από την πολυφασματική απεικόνιση συσχετίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX. Επίσης, από τον δείκτη μεροληψίας B_f (Baranyi et al., 1999), ο οποίος είναι μεγαλύτερος του 1 (για τον αέρα: 1.015, για την τροποποιημένη ατμόσφαιρα: 1.051), φαίνεται ότι το μοντέλο έχει την τάση να υπερεκτιμά τον πληθυσμό της OMX (ζώνη fail- safe)(Ross, 1996), ωστόσο θεωρείται ικανοποιητικό. Παράλληλα, οι τιμές του συντελεστή ακριβείας A_f δείχνουν ότι η μέση απόκλιση των προβλεπόμενων αποικιών από τις παρατηρούμενες είναι της τάξης του 14.6 % για την περίπτωση της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες και του 16.2 % γι' αυτήν των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών

(Ross,1996, Baranyi et al., 1999, Oscar, 2005). Η ικανοποιητική απόδοση των δύο μοντέλων φαίνεται και από τα διαγράμματα προβλεπόμενων- παρατηρούμενων τιμών του σχήματος 3.21.

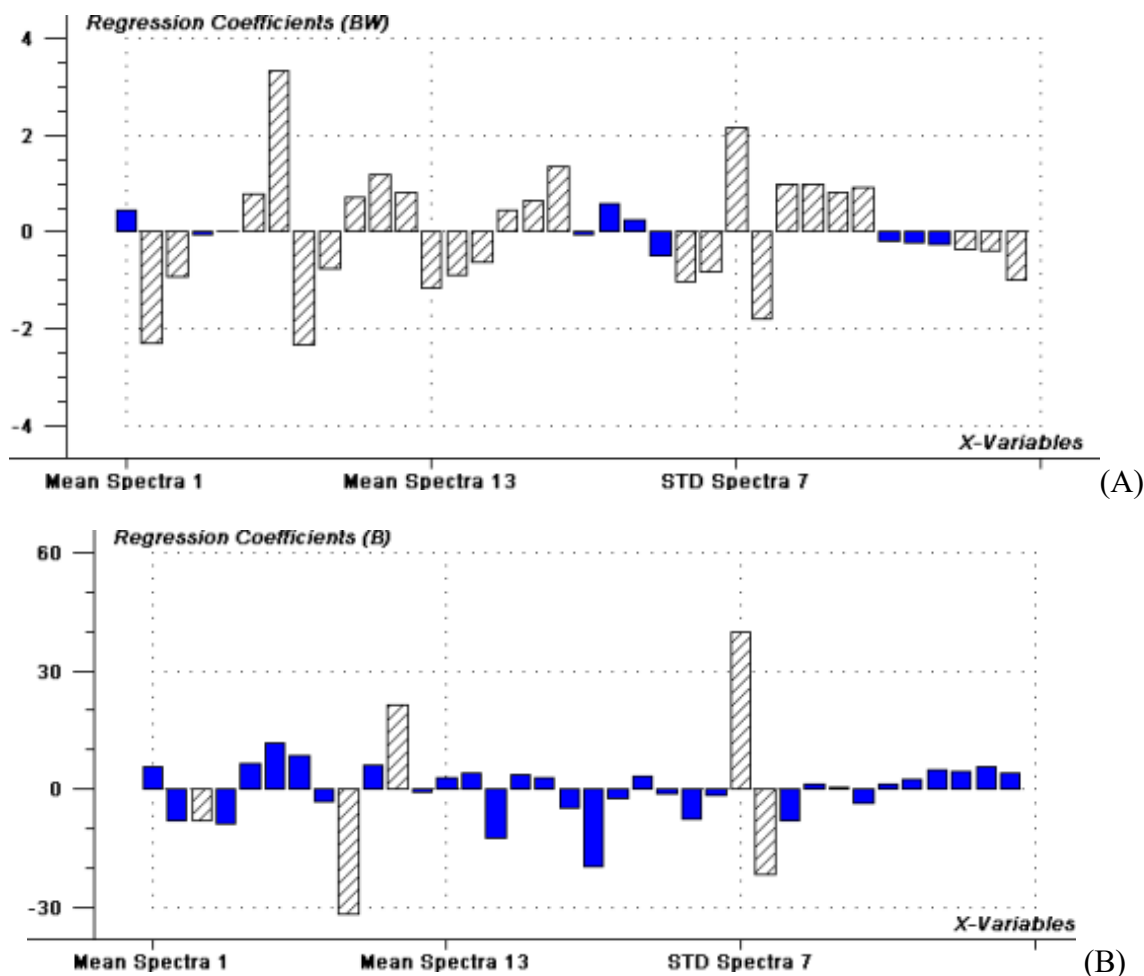
Πίνακας 3.3: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα της παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) στα δείγματα του αέρα και των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών.

		Αέρας	MAP
OMX Εύρος Βαθμονόμησης (log CFU/g)		4.34-10.69	3.34-11.57
OMX Εύρος Πρόβλεψης (log CFU/g)		4.22-10.79	3.28-12
Λανθάνουσες συνιστώσες (LVs)		9	8
Ανάπτυξη	RMSE _C	0.898	0.838
	r _c	0.916	0.893
Επικύρωση CV	RMSE _{F_{CV}}	1.004	0.94
	r _{cv}	0.894	0.864
Πρόβλεψη	RMSE _p	1.017	1.186
	r _p	0.892	0.781
	B _f	1.015	1.051
	A _f	1.146	1.162



Σχήμα 3.21: Διαγράμματα συσχέτισης των προβλεπόμενων (—) με τις παρατηρούμενες (●) τιμές για την συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες (αριστερά) και σε τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες (δεξιά). Οριοθέτηση ορίων αστοχίας πρόβλεψης στον ± 1 λογάριθμο (fail-safe:+1, fail-dangerous:-1).

Όπως φάνηκε και από τα φάσματα του φρέσκου και του αλλοιωμένου χοιρινού κιμά (Σχήματα 3.19, 3.20), δεν επηρεάζουν όλα τα μήκη κύματος στον ίδιο (θετικό ή αρνητικό) βαθμό την τελική πρόβλεψη του μοντέλου ως προς την OMX (ElMasry et al., 2012). Για να κατασκευαστούν οι συναρτήσεις που να προσδιορίζουν ποσοτικά την OMX σε δείγματα χοιρινού κιμά σε αερόβιες συνθήκες και σε τροποποιημένες ατμόσφαιρες, υπολογίστηκαν, με την βοήθεια του λογισμικού The Unscrambler, οι συντελεστές β οι οποίοι επηρεάζουν περισσότερο την πρόβλεψη του μοντέλου (b- coefficients) (Σχήμα 3.22).



Σχήμα 3.22: Οι συντελεστές β για τα δεδομένα των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων, για τα 18 φάσματα, στην περίπτωση των δειγμάτων που συντηρήθηκαν κάτω από αερόβιες συνθήκες (A) και από τροποποιημένη ατμόσφαιρα (B).

Παρατηρώντας το Σχήμα 3.22 (A), φαίνεται ότι σημαντική είναι η επίδραση των φασμάτων των 435, 450, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm για εκτίμηση της OMX με βάση το συγκεκριμένο μοντέλο. Αντίθετα, στην περίπτωση του μοντέλου για τις τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες (Σχήμα 3.22 B), μόνο τα φάσματα των 450, 570, 590,

630 και 660 nm επηρεάζουν την πρόβλεψη της OMX. Οι συναρτήσεις με βάση τις οποίες υπολογίζεται ο πληθυσμός της OMX σε δείγμα χοιρινού κιμά αερόβιων και τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας, είναι οι εξής:

$$Y_{OMX,A} = 7.75 - 2.29 \cdot X_{Mean,435} - 0.93 \cdot X_{Mean,450} + 0.79 \cdot X_{Mean,525} + 3.35 \cdot X_{Mean,570} - 2.32 \cdot X_{Mean,590} - 0.76 \cdot X_{Mean,630} + 0.73 \cdot X_{Mean,645} + 1.2 \cdot X_{Mean,660} + 0.81 \cdot X_{Mean,700} - 1.16 \cdot X_{Mean,850} - 0.89 \cdot X_{Mean,870} - 0.61 \cdot X_{Mean,890} + 0.44 \cdot X_{Mean,910} + 0.64 \cdot X_{Mean,940} + 1.37 \cdot X_{Mean,970} - 1.03 \cdot X_{SD,505} - 0.82 \cdot X_{SD,525} + 2.16 \cdot X_{SD,570} - 1.79 \cdot X_{SD,590} + 0.98 \cdot X_{SD,630} + X_{SD,645} + 0.82 \cdot X_{SD,660} + 0.92 \cdot X_{SD,700} - 0.35 \cdot X_{SD,910} - 0.39 \cdot X_{SD,940} - 0.99 \cdot X_{SD,970} \quad \text{(Εξίσωση 3.1)}$$

$$Y_{OMX,T-A} = -7.87 \cdot X_{Mean,450} - 31.38 \cdot X_{Mean,630} + 21.32 \cdot X_{Mean,660} + 39.96 \cdot X_{SD,570} - 21.73 \cdot X_{SD,590} \quad \text{(Εξίσωση 3.2)}$$

Όπου: Y= προβλεπόμενος πληθυσμός OMX (log CFU/g), $X_{mean, nm}$ = ο μέσος όρος των ανακλάσεων για το συγκεκριμένο φάσμα, $X_{SD, nm}$ = η τυπική απόκλιση του δείγματος για το συγκεκριμένο φάσμα.

Συγκρίνοντας τα ευρήματα αυτά με τα φάσματα του φρέσκου και του αλλοιωμένου φαίνεται να υπάρχει μία συμφωνία ως προς τα φάσματα που δίνουν τις περισσότερες πληροφορίες για την κατασκευή του μοντέλου. Αναλυτικότερα, η επίδραση του μήκους κύματος 570 nm στο μοντέλο πρόβλεψης της OMX, για αερόβιες συνθήκες, αποδίδεται κυρίως στο ότι η μυογλοβίνη (570 nm) (Dissing et al., 2012, Panagou et al., 2014) σε χαμηλή συγκέντρωση O₂ (όπως η ατμοσφαιρική) συναντάται στην ανηγμένη της μορφή, διατηρώντας το σκοτεινό χρώμα του κόκκινου κρέατος (Adams and Moss, 2008). Παράλληλα, η οξυμυογλοβίνη (590 nm) προσδίδει στο κόκκινο κρέας ένα έντονο κόκκινο χρώμα, το οποίο συνδέεται με την όψη φρεσκάδας του (Panagou et al. 2014, Li et al, 2015). Από την άλλη πλευρά, ο σχετικά υψηλός συντελεστής παλινδρόμησης για το μήκος κύματος των 660 nm σχετίζεται άμεσα με την διαδικασία της οξείδωσης της επιφάνειας του κρέατος, η οποία λαμβάνει χώρα κατά το πείραμα αλλοίωσης, Όσον αφορά την αυξημένη επίδραση του 970 nm, αυτή οφείλεται στην ύπαρξη νερού στην επιφάνεια του κρέατος (Barbin et al., 2013, ElMasry et al., 2013, Kamruzzaman et al., 2016).

Στο μοντέλο εκτίμησης της OMX σε χοιρινό κιμά υπό τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας, οι αυξημένες τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης αντιστοιχούν στα μήκη κύματος 570, 590, 630 και 660 nm όπου τα τρία πρώτα σχετίζονται με την μυογλοβίνη, την οξυμυογλοβίνη και την μεταμυογλοβίνη αντιστοίχως. Η επίδραση της μεταμυογλοβίνης

εμφανίζεται μεγαλύτερη από αυτή της οξυμυογλοβίνης, γεγονός που οφείλεται στον αυξημένο ρυθμό σχηματισμού της πρώτης, λόγω της οξειδωσης της μυογλοβίνης και της οξυογλοβίνης κάτω από συνθήκες υψηλής συγκέντρωσης οξυγόνου (Adams and Moss, 2008, Davis and Ghaly, 2011).

3.6.3 Αποτελέσματα διακριτικής ανάλυσης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA).

Με την διακριτική ανάλυση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων έγινε μία προσπάθεια διαχωρισμού και ταξινόμησης σε υπο-σύνολα βάσει του βαθμού αλλοιώσης των δειγμάτων χοιρινού κρέατος. Τα αποτελέσματα της ελεγχόμενης μεθόδου ανάλυσης δεδομένων δίνονται αριθμητικά (% Ευαισθησία και % Συνολική ακρίβεια) υπό την μορφή του Πίνακα 3.5 (συντήρηση με αερόβιες συνθήκες) και του Πίνακα 3.6 (συντήρηση με τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας, καθώς και γραφικά (3.23, 3.24). Παρατηρείται ότι τα μοντέλα ταξινόμησης δειγμάτων χοιρινού κρέατος έχουν μεγάλη ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό και την κατηγοριοποίηση των κλάσεων του φρέσκου και του αλλοιωμένου. Πιο συγκεκριμένα, για την περίπτωση του αέρα (LVs: 6), παρουσιάζει 100 % (φρέσκο) και 97.7 (αλλοιωμένο) % ευαισθησία κατά την ανάπτυξη και την επικύρωση καθώς και 95% για το φρέσκο και 88.24% για το αλλοιωμένο κατά την διαδικασία της πρόβλεψης. Επίσης, σε όλες τις διαδικασίες για την δημιουργία του μοντέλου η % συνολική ακρίβεια συγκέντρωσε ποσοστό μεγαλύτερο του 84.48%. Για τα δείγματα που συντηρήθηκαν κάτω από τροποποιημένη ατμόσφαιρα (LVs: 5), εμφανίζεται 100 % (ανάπτυξη), 96.97 % (επικύρωση), 82.91 % (πρόβλεψη) ευαισθησία για την κλάση του φρέσκου και ταυτόχρονα 94.44 % (ανάπτυξη), 93.33 % (επικύρωση) και 92.31 % (πρόβλεψη). Επιπλέον, η % συνολική ακρίβεια της πρόβλεψης του μοντέλου είναι 79.63 %, ενώ παράλληλα από τα σχήματα 3.23 και 3.24, φαίνεται ότι υπάρχει μικρή αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δύο κλάσεων φρέσκου και αλλοιωμένου.

Όπως φαίνεται από τους Πίνακες 3.5 και 3.6, το μοντέλο που κατασκευάστηκε σε κάθε περίπτωση συσκευασίας, δεν μπορούσε να διαχωρίσει και εν συνεχεία να ταξινομήσει σωστά τα οριακά φρέσκα δείγματα καθώς στην μία περίπτωση (αεροβική συσκευασία) είχε % ευαισθησία 52.30 (ανάπτυξη) και 0 (επικύρωση και πρόβλεψη), ενώ στην άλλη (τροποποιημένη ατμόσφαιρα) είχε πλήρη αδυναμία διαχωρισμού με 0 % ευαισθησία. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τα σχήματα 3.23 και 3.24, όπου παρατηρείται αδυναμία διαχωρισμού των οριακά φρέσκων από τα φρέσκα και τα αλλοιωμένα. Μία πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι το ότι δεν χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα δείγματα οριακά φρέσκου χοιρινού κρέατος κατά την ανάπτυξη του μοντέλου, καθόσον

είναι πρακτικά δύσκολη η ύπαρξη αρκετών οριακά φρέσκων δειγμάτων σε πείραμα αλλοίωσης. Ταυτόχρονα, η επιλογή του βαθμού αλλοίωσης για το οριακά φρέσκο δείγμα με βάση την νομοθεσία (ΕΕ 2073/2005) δεν θεωρείται επιτυχημένη καθώς το οριακά φρέσκο δείγμα απέχει μόλις 1 log CFU/g από το φρέσκο και το αλλοιωμένο δείγμα.

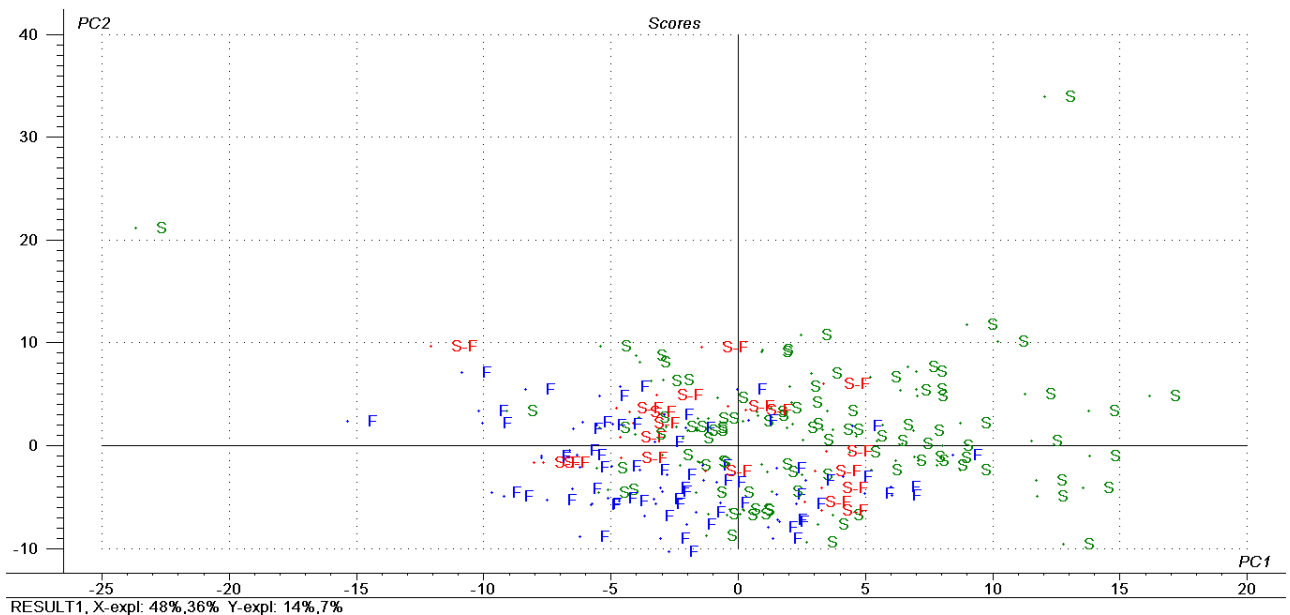
Πίνακας 3.4: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα του αέρα για τις τρεις κλάσεις αλλοίωσης.

Αέρας						
Ανάπτυξη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=168)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	60	0	0	60	100
	Οριακά Φρέσκο	11	4	6	21	52.38
	Αλλοιωμένο	2	0	85	87	97.70
	Συνολική Ακρίβεια %					88.69
Επικύρωση CV	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=168)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	60	0	0	60	100
	Οριακά Φρέσκο	15	0	6	21	0
	Αλλοιωμένο	2	0	85	91	97.70
	Συνολική Ακρίβεια %					86.31
Πρόβλεψη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=58)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	19	0	1	20	95
	Οριακά Φρέσκο	4	0	0	4	-
	Αλλοιωμένο	4	0	30	34	88.24
	Συνολική Ακρίβεια %					84.48

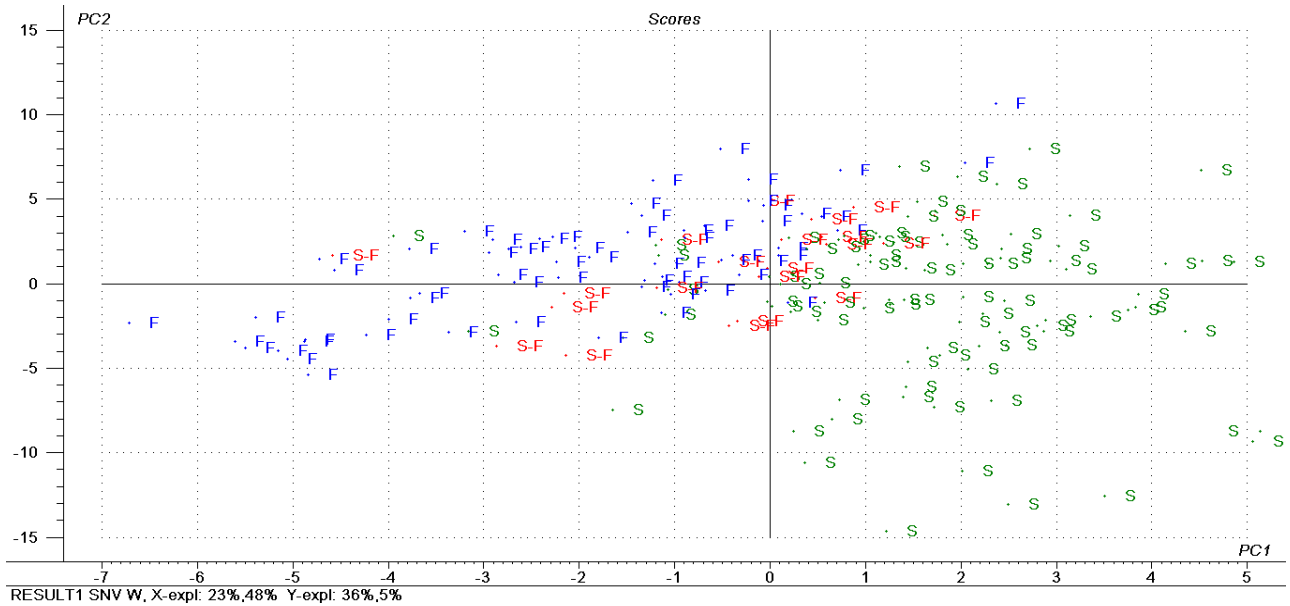
Πίνακας 3.5: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας για τις τρεις κλάσεις αλλοίωσης.

Τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες

Ανάπτυξη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=177)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	66	0	0	66	100
	Οριακά Φρέσκο	10	0	11	21	0
	Αλλοιωμένο	5	0	85	90	94.44
Συνολική Ακρίβεια %						85.31
Επικύρωση CV	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=177)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	64	2	0	66	96.97
	Οριακά Φρέσκο	11	0	10	21	0
	Αλλοιωμένο	6	0	84	90	93.33
Συνολική Ακρίβεια %						83.62
Πρόβλεψη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=54)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	19	0	4	23	82.61
	Οριακά Φρέσκο	4	0	1	5	0
	Αλλοιωμένο	2	0	24	26	92.31
Συνολική Ακρίβεια %						79.63



Σχήμα 3.23: Χωροταξική Απεικόνιση των τριων κλάσεων (φρέσκο:F, οριακά φρέσκο:S-F, αλλοιωμένο:S) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των αερόβιων συνθηκών συντήρησης.



Σχήμα 3.24: Χωροταξική Απεικόνιση των τριων κλάσεων (φρέσκο:**F**, οριακά φρέσκο:**S-F**, αλλοιωμένο:**S**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συντήρησης.

Για τους παραπάνω λόγους, επιλέχθηκε να μετατραπούν τα οριακά φρέσκα δείγματα σε φρέσκα ή αλλοιωμένα, ανάλογα με την πιθανότητα το δείγμα να κατατάσσεται στην μία ή στην άλλη κλάση (Bayesian prior) (Friedman, 1989). Με την προσέγγιση αυτή, επιτυγχάνεται ταυτόχρονα η κατάργηση μίας κλάσης που μειώνει την % συνολική ακρίβεια του μοντέλου, η αύξηση του αριθμού των δειγμάτων φρέσκου και αλλοιωμένου και κατ' επέκταση αυξάνεται η πιθανότητα σωστής ταξινόμησης ενός δείγματος σε δύο υπο- σύνολα (Brereton, 2006, Brereton and Lloyd, 2014). Από την μετατροπή αυτή, προκύπτουν οι ακόλουθοι πίνακες 3.7 και 3.8, με τις νέες δύο κλάσεις του φρέσκου και του αλλοιωμένου καθώς και τα σχήματα 3.25 και 3.26 με τις αντίστοιχες απεικονίσεις στο επίπεδο.

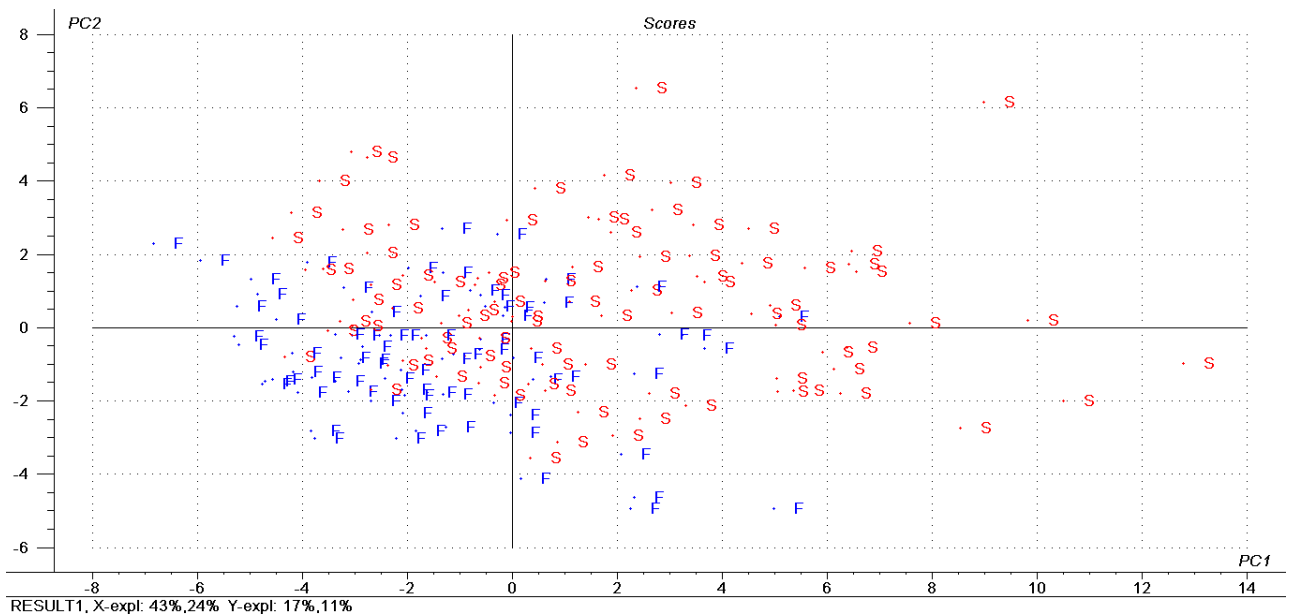
Πίνακας 3.6: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα του αέρα για τις δυο κλάσεις αλλοίωσης.

Αέρας					
Ανάπτυξη	Από/σε	Φρέσκο	Αλλοίωση	Συνολικά δείγματα (n=168)	% Ευαισθησία

	Φρέσκο	72	3	75	96
	Αλλοιωμένο	7	86	93	92.47
	Συνολική Ακρίβεια %				94.05
Επικύρωση CV	Από/σε	Φρέσκο	Αλλοίωση	Συνολικά δείγματα (n=168)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	72	3	75	96
	Αλλοιωμένο	9	84	93	90.32
	Συνολική Ακρίβεια %				92.86
Πρόβλεψη	Από/σε	Φρέσκο	Αλλοίωση	Συνολικά δείγματα (n=168)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	23	1	24	95.83
	Αλλοιωμένο	4	30	34	88.23
	Συνολική Ακρίβεια %				91.38

Πίνακας 3.7: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) στα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας για τις δυο κλάσεις αλλοίωσης.

Τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας					
Ανάπτυξη	Από/σε	Φρέσκο	Αλλοίωση	Συνολικά δείγματα (n=177)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	72	4	76	94.74
	Αλλοιωμένο	4	96	100	96.04
	Συνολική Ακρίβεια %				95.48
Επικύρωση CV	Από/σε	Φρέσκο	Αλλοίωση	Συνολικά δείγματα (n=177)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	71	5	76	93.42
	Αλλοιωμένο	5	96	101	95.05
	Συνολική Ακρίβεια %				94.35
Πρόβλεψη	Από/σε	Φρέσκο	Αλλοίωση	Συνολικά δείγματα (n=54)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	18	9	27	66.67
	Αλλοιωμένο	4	23	27	85.19
	Συνολική Ακρίβεια %				75.93



Σχήμα 3.25: Χωροταξική Απεικόνιση των δυο κλάσεων (φρέσκο:**F**, αλλιωμένο:**S**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των αερόβιων συνθηκών συντήρησης.



Σχήμα 3.26: Χωροταξική Απεικόνιση των δυο κλάσεων (φρέσκο:**F**, αλλιωμένο:**S**) στα επίπεδα όπως ορίζονται από τις λανθάνουσες συνιστώσες LVs: 1-2, κατά την κατασκευή του μοντέλου, για τα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συντήρησης.

Με την αύξηση του αριθμού των δειγμάτων ανά κλάση, κατά την ανάπτυξη, παρατηρήθηκε βελτίωση της διακριτικής ικανότητας των μοντέλων, για τις αερόβιες (LVs: 7) και τις τροποποιημένες συνθήκες συσκευασίας (LVs: 9), τόσο γραφικά όσο και αριθμητικά. Αναλυτικότερα, για την περίπτωση του αέρα η % συνολική ακρίβεια κατά την πρόβλεψη του μοντέλου ήταν 91.38 % ενώ για τις τροποποιημένες συνθήκες ήταν 75.93%. Στην τελευταία περίπτωση, μπορεί η % συνολική ακρίβεια να ήταν μικρότερη από την αντίστοιχη για τις τρεις κλάσεις, ωστόσο από το σχήμα 3.26 φάνηκε ότι δεν αλληλεπικαλύπτονται οι κλάσεις του φρέσκου με του αλλοιωμένου όσο στο σχήμα 3.24.

Τα μήκη κύματος που επηρεάζουν την διακριτική ικανότητα των δύο μοντέλων, ήταν όμοια με αυτά που προέκυψαν από τα μοντέλα PLS- R, κάτι που είναι αναμενόμενο καθ' όσον ο διαχωρισμός των κλάσεων έγινε με βάση την OMX και την υπάρχουσα νομοθεσία. Πιο συγκεκριμένα, σημαντική ήταν η επίδραση των 570, 590, 630, 660, 700, 910, 940, 970 nm για το μοντέλο των αερόβιων συνθηκών και των 570, 590, 630, 700, 890, 910 nm για τις τροποποιημένες συνθήκες συσκευασίας. Όπως αναφέρθηκε και στο υποκεφάλαιο 3.5.2, τα περισσότερα από τα μήκη κύματος αυτά, σχετίζονται με την αλλοίωση του χρώματος του χοιρινού κιμά και φαίνεται να επηρεάζουν μοντέλα κατάταξης και σε άλλα είδη κόκκινου κρέατος πέραν του χοιρινού κιμά (Dissing et al., 2012) όπως είναι το μοσχάρι (φιλέτο ή κιμάς) (Panagou et al., 2014), νοθευμένοι χοιρινοί κιμάδες με μοσχάρι (Rorodi et al., 2013) και μοσχαρίσιοι με κρέας αλόγου (Rorodi et al., 2017).

3.6.4 Αποτελέσματα από τη μέθοδο της διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (DFA).

Για τον διαχωρισμό των δειγμάτων αλλοίωσης του χοιρινού κιμά, υπό αερόβιες και τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συντήρησης, σε τρεις κατηγορίες (όπως στην υποενότητα 3.5.3), εφαρμόστηκε η μέθοδος της διακριτικής ανάλυσης παραγόντων και τα αποτελέσματα της παρατίθενται στους Πίνακες 3.9 και 3.10. Επίσης, η διακριτική ικανότητα των δύο μοντέλων φαίνεται στα Σχήματα 3.27 και 3.28.

Πίνακας 3.8: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (DFA) στα δείγματα του αέρα για τις τρεις κλάσεις αλλοίωσης.

Αέρας						
Ανάπτυξη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=170)	% Ευαισθησία
		Φρέσκο	51.94	4.72	0.00	56.67

	Οριακά Φρέσκο	0.00	56.67	0.00	56.67	100.00
	Αλλοιωμένο	0.00	7.47	49.19	56.67	86.81
	Συνολική Ακρίβεια					92.83
Επικύρωση CV	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=170)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	50.06	6.61	0.00	56.67	88.33
	Οριακά Φρέσκο	8.95	47.72	0.00	56.67	84.21
	Αλλοιωμένο	0.62	9.34	46.70	56.67	82.42
	Συνολική Ακρίβεια %					84.99
Πρόβλεψη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=58)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	16.00	4.00	0.00	20	70.00
	Οριακά Φρέσκο	2.00	2.00	0.00	4	50.00
	Αλλοιωμένο	1.00	6.00	27.00	34	79.41
	Συνολική Ακρίβεια %					77.59

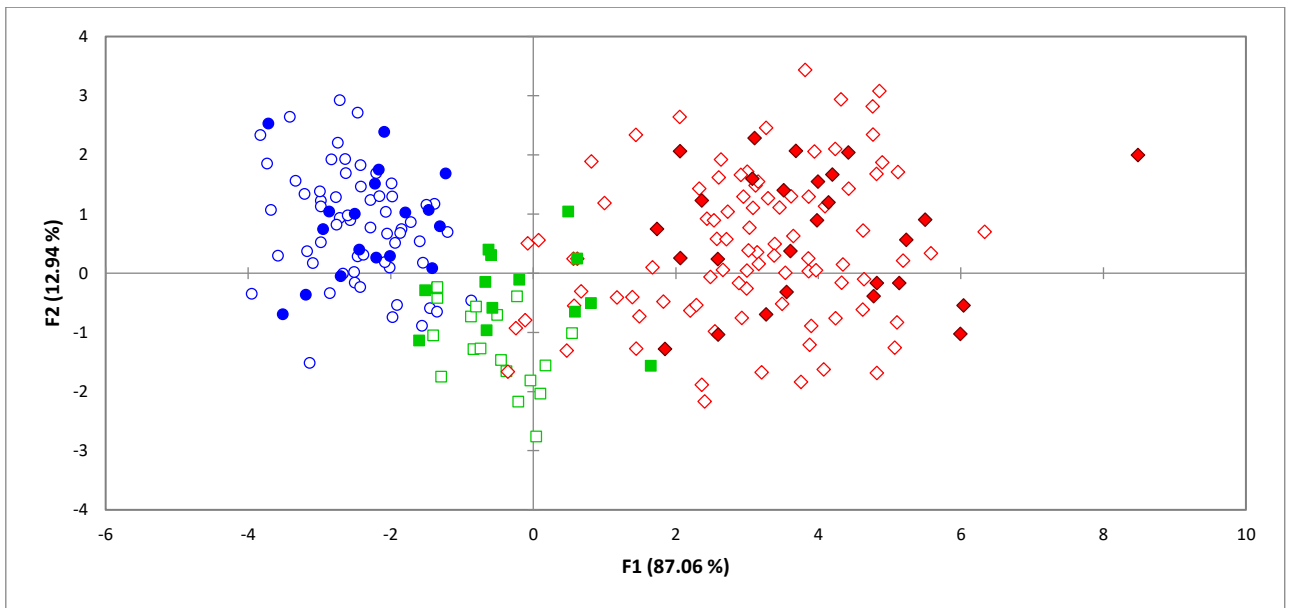
Πίνακας 3.9: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου διακριτικής ανάλυσης παραγόντων (DFA) στα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας για τις τρεις κλάσεις αλλοίωσης.

Τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες συσκευασίας						
Ανάπτυξη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=170)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	60.00	6.00	0.00	66.00	90.91
	Οριακά Φρέσκο	9.00	7.00	7.00	23.00	30.43
	Αλλοιωμένο	8.00	1.00	80.00	89.00	89.89
	Συνολική Ακρίβεια					82.58
Επικύρωση CV	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=170)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	57.00	9.00	0.00	66.00	86.36
	Οριακά Φρέσκο	9.00	6.00	8.00	23.00	26.09
	Αλλοιωμένο	8.00	2.00	79.00	89.00	88.76
	Συνολική Ακρίβεια %					79.78

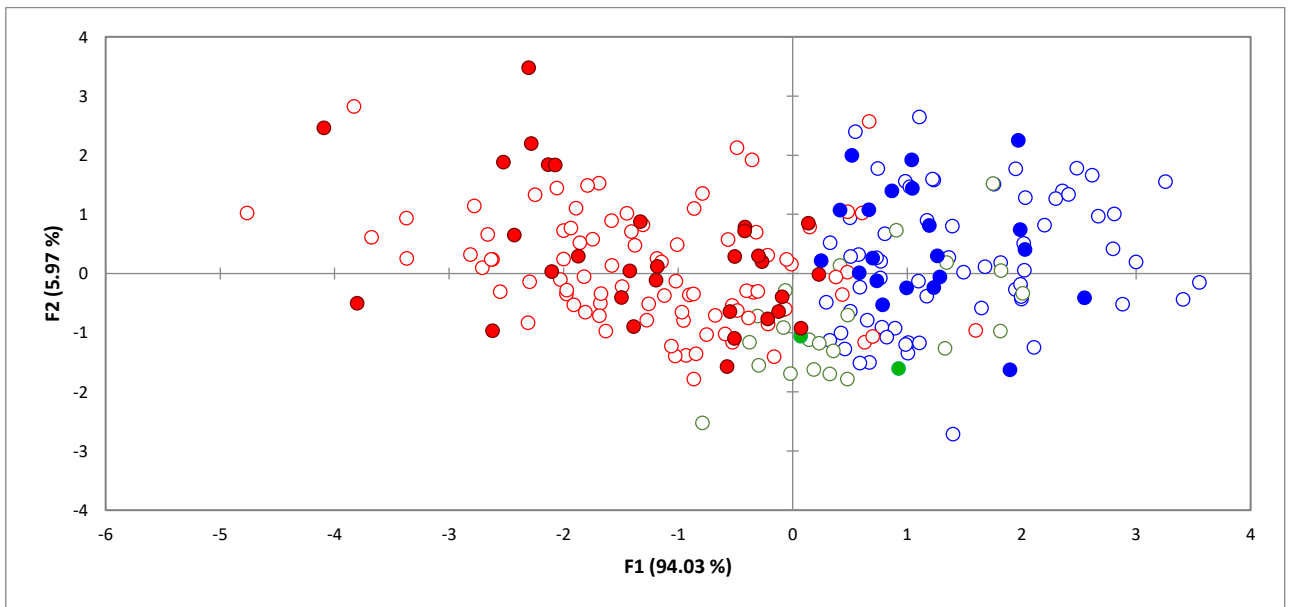
Πρόβλεψη	Από /σε	Φρέσκο	Οριακά Φρέσκο	Αλλοιωμένο	Συνολικά δείγματα (n=58)	% Ευαισθησία
	Φρέσκο	17.00	0.00	6.00	23.00	73.91
	Οριακά Φρέσκο	2.00	1.00	2.00	5.00	20.00
	Αλλοιωμένο	2.00	1.00	23.00	26.00	88.46
	Συνολική Ακρίβεια %					75.93

Σύμφωνα με τον Πίνακα 3.9, με το συγκεκριμένο μοντέλο διαχωρίστηκαν τα οριακά φρέσκα δείγματα χοιρινού κιμά, με % ευαισθησία ως προς την κλάση αυτή ίση με 50%. Παράλληλα, στο σχήμα 3.27 η αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των τριών κλάσεων φάνηκε ότι ήταν μειωμένη συγκριτικά με αυτήν που προκύπτει από το μοντέλο διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) (Σχήμα 3.23). Αντιθέτως, τα ποσοστά της ευαισθησίας για τις κλάσεις του φρέσκου και αλλοιωμένου ήταν αισθητά μειωμένα (μέγιστη τιμή το 91.67 %) από αυτά του μοντέλου PLS-DA (μέγιστη τιμή: 100%) (Πίνακας 3.5), κάτι που συνέβαλε και στην % συνολική ακρίβεια της πρόβλεψης του μοντέλου DFA (77.59 %).

Η % ευαισθησία του μοντέλου των τροποποιημένων ατμοσφαιρών (20%) (Πίνακας 3.10), ως προς την κλάση των οριακά φρέσκων, ήταν κατά πολύ μειωμένη από αυτήν του μοντέλου των αερόβιων συνθηκών (Πίνακας 3.9) και ταυτόχρονα βελτιωμένη σε σχέση με το μοντέλο PLS-DA (0 %) (Πίνακας 3.6). Επιπλέον, φάνηκε να υπάρχει μεγάλη αλληλοεπικάλυψη της μεσαίας κλάσης από τις άλλες δύο (Σχήμα 3.28), κάτι που δεν ίσχυσε για το μοντέλο των αερόβιων συνθηκών (3.27). Όσον αφορά, την διακριτική ικανότητα του μοντέλου ως προς το φρέσκο και το αλλοιωμένο, η % ευαισθησία του πρώτου, κατά την πρόβλεψη, έφτασε στο 73.91 % και του δεύτερου στο 88.46 %, ποσοστά μικρότερα από αυτά του μοντέλου PLS-DA (82.61 και 92.31 % αντιστοίχως). Μειωμένο εμφανίστηκε και το συνολικό ποσοστό ακρίβειας της πρόβλεψης καθώς άγγιξε το 75.93 %, ενώ για τις αντίστοιχες συνθήκες το μοντέλο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων ήταν 79.63 %.



Σχήμα 3.27: Απεικόνιση των τριών κλάσεων στα επίπεδα όπως ορίζονται από τους παράγοντες Fisher:1-2 κατά την ανάπτυξη και πρόβλεψη του μοντέλου, για τα δείγματα των αερόβιων συνθηκών συντήρησης, όπου φρέσκο ◯(ανάπτυξη), ●(πρόβλεψη), οριακά φρέσκο ◻(ανάπτυξη), ◼(πρόβλεψη), αλλοιωμένο ◊(ανάπτυξη), ◈(πρόβλεψη).



Σχήμα 3.28: Απεικόνιση των τριών κλάσεων στα επίπεδα όπως ορίζονται από τους παράγοντες Fisher:1-2 κατά την ανάπτυξη και πρόβλεψη του μοντέλου, για τα δείγματα των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών, όπου φρέσκο ◯ (ανάπτυξη), ●(πρόβλεψη), οριακά φρέσκο ◻(ανάπτυξη), ◼(πρόβλεψη), αλλοιωμένο ◊ (ανάπτυξη), ◈(πρόβλεψη).

Είναι αναμενόμενο η διακριτική ικανότητα των δύο μεθόδων να είναι παρόμοια, καθώς και οι δύο μπορούν να διαχειριστούν δεδομένα με αρκετό θόρυβο, να μειώσουν τις διαστάσεις του χώρου των δεδομένων και να δημιουργήσουν συντελεστές εμπιστοσύνης όπου θα ορίσουν διαφορετικά υπό- σύνολα (Gromski et al., 2015). Επίσης, τα αποκλίνοντα σημεία επηρεάζουν εξίσου τις δύο μεθόδους (Gromski et al., 2015), κάτι που εξηγεί και το ότι και στις δύο η συνεισφορά των μηκών κύματος είναι όμοια. Αντιθέτως, η αδυναμία διαχωρισμού της κλάσης του οριακά φρέσκου από τις άλλες δύο, στην περίπτωση του μοντέλου διακριτικής ανάλυσης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων, οφείλεται στην απουσία πολλών δεδομένων (X μεταβλητών) που να υποδεικνύουν την αντίστοιχη κλάση (Breteon et al., 2006). Όσον αφορά, το μοντέλο της διακριτικής ανάλυσης παραγόντων, έχει τη δυνατότητα προβολής σε $c-1$ επίπεδα (όπου c = αριθμός κλάσεων) (Ramos and Liow, 2012, Jonhson and Wichern, 2015) και επομένως είναι λογικό να παρουσιάζει μικρότερη % συνολική ακρίβεια και ταυτόχρονα μικρότερη παραλλακτικότητα μεταξύ των κλάσεων.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και τα πρωτογενή μοντέλα ανάπτυξης κατά Baranyi, επιβεβαιώθηκε η συνεργιστική δράση της θερμοκρασίας και των τροποποιημένων ατμοσφαιρικών συνθηκών συσκευασίας στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του χοιρινού κιμά. Στην περίπτωση της συντήρησης υπό αερόβιες συνθήκες, κυρίαρχος αλλοιωγόνος μικροοργανισμός σε όλες τις θερμοκρασίες επώασης ήταν τα *Pseudomonas* spp., ακολουθούμενα από τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta* και LAB. Η φάση προσαρμογής των *Pseudomonas* spp. αυξήθηκε με την μείωση της θερμοκρασίας συντήρησης, με μεγαλύτερη τιμή τις 29.98 ώρες για τους 4 °C και μικρότερη τις 17.077 ώρες για τους 12 °C. Επίσης, παρατηρήθηκε παρόμοια ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp. για την θερμοκρασία των 8 °C και του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ με φάση προσαρμογής τις 21.943 και 22.698 ώρες αντιστοίχως.

Όσον αφορά στην περίπτωση της συντήρησης του χοιρινού κιμά υπό τροποποιημένη ατμόσφαιρα (O₂-CO₂: 80-20), οι μικροοργανισμοί που κυριάρχησαν σε όλες τις θερμοκρασίες επώασης ήταν τα βακτήρια *Brochothrix thermosphacta* και LAB. Η συνδυαστική επίδραση της θερμοκρασίας και της τροποποιημένης ατμόσφαιρας κατά την αλλοίωση των δειγμάτων υπεδείχθει από τους πληθυσμούς των *Brochothrix thermosphacta* και LAB στους 4 °C για 328 ώρες συντήρησης, όπου ήταν ίσοι με 8.32 log CFU/g και 7.92 log CFU/g αντιστοίχως. Αντίθετα, η συντήρηση στους 12 °C σε συνδυασμό με την αλλαγή στην ατμόσφαιρα συσκευασίας φάνηκε να μην επηρεάζει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, καθώς η ανάπτυξη της OMX (9.06 log στις 160 ώρες) ήταν παρόμοια με αυτή της OMX (9.31 log CFU/g στις 158 ώρες) για την περίπτωση της αερόβιας συσκευασίας, κάτι που συμφωνεί και με την βιβλιογραφία (Koutsoumanis et al., 2008, Παπαδοπούλου, 2013). Η επιρροή της τροποποιημένης ατμόσφαιρας και των 8 °C ήταν σημαντική εφόσον η συντήρηση διήρκεσε 230 ώρες στις αερόβιες, ενώ στις υπό τροποποιημένες συνθήκες 256 ώρες (με τελικό φορτίο OMX στους 9 λογαριθμικούς κύκλους και στις δύο περιπτώσεις). Παράλληλα, η τροποποιημένη ατμοσφαιρική συσκευασία για το δυναμικό προφίλ θερμοκρασίας επίδρασε σε μικρό βαθμό στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών, καθώς η τελική τιμή της OMX για τις 208 ώρες συντήρησης ήταν ίση με 8.7 log CFU/g για τις αερόβιες συνθήκες και με 9.43 log CFU/g για τις 230 ώρες συντήρησης υπό τροποποιημένες συνθήκες.

Τα μοντέλα πρόβλεψης της OMX σε χοιρινό κιμά με βάση δεδομένα πολυφασματικής απεικόνισης υπό αερόβιες και τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες, εμφανίσαν για την πρόβλεψη RMSE ίσο με 1.017 και 1.186 αντιστοίχως, καθώς και συντελεστή συσχέτισης r_p ίσο με 0.892 και 0.781.

Από τους συντελεστές β για τα δεδομένα των μέσων ανακλάσεων και των τυπικών αποκλίσεων, φάνηκε ότι σημαντική ήταν η επίδραση των φασμάτων με μήκος κύματος (nm) 435, 450, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 για την περίπτωση των αερόβιων συνθηκών, και 570, 590, 630 και 660 nm για τις τροποποιημένες ατμοσφαιρικές συνθήκες. Τα μήκη κύματος αυτά σχετίζονται άμεσα με το κόκκινο χρώμα του κρέατος, καθώς αντιστοιχούν στην μυογλοβίνη, την οξυμυογλοβίνη και την μεταμυογλοβίνη (ElMasry et al., 2013, Panagou et al., 2014, Li et al., 2015).

Η ποιοτική ταξινόμηση με βάση τον βαθμό αλλοίωσης του χοιρινού κιμά σε τρεις υπο-κατηγορίες δεν φάνηκε να επιτυγχάνεται, καθώς από τα μοντέλα εκτίμησης της αλλοίωσης παρουσιάστηκε αλληλεπικάλυψη της κλάσης του οριακά φρέσκου με τις άλλες δύο κλάσεις. Για την περίπτωση των τριών κλάσεων και των αερόβιων συνθηκών, το μοντέλο εκτίμησης της αλλοίωσης PLS-DA παρουσίασε συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 84.48 %, ενώ των τροποποιημένων συνθηκών 79.63 %. Αντίθετα, τα μοντέλα εκτίμησης της αλλοίωσης για δυο κλάσεις (φρέσκο, αλλοιωμένο) διαχώρισαν τα δείγματα με συνολική ακρίβεια πρόβλεψης 91.38 % για τις αερόβιες και 75.93 % για τις τροποποιημένες. Διαχωρισμός μεταξύ των τριών κλάσεων χοιρινού κιμά φάνηκε δυνατός κατά την εφαρμογή του μοντέλου εκτίμησης αλλοίωσης DFA, ωστόσο η συνολική ακρίβεια πρόβλεψης για τις αερόβιες συνθήκες υπολογίστηκε στο 77.59 % και για τις τροποποιημένες στο 75.93 %.

Κλείνοντας, από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα και τα πρωτογενή μοντέλα ανάπτυξης φάνηκε η συνδυαστική δράση της θερμοκρασίας και των τροποποιημένων συνθηκών στην ανάπτυξη της μικροχλωρίδας του χοιρινού κιμά. Τα αποτελέσματα των μοντέλων εκτίμησης της OMX (με βάση δεδομένα πολυφασματικής απεικόνισης) παρουσίασαν καλή συσχέτιση με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, καθώς η πρόβλεψη των ποσοτικών μοντέλων, με βάση τα δεδομένα (μικροβιολογικά και πολυφασματικής απεικόνισης) του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ ήταν ικανοποιητική. Αντίστοιχα, η ακρίβεια της πρόβλεψης των ποιοτικών μοντέλων εκτίμησης (PLS-DA και DFA) της αλλοίωσης του χοιρινού κιμά ήταν καλή, με βάση τα δεδομένα του δυναμικού θερμοκρασιακού προφίλ. Ωστόσο, με τη συλλογή περισσότερων μικροβιολογικών και πολυφασματικών δεδομένων είναι δυνατή η βελτίωση των παραπάνω μοντέλων εκμάθησης. Τέλος, η δημιουργία μοντέλων βασισμένων σε διαφορετικούς αλγόριθμους, όπως είναι τα μη γραμμικά μοντέλα, μπορεί να συμβάλει στην περαιτέρω βελτίωση της εκτίμησης της αλλοίωσης του χοιρινού κιμά.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdi, H. 2003. Partial Least Squares (PLS). Regression. In: Lewis-Beck M., Bryman, A., Futing T. (eds.). *Encyclopedia of Social Sciences Research Methods*. Thousand Oaks (CA): Sage. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://www.utdallas.edu/~herve/Abdi-PLS-pretty.pdf> [ανάκτηση 28/2/2018].
- Adams, J. R., Huffman, D. L. 1972. Effect of controlled gas atmospheres and temperatures on quality of packaged pork. *Journal of Food Science*. 37(6): 869-872.
- Adams, M.R., Moss, M.O., 2008. Food Microbiology, In: *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry. Cambridge: UK.
- Ammor, M.S., Argyri, A., Nychas, G.-J.E. 2009. Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics, *Meat Science*. 81:507-514.
- Argyri, A.A., Panagou, E.Z., Tarantilis, P.A., Polysiou, M., Nychas, G.-J.E. 2010. Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial networks. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145:146-154.
- Argyri, A. A., Jarvis, R. M., Wedge, D., Xu, Y., Panagou, E. Z., Goodacre, R., Nychas, G. J. E. 2013. A comparison of Raman and FT-IR spectroscopy for the prediction of meat spoilage. *Food Control*, 29(2), 461-470.
- Argyri, A. A., Panagou, E. Z., Nychas, G. J. 2014. Monitoring microbial spoilage of foods by vibrational spectroscopy (FT-IR & Raman). *Novel food preservation and microbial assessment techniques*, 386.
- Ballabio, D., Todeschini R. 2009. Multivariate Classification of Qualitative Analysis. In: Sun D.W.(ed.) *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Oxford: Elsevier Inc.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* 23:277-294.
- Baranyi, J., Pin, C., Ross, T. 1999. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*. 48:159–166.
- Barbin, D.F., Elmasry, G., Sun, D.-W., Allen, P. 2013. Non-destructive determination of chemical composition in intact and minced pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*. 138: 1162-1171.
- Belitz, H.D., W. Grosch and P. Schieberle, 2009. *Food Chemistry* (4th Edition). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Berrueta, L.A., Alonso-Salces, R.M., Héberger, K. 2007. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 1158:196–214.
- Bi, Y., Yuan, K., Xiao, W., Wu, J., Shi, C., Xia, J., Chu, G., Zhang, G., Zhou, G. 2016. A local pre-processing method for near-infrared spectra, combined with spectral segmentation and standard normal variate transformation. *Analytica Chimica Acta*. 909: 30-40.

- Björkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, W. H., Vandamme, P. 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3764-3772.
- Blixt, Y., Borch, E. 2002. Comparison of shelf life of vacuum-packed pork and beef. *Meat Science*, 60(4), 371-378.
- Borch, E., Kant-Moyermans, M.-L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat products and cured meat. *International Journal of Food Microbiology*. 33: 103-120.
- Brereton, R.G., 2006. Consequences of sample size, variable selection, model validation and optimization for predicting classification ability from analytical data. *Trends Anal. Chem.* 25: 1103- 1111.
- Brereton, R.G., Lloyd G.R. 2014. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemometrics*. 28: 213-225.
- Brunckner, S. 2010. *Predictive shelf life model for the improvement of quality management in meat chains*. 2010. PhD Thesis. Universitäts-und Landesbibliothek Bonn.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. 2012a. Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry. *Journal of Food Quality*, 35(5), 372-382.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. 2012b. Influence of cold chain interruptions on the shelf life of fresh pork and poultry. *International journal of food science & technology*, 47(8), 1639-1646.
- Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B., Kreyenschmidt, J. 2013. A predictive shelf life model as a tool for the improvement of quality management in pork and poultry chains. *Food control*, 29(2), 451-460.
- Carstensen, J.M., Hansen, J.F. 2003, An apparatus and a method of recording an image of an object. Patent family EP1051660, Issued in 2003.
- Carstensen, J.M., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E. 2013. Quantitative Analysis of Meat Spoilage using VIS/NIR Spectral Imaging. [online]. Διαθέσιμο στο: <https://videometer.com/Portals/1/pdfs/Meat%20spoilage.pdf?ver=2013-10-31-094511-093>. [ανάκτηση 13/02/2018].
- Chen, Q., Cai, J., Wan, X., Zhao, J. 2011. Application of linear/non-linear classification algorithms in discrimination of pork storage time using Fourier transform near infrared (FT-NIR) spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology*. 44:2053-2058.
- Dainty, R. H., Mackey, B. M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal of Applied Microbiology*, 73(s21).
- Dainty, R.H. 1996. Chemical~biochemical detection of spoilage. *International Journal of*

Food Microbiology. 33: 19-33.

Daugaard, S.B, Adler-Nissen, J., Carstensen, J.M. 2010. New vision technology for multidimensional quality monitoring of continuous frying of meat. *Food Control*. 21:626-632.

Dave, D., Ghaly, A. E. 2011. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(4), 486-510.

Devlieghere, F., Debevere, J., Van Impe, J. 1998. Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *International journal of food microbiology*, 41(3), 231-238.

Devlieghere, F., Debevere, J. 2000. Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 33(8), 531-537.

Dissing, B.S., Papadopoulou, O.S., Tassou, C., Ersboll, B.K., Carstensen, J.M., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2013, Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat. *Food Bioprocess Technol* 6:2268-2279.

Dixon, N. M., Kell, D. B. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 67(2), 109-136.

Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., Kagkli, D.M., Nychas, G.J. 2010. Lactic acid bacteria population dynamics during minced beef storage under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. *Food Microbiology*. 27: 1028-1034.

Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J.E. 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* 157: 130-141.

Doulgeraki, A. I., Nychas, G. J. E. 2013. Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. *Food microbiology*, 34(1), 62-69.

Drosinos, E. H., Board, R. G. 1994. Metabolic activities of pseudomonads in batch cultures in extract of minced lamb. *Journal of Applied Microbiology*, 77(6), 613-620.

Dufour, E. 2009. Principles of Infrared Spectroscopy. In: Sun, D. W. (Ed.). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press. NY.

Ebbing, D.D., Gammon, S.D. Γενική Χημεία. Έκτη έκδοση. Τραυλός. Αθήνα: Ελλάδα.

EC 852/2004, [online] Διαθέσιμο στο: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0852-20090420> [ανάκτηση 13/02/2018].

EC 853/2004, [online] Διαθέσιμο στο: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0853-20140601> [ανάκτηση 19/3/2018]

EC 2073/2005, [online] Διαθέσιμο στο: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/ALL/?uri=CELEX:32005R2073> [ανάκτηση 19/3/2018]

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014a. Scientific opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. Part 1 (meat of domestic ungulates). *EFSA Journal* 2014. 12(3):3601.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2014b. Scientific opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. Part 2 (minced meat from all species). *EFSA Journal* 2014. 12(7):3783

EFSA Journal 2016, Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. 14(6):4523. [online] Διαθέσιμο στο: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4523> [ανάκτηση 20/03/2018]

Ellis, D. I., Goodacre, R. 2001. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of muscle foods: current status and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 12(11), 414-424.

Ellis, D. I., Broadhurst, D., Kell, D. B., Rowland, J. J., Goodacre, R. 2002. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), 2822-2828.

Ellis, D. I., Broadhurst, D., Goodacre, R. 2004. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Analytica Chimica Acta*, 514(2), 193-201.

Elmasry, G., Barbin, D.F., Sun, D.-W., Allen, P. 2012. Meat quality evaluation by hyperspectral imaging technique: A overview. *Critical Reviews in Food Science and Food Nutrition*. 52: 689-711.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F. 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4663-4671.

Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Ferranti, P., Villani, F. 2010. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. *International journal of food microbiology*, 142(1-2), 120-131.

Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., Degirmencioglu, A. 2011. The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat. *Meat science*, 88(2), 221-226.

Estelles-Lopez, L., Ropodi, A., Pavlidis, D., Fotopoulou, J., Gkousari, C., Peyrodie, A., Panagou, E., Nychas, G.-J., Mohareb, F. 2017. An automated ranking platform for machine learning regression models for meat spoilage prediction using multi-spectral imaging and metabolic profiling. *Food Research International* 99:206-215.

Everitt, B., Rabe-Hesketh, S. 2001. Discriminant Function Analysis. *In: Analyzing Medical Data Using S-PLUS Statistics for Biology and Health*. Springer, New York: NY.

FAO, 2012. Sources of Meat. [online]. Διαθέσιμο στο: www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_sources.html [ανάκτηση 25/03/2018].

- FAO, 2018. MEAT, FAT AND OTHER EDIBLE CARCASS PARTS. [online]. Διαθέσιμο στο: www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E03.htm [ανάκτηση 25/03/2018].
- Feng, C. H., Makino, Y., Oshita, S., Martín, J. F. G. 2018. Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: current state-of-the-art research advances. *Food Control*, 84, 165-176.
- Freeman, L. R., Silverman, G. J., Angelini, P., Merritt, C., Esselen, W. B. 1976. Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(2), 222-231.
- Friedman, J.H. 1988. Regularized Discriminant Analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 84 (405): 165-175.
- FUSIONS EU, 2016. Estimates of European food waste levels. [online]. Διαθέσιμο στο: <http://www.fusions.org/phocadownload/Publications/Estimates%20of%20European%20food%20waste%20levels.pdf> [ανάκτηση 25/03/2018].
- Gill, C. O., Newton, K. G. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 43(2), 189-195.
- Gill, C. O., Newton, K. G. 1978. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Science*, 2(3), 207-217.
- Gill, C. O., Newton, K. G. 1980. Growth of bacteria on meat at room temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 49(2), 315-323.
- Gill, C. O., Tan, K. H. 1980. Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 39(2), 317-319.
- Gill, C.O., Jeremiah, L.E.1991. The storage life of non-muscle offals packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiology* 8:339-353.
- Gill, C.O. 2005. Sources of microbial contamination at slaughtering plants. In: Sofos, J.N.(ed.) *Improving the safety of fresh meat*. Cambridge: WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., Givskov, M. 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International journal of food microbiology*, 78(1-2), 79-97.
- Gromski, P.S., Muhamadali, H., Ellis, D.I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M.L., Goodacre, R. 2015. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis- a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*. 879:10-23.
- Gould, G.W. 1996. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*. 33. 51-64.
- Gowen, A. A., Feng, Y., Gaston, E., Valdramidis, V. 2015. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, 137, 43-54.

ICMSF, 2002. *Microorganisms in Foods 7*. KLUWER ACADEMIC/ PLENUM PUBLISHERS. New York: USA.

Höll, L., Behr, J., Vogel, R. F. 2016. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food microbiology*, 60, 84-91.

Huang, H., Liu, L., Ngadi, M. O. 2014. Recent developments in hyperspectral imaging for assessment of food quality and safety. *Sensors*, 14(4), 7248-7276.

Jay, J.M., M.J. Loessner and D.A. Golden, 2005. *Modern Food Microbiology*, 7th Edn., Springer Science and Business Media. NY.

Jiang, Y., Gao, F., Xu, X. L., Su, Y., Ye, K. P., Zhou, G. H. 2010. Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR–DGGE. *Meat Science*, 86(4), 889-895.

Johansson, P., Paulin, L., Säde, E., Salovuori, N., Alatalo, E. R., Björkroth, K. J., Auvinen, P. 2011. Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811T, in association with specific spoilage reactions. *Applied and environmental microbiology*, 77(13), 4344-4351.

Johnson, R.A., Wichern, D. 2015. *Multivariate Analysis*. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. DOI: 10.1002/9781118445112.stat02623.pub2.

Kakouri, A., Nychas, G. J. E. 1994. Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, 76(2), 163-172.

Kamruzzaman, M., Makino, Y., Oshita, S. 2016. Hyperspectral imaging for real-time monitoring of water holding capacity in red meat. *LWT- Food Science and Technology*. 66: 685-691.

Kerry, J. P., O'grady, M. N., Hogan, S. A. 2006. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat science*, 74(1), 113-130.

Kilcast, D., Subramaniam, P. 2000. *The Stability and Shelf-Life of Food*. In: Woodhead Publishing, Leatherhead Food Research, UK, 1st Edition.

Koutsoumanis, K., Taoukis, P.S. 2005. Meat safety, refrigerated storage and transport: modeling and management. In: Sofos, J.N.(ed.) *Improving the safety of fresh meat*. Cambridge: WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.

Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., Nychas, G. J. 2006. Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 124-134.

Koutsoumanis, K.P., Stamatiou, A.P., Drosinos, E.H., Nychas, G-J.E. 2008. Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self-developed modified atmosphere induced by the respiratory activity of meat microflora. *Food Microbiology* 25: 915-921.

- Labadie, J. 1999. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*. 52: 299- 305.
- Lambert, A. D., Smith, J. P., Dodds, K. L. 1991. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat—a review. *Food Microbiology*, 8(4), 267-297.
- Lambropoulou, K. A., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. 1996. The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 C. *International journal of food microbiology*, 30(3), 281-291.
- Law, J. W. F., Ab Mutalib, N. S., Chan, K. G., Lee, L. H. 2015. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5, 770.
- Lebert, I., Begot, C., Lebert, A. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8–7.0), water activity (0.97–1.00) and temperature (7–25 C). *International journal of food microbiology*, 39(1-2), 53-60.
- Leistner, L. 1978. Hurdle effect and energy saving, In: W.K. Downey (ed.). *Food Quality and Nutrition* Applied Science Publishers. London, UK.
- Leistner, L., Gorris, L.G.M. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*. 6: 41-46.
- Leistner, L.. 2000. *Basic aspects of food preservation by hurdle technology*. *International Journal of Food Microbiology*. 55: 181–186.
- Li, M. Y., Zhou, G. H., Xu, X. L., Li, C. B., Zhu, W. Y. 2006. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food microbiology*, 23(7), 607-611.
- Li, H.H., Chen, Q.S., Zhao, J.W., Wu, M.Z. 2015. Nondestructive detection of total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in pork meat by integrating hyperspectral imaging and colourimetric sensor combined with a nonlinear data fusion. *LWT-Food Science and Technology*. 63: 268- 274.
- Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., Casiraghi, E. 2010. Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat science*, 84(1), 129-136.
- Ma, F., Yao, J., Xie, T., Liu, C., Chen, W., Chen, C., Zheng, L. 2014. Multispectral imaging for rapid and non-destructive determination of aerobic plate count (APC) in cooked pork sausages. *Food research international*, 62, 902-908.
- Mandal, P. K., Biswas, A. K., Choi, K., Pal, U. K. 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *American Journal Of Food Technology*, 6(2), 87-102.
- Mano, S. B., Ordonez, J. A., De Fernando, G. G. 2000. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. *Food microbiology*, 17(6), 657-669.

- McClure, P. J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T. M., Roberts, T. A. 1993. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*, 19(3), 161-178.
- McKellar, R.C., Lu, X. 2003. Primary Models. In: McKellar, R.C., Lu, X.(eds.) *Modeling Microbial Responses in Food*. Florida: CRC Press.
- McMeekin, T. A. 2007. Predictive microbiology: quantitative science delivering quantifiable benefits to the meat industry and other food industries. *Meat science*, 77(1), 17-27.
- McMillin, K. W. 2017. Advancements in meat packaging. *Meat science*, 132, 153-162.
- Mejlholm, O., Dalgaard, P. 2013. Development and validation of an extensive growth and growth boundary model for psychrotolerant *Lactobacillus* spp. in seafood and meat products. *International journal of food microbiology*, 167(2), 244-260.
- Mohareb, F., Iriondo, M., Doulgeraki, A.I., Van Hoek, A., Aart, H., Bessant, C., Nychas, G.-J.E. 2015. Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. *Food Contro*. 57: 152-160.
- Mortimore, S., Wallace, C. 2013. *HACCP: A practical approach*. Springer Science & Business Media.
- Nam, K. C., Jo, C., Lee, M. 2010. Meat products and consumption culture in the East. *Meat Science*, 86(1), 95-102.
- Nychas, G.-J.E., Tassou, C.C. 1997. Spoilage Processes and Proteolysis in Chicken as Detected by HPLC. *J Sci Food Agric*. 74:199-208.
- Nychas, G. J. E., Drosinos, E. H., Board, R. G. 1998. Chemical changes in stored meat. *The microbiology of meat and poultry*, 288-326.
- Nychas, G.-J.E., Skandamis, P.N. 2005. Fresh meat spoilage and modified atmosphere packaging (MAP). In: Sofos, J.N.(ed.) *Improving the safety of fresh meat*. Cambridge: WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.
- Nychas, G.-J.E., Marshall, D.L., Sofos, J.N. 2007.CHAPTER 6 Meat, Poultry, and Seafood. In: Doyle M, Beuchat L (ed), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition*. ASM Press, Washington, DC.
- Nychas, G.J., Skandamis, P.N., Tassou, C.C., Koutsoumanis, K.P. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Sci*. 78(1-2):77-89.
- Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., Mohareb, F. 2016. Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, 12, 13-20.
- Oscar, T.P. 2005. Validation of Lag Time and Growth Rate Models for Salmonella Typhimurium: Acceptable Prediction Zone Method. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*. 70 (2): 129-137.
- Panagou, E.Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J.M., Nychas, G.-J.E. 2014. Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the

- microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology* 174:1-11.
- Papadopoulou, O., Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Nychas, G.-J.E., 2011. Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International* 44: 3264-3271.
- Pooni, G. S., Mead, G. C. 1984. Prospective use of temperature function integration for predicting the shelf-life of non-frozen poultry-meat products. *Food Microbiology*, 1(1), 67-78.
- Pothakos, V., Snauwaert, C., De Vos, P., Huys, G., Devlieghere, F. 2014. Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. *Food microbiology*, 39, 61-67.
- Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., Ercolini, D. 2015. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. *Meat science*, 109, 66-74.
- Ramos, S.D.S., Liow, S. J. R. 2012. Discriminant Function Analysis. In: Chapelle, C.A.(ed). *The Encyclopedia of Applied Linguistics* 1. John Wiley & Sons, Inc.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball, A. 1982. Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 149 (1):1-5.
- Reid, R., Fanning, S., Whyte, P., Kerry, J., Lindqvist, R., Yu, Z., Bolton, D. 2017. The microbiology of beef carcasses and primals during chilling and commercial storage. *Food microbiology*, 61, 50-57.
- Remenant, B., Jaffrès, E., Dousset, X., Pilet, M. F., Zagorec, M. 2015. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. *Food microbiology*, 45, 45-53.
- Rinnan, A., Berg, F., Engelsen, B. 2009. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends in Analytical Chemistry*, 28 (10): 1201-1222.
- Romia, M.B, Bernardez, M.A. 2009. Multivariate Calibration of Quantitative Analysis. In: Sun D.W.(ed.) *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Oxford: Elsevier Inc.
- Ropodi, A., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E., 2013. ASSESSMENT OF MICROBIOLOGICAL QUALITY AND AUTHENTICITY OF MINCED MEAT USING MULTISPECTRAL IMAGE ANALYSIS. In: 8th International Conference on Predictive Modelling in Food, Paris, France, 16-19 September 2013.
- Ropodi, A. I., Pavlidis, D. E., Mohareb, F., Panagou, E. Z., Nychas, G. J. 2015. Multispectral image analysis approach to detect adulteration of beef and pork in raw meats. *Food Research International*, 67, 12-18.
- Ropodi, A.I., Panagou, E.Z., Nychas, G.-J.E.. 2016. Data mining derived from Food analyses using non-invasive/non-destructive analytical techniques; Determination of Food authenticity, quality & safety in tandem with Computer Science Disciplines. *Trends in Food Science & Technology*. 50: 11-15.

- Ropodi, A.I. 2017. Determination of minced meat quality using Machine Learning. Phd thesis. Agricultural University of Athens.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Letters in Applied Bacteriology*. 81: 501-508.
- Ross, T., Dalgaard, P. 2003. Secondary Models. In: McKellar, R.C., Lu, X.(eds.) *Modeling Microbial Responses in Food*. Florida: CRC Press.
- Russell, N. J., Gould, G. W. 1991. Factors affecting growth and survival. In: *Food preservatives*.
- Schmitt, R. E., Schmidt-Lorenz, W. 1992. Formation of ammonia and amines during microbial spoilage of refrigerated broilers. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie*, 25(1), 6-10.
- Serraino, A., Bardasi, L., Riu, R., Pizzamiglio, V., Liuzzo, G., Galletti, G., Merialdi, G. 2012. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat science*, 90(2), 502-506.
- Sharifzadeh, S., Clemmensen, L. H., Borggaard, C., Støier, S., Ersbøll, B. K. 2014. Supervised feature selection for linear and non-linear regression of $L^* a^* b^*$ color from multispectral images of meat. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 27, 211-227.
- Singh, P., Wani, A. A., Saengerlaub, S., Langowski, H. C. 011. Understanding critical factors for the quality and shelf-life of MAP fresh meat: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(2), 146-177.
- Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E. 2002. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. *International journal of food microbiology*, 79(1-2), 35-45.
- Solokova, M., Lapalme, G. 2009. A systematic analysis of performance measures for classification tasks. *Information Processing and Management*. 45: 427–437.
- Stopforth, J.D., Sofos, J.N. 2005. Carcass chilling. In: Sofos, J.N.(ed.) *Improving the safety of fresh meat*. Cambridge: WOODHEAD PUBLISHING LIMITED.
- Spelhaug, S. R., Harlander, S. K. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Protection*, 52(12), 856-862.
- Sun, D. W. 2009. *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic Press. NY.
- Swatland, H. J. 2010. Meat products and consumption culture in the West. *Meat science*, 86(1), 80-85.
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Nychas, G.-J.E. 2015. High Throughput Multispectral Image Processing with Applications in Food Science. *PlosOne* DOI:10.1371/journal.pone.0140122.
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Panagou, E., Nychas, G.-J. 2016. Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*. 161:606-614.

Tsigarida, E., Nychas, G. J. 2001. Ecophysiological attributes of a *Lactobacillus* sp. and a *Pseudomonas* sp. on sterile beef fillets in relation to storage temperature and film permeability. *Journal of applied microbiology*, 90(5), 696-705.

Videometer A/S, 2018. [online]. Διαθέσιμο στο: www.videometer.com [ανάκτηση 12/02/2018]

Vihavainen, E. J., Björkroth, K. J. 2009. Diversity of *Leuconostoc gasicomitatum* associated with meat spoilage. *International journal of food microbiology*, 136(1), 32-36.

WathWorks, 2016. Introducing Machine Learning. Matlab e-Book. WathWorks Inc. [online]: Διαθέσιμο στο: <https://www.mathworks.com/campaigns/products/offer/machine-learning-with-matlab.html> [ανάκτηση 12/03/2018].

Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L. 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 58:109-130.

Zhou, G. H., Xu, X. L., Liu, Y. 2010. Preservation technologies for fresh meat—A review. *Meat science*, 86(1), 119-128.

Zwietering, M. H., Wijtzes, T., De Wit, J. C., Riet, K. V. T. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection*, 55(12), 973-979.

Παπαδοπούλου, Ο.Σ. 2013. Εκτίμηση της αλλοίωσης του κρέατος με σύγχρονες μεθόδους. Διδακτορική διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Νυχάς, Γ-Ι. Ε., Σημειώσεις Μικροβιολογίας Τροφίμων Ι. Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.