



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

«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΚΛΑΣΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΑΧΕΩΝ ΜΗ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ-ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ευάγγελος Γ. Δαγρές



Επιβλέπων: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2019

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

«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΚΛΑΣΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΑΧΕΩΝ ΜΗ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ-ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ευάγγελος Γ. Δαγρές



Επιβλέπων: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ, 2019

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΟΙΩΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΚΛΑΣΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΑΧΕΩΝ ΜΗ ΠΑΡΕΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ-ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ»

Ευάγγελος Γ. Δαγρές

Επιβλέπων: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής ΓΠΑ

Πανάγου Ευστάθιος, Επικουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Ζερβάκης Γεώργιος Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Περίληψη

Η χημική σύσταση των φρούτων και των λαχανικών τα καθίστα μια άριστη οικολογική θέση για την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροβιακών ομάδων. Η παρούσα μελέτη είχε ως βασικό σκοπό την παρακολούθηση, τον χαρακτηρισμό και την εκτίμηση της μικροβιακής αλλοίωσης προϊόντων φυτικής προέλευσης, κάνοντας χρήση κλασικών και ταχέων μεθόδων ανάλυσης καθώς και κατάλληλων μοριακών τεχνικών. Τα υπό μελέτη προϊόντα φυτικής προέλευσης ήταν δείγματα φρέσκου ανανά και νωπών μανιταριών του είδους *P. ostreatus*. Η μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα δείγματα του ανανά και του μανιταριού αποθηκεύτηκαν κάτω από αερόβιες συνθήκες σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης και υποβλήθηκαν σε μικροβιολογική ανάλυση με απώτερο σκοπό την μελέτη της κινητικής κατάστασης της αλλοιωγόνου μικροβιακής χλωρίδας σε κάθε θερμοκρασία. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε οργανοληπτικός έλεγχος και μέτρηση του pH. Επιπλέον, στα δείγματα του ανανά έγινε πολυφασματική ανάλυση με την χρήση του οργάνου VideometerLab. Τα δεδομένα της μικροβιολογικής και της πολυφασματικής ανάλυσης του ανανά, συσχετίστηκαν με την μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLSR). Σκοπός αυτής της συσχέτισης ήταν η ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού (OMX) του εξεταζόμενου τροφίμου μέσω των δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης. Το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης PLSR ήταν το λογισμικό χημειομετρίας “The Unscrambler” (έκδοση 9.7, CAMO Software AS, Oslo, Norway). Τέλος, πραγματοποιήθηκε μοριακή ανάλυση σε προσβεβλημένα μανιτάρια από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*. Η μοριακή ανάλυση περιελάμβανε την απομόνωση βακτηριακού γενομικού DNA και την χρήση της Rapid-PCR με στόχο μια αρχική εκτίμηση των διαφορετικών φαινοτυπικών ηλεκτοφορητικών προφίλ των βακτηρίων του γένους αυτού.

Η κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα της αλλοίωσης στον ανανά σε όλες τις θερμοκρασίες συντήρησης ήταν οι ζύμες, ενώ στο μανιτάρι οι Ψευδομονάδες και τα Εντεροβακτήρια. Τα δεδομένα της μικροβιολογικής και της πολυφασματικής ανάλυσης του ανανά, έδειξαν μεγάλο βαθμό συσχέτισης, ενώ η ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού (OMX) του εξεταζόμενου τροφίμου μέσω των δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης ήταν επιτυχής και παρουσίασε αρκετά καλά αποτελέσματα σε όλους τους εξεταζόμενους δείκτες επίδοσης. Τέλος, Η αναγνώριση και η διαφοροποίηση όλων των ευδιάκριτων προφίλ των στελεχών του γένους *Pseudomonas* πραγματοποιήθηκε μέσα από την χρήση της μεθόδου της RAPD-PCR και οπτικοποιήθηκε μέσα από την διενέργεια της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης. Οι 49 απομονώσεις που ελήφθησαν από τα προσβεβλημένα μανιτάρια ομοδοποιήθηκαν με βάση το ποσοστό ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ που πάρθηκαν μέσα από την χρήση της μεθόδου της RAPD-PCR. Η

ομαδοποίηση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσα από την εφαρμογή του προγράμματος BioNumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium) αλλά και μέσω χειροκίνητων προσαρμογών μέσα από την παρατήρηση των φωτογραφιών ηλεκτροφόρησης. Η τελική ανάλυση κατά συστάδες δημιούργησε (cluster analysis) ένα δενδρόγραμμα το οποίο αποκάλυψε την ύπαρξη 6 διαφορετικών ομάδων.

Λέξεις κλειδιά: **Μικροβιακή αλλοιώση, Φρούτα και Λαχανικά, Ανανάς, Μανιτάρι, Πολυφασματική ανάλυση**

Abstract

The chemical composition of fruits and vegetables makes it an excellent ecological place for the development of degenerative microbial groups. The purpose of this study was to monitor, characterize and assess the microbial spoilage of plant products using classical and rapid analytical methods and appropriate molecular techniques. The studied products of plant origin were samples of fresh pineapple and fresh mushrooms of *P. ostreatus*. The study was conducted in the Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Food of the Agricultural University of Athens.

Pineapple and mushroom samples were stored under aerobic conditions at different preservation temperatures and subjected to microbiological analysis with the ultimate goal of studying the kinetic status of alien microbial flora at each temperature. At the same time, organoleptic control and pH measurement were performed. In addition, perennial samples were multifactor analyzed using VideometerLab. The data of microbiological and multi-spectral analysis of pineapple were correlated with the Partial Least Squares Regression (PLSR) method. The purpose of this correlation was to develop a model of predicting the microbial population (OMX) of the food being tested through the multispectral imaging data. The statistical processing program used to implement the PLSR analysis was the chemistry software "The Unscrambler" (version 9.7, CAMO Software AS, Oslo, Norway). Finally, molecular analysis was performed on infected mushrooms of bacteria of the genus *Pseudomonas*. The molecular analysis consisted of isolation of bacterial genomic DNA and the use of Rapid-PCR for an initial assessment of the different phenotypic electrophoretic profiles of bacteria of this genus.

The dominant microbial group of pineapple lesion at all maintenance temperatures was the dough, while the *Pseudomonas* and Enterobacteria were the mushroom. The data of microbiological and multi-spectral analysis of pineapples showed a high degree of correlation, while the development of a model of predicting the microbial population (MMX) of the food under study through multispectral imaging data was successful and showed quite good results in all tested performance indicators. Finally, the identification and differentiation of all distinct profiles of the strains of the genus *Pseudomonas* was performed through the use of the RAPD-PCR method and visualized through the technique of electrophoresis. The 49 isolates obtained from the affected mushrooms were homologated based on the similarity of their electrophoretic profiles obtained through the use of the RAPD-PCR method. This grouping was carried out through the application of Bionumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium), but also through manual adjustments through observation of electrophoresis photographs. The final cluster analysis created a cluster analysis that revealed the existence of 6 different clusters.

Key words: Microbial spoilage, Fruits and Vegetables, Pineapple, Mushroom, Multi-spectral analysis

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Φρούτα και λαχανικά.....	9
1.2 Ποιοτικά κριτήρια των φρέσκων φρούτων και λαχανικών	10
Γεύση (taste) και άρωμα (aroma).....	13
1.3 Τα φρούτα και λαχανικά ως δυναμικό σύστημα.....	13
1.4 Μικροβιακή χλωρίδα φρούτων και λαχανικών	19
1.5 Αλλοίωση τροφίμων.....	22
1.5.1 Μικροβιακή αλλοίωση φρούτων και λαχανικών.....	22
1.6 Νομοθεσία και θέματα ασφάλειας για τα νωπά φρούτα και λαχανικά	25
1.7 Ανανάς (<i>Ananas comosus</i>).....	26
1.7.1 Γενικά στοιχεία.....	26
1.7.2 Ταξινόμική κατάταξη και βοτανικά στοιχεία.....	27
1.7.3 Διατροφική αξία	29
1.8 Μανιτάρια του είδους <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
1.8.1 Γενικά στοιχεία.....	31
1.8.2 Ταξινόμική κατάταξη και μορφολογικά στοιχεία.....	33
1.8.3 Διατροφική αξία	34
1.9 Γρήγορες και μη παρεμβατικές μέθοδοι ανάλυσης της ποιότητας των νωπών φρούτων και λαχανικών	37
1.9.1 Φασματοσκοπικές μέθοδοι.....	38
1.9.2 Απεικονιστικές μέθοδοι.....	39
1.9.3 Χημειομετρία.....	40
1.10 Προβλεπτική μικροβιολογία.....	40
1.11 Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης μικροοργανισμών.....	41
<i>Randomly amplified polymorphism DNA based PCR (RAPD-PCR)</i>	42
1.12 Σκοπός της μελέτης.....	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	44
2.1 Δείγματα και προετοιμασία.....	44
2.2 Πειράματα συντήρησης ανανά και μανιταριών	44
2.2.1 Συνθήκες συντήρησης και δειγματοληψίες	44
2.2.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις.....	46
2.2.3 Πολυφασματική ανάλυση (Multispectral imaging)	48
2.3 Ανάλυση δεδομένων.....	50
2.3.1 Ανάλυση μικροβιολογικών δεδομένων	50
2.3.2 Απόκτηση δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης από το VideometeLab.....	51

2.3.3	Συσχέτιση μικροβιολογικών και φασματοσκοπικών δεδομένων	51
2.4	Μελέτη προσβεβλημένων μανιταριών	52
2.4.1	Απομόνωση αποικιών από προσβεβλημένα μανιτάρια	52
2.4.2	Μοριακή ανάλυση.....	52
3.	Αποτελέσματα-Συζήτηση.....	55
3.A	Αποτελέσματα.....	55
3.1	Μικροβιολογικές αναλύσεις στον ανανά.....	55
3.2	Μικροβιολογικές αναλύσεις στο μανιτάρι.....	58
3.3	Μέτρηση του pH στον ανανά.....	63
3.4	Μέτρηση του pH στο μανιτάρι.....	65
3.5	Συσχέτιση μικροβιολογικών και φασματοσκοπικών δεδομένων	67
3.5.1	Προεπεξεργασία φασματικών δεδομένων	67
3.5.2	Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης.....	70
3.5.3	Επικύρωση μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης.....	71
3.5.4	Επίδοση μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης	75
3.6	Μοριακή ανάλυση.....	80

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φρούτα και λαχανικά

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, ως "νωπά τρόφιμα φυτικής προέλευσης" νοούνται αυτοτελή φυτά ή μέρη αυτών, κατάλληλα για διατροφή που διατίθενται στην κατανάλωση στη φυσική τους κατάσταση και διακρίνονται σε λαχανικά και οπώρες. Η Διεθνής Ένωση Νωπών Προϊόντων (International Fresh-cut Produce Association-IFPA) ορίζει ως "νωπό προϊόν φυτικής προέλευσης" κάθε φρούτο ή λαχανικό ή συνδυασμός αυτών που έχει αλλάξει φυσικά από την αρχική του μορφή, αλλά παραμένει σε φρέσκια κατάσταση.

Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν σημαντικό κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής παρέχοντας ένα πλήθος ευεργετικών ιδιοτήτων για την υγεία (Abadias *et al.* 2008). Η ικανότητα τους αυτή αντανάκλαται μέσα από τη χημική τους σύνθεση αφού περιέχουν πλήθος θρεπτικών συστατικών με αντιοξειδωτικές ιδιότητες (ανθοκυανίνες, φαινολικές ενώσεις), βιταμινών Α και C, υδατανθράκων, διαιτητικών ινών καθώς και ουσιών όπως καροτενοειδή, τοκοφερόλες, και ασκορβικό οξύ που φαίνεται να συμβάλλουν σημαντικά στην πρόληψη πολλών ασθενειών (Kader and Berret 2004, Artes and Allende 2005, Nichenamelta *et al.* 2006). Η προτροπή για κατανάλωση νωπών φρούτων και λαχανικών ενισχύεται και από πολλούς διεθνείς οργανισμούς όπως τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO), το Υπουργείο Γεωργίας των ΗΠΑ (USDA) και την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) γιατί έχει βρεθεί ότι ελαχιστοποιούν την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών ασθενειών και καρκίνου (Verbeke *et al.* 2004, Su and Arab 2006, Allende *et al.* 2006a). Η ευεργετική δράση των φρούτων και λαχανικών όσο αναφορά στην πρόληψη σοβαρών ασθενειών έχει αναφερθεί σε πλήθος ερευνητικών μελετών (Wang *et al.* 2014).

Τα τελευταία χρόνια έχουν αυξηθεί σημαντικά οι πωλήσεις στην αγορά ετοιμών προς κατανάλωση νωπών φρούτων και λαχανικών εξαιτίας της αλλαγής του τρόπου ζωής των καταναλωτών (Di Egidio *et al.* 2009). Η έντονη ζήτηση για φρέσκα προϊόντα, υγιεινά που θα διατηρούν την θρεπτική τους αξία, θα είναι εύκολα στην προετοιμασία τους και θα μπορούν να αποτελέσουν ένα πλήρες γεύμα, καθιστούν την αγορά νωπών και ελάχιστα επεξεργασμένων φρούτων και λαχανικών (Minimally Processed Fruits and Vegetables-MPFVs) ολοένα και αυξανόμενη (Scolari and Vescovo 2004, Froder *et al.* 2007).

Τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά διατίθενται στην αγορά σε διαφορεές μορφές όπως αποφλοιωμένα, κομμένα σε φέτες ή ψιλοκομμένα (Francis *et al.* 2012). Προκειμένου να εξασφαλιστεί η διατήρηση των χαρακτηριστικών ποιότητας που σχετίζονται με την εμφάνιση, την υφή, τη γεύση, το άρωμα, τη θρεπτική αξία και παράλληλα να επιτευχθεί η ασφάλεια του προϊόντος, τα φρούτα και τα λαχανικά υποβάλλονται σε ήπιες μεθόδους επεξεργασίας (κυρίως μη θερμικές). Ως συνέπεια αυτού, η διάρκεια ζωής των προϊόντων αυτών είναι σχετικά μικρή, 5-7 ημέρες στους 4 °C (Cliffe-Byrnes and O'Beirne 2002, Allende *et al.* 2006b, Di Egidio *et al.* 2009). Τα βασικά

στάδια επεξεργασίας των φρούτων και των λαχανικών περιλαμβάνουν τη διαλογή, τον καθαρισμό, το πλύσιμο, την αποφλοιώση, το κόψιμο, τον τεμαχισμό, την απολύμανση και την συσκευασία του τελικού προϊόντος. Όλες αυτές οι διαδικασίες δεν εξασφαλίζουν την πλήρη εξάλειψη του μικροβιακού φορτίου, και για τον λόγο αυτό, η ψύξη αποτελεί το κυριότερο μέσο συντήρησης αυτών των ευπαθών προϊόντων (Froder *et al.* 2007). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνολογίες, κυρίως μη θερμικής φύσεως, με κύριο στόχο την αύξηση του χρόνου ζωής των νωπών φρούτων και λαχανικών. Στις τεχνολογίες αυτές ανήκουν η θεραπεία με όζον, η υπεριώδης ακτινοβολία, η γάμμα ακτινοβολία, η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, η χρήση υπερήχων και άλλες (Ramos *et al.* 2013, Benitez *et al.* 2014).

Η αλλοίωση των φρούτων και των λαχανικών μπορεί να είναι αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών παραγόντων καθώς και αλληλεπίδρασης αυτών. Οι κυτταρικοί ιστοί των προϊόντων αυτών υπόκεινται σε φυσιολογική φθορά με την πάροδο του χρόνου αλλά μπορεί να επηρεαστούν από χειρισμούς κατά την συγκομιδή, την προετοιμασία, την επεξεργασία, την αποθήκευση και τις υπάρχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες. Βλάβες στην εξωτερική επιφάνεια των φρούτων και των λαχανικών σε οποιοδήποτε στάδιο επεξεργασίας μπορεί να συμβάλλουν στην αύξηση μεταβολικών (αυξημένος ρυθμός αναπνοής, παραγωγή αιθυλενίου, δράση ενζύμων) και μικροβιακών (αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών) δραστηριοτήτων που με την σειρά τους οδηγούν στην ποιοτική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος (Silveira *et al.* 2007a Azarhkhsh *et al.* 2014).

1.2 Ποιοτικά κριτήρια των φρέσκων φρούτων και λαχανικών

Η ποιότητα των νωπών προϊόντων φυτικής προέλευσης περιλαμβάνει πολλά χαρακτηριστικά που ποικίλλουν ανάλογα με την φύση του προϊόντος. Οι κύριες συνιστώσες που καθορίζουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των φρούτων και λαχανικών συνοψίζονται στον Πίνακα 1 και σχετίζονται με την εμφάνιση, την υφή, τη γεύση, τη θρεπτική αξία, καθώς και με θέματα ασφάλειας του τελικού προϊόντος (Francis *et al.* 2012).

Η καταναλωτική προτίμηση αρχικά επηρεάζεται από την εμφάνιση και το χρώμα του προϊόντος, και στη συνέχεια ακολουθούν τα υπόλοιπα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (άρωμα, γεύση και υφή) που γίνονται αντιληπτά μέσω αισθητηριακών οργάνων (αφή, μάσηση) (Barret *et al.* 2010). Τα νωπά φρούτα και λαχανικά που προορίζονται για κατανάλωση θα πρέπει να διατηρούν την φρεσκάδα τους, η εξωτερική τους επιφάνεια να συνοδεύεται από έντονο φωτεινό χρώμα και να είναι απαλλαγμένη από οποιαδήποτε ανεπιθύμητη μεταβολή που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τα αγοραστικά και αισθητικά κριτήρια του καταναλωτή (Montero-Calderon and Araya 2010, Francis *et al.* 2012,). Τα εξωτερικά χαρακτηριστικά ποιότητας (εμφάνιση, χρώμα, κ.λπ.) διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην αρχική απόφαση του καταναλωτή να προβεί στην αγορά του προϊόντος. Τα εσωτερικά ή μη εμφανή χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το άρωμα, τη γεύση, τη διατροφική αξία και την ασφάλεια καθορίζουν το αν θα συνεχιστεί η αγορά. Ο συνδυασμός εξωτερικών,

εσωτερικών και μη εμφανών χαρακτηριστικών ποιότητας συμβάλουν στη συνολική αποδοχή του νωπού φυτικού προϊόντος (Pattee 1985).

Η εμφάνιση

Η εμφάνιση αποτελεί το βασικότερο κριτήριο ποιότητας, αφού παίζει σημαντικό ρόλο στο βαθμό αρέσκειας και αποδοχής του τροφίμου από τον καταναλωτή (Lund and Snowdon 2000). Το σχήμα, το μέγεθος, η στιλπνότητα και η απουσία ελαττωμάτων από την εξωτερική επιφάνεια είναι οι κύριοι παράγοντες που συντελούν στην εμφάνιση των νωπών προϊόντων φυτικής προέλευσης. Το σχήμα και το μέγεθος μπορεί να επηρεαστεί από την ποικιλία, το στάδιο ωριμότητας και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Τα φρούτα και τα λαχανικά πρέπει να έχουν ομοιόμορφο μέγεθος και χαρακτηριστικό σχήμα. Η εμφάνιση ανεπιθύμητων μεταβολών στην εξωτερική επιφάνεια του προϊόντος (χτυπήματα, ρωγμές, κηλίδες κ.λπ.) μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δράσης μικροοργανισμών και εντόμων ή χειρισμών κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και της επεξεργασίας. Η λαμπερή όψη (στιλπνότητα) των φρούτων και των λαχανικών που έχει να κάνει με την ικανότητα της φυτικής επιφάνειας να αντανακλά το φως (Mitcham *et al.* 1996) επηρεάζεται από το υδατικό περιεχόμενο του προϊόντος, από την εναπόθεση κηρού στην εξωτερική επιφάνεια και τους χειρισμούς μετά την συγκομιδή (Barrett *et al.* 2010).

Υφή

Η υφή αποτελεί ένα βασικό κριτήριο ποιότητας των φρούτων και λαχανικών αφού έχει συσχετιστεί στενά με την υποβάθμιση των κυτταρικών ιστών, ενώ παράλληλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης προσδιορισμού της φρεσκάδας του προϊόντος (Cantwell and Susslow 2002). Γενικά, η υφή μπορεί να οριστεί ως το σύνολο των ιδιοτήτων που προκύπτουν από τα δομικά στοιχεία του τροφίμου και το πώς αυτά γίνονται αντιληπτά από τα αισθητήρια όργανα του ανθρώπινου οργανισμού (Bourne 1982). Οι καταναλωτές συνήθως προτιμούν νωπά φυτικά προϊόντα με συνεκτική και τραγανή υφή (Filion and Kilcast 2002). Η χαλάρωση των φυτικών ιστών (μαλάκωμα φρούτων και λαχανικών) επηρεάζει σημαντικά την διάρκεια ζωής των νωπών προϊόντων (Karakurt and Huber 2004).

Χρώμα

Το χρώμα αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό ποιότητας των νωπών φρούτων και λαχανικών. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο αξιολόγησης του σταδίου ωριμότητας και της ποιότητας τόσο από τις βιομηχανίες εμπορίας νωπών φυτικών προϊόντων όσο και από τους καταναλωτές (Abbott 1999, Marti 2003). Η ανάπτυξη του χρώματος στα φρούτα και τα λαχανικά οφείλεται στην παρουσία φυσικών χρωστικών. Σε αυτές τις χρωστικές ανήκουν οι χλωροφύλλες (πράσινο χρώμα), τα καροτενοειδή (κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο), οι ανθοκυανίνες (κόκκινο, μπλε), τα φλαβονοειδή (κίτρινο) και οι βεταλαΐνες (κόκκινο) (Barrett *et al.* 2010)

Γεύση και Άρωμα

Ένα άλλο βασικό κριτήριο της ποιότητας των νωπών φρούτων και λαχανικών είναι η γεύση (Kader *et al.* 2008). Η αντίληψη των τεσσάρων βασικών συνιστωσών του αισθήματος της γεύσης: γλυκιά, ξινή, αλμυρή και πικρή στη στοματική κοιλότητα σε συνδυασμό με το άρωμα συντελούν στην καλύτερη αποσαφήνιση του όρου (Meilgaard *et al.* 1991). Οι κύριες γεύσεις των φρούτων και των λαχανικών είναι η γλυκιά, η ξινή, η αλμυρή, η πικρή και η ουμάμι (Yamaguchi and Ninomiya 2000). Ένα πρωτεύον χαρακτηριστικό της γεύσης των νωπών φυτικών προϊόντων είναι η γλυκύτητα, η οποία μεταβάλλεται ανάλογα με τα επίπεδα της οξύτητας και των αρωματικών ενώσεων του προϊόντος (Baldwin 2004). Οι κύριες πτητικές ενώσεις που είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη του αρώματος στα φρούτα είναι τα πτητικά έλαια και οι αλοϊφατικοί εστέρες. Οι ενώσεις αυτές συμβάλλουν στο να γίνεται εντονότερο το άρωμα των φρούτων σε σχέση με αυτό των λαχανικών, όπου τα κύρια πτητικά συστατικά που συντελούν στην ανάπτυξη του αρώματος είναι ενώσεις θείου και αζώτου (O' Mahony 1995).

Διατροφική αξία

Η διατροφική αξία είναι μια εξίσου σημαντική συνιστώσα όσον αναφορά στην ποιότητα, η οποία όμως δεν μπορεί να γίνει αντιληπτή από τις βασικές αισθήσεις αλλά επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Τα φρούτα και τα λαχανικά συνιστούν πλούσια πηγή μικρο- και μακρο-θρεπτικών συστατικών. Στα μακροθρεπτικά κατατάσσονται οι υδατάνθρακες και οι διαιτητικές ίνες. Το κλάσμα των μικροθρεπτικών συστατικών περιλαμβάνει την βιταμίνη C, το σύμπλεγμα βιταμινών B (θειαμίνη, ριφοβλαμίνη, B6, νιασίνη, φυλλικό οξύ), ανόργανα άλατα, πολυφαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή και γλυκοσινολικές ενώσεις. Μια περεταίρω διάκριση των μικροθρεπτικών συστατικών μπορεί να γίνει με βάση την ικανότητα τους να διαλύονται στο νερό ή στο λίπος. Η βιταμίνες B και C, και οι πολυφαινολικές και οι γλυκοσινολικές ενώσεις αποτελούν υδατοδιαλύτες ουσίες, ενώ οι βιταμίνες A και E και τα κοροτενοειδή (λυκοπένιο, β-καροτένιο) ανήκουν στο λιποδιαλύτο κλάσμα (Barret *et al.* 2010).

Πίνακας 1: Κριτήρια ποιότητας και μετρούμενα χαρακτηριστικά των νωπών φρούτων και λαχανικών (Barrett 2000, Kader 2011)

Κριτήριο ποιότητας	Χαρακτηριστικά
Εμφάνιση (appearance)	Μέγεθος: Διαστάσεις, μάζα, όγκος Σχήμα και μορφή: λόγος διαμέτρου/μήκος, συμπαγές, ομοιομορφία Χρώμα: Ομοιομορφία, ένταση, στιλπνότητα Βλάβες: Επιφανειακές, εσωτερικές, μορφολογικές, μηχανικές, φυσιολογικές, παθολογικές (αποσύνθεση) και εντομολογικές
Υφή (texture)	Σκληρότητα, απαλότητα, τραγονότητα, λιπαρότητα, ινώδες, αντοχή στην συμπίεση, περιεκτικότητα σε χυμό
Γεύση (taste) και άρωμα (aroma)	Γλυκύτητα, στυπτικότητα, πικρότητα, οξύτητα, πτητικές ενώσεις, δυσάρεστες γεύσεις και οσμές
Θρεπτική αξία (nutritional value) και βιοδραστικές ενώσεις (bioactive compounds)	Μάκρο- και μικρο- θρεπτικά συστατικά (μεταλλικά στοιχεία), υδατάνθρακες, διαιτητικές ίνες, λιπίδια, πρωτεΐνες, φαιολικές ενώσεις, αντιοξειδωτικές ιδιότητες και χρωστικές
Βιοχημικό προφίλ (biochemical profile)	Περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά, οξύτητα, pH
Ασφάλεια (safety)	Μικροβιακή ανάπτυξη (αλλοιογόνοι και παθογόνοι μικροοργανισμοί), μυκοτοξίνες, ρύποι (χημικά υπολείμματα και βαρέα μέταλλα)

1.3 Τα φρούτα και λαχανικά ως δυναμικό σύστημα

Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούνται από ζωντανούς κυτταρικούς ιστούς που πρέπει να ανταπεξέλθουν στις καταπονήσεις που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και της επεξεργασίας. Κατά τη συγκομιδή, σταματάει η τροφοδοσία νερού και θρεπτικών συστατικών από το μητρικό φυτό ενώ παράλληλα προκαλείται τραυματισμός των ιστών στο σημείο τομής. Η επεξεργασία με την σειρά της, προξενεί περαιτέρω βλάβες στην εξωτερική επιφάνεια του συγκομισμένου προϊόντος μέσω των διαδικασιών κοπής και απομάκρυνσης του εξωτερικού φλοιού που παρέχει φυσική προστασία στο προϊόν. Οι τροποποιήσεις αυτές επηρεάζουν τη σταθερότητα και την ακεραιότητα των φυτικών ιστών, καθιστώντας τα νωπά φρούτα και λαχανικά πιο επιρρεπή στην αλλοίωση σε σχέση με την αρχική πρώτη ύλη.

Η λειτουργία της αναπνοής καθώς και άλλες μεταβολικές διεργασίες συνεχίζουν να λαμβάνουν χώρα μέχρι την κατανάλωση του προϊόντος. Όλες αυτές οι μεταβολές που συμβαίνουν κατά την διάρκεια της επεξεργασίας των νωπών φρούτων και λαχανικών μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: (i) σε φυσικές (τραυματισμός εξωτερικής επιφάνειας και απομάκρυνση προστατευτικού φλοιού), (ii) σε φυσιολογικές (αύξηση του ρυθμού αναπνοής και παραγωγής αιθυλενίου) και (iii) σε βιοχημικές (αλλαγές στο χρώμα, στην υφή, στο άρωμα, στη γεύση και στη θρεπτική αξία του προϊόντος) (Varoquaux and Wiley 1997, Montero-Calderon and Araya 2010).

Από όλα τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα νωπά φυτικά προϊόντα αποτελούν ένα συνεχές μεταβαλλόμενο σύστημα. Η εμφάνιση και η ένταση των αλλαγών αυτών μπορεί να επηρεαστεί από την δράση εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων. Οι κυριότεροι ενδογενείς παράγοντες που απορρέουν από ίδιο το προϊόν και επιφέρουν αλλαγές που μπορεί να οδηγήσουν στην υποβάθμιση της ποιότητας και στη μείωση του χρόνου ζωής των νωπών φυτικών προϊόντων είναι οι εξής:

Ρυθμός αναπνοής

Η αναπνοή ως φυσιολογική μεταβολική διεργασία συντελεί στην οξειδωτική διάσπαση πιο σύνθετων οργανικών μορίων που υφίστανται στα φυτικά κύτταρα, με σκοπό την παραγωγή απλούστερων μορίων (CO_2 , H_2O) και ενέργειας (Fonseca *et al.* 2002). Η διαδικασία της αναπνοής αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες υποβάθμισης της ποιότητας των νωπών φρούτων και λαχανικών λόγω της κατανάλωσης αναπνευστικών υποστρωμάτων (σάκχαρα και οργανικά οξέα) που απαιτείται για τη λειτουργία της (Chitarra and Chitarra 2005).

Η αναπνευστική δραστηριότητα παρέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά (ενέργεια και θρεπτικά υποστρώματα), τα οποία συντονίζουν τον ρυθμό άλλων μεταβολικών διεργασιών. Αυτές οι μεταβολικές διεργασίες μπορεί να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση στις ποιοτικές παραμέτρους (υφή, χημική σύνθεση, άρωμα, γεύση κ.λπ.) των φρούτων και των λαχανικών. Φυτικά προϊόντα με υψηλό ρυθμό αναπνοής τείνουν να έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής σε σύγκριση με προϊόντα που έχουν χαμηλό ρυθμό αναπνοής.

Η αναπνευστική λειτουργία επηρεάζεται από ένα πλήθος περιβαλλοντικών παραγόντων όπως είναι η ηλιακή ακτινοβολία, η χημική και υδατική καταπόνηση καθώς και η προσβολή από παθογόνους μικροοργανισμούς. Σε μετασυλλεκτικό επίπεδο, η αναπνοή επηρεάζεται κυρίως από τη θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία, την ατμοσφαιρική σύσταση και τις φυσικές καταπονήσεις (Saltveit 2003, 2004). Οι εσωτερικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αναπνοή και έχουν να κάνουν με το ίδιο το φυτό είναι το στάδιο ωριμότητας του προϊόντος και το είδος του φυτικού οργάνου (φύλλα, ρίζες, καρπός κ.λπ.) που χρησιμοποιείται για κατανάλωση, καθώς κάθε μέρος του φυτικού σώματος παρουσιάζει διαφορετική μεταβολική δραστηριότητα άρα και διαφορετικό ρυθμό αναπνοής. Η ποικιλία του φυτού είναι ένας εξίσου σημαντικός

ενδογενής παράγοντας, αφού διαφορετικές ποικιλίες του ίδιου προϊόντος τείνουν να έχουν διαφορετικό ρυθμό αναπνοής (Song *et al.* 1992). Τέλος, ανάλογα με τον αναπνευστικό τύπο του καρπού, φαίνεται ότι στους μη-κλιμακτηριακούς καρπούς, ο ρυθμός αναπνοής μετά την συγκομιδή μειώνεται αργά σε σχέση με τους κλιμακτηριακούς και ανώριμους καρπούς όπου παρατηρείται ταχύτερη μείωση του ρυθμού αναπνοής (Saltveit 2004). Η αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μπορεί να επιφέρουν αύξηση του ρυθμού αναπνοής και στους δυο τύπους καρπών, ύστερα από κάποια περίοδο αποθήκευσης (Fonseca *et al.* 2002).

Απώλειες ύδατος

Τα φρούτα και τα λαχανικά χαρακτηρίζονται από υψηλό υδατικό περιεχόμενο. Το νερό αυτό μπορεί εύκολα να χαθεί μέσω των στοματίων, των φακιδίων και άλλων επιδερμικών δομών που υπάρχουν στην φυτική επιφάνεια, όταν η σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας είναι σχετικά χαμηλή. Η διαφορά σχετικής υγρασίας μεταξύ του εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντος του προϊόντος είναι η κινητήριος δύναμη για την εμφάνιση απωλειών νερού. Ο εξωτερικός φλοιός των φρούτων και των λαχανικών αποτελεί ένα φυσικό εμπόδιο που βοηθά εν μέρει στον έλεγχο των υδατικών απωλειών. Η ικανότητα αυτή μπορεί να επηρεαστεί από την μορφολογία της επιφάνειας, την αναλογία της επιφάνειας ως προς το βάρος ή τον όγκο, το στάδιο ωριμότητας, τις σωματικές βλάβες, καθώς και από την θερμοκρασία, τη σχετική υγρασία και την κίνηση του αέρα γύρω από το περιβάλλον του προϊόντος. Ορισμένες κατηγορίες φυτικών προϊόντων είναι πιο επιρρεπείς στις απώλειες νερού όπως είναι τα μαρούλια και γενικά τα φυλλώδη λαχανικά σε σύγκριση με ορισμένα φρούτα (μήλα, αχλάδια κ.λπ.) που είναι πιο ανθεκτικά στις υδατικές απώλειες (Yingsanga *et al.* 2006).

Οι απώλειες σε υγρασία (αφυδάτωση) των νωπών οπωροκηπευτικών δεν μπορούν να σταματήσουν εντελώς, αλλά μπορεί να περιοριστούν μέσα από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας κατά την αποθήκευση. Η θερμοκρασία αποθήκευσης θα πρέπει να είναι σχετικά χαμηλή σε σημείο που να μην προξενεί βλάβες ή τραυματισμούς στο προϊόν. Η σχετική υγρασία πρέπει να είναι πάνω από το 80 % για τα περισσότερα προϊόντα και 95-100% για τα πιο ευαίσθητα προϊόντα (Cantwell 2002, Tompson and Kader 2004).

Δράση ενζύμων

Η δράση ορισμένων ενζύμων μπορεί να επιφέρει μη επιθυμητές μεταβολές στην υφή, στο χρώμα και στη γεύση των φρούτων και των λαχανικών που θα οδηγήσουν στην ποιοτική υποβάθμιση και στην μείωση της διάρκειας ζωής του τελικού προϊόντος.

Οι μπανάνες, τα μήλα, τα αχλάδια και μερικά κομμένα σε φέτες λαχανικά μπορεί να αναπτύξουν έντονο αποχρωματισμό μετά από την έκθεσή τους στον ατμοσφαιρικό αέρα. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από ένζυμα που είναι γνωστά ως φαινολοξειδάσες ή οξειδάσες της πολυφαινόλης, τα οποία αντιδρούν με τα φαινολικά συστατικά του τροφίμου παρουσία του οξυγόνου προκαλώντας την παραγωγή

σκοτεινών χρωστικών ουσιών. Η ενζυμική αμαύρωση των φρούτων και των λαχανικών λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα και είναι πολύ έντονη ύστερα από τον τραυματισμό των φυτικών κυττάρων κατά την επεξεργασία (αποφλοιώση, τεμαχισμός, κοπή) (Anderson 2004). Τα ένζυμα που εμπλέκονται στις αντιδράσεις αμαύρωσης είναι η οξειδάση της πολυφαινόλης (Polyphenol oxidase-PPO) (Silva and Sulaiman 2018), η φανολική περοξειδάση (Phenol peroxidase-POD) (De gl'Innocenti et al. 2005) και η φαινυλαλανική αμμωνιακή λυάση (Phenylalanine ammonia lyase-PAL) (Salveit 1997). Η λυάση της αμμωνίας της φαινυλαλανίνης καταλύει την βιοσύνθεση πρόδρομων φαινολικών ενώσεων (φαινυλοπροπανοειδών) μέσα από την απαμίνωση της L-φαινυλλαλανίνης σε κινναμικό οξύ (Croteau et al. 2000). Η PPO είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση του χρώματος και του αρώματος των νωπών φυτικών προϊόντων τόσο κατά την επεξεργασία όσο και κατά την αποθήκευση (Silva and Sulaiman 2018).

Τα φρέσκα φυτικά προϊόντα θα πρέπει να διατηρούν τη συνεκτική και τραγανή τους υφή μέχρι να φτάσουν στον καταναλωτή (Filion and Kilcast 2002). Η χαλάρωση των φυτικών ιστών είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τη σταθερότητα των φρούτων και των λαχανικών και προκαλείται από την δράση δύο ενζύμων, τη μεθυλεστεράση της πηκτίνης (Pectin methylesterase-PME) και την πολυγαλακτουρονάση (Polygalacturonase-PG) (Karakurt and Huber, 2003). Τα ένζυμα αυτά καταλύουν την αντίδραση αποδόμησης των πηκτινών. Αρχικά, η πηκτίνη απομεθυλιώνεται από την μεθυλεστεράση της πηκτίνης και στη συνέχεια μετατρέπεται σε πολυγαλακτουρονικό όξυ με την δράση της πολυγαλακτουρονάσης (Rico et al. 2007). Η μεθυλεστεράση της πηκτίνης (PME) είναι ένα ένζυμο που διαθέτουν πολλά παθογόνα (π.χ. *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Penicillium citrinum* και *Erwinia carotovora*) και μη παθογόνα (π.χ. *Flavobacterium*) των φυτών (Erkmen and Bazoglou 2016).

Η εμφάνιση μη επιθύμητων γεύσεων στα φρούτα και τα λαχανικά μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δράσης ενζύμων που εμπλέκονται στην οξείδωση των λιπαρών υλών. Η λιποξυγενάση και η υπεροξειδάση είναι ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών και υπεροξειδίων κατά την αντίδραση λιπαρών ενώσεων με το οξυγόνο. Οι αντιδράσεις αυτές μπορεί να επιφέρουν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων (π.χ. ταγγή γεύση) ή επιθυμητών γεύσεων (π.χ. στην τομάτα) στα νωπά φυτικά προϊόντα (Anthon and Barrett 2003, Myung et al. 2006)

Αλλαγές στην θρεπτική αξία

Οι καταναλωτές επιθυμούν τα φρέσκα φρούτα και τα λαχανικά που θα φτάσουν στο τραπέζι τους να διατηρούν την υψηλή διατροφική τους αξία. Ωστόσο, αυτό το χαρακτηριστικό ποιότητας είναι πολύ δύσκολο να αξιολογηθεί με βάση την οπτική εμφάνιση του προϊόντος. Η θρεπτική σύσταση των νωπών φυτικών προϊόντων μπορεί να επηρεαστεί από γενετικούς παράγοντες, τις περιβαλλοντικές συνθήκες της καλλιέργειας (θερμοκρασία, φωτισμός κ.λπ.), τις καλλιεργητικές τεχνικές (γονιμοποίηση, άρδευση κ.λπ.), τις πρακτικές επεξεργασίας (απολύμανση,

ακτινοβολία κ.λπ.) το στάδιο ωριμότητας πριν και μετά την συγκομιδή και τους χειρισμούς επεξεργασίας. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης παρατηρείται μια μικρή μεταβολή στην θρεπτική σύσταση, λόγω απώλειας διαιτητικών ινών, μεταλλικών στοιχείων και βιταμινών.

Η διάρρηξη των φυτικών ιστών κατά την διενέργεια των διαδικασιών κοπής μπορεί να διεγείρει την παραγωγή αιθυλενίου όπου με την σειρά της θα οδηγήσει στην αύξηση του ρυθμού αναπνοής και στη γρηγορότερη απώλεια ορισμένων βιταμινών. Η βιταμίνη C είναι το συστατικό που υποβαθμίζεται γρηγορότερα σε σχέση με τις υπόλοιπες βιταμίνες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης προσδιορισμού της φρεσκάδας σε πολλά φρούτα και λαχανικά (Barrett *et al.* 2010). Μετά την κοπή, οι αντιοξειδωτικές ουσίες (βιταμίνη C, καροτενοειδή, φαινολικές ενώσεις κ.λπ.) είναι πιο επιρρεπείς στην υποβάθμιση λόγω έκθεσης τους στο οξυγόνο ή στο φως. Απώλειες σε βιταμίνη C παρατηρήθηκαν σε φρέσκα προϊόντα κατά την αποθήκευσή τους στους 5 °C για 6 ημέρες. Οι απώλειες αυτές κυμαίνονταν στο 5% στο μάγκο, στο 25% σε κομμένα κομμάτια πεπονιού, ενώ το φως προήγαγε την αποδόμηση της βιταμίνης C σε καρπούς ακτινιδίου (Gi *et al.* 2006). Επιπλέον, η οξείδωση των βιταμινών μπορεί να συμβεί κατά την εφαρμογή των διαδικασιών απολύμανσης και έκθεσης των φυτικών προϊόντων σε όξινο pH (Wright and Kader 1997).

Η κυτταρική διαμερισματοποίηση που δημιουργείται μετά την κοπή συμβάλλει στην έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ υποστρωμάτων του προϊόντος και ενζύμων, όπως την οξειδάση του ασκορβικού, την οξειδάση της πολυφαινόλης και την περοξειδάση. Τα ενζυμα αυτά μπορεί επιφέρουν την περαιτέρω αποδόμηση φυτοθρεπτικών συστατικών (καροτενοειδή, φλαβονοειδή κ.λπ.) (Reyes *et al.* 2007).

Δράση μικροοργανισμών

Τα φρέσκα φρούτα και λαχανικά αποτελούν άριστη οικολογική θέση για μικροβιακή ανάπτυξη. Σε αυτό συμβάλλει η υψηλή ενεργότητα νερού (a_w) αυτών των προϊόντων, ενώ το pH του εκάστοτε προϊόντος (σχετικά ουδέτερο ή όξινο pH για λαχανικά και φρούτα, αντίστοιχα) θα καθορίσει και τα είδη των μικροοργανισμών που θα αναπτυχθούν (Parish *et al.* 2003). Οι κατεστραμμένοι φυτικοί ιστοί που δημιουργούνται από τραυματισμούς της εξωτερικής επιφάνειας κατά την προετοιμασία των νωπών φυτικών προϊόντων μπορεί να αποτελέσουν άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών αλλά και μικροοργανισμών που σχετίζονται με την αλλοίωση (Francis *et al.* 2012).

Οι κυριότεροι εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν άμεσα τα ενδογενή χαρακτηριστικά των φρούτων και των λαχανικών είναι οι εξής:

Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία συνιστά τον σημαντικότερο εξωτερικό παράγοντα, τόσο κατά την μετασυλλεκτική επεξεργασία όσο και για την αποθήκευση πριν την επεξεργασία των νωπών φρούτων και λαχανικών, αφού ρυθμίζει όλες τις υφιστάμενες μεταβολές που

μπορούν να συμβούν σε ένα φυτικό προϊόν. Σε χαμηλές θερμοκρασίες παρατηρείται επιβράδυνση όλων εκείνων των αντιδράσεων που σχετίζονται με αλλαγές στα ποιοτικά χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα τη διατήρηση των χαρακτηριστικών αυτών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η βέλτιστη θερμοκρασία αποθήκευσης πρέπει να επιλέγεται με βάση το προϊόν. Γενικά, τα νωπά οπωροκηπευτικά που είναι κομμένα σε κομμάτια συνίσταται να αποθηκεύονται στους 5 °C ή χαμηλότερα. Τα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τις θερμοκρασιακές τους απαιτήσεις σε αυτά που είναι ανεκτικά σε θερμοκρασίες κατάψυξης (≤ 0 °C), σε αυτά που χρειάζονται θερμοκρασίες κοντά στους 0 °C και στα ευαίσθητα στη ψύξη φυτικά προϊόντα που δεν μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από 7 έως 13 °C, λόγω της ανάπτυξης τραυματισμών. Η αποθήκευση σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από εκείνες που είναι ανεκτές για το προϊόν μπορεί να οδηγήσουν σε ανομοιόμορφη ωρίμανση, σε αλλαγές της υφής, σε απώλειες χρώματος, γεύσης και αρώματος καθώς και σε άλλες ανεπιθύμητες μεταβολές.

Η εξάρτηση του ρυθμού διαπνοής από τη θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με το προϊόν. Κατά γενικό κανόνα, η αναπνευστική δραστηριότητα αυξάνει σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης. Για κάθε 10 βαθμούς αύξησης της θερμοκρασίας αποθήκευσης μεταξύ του εύρους από 0 έως 30 °C, τα ποσοστά αναπνοής και υποβάθμισης αυξάνονται δύο έως τρεις φορές (Kader 2002a, Salveit 2004).

Σχετική υγρασία

Η σχετική υγρασία αποτελεί έναν εξίσου σημαντικό εξωτερικό παράγοντα που επηρεάζει τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των φρούτων και των λαχανικών (Nunes, 2008). Η συνιστώμενη τιμή της σχετικής υγρασίας κατά την αποθήκευση για τις περισσότερες καλλιέργειες οπωροκηπευτικών είναι τουλάχιστον 90% (Cantwell, 2002). Ωστόσο, τα περισσότερα νωπά φυτικά προϊόντα μεταχειρίζονται κάτω από τις βέλτιστες τιμές σχετικής υγρασίας με αποτέλεσμα τις υψηλές απώλειες ύδατος. Σχετικά μικρές απώλειες υγρασίας της τάξεως του 3-6% μπορεί να οδηγήσουν σε μαρασμό, συρρίκνωση και να συμβάλουν στην ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος (Nunes and Emond 2007). Η ουσιαστική απώλεια του νερού συνεπάγεται και απώλεια νωπού βάρους με άμεσο οικονομικό αντίκτυπο (χαμηλή εμπορευσιμότητα) εάν το προϊόν πωλείται κατά βάρος.

Όσον αφορά στα ποιοτικά κριτήρια, οι ελαφριές απώλειες ύδατος επιφέρουν μικρές μεταβολές στο χρώμα και στην υφή. Όταν το φαινόμενο γίνει πιο έντονο παρατηρούνται πιο προφανείς επιβλαβείς μεταβολές όπως είναι η απώλεια σπαργής, ο αποχρωματισμός και αλλαγές στη γεύση και στη θρεπτική αξία του προϊόντος (Kays and Paul 2004). Τέλος, το περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας που μπορεί να δημιουργηθεί ακόμα και μέσα στην συσκευασία του προϊόντος λόγω της απελευθέρωσης και της συμπύκνωσης νερού πάνω στην επιφάνεια των φρούτων και των λαχανικών μπορεί να ενισχύσει την μικροβιακή ανάπτυξη (Ayala-Zavala *et al.* 2008).

Τραυματισμός της φυτικής επιφάνειας

Κατά την επεξεργασία των ελάχιστα μεταποιημένων φυτικών προϊόντων απομακρύνεται η φυσική επιδερμίδα (π.χ. στα φρούτα) που λειτουργεί ως φυσικό εμπόδιο στην ανταλλαγή αερίων, στις υδατικές απώλειες και στην πιθανή μικροβιακή εισβολή, καθιστώντας το τελικό προϊόν πιο ευπαθές σε σχέση με την αρχική του μορφή (Altekruse *et al.* 1997, Agar *et al.* 1999). Οι λειτουργίες της αποφλοιώσης, της κοπής και του τεμαχισμού των φρούτων και λαχανικών μπορεί να επιφέρουν την καταστροφή των επιφανειακών φυτικών κυττάρων με άμεση συνέπεια την απελευθέρωση ενδοκυτταρικών υγρών που αποτελούν μια πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών και λειτουργούν ως άριστο υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Barry-Ryan *et al.* 2000, Brecht 2006).

Αποτέλεσμα των τραυματισμών/φθορών που δημιουργούνται κατά την μεταποίηση είναι η σύνθεση ανεπιθύμητων ενώσεων που επιφέρουν δυσάρεστη γεύση, η απώλεια της σταθερότητας, η αυξημένη αναπνοή και η επίσπευση των διαδικασιών γήρανσης (Artes *et al.* 2007). Στους μη-κλιμακτηριακούς καρπούς, η καταστροφή των φυτικών ιστών οδηγεί στην αύξηση του ρυθμού αναπνοής και την παραγωγή αιθυλενίου, επιταχύνοντας έτσι την υποβάθμισή τους, ενώ στους κλιμακτηριακούς ενεργοποιούνται οι διαδικασίες πρόωρης ωρίμανσης (Salveit 1997, Salveit *et al.* 2005).

1.4 Μικροβιακή χλωρίδα φρούτων και λαχανικών

Τα νωπά φρούτα και λαχανικά συνιστούν μέρη του φυτικού σώματος (φύλλα, καρποί, ρίζες κ.α.) και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται από διαφορετική μορφολογία και μεταβολισμό, παρέχοντας έτσι μια ποικιλία οικολογικών θέσεων για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Ponce *et al.* 2002). Η παρουσία και αριθμός των μικροοργανισμών ποικίλει ανάλογα με τον τύπο του προϊόντος, τις αγρονομικές πρακτικές, τη γεωγραφική θέση της παραγωγής και τις καιρικές συνθήκες πριν την συγκομιδή. Η συγκομιδή, η μεταφορά και οι περεταίρω χειρισμοί επεξεργασίας μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό το είδος και το επίπεδο του μικροβιακού φορτίου των φρούτων και των λαχανικών (Olaimat and Holley 2012). Το μικροβιακό φορτίο των νωπών φυτικών προϊόντων που διατίθενται στην αγορά εξαρτάται από το χρόνο αποθήκευσης, τη θερμοκρασία και ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το είδος του προϊόντος (Watada *et al.* 2005).

Ο αριθμός και ο τύπος της μικροβιακής χλωρίδας των νωπών φυτικών προϊόντων είναι εξαιρετικά μεταβλητός. Οι πληθυσμοί των μεσόφιλων βακτηρίων κυμαίνονται μεταξύ του 10^3 - 10^9 κύτταρα/g μετά την συγκομιδή, εξαρτώμενοι από το προϊόν και το είδος της καλλιέργειας (Oliveira *et al.* 2010). Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια αποτελούν την κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα στα περισσότερα λαχανικά, ενώ οι ζύμες και οι μύκητες είναι οι πιο συχνά εμφανιζόμενες μικροβιακές ομάδες στα φρούτα (Burnett and Beachat 2000, Tournas 2005).

Τα κυριότερα γένη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που συναντώνται στα φρούτα και στα λαχανικά είναι τα *Pseudomonas*, *Erwinia* (είδος: *E. herbicola*), *Flavobacterium*, *Xanthomonas* και *Enterobacter* (είδος: *E. agglomerans*). Η μυκητιακή χλωρίδα αντιπροσωπεύεται από τα γένη *Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium* και *Aspergillus*. Τα φρούτα επειδή παρουσιάζουν υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα έχουν ως συνηθέστερη μικροβιακή ομάδα τις ζύμες, με κυρίαρχα τα γένη *Torulopsis*, *Saccharomyces* και *Candida* (Pianetti *et al.* 2008, Caronigro *et al.* 2010, de Azeredo *et al.* 2011). Το γένος *Pseudomonas* είναι το κυρίαρχο γένος σε πολλά λαχανικά και μπορεί να αντιπροσωπεύει το 50-90% του συνολικού επιφάνειακού μικροβιακού πληθυσμού (Zagory 1999, Arvanitoyannis and Stratakos 2010,).

Η αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα των νωπών φυτικών προϊόντων είναι συνήθως μη παθογόνος για τον άνθρωπο (FDA, 2008). Ωστόσο, τα φρούτα και τα λαχανικά μπορούν να επιμολυνθούν κατά την διάρκεια της παραγωγής και επεξεργασίας τους από μικροοργανισμούς που είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο (Elizaquivel and Aznar 2012). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν ανιχνευθεί πάνω στη επιφάνεια των νωπών φρούτων και λαχανικών είναι τα βακτήρια *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* και *Listeria monocytogenes* (Heard 2002). Η φυσική μικροχλωρίδα των φρούτων και των λαχανικών πολλές φορές δρα παρεμποδιστικά έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, ορισμένα στελέχη του γένους *Pseudomonas* που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από νωπά προϊόντα δρουν ανταγωνιστικά και περιορίζουν την ανάπτυξη παθογόνων στελεχών του είδους *E. coli*. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος L-56-96 του είδους *Pseudomonas syringae* έχει βρεθεί ότι παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *E. coli* σε τραυματισμένους ιστούς μήλου (Janisiewicz and Conoway 1999). Επιπλέον, ένα στέλεχος του είδους *Pseudomonas graminis* που απομονώθηκε από την επιφάνεια μήλων, εξετάστηκε ως προς την ικανότητα του να μειώνει τους πληθυσμούς των *E. coli* O157:H7, *S. enterica* και του *Listeria innocua* σε φρέσκα μήλα και ροδάκινα (Alegre *et al.* 2013a).

Οι κρίσιμοι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την μικροβιολογία των φρούτων και των λαχανικών είναι οι εξής:

Το φυσικό περιβάλλον

Τα φυσικό περιβάλλον στο οποίο εκτίθενται τα νωπά φρούτα και λαχανικά περιέχει πολυάριθμες εστίες μόλυνσης από μικροοργανισμούς. Η μόλυνση μπορεί να λάβει χώρα σε όλα τα στάδια παραγωγικής διαδικασίας, από το χωράφι μέχρι τον καταναλωτή. Στο χωράφι τα νωπά φυτικά προϊόντα μπορεί να έρθουν σε επαφή με το χώμα, με περιττώματα, με ζώα, με έντομα ή τους ανθρώπους και να επιμολυνθούν από παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι ανθρώπινοι χειρισμοί, ο εξοπλισμός συγκομιδής, επεξεργασίας, μεταφοράς και διανομής μπορούν να οδηγήσουν στην περεταίρω επιμόλυνση και να επηρεάσουν το μικροβιακό φορτίο των φρούτων και των λαχανικών (Sothornvit and Kiatchanapaibul 2009). Οι περιβαλλοντικές συνθήκες έχουν μεγάλη επίδραση στους βακτηριακούς πληθυσμούς. Η ανάπτυξη και η

επιβίωση βακτηριακών πληθυσμών μπορεί να προωθηθεί σε περιβάλλοντα υψηλής σχετικής υγρασίας (Beattie and Lindow 1999).

Η επεξεργασία

Κατά την διάρκεια της επεξεργασίας (αποφλοιώση, κοπή και τεμαχισμός), η εξωτερική επιφάνεια του προϊόντος εκτίθεται στον ατμοσφαιρικό αέρα με αποτέλεσμα η μόλυνση από βακτήρια, ζύμες και μούχλες να είναι αρκετά πιθανή. Η αφαίρεση του εξωτερικού προστατευτικού φλοιού έχει σαν συνέπεια την παροχή μεγάλων επιφανειών με πληθώρα θρεπτικών συστατικών που μπορεί να ευνοήσουν τη μικροβιακή ανάπτυξη, η οποία με την σειρά της θα οδηγήσει στην μείωση της διάρκειας ζωής του προϊόντος (Muriel-Galet *et al.* 2013). Επιπλέον, οι μηχανικές βλάβες που δημιουργούνται στο φυτικό ιστό κατά την διάρκεια της επεξεργασίας μπορεί να αυξήσουν τον μεταβολικό ρυθμό και να επισπεύσουν την γήρανση, μειώνοντας έτσι την αντοχή του προϊόντος στην μικροβιακή αλλοίωση (Badosa *et al.* 2008).

Η συσκευασία

Η συσκευασία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή ποιότητα των νωπών φρούτων και λαχανικών. Η αέρια σύσταση της ατμόσφαιρας της συσκευασίας που περιβάλλει το προϊόν έχει σημαντική επίδραση στη μικροβιολογία και στη διάρκεια ζωής του προϊόντος στο ράφι. Τροποποιημένες ατμόσφαιρες με χαμηλή συγκέντρωση σε οξυγόνο είναι ικανές να εμποδίσουν την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών συμβάλλοντας έτσι στην αύξηση του χρόνου ζωής των συσκευασμένων προϊόντων (Al-Ati and Hotchkiss 2003). Την ίδια στιγμή όμως, κατά τον σχεδιασμό κατάλληλων συσκευασιών για τα φρούτα και τα λαχανικά, θα πρέπει η ατμόσφαιρα του εσωτερικού της συσκευασίας να αξιολογείται σε συνδυασμό με το είδος του φρούτου/λαχανικού και κυρίως με βάση τον ρυθμό αναπνοής του ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών αυτών των προϊόντων (Conte *et al.* 2011).

Το νερό πλύσης

Το πλύσιμο και η εφαρμογή των διαδικασιών απολύμανσης είναι τα μοναδικά μέσα που διαθέτει η βιομηχανία παραγωγής ελάχιστα μεταποιημένων φρούτων και λαχανικών για την μείωση του πληθυσμού αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών (Alegre *et al.* 2013a). Τα νωπά φυτικά προϊόντα πλένονται και απολυμαίνονται πριν από την κοπή και κατά την διάρκεια της επεξεργασίας. Ωστόσο, η χρήση κακής ποιότητας νερού πλύσης μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μικροβιακού φορτίου πάνω στην επιφάνεια του προϊόντος. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, το νερό πλύσης είναι δυνατόν να εισέλθει μέσω διήθησης στους ενδοκυτταρικούς χώρους, βοηθώντας έτσι τους μικροοργανισμούς να έρθουν σε επαφή με τους φυτικούς ιστούς. Η εισχώρηση και η μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών μέσω του νερού πλύσης αποτελούν σημαντικά ζητήματα όσον αναφορά στην ασφάλεια των νωπών φρούτων και λαχανικών (Qadri *et al.* 2015).

1.5 Αλλοίωση τροφίμων

Ως αλλοίωση τροφίμου ορίζεται οποιαδήποτε διαδικασία μεταβολής που καθιστά ένα προϊόν ανεπιθύμητο ή μη αποδεκτό για κατανάλωση (Kantor *et al.* 1997). Οι μεταβολές αυτές αφορούν αλλαγές στην εμφάνιση, στην οσμή ή στη γεύση (Madigan *et al.* 2011) που μπορεί να γίνουν αντιληπτές μέσω των αισθητηριακών μηχανισμών (απτική, οπτική, οσφρητική ή γευστική αίσθηση). Η αλλοίωση μπορεί να λάβει χώρα σε οποιοδήποτε στάδιο της αλυσίδας των τροφίμων ως αποτέλεσμα φυσικών βλαβών, μόλυνσης από μικροοργανισμούς, ή της δράσης εντόμων ή ενδογενών ενζύμων στον φυτικό ή ζωικό ιστό (Rawat 2015).

Η δραστηριότητα των μικροοργανισμών και οι υφιστάμενες αλλαγές που απορρέουν μέσα από την μεταβολική τους δράση, έχουν ευρέως αναγνωριστεί ως ο σημαντικότερος παράγοντας αλλοίωσης στα τρόφιμα (Nychas *et al.* 1998). Οι χημικές αντιδράσεις που προκαλούν ανεπιθύμητες μεταβολές στα τρόφιμα, συμβάλλοντας έτσι στην αισθητική απόρριψη τους, είναι αποτέλεσμα μιας ποικιλίας μικροβιακών κοινοτήτων που χρησιμοποιούν τα τρόφιμα ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Τα βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες συνιστούν τους κύριους αλλοιογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων. Ορισμένοι μικροβιακοί πληθυσμοί εντοπίζονται σε πολλούς τύπους αλλοιωμένων τροφίμων, ενώ άλλοι παρευρίσκονται επιλεκτικά σε ένα μόνο τύπο αλλοιωμένου προϊόντος (Gram *et al.* 2002). Η μικροβιακή ομάδα που αποτελεί μέρος της συνολικής μικροβιακής χλωρίδας και μέσω διαφόρων οικολογικών στρατηγικών θα καταφέρει να κυριαρχήσει έναντι των άλλων μικροβιακών πληθυσμών, επιφέροντας την αλλοίωση ενός συγκεκριμένου τύπου τροφίμου, αναφέρεται ως «Εφήμεροι (Ειδικοί) Αλλοιογόνοι Μικροοργανισμοί» (Ephemeral (Specific) Spoilage Organisms-E(S)SO) (Koutsoumanis and Nychas 2000, Nychas *et al.* 2007). Οι εφήμεροι (ειδικοί) αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί συνήθως είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή ενώσεων που προκαλούν την εμφάνιση δυσάρεστων οσμών (off-odors) στο προϊόν (Gram *et al.* 2002).

1.5.1 Μικροβιακή αλλοίωση φρούτων και λαχανικών

Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι από τα πιο ευαλλοιώτα τρόφιμα στην αγορά. Η χημική τους σύσταση χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή σε πρωτεΐνες. Το εύρος του pH τους κυμαίνεται από την τιμή 7.0 έως ελαφρά όξινο και παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα νερού. Αυτό το βιοχημικό προφίλ των φρούτων και των λαχανικών τα καθίστα εξαιρετικά ενδιαιτήματα για την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών (DeI Nobile *et al.* 2008, Selma *et al.* 2008a). Οι υφιστάμενες μεταβολές που σχετίζονται με την μικροβιακή αλλοίωση έχουν να κάνουν με τον έντονο αποχρωματισμό, την νέκρωση των φυτικών ιστών, την απώλεια της υφής και την ανεπιθύμητη παραγωγή δυσάρεστων γεύσεων και οσμών (Ponce *et al.* 2002). Η μικροβιακή αλλοίωση των νωπών φυτικών προϊόντων μπορεί να λάβει χώρα σε οποιοδήποτε στάδιο της εφοδιαστικής αλυσίδας (Mahajan *et al.* 2017).

1.5.1.1 Μικροβιακή αλλοίωση λαχανικών

Τα λαχανικά αποτελούν σημαντική πηγή υδατανθράκων (5% η περισσότερη), ενώ είναι φτωχά γενικά σε πρωτεΐνες (1-2%). Το pH των περισσότερων λαχανικών κυμαίνεται μεταξύ 5.0 και 6.5, γεγονός που ευνοεί την ανάπτυξη βακτηρίων, ζυμών και νηματοειδών μυκήτων (Erkmen and Bozoglu 2016). Το μικροβιακό φορτίο των έτοιμων προς κατανάλωση νωπών λαχανικών είναι ικανό να προκαλέσει απώλειες λόγω αλλοίωσης μέχρι και 30% ακόμα και σε φρέσκα λαχανικά που έχουν υποστεί την διαδικασία της απολύμανσης και έχουν αποθηκευτεί κάτω από θερμοκρασίες ψύξης (Federico *et al.* 2015).

Οι αλλαγές στην εμφάνιση που σχετίζονται με την μικροβιακή αλλοίωση των λαχανικών περιγράφονται με τον όρο «σήψη/σάπισμα (rot)» (Hozbor *et al.* 2006). Οι μικροοργανισμοί βρίσκουν πρόσφορο έδαφος και αναπτύσσονται γρηγορότερα σε τραυματισμένα ή κομμένα λαχανικά. Ο ατμοσφαιρικός αέρας, η αυξημένη υγρασία και οι σχετικά υψηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης ευνοούν την εμφάνιση ελαττωμάτων/φθορών που σχετίζονται με την μικροβιακή αλλοίωση. Τα κυριότερα είδη αλλοιογόνων βακτηρίων που απαντώνται στα λαχανικά ανήκουν στα γένη *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus* και *Clostridium*. Τα γένη *Penicillium*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Alternaria* και *Botrytis* αποτελούν τις κύριες ομάδες νηματοειδών μυκήτων που προκαλούν αλλοιώσεις στα λαχανικά.

Τα λαχανικά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αποτελούν άριστη οικολογική θέση για την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών εξαιτίας της αφθονίας θρεπτικών συστατικών, του ουδέτερου pH και της υψηλής a_w . Ωστόσο, αν και τα λαχανικά κατά την διάρκεια της καλλιέργειας τους, εκτίθενται σε μία πληθώρα μικροβιακών κοινοτήτων που απαντώνται στην επιφάνεια του εδάφους, δεν είναι δυνατόν όλες αυτές οι μικροβιακές ομάδες να μολύνουν το φυτό και να επιφέρουν την υποβάθμιση του. Για τον λόγο αυτό, η αλλοίωση πολλές φορές προέρχεται από μικροοργανισμούς που δεν συναντώνται στο έδαφος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria-LAB). Οι περισσότερες απώλειες λόγω αλλοίωσης των λαχανικών δεν οφείλονται στην δράση παθογόνων μικροοργανισμών των φυτών αλλά σε βακτήρια και νηματοειδής μύκητες (molds) που εκμεταλλεύονται τις μηχανικές φθορές και τους τραυματισμούς που δημιουργούνται πάνω στην φυτική επιφάνεια.

Ορισμένες μικροβιακές ομάδες εντοπίζονται μόνο σε ορισμένους τύπους λαχανικών, ενώ άλλες είναι δυνατόν να παρευρίσκονται σε μια μεγαλύτερη ποικιλία λαχανικών. Το είδος *Erwinia carotovora* είναι το πιο συνηθισμένο βακτήριο αλλοίωσης και έχει εντοπιστεί σχεδόν σε όλα τα είδη λαχανικών προκαλώντας το λεγόμενο βακτηριακό σάπισμα (bacterial soft rot). Το βακτήριο αυτό έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται και κάτω από θερμοκρασίες ψύξης (Tournas 2005). Τα στελέχη του γένους *Pseudomonas* αποτελούν επίσης μια σημαντική μικροβιακή ομάδα αλλοίωσης στα φρέσκα λαχανικά κατά την αποθήκευση σε συνθήκες ψύξης (Federico *et al.* 2015). Η βακτηριακή αλλοίωση αρχικά ξεκινάει με την χαλάρωση/αποσύνθεση των φυτικών ιστών εξαιτίας της αποδόμησης της πηκτίνης. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η ζύμωση

του αμύλου και απλών σακχάρων με άμεση συνέπεια την παραγωγή γαλακτικού οξέος και αιθανόλης που συμβάλλουν στην ανάπτυξη δυσάρεστων γεύσεων και οσμών (Rawat 2015). Τα αλλοιογόνα βακτήρια μετά την επιτυχή εγκαθίδρυση τους πάνω στο φυτικό σώμα παράγουν μια σειρά από ένζυμα γνωστά ως ένζυμα αποδόμησης φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων (Plant Cell Wall-Degrading Enzymes-PCWDEs) (Lee *et al.* 2013). Στα ένζυμα αυτά ανήκουν κυτταρινάσες, ξυλανάσες, πολυγαλακτουρονάσες, πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες και πηκτινάσες, με την τελευταία κατηγορία να συνιστά και τη σημαντικότερη ομάδα ενζύμων μικροβιακής προέλευσης που συσχετίζονται με την αλλοίωση των λαχανικών. Κατά την διάρκεια της μόλυνσης η επενέργεια της δράσης αυτών των ενζύμων οδηγεί στην νέκρωση και την καταστροφή των φυτικών ιστών (Abbott and Boraston 2008).

1.5.1.2 Μικροβιακή αλλοίωση φρούτων

Τα φρούτα με την σειρά τους από άποψη χημικής σύστασης αποτελούνται από 85% νερό, 13% υδατάνθρακες, 0.9% πρωτεΐνες, 0.3% λίπος και 0.5% τέφρα. Το pH των φρούτων σε αντίθεση με αυτό των λαχανικών είναι μικρότερο ή ίσο του 4.5, γεγονός που συνιστά ανασταλτικό παράγοντα για την επιβίωση και την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων. Οι ζύμες, οι νηματοειδής μύκητες και βακτήρια που είναι ανεκτικά σε όξινα περιβάλλοντα (π.χ. οξυγαλακτικά βακτήρια, *Acetobacter* και *Glucanobacter*) αποτελούν τις συνηθέστερες μικροβιακές κοινότητες των φρούτων (Erkmen and Bazoglou 2016).

Τα φρέσκα φρούτα φιλοξενούν ένα μεγάλο αριθμό μικροβιακών ομάδων πάνω στην επιφάνεια τους, των οποίων η ανάπτυξη αναστέλλεται μετά την συγκομιδή. Η φυσιολογική διαδικασία της ωρίμανσης οδηγεί σε χαλάρωση των κυτταρικών τοιχωμάτων και σε μείωση του ποσού των παραγόμενων αντιμικροβιακών ουσιών. Οι φθορές που δημιουργούνται στην φυτική επιφάνεια κατά την συγκομιδή δημιουργούν πρόσφορο έδαφος για την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών. Οι νηματοειδής μύκητες είναι ανεκτικοί στο όξινο περιβάλλον και στην υψηλή a_w των περισσότερων φρούτων (εσπεριδοειδή, μήλα, αχλάδια κ.λπ.), συνιστώντας μία από τις κύριες ομάδες μικροβιακής αλλοίωσης. Οι νηματοειδής μυκήτες που συχνά απομονώνονται από αλλοιωμένα φρούτα ανήκουν στα γένη *Penicillium*, *Botrytis* και *Rhizopus* (Calvo *et al.* 2007). Είδη βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Erwinia* και *Xanthomonas* μπορεί να προκαλέσουν αλλοιώσεις σε μερικά φρούτα αλλά το πρόβλημα εμφανίζεται εντονότερο στα νωπά συσκευασμένα φρούτα (Ngarmsak *et al.* 2006, Restuccia *et al.* 2006). Οι ζύμες αποτελούν ένα άλλο σημαντικό ζήτημα όσο αναφορά στην αλλοίωση των φρούτων, με τη δράση τους να προξενεί μεταβολές στο χρώμα, καθώς και παραγωγή αερίων (CO_2) και πτητικών ουσιών με δυσάρεστη οσμή (Loureiro and Querol 1999, Tournas 2006).

Τα νωπά φρούτα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, φιλοξενούν μια μεγάλη ομάδα μικροβιακών κοινοτήτων πάνω στην επιφάνεια τους. Αυτό το αρχικό μικροβιακό φορτίο των φρούτων μπορεί να έχει αποκτηθεί φυσικά από μικροοργανισμούς που απαντώνται στη φύση ή να έχει προκληθεί κατά την συγκομιδή, την επεξεργασία και τους χειρισμούς των χειριστών τροφίμων ή των καταναλωτών. Στην περίπτωση που

το αρχικό μικροβιακό φορτίο είναι υψηλό και οι πρακτικές προετοιμασίας ανεπαρκείς, ορισμένοι μικροοργανισμοί θα επιβιώσουν, θα αναπτυχθούν και θα οδηγήσουν στην αλλοίωση του προϊόντος (Beuchat 2002).

1.6 Νομοθεσία και θέματα ασφάλειας για τα νωπά φρούτα και λαχανικά

Η μόλυνση των νωπών φρούτων και λαχανικών από παθογόνους μικροοργανισμούς αποτελεί σημαντικό ζήτημα ασφάλειας, καθώς τα φρέσκα φυτικά προϊόντα συχνά καταναλώνονται ωμά χωρίς να έχουν υποστεί κανένα είδος θερμικής επεξεργασίας, αποτελώντας έτσι όχημα για την μεταφορά μικροοργανισμών που μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στην υγεία των καταναλωτών (Garrasco *et al.* 2012, Zweifel and Stephan 2012). Τα στάδια επεξεργασίας των ελάχιστα μεταποιημένων φρούτων και λαχανικών περιλαμβάνουν την πλύση, την κοπή, την αποφλοιώση, τον τεμαχισμό, την απολύμανση και την συσκευασία. Ωστόσο, οι λειτουργίες αυτές δεν εγγυώνται την πλήρη εξάλειψη και καταστροφή των αλλοιγόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που υφίστανται πάνω στο φυτικό προϊόν. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις κρουσμάτων/επιδημιών από παθογόνους μικροοργανισμούς που σχετίζονται με την κατανάλωση νωπών φυτικών προϊόντων (CDC 2016). Οι κυριότεροι παθογόνοι μικροοργανισμοί που έχουν εντοπιστεί και συνδεθεί με εμφάνιση κρουσμάτων σε μολυσμένα φρούτα και λαχανικά περιλαμβάνουν βακτήρια των γενών *Salmonella* (είδος *S. enterica*), *Listeria* (είδος *L. monocytogenes*), *Shigella*, *Escherichia* (είδος *E. coli*), ιούς και παράσιτα (Ramos *et al.* 2013).

Ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 της επιτροπής της 15^{ης} Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα καθορίζει στο Κεφάλαιο 2.5 ένα πλάνο μικροβιολογικής ανάλυσης και παρουσιάζει τις μικροβιακές απαιτήσεις που πρέπει να πληρούν τα έτοιμα προς κατανάλωση νωπά οπωροκηπευτικά. Στις απαιτήσεις αυτές περιλαμβάνονται (Κανονισμός 2073/2005):

- Για το είδος *E. coli* που χρησιμεύει ως δείκτης υγιεινής των διαδικασιών παραγωγής ισχύουν τα ακόλουθα: Η παρουσία μικροβιακού πληθυσμού κάτω από 10^2 CFU/g κρίνεται ικανοποιητικό αποτέλεσμα, εάν ο μέγιστος αριθμός είναι μεταξύ του 10^2 και 10^3 CFU/g και οι υπόλοιπες τιμές είναι μικρότερες 10^2 CFU/g το αποτέλεσμα της μικροβιολογικής ανάλυσης θεωρείται αποδεκτό, ενώ εάν μία οι περισσότερες τιμές είναι μεγαλύτερη από 10^3 CFU/g ή περισσότερο τότε το αποτέλεσμα θεωρείται μη ικανοποιητικό.
- Απουσία των γενών *Salmonella*, *Singella* και του ορότυπου *E. coli* O157:H7 σε 25 g νωπού προϊόντος.

Στην εθνική και κοινοτική νομοθεσία δεν υπάρχουν σαφή μικροβιολογικά όρια όσο αναφορά στους μικροοργανισμούς αλλοίωσης.

Για την πρόληψη και την αντιμετώπιση των προβλημάτων μικροβιολογικής φύσεως (αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς) συνίσταται η εφαρμογή προγραμμάτων που θα διασφαλίζουν την ποιότητα και την ασφάλεια των νωπών φρούτων και λαχανικών σε όλα τα στάδια παραγωγής, από το χωράφι μέχρι την τελική κατανάλωση του προϊόντος. Η εφαρμογή των προγραμμάτων Ορθής Γεωργικής Πρακτικής (Good Agriculture Practices-GAPs) και του συστήματος Ανάλυσης Κινδύνων και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (Hazard Analysis and Critical Control Points-HACCP) εντός των εγκαταστάσεων, συμβάλλουν στην ελαχιστοποίηση των κινδύνων που σχετίζονται με την μικροβιολογία των νωπών φυτικών προϊόντων (Mahajan *et al.* 2017). Επιπλέον, η επιλογή κατάλληλων/αξιόπιστων προμηθευτών και ο τακτικός έλεγχος τους ώστε να εξασφαλίζεται η εναρμόνισή τους με τις προδιαγραφές που θέτει η αγορά, αναμένεται να παράσχουν επαρκείς πληροφορίες σχετικά με την μικροβιολογική κατάσταση των εισερχόμενων πρώτων υλών. Η υλοποίηση των διαδικασιών Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής (Good Manufacturing Practices-GMPs) σε όλα τα στάδια της εφοδιαστικής αλυσίδας είναι απαραίτητες ώστε να αποφευχθούν οι περιπτώσεις διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Οι GMP περιλαμβάνουν το διαχωρισμό των ετοιμών προς κατανάλωση προϊόντων από τις αρχικές πρώτες ύλες, τους χειρισμούς του προσωπικού και την υγιεινή και τον καθαρισμό των σκευών και του εξοπλισμού επεξεργασίας σύμφωνα με τις Τυποποιημένες Διαδικασίες Λειτουργίας Υγιεινής (Sanitation Standard Operating Procedures-SSOPs) (Lianou and Sofos 2007).

1.7 Ανανάς (*Ananas comosus*)

1.7.1 Γενικά στοιχεία

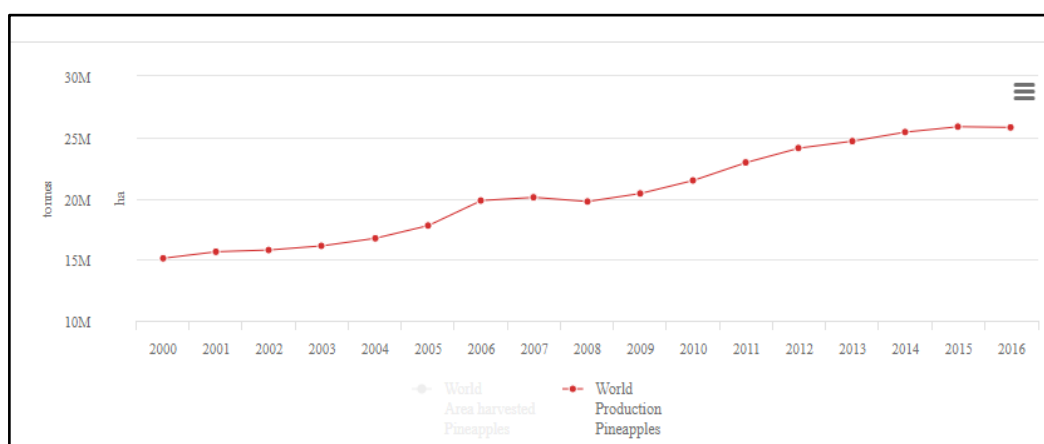
Ο ανανάς (*Ananas comosus* (L.) Merr.) αποτελεί το τρίτο πιο καλλιεργούμενο τροπικό φυτό μετά την μπανάνα και τα εσπεριδοειδή, ενώ η καλλιέργειά του λαμβάνει χώρα τόσο σε τροπικές όσο και υποτροπικές περιοχές (Paul and Duarte 2011). Ο ανανάς είναι ένα εξαιρετικά δημοφιλές τροπικό φρούτο που καταναλώνεται παγκοσμίως (Montero-Calderon *et al.* 2008, Azarakhsh *et al.* 2012, Gabri *et al.* 2014) σε διάφορες μορφές όπως κονσερβοποιημένος (σε φέτες), νωπός (κομμένα κομμάτια) αλλά και σε χυμούς (Coppens d'Heckenbrugge *et al.* 2011) και ανήκει στην κατηγορία των μη κλιμακτηριακών καρπών (Lobo and Paul 2017).

Η Κόστα Ρίκα, η Βραζιλία, οι Φιλιππίνες, η Ταϊλάνδη, η Ινδονησία και η Ινδία είναι οι κύριες χώρες παραγωγής ανανά σε παγκόσμιο επίπεδο σύμφωνα με τα στοιχεία του FAO για το 2013 (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Οι κύριες χώρες παραγωγής ανανά (FAOSTAT 2013).

Χώρα	Παραγωγή (σε μετρικούς τόνους)
Κόστα Ρίκα	2.685.131
Βραζιλία	2.483.831
Φιλιππίνες	2.458.420
Ταϊλανδή	2.209.351
Ινδονησία	1.837.155
Ινδία	1.571.000

Στο γράφημα που ακολουθεί παρουσιάζεται η πορεία της παραγωγής ανανά από το 2000 μέχρι το 2016 εκφρασμένη σε εκατομμύρια μετρικούς τόνους.



Γράφημα 1: Η παγκόσμια παραγωγή ανανά από το 2000 μέχρι το 2016 (FAOSTAT 2018)

Όσον αναφορά στην χημική του σύσταση, ο ανανάς αποτελεί σημαντική πηγή του ενζύμου της βρωμελαΐνης (χρησιμοποιείται στην τρυφεροποίηση του κρέατος), ενώ χαρακτηρίζεται από την παρουσία φυτικών ινών υψηλής διατροφικής αξίας (Correns d' Eeckenbrugge *et al.* 2011). Επίσης, περιέχει σημαντικά ποσοστά ασβεστίου, καλίου, χαλκού και βιταμινών C, B1, B6. Η περιεκτικότητα σε λιπαρές ύλες και χοληστερόλη είναι μικρή και συνιστά άριστο βοήθημα για την εύρυθμη λειτουργία του πεπτικού συστήματος, ενώ παρουσιάζει φυσική αντιφλεγμονώδη δράση (Joy 2010).

1.7.2 Ταξινομική κατάταξη και βοτανικά στοιχεία

Η ταξινομική κατάταξη του ανανά (*Ananas comosus*) είναι η εξής (USDA-Plants Database):

- Βασίλειο: Plantae-Plants (Φυτά)
- Υποβασίλειο: Tracheobionta-Vascular plants (Αγγειόφυτα)
- Υπερσπονομοταξία: Spermatophyta-Seed plants (Σπορόφυτα)
- Συνομοταξία: Magnoliophyta-Flowering plants
- Κλάση: Liliopsida-Monocotyledons (Μονοκοτυλήδονα)

- Υποκλάση: Zingiberidae
- Τάξη: Bromeliales
- Οικογένεια: Bromeliaceae – Bromeliad family (Βρομελιίδες)
- Γένος: *Ananas* Mill.
- Είδος: *Ananas comosus* (L.) Merr. (Ανανάς ο εύκομος)

Οι κυριότερες καλλιεργούμενες ποικιλίες ανανά είναι οι ‘Cayenne’, ‘Spanish’, ‘Queen’, ‘Pernambuco’ και ‘Perolera’. Οι ποικιλίες αυτές χαρακτηρίζονται από παγκόσμια εξάπλωση και έχουν την δυνατότητα προσαρμογής στις τοπικές γεωκλιματικές συνθήκες κάθε περιοχής. Η διαφορά των ποικιλιών αυτών έχει να κάνει με τα χαρακτηριστικά του φυτού (σχήμα, εμφάνιση, ανάπτυξη κ.λπ.) και της σάρκας του καρπού, καθώς και με την μορφολογία των φύλλων (UNCTAD 2016). Η ποικιλία ‘Smooth Cayenne’ αντιπροσώπευε την πλειοψηφία της παγκόσμιας παραγωγής στο δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα (PIP-Coleasp 2011), τόσο για κονσερβοποιημένο όσο και για νωπό ανανά. Από το 2000 και έπειτα για την καλλιέργεια του ανανά χρησιμοποιείται ένα υβρίδιο που δημιουργήθηκε στην Χαβάη το 1970 (Βασιλακάκης 2016). Το υβρίδιο αυτό ονομάζεται ‘Extra Sweet’ ή ‘MD-2’ και μαζί με την ποικιλία ‘Smooth Cayenne’ καλλιεργούνται σε τεράστια κλίμακα (PIP-Coleasp 2011, Viana *et al.* 2013).



Εικόνα 1: Καλλιέργεια ανανά

Ο ανανάς (*Ananas comosus* L.) είναι ένα ποώδες, πολυετές φυτό που το ύψος του κυμαίνεται από 70-150 εκ. Το φυτικό σώμα αποτελείται από ένα σκληρό βλαστό και μια ροζέτα από κηρώδη στενόμακρα φύλλα. Κατά την διάρκεια της άνθησης παρατηρείται μία διόγκωση και επιμήκυνση του βλαστικού άξονα κοντά στην κορυφή, σχηματίζοντας μια ταξιανθία από μικρά ιώδη ή κόκκινα άνθη. Το φρούτο του ανανά έχει σχήμα κυλινδρικό-οβάλ είναι συγκάρπιο και αποτελείται από την ένωση πολλών μικρών φρούτων. Ο καρπός είναι χυμώδης και σαρκώδης σύνθεσης, με ινώδη εντερώνη στο μέσο κεντρικό άξονα. Το περίβλημα του καρπού είναι σκληρό κηρώδες, χρώματος σκούρου πράσινου, κίτρινου, πορτοκαλοκίτρινου ή

κοκκινωπού όταν ο καρπός ωριμάσει. Το χρώμα της σάρκας είναι λευκό έως κίτρινο (Βασιλακάκης 2016).



Εικόνα 2: Καρπός ανανά

1.7.3 Διατροφική αξία

Ο φρέσκος ανανάς από πλευράς διατροφικής αξίας αποτελεί σημαντική πηγή αντιοξειδωτικών ουσιών (βιταμίνη C και φαινολικές ενώσεις), ενώ χαρακτηρίζεται από μία σχετικά όξινη γεύση, έντονο άρωμα και περιεκτικότητα της σάρκας σε χυμό (Montero-Calderon *et al.* 2008, Azarakhsh *et al.* 2012, Mantilla *et al.* 2013.). Η χημική σύσταση του ανανά (Πίνακας 3) περιλαμβάνει συστατικά όπως διαιτητικές ίνες, βρωμελαΐνη, βιταμίνη C, βιταμίνες του συμπλέγματος B, μεταλλικά στοιχεία (μαγγάνιο, χαλκό, ασβέστιο, ψευδάργυρο) και β-καροτένιο. Η σάρκα του είναι απαλλαγμένη από λιπαρές ύλες και χοληστερόλη, ενώ παρουσιάζει ελάχιστη περιεκτικότητα σε νάτριο και χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο (Lobo and Paul 2017).

Τα πτητικά συστατικά είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη του αρώματος και της γεύσης στον φρέσκο ανανά. Περισσότερες από 280 πτητικές ενώσεις έχουν εντοπιστεί στον ανανά, ωστόσο μερικά μόνο από αυτά τα πτητικά έχουν αναγνωριστεί ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη αρώματος και γεύσης (Tokitomo *et al.* 2005). Οι Berger *et al.* (1985) αναγνώρισαν δύο ενώσεις υδρογοναθράκων, το 1-(E,Z)-3,5-εντεκατριένιο και το 1-(E,Z,Z)-3,5,8-εντεκατριένιο, που φαίνεται ότι συμβάλλουν στο άρωμα του φρέσκου ανανά. Αλλά σημαντικά συστατικά αρώματος είναι οι εστέρες του μέθυλ- και αιθυλ- 2-μεθυλβουτανοϊκού, εξανοϊκού μεθυλίου, μέθυλ- και αιθυλ- 3(μεθύλειο) προπανοϊκού, καθώς υδροξυ- και ακετόξυ εστέρες και γ-λακτόνες (Preston *et al.* 2003).

Η κατανάλωση του καρπού αυτού προσφέρει τεράστια οφέλη στην υγεία, αφού συμβάλλει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και των οστών, βοηθάει στην πέψη των πρωτεϊνών, ανακουφίζει από τα συμπτώματα του κοινού κρυολογήματος (Lobo and Paul 2017) και μειώνει την όρεξη βοηθώντας στον έλεγχο του βάρους (Coveca 2002). Επιπλέον, μέσω των φυτικών ινών που περιέχει συντελεί στην αντιμετώπιση προβλημάτων δυσκοιλιότητας, ενώ παράλληλα ρυθμίζει τον

πληθυσμό της εντερικής μικροχλωρίδας , συμβάλλοντας στον έλεγχο της διάρροιας (Baez et al. 2007).

Η βρωμελαΐνη είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεολυτικών ενζύμων που απαντά φυσικά στον ανανά και χρησιμοποιείται στην φαρμακοβιομηχανία, στην παραγωγή μύρας και στην κτηνοτροφία για την τρυφεροποίηση του κρέατος (Lobo and Paul 2017). Το ένζυμο αυτό είναι μια πρωτεΐνωση της κυστεΐνης και χαρακτηρίζεται από ένα πλήθος θεραπευτικών ιδιοτήτων. Χρησιμοποιείται για την θεραπεία της αλβουμινουρίας (Coveca 2002), καθώς και στην αντιμετώπιση εντερικών ελμινθιάσεων (νηματώδης και κεστώδης σκώληκες) (Steprek *et al.* 2007).

Πίνακας 3: Χημική σύσταση νοπού ανανά

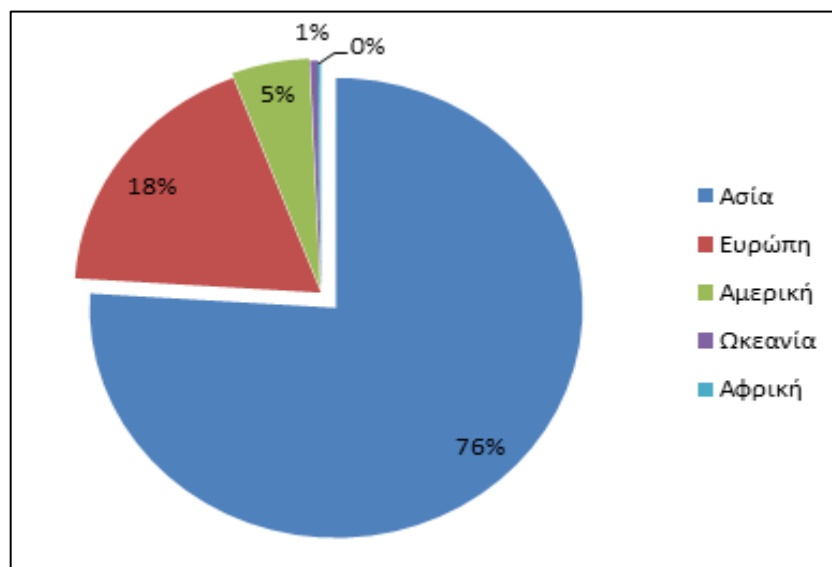
Χημική σύνθεση	Νωπός ανανάς¹	Βιβλιογραφία	
Νερό (g)	86	USDA Nutrient Database (2018)	
Ενέργεια (Kcal)	50		
Πρωτεΐνες (g)	0.54		
Ολικό λιπιδιακό περιεχόμενο (fat)	0.12		
Υδατάνθρακες (g)	13.12		
Διαιτητικές ίνες (Συνολικά) (g)	1.4		
Ολική περιεκτικότητα σε σάκχαρα (g)	9.85		
¹ Μέση τιμή όλων των ποικιλιών			
Χημική σύνθεση	Νωπός ανανάς (100g NB)	Βιβλιογραφία	
Ενέργεια (kJ/100g)	200-223*	Βασιλακάκης (2016)	
Ενέργεια (kcal/100g)	50-52.6*		
Νερό (g/100g)	85.8		
Πρωτεΐνες (g/100g)	0.4-0.54*		
Υδατάνθρακες (g/100g)	11-12.63*		
Λίπη (g/100g)	0.12-0.2*		
Σάκχαρα (g/100g)	9.24-9.26*		
Ίνες (g/100g)	1.4-1.52*		
Μεταλλικά στοιχεία			
Νάτριο (Na) (mg/100g)	<5.67		Anses-French agency for food , environmental, health and safety (2018)
Μαγνήσιο (Mg) (mg/100g)	12-19.8*		
Φώσφορος (P) (mg/100g)	8-11		
Κάλιο (K) (mg/100g)	115-170*		
Ασβέστιο (Ca) (mg/100g)	13-20.3*		
Σίδηρος (Fe) (mg/100g)	0.225-0.28*		
Χαλκός (Cu) (mg/100g)	0.076		
Ψευδάργυρος (Zn) (mg/100g)	0.19-0.667*		
Σελήνιο (Se) (μg/100g)	0.28		
Ιώδιο (I) (μg/100g)	1.22		
Μαγγάνιο (Mn) (mg/100g)	2.02		
B-καροτένιο (μg/100g)	38.5		
Βιταμίνες			
E (μg/100g)	0.1		
C (mg/100g)	12		

B1-Θειαμίνη (mg/100g)	0.08
B2-Ριβοβλαβίνη (mg/100g)	0.03
B3-Νιασίνη (mg/100g)	0.3-0.489*
B5-Παντοθενικό οξύ (mg/100g)	0.16-0.205*
B6 (mg/100g)	0.101-0.110*
B9-Φολικό οξύ (μg/100g)	13.5-15*
*Δεν αντιπροσωπεύει το εύρος τιμών αλλά την τιμή από κάθε βιβλιογραφική πηγή	

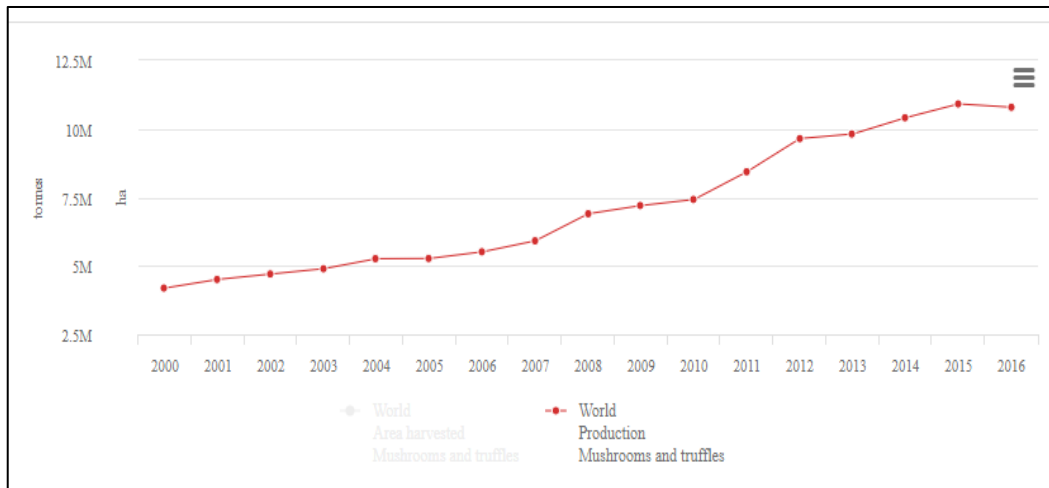
1.8 Μανιτάρια του είδους *Pleurotus ostreatus*

1.8.1 Γενικά στοιχεία

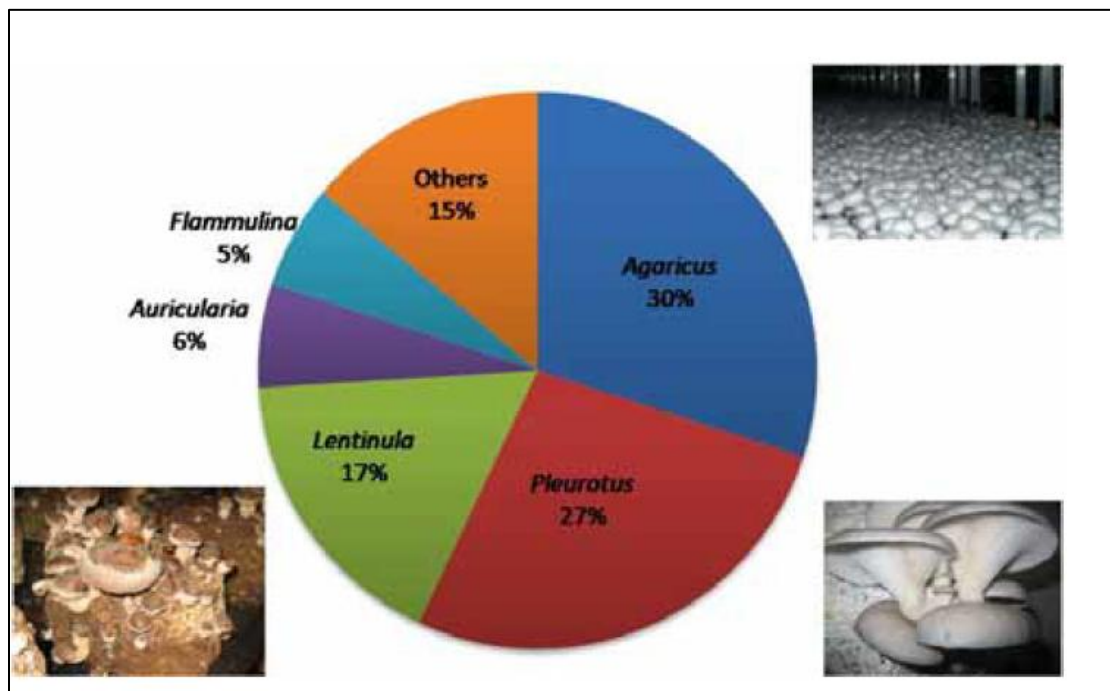
Σύμφωνα με στοιχεία της βάσης δεδομένων του FAO για το 2016, η Ασία αποτελεί οδηγό της παγκόσμιας παραγωγής μανιταριών και τρούφας, και ακολουθούν η Ευρώπη και η Αμερική, (Γράφημα 1). Η πορεία της παγκόσμιας παραγωγής μανιταριών από το 2000 μέχρι το 2016 εκφρασμένη σε εκατομμύρια μετρικούς τόνους παρουσιάζεται στο Γράφημα 2, ενώ το εκτιμώμενο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής βρώσιμων μανιταριών κατά γένος το έτος 2010 απεικονίζεται στο Γράφημα 3.



Γράφημα 1: Παγκόσμια παραγωγή μανιταριών και τρούφας για το 2016 (FAOSTAT 2018)



Γράφημα 2: Η παγκόσμια παραγωγή μανιταριών και τρούφας από το 2000 μέχρι το 2016 (FAOSTAT 2018)



Γράφημα 3: Το εκτιμώμενο ποσοστό της παγκόσμιας παραγωγής βρώσιμων μανιταριών κατά γένος το 2010 (ICMBMP8- 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 2014)

Τα κύρια γένη βρώσιμων μανιταριών που παράγονται παγκοσμίως είναι τα *Agaricus* (30%), *Pleurotus* (27%), *Lentinula* –Shiitake (17%) καθώς και τα γένη *Flammulina* (5%) και *Auricularia* (6%) (ICMBMP8 2014). Τα μανιτάρια αποτελούν πλέον ένα από τα πιο δημοφιλή “λαχανικά”, συνιστώντας αναπόσπαστο κομμάτι της ανθρώπινης διατροφής. Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί σημαντικά η κατανάλωση μιας μεγάλης ποικιλίας εδώδιμων ειδών μανιταριών. Τα τρόφιμα αυτά χαρακτηρίζονται από υψηλή

διατροφική αξία αφού έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, βιταμίνες Β, C, β-καροτένιο, φαινόλες και μεταλλικά στοιχεία (Sanmee *et al.* 2003, Agrahar-Murugkar and Subbulakshmi 2005). Το γένος *Pleurotus* που περιλαμβάνει περίπου 40 διαφορετικά είδη που συχνά αναφέρονται ως οστρεωδηδήμανιτάρια (“oyster mushrooms”) αποτελούν από τα πιο εμπορικά βρώσιμα μανιτάρια παγκοσμίως. Το *Pleurotus ostreatus* είναι το πιο σημαντικό είδος της ομάδας αυτής. Η ευρεία κατανάλωση του απορρέει μέσα από την ευκολία της καλλιέργειας του, την γεύση του, την θρεπτική του αξία και το πλήθος φαρμακευτικών ιδιοτήτων που προσφέρει (Rajapakse *et al.* 2007, Deepalakshmi and Mirunalini 2014).

1.8.2 Ταξινόμική κατάταξη και μορφολογικά στοιχεία

Η πρώτη περιγραφή του γένους *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. πραγματοποιήθηκε το 1821 από τον Elias Magnus Fries ως *Agaricus*, φυλή *Pleurotus*, ενώ η αναγνώριση του γένους έγινε το 1971 από τον Kummer. Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* καλλιεργήθηκαν για πρώτη φορά στην Γερμανία κατά την διάρκεια του Πρώτου Παγκοσμίου Πολέμου σύμφωνα με την τον **Kaufer (Kaufer 1936)**.

Η ταξινόμική κατάταξη του είδους *P. ostreatus* είναι η εξής (Mycobank):

- Βασίλειο: Fungi (Μύκητες)
- Φύλο: Basidiomycota (Βασιδιομύκητες)
- Υποφύλο: Agaricomycotina
- Κλάση: Agaricomycetes
- Υποκλάση: Agaricomycetidae
- Τάξη: Agaricales
- Οικογένεια: Pleurotaceae
- Γένος: *Pleurotus*
- Είδος: *Pleurotus ostreatus*

Η κοινή αγγλική ονομασία που έχει δοθεί στα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* ως “oyster mushrooms” έχει να κάνει με το χαρακτηριστικό σχήμα του είδους *P. ostreatus* που μοιάζει με αυτή των στρειδιών (Zervakis and Balis 1996, Hassen *et al.* 2011), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



Εικόνα 1: Μανιτάρια του είδους *P. ostreatus*

Το είδος *P. ostreatus* συνιστά ένα από τα τυπικά είδη του γένους *Pleurotus* και χαρακτηρίζεται από παγκόσμια βιοκατανομή. Η καλλιέργεια του λαμβάνει χώρα κυρίως στις εύκρατες ζώνες. Ο σχηματισμός καρποφοριών πραγματοποιείται σε σχετικά χαμηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με άλλα είδη *Pleurotus*. Η σάρκα του μανιταριού είναι λευκού χρώματος και το πάχος της ποικίλλει. Ο πύλος του έχει μέγεθος 3-12 cm, ενώ μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 25 cm, είναι επίπεδος έως ελαφρά κυρτός, λείος με λεία έως ελαφρά συνεστραμμένα προς τα πάνω χείλη και το χρώμα του ποικίλει από ανοιχτό μπλε έως καστανό ή κυανότεφο έως τεφρό. Ο στύπος απουσιάζει, ενώ όταν υφίσταται φτάνει τα 0,5-2 cm, είναι οριζόντιος έως έκκεντρος, κυλινδρικός με πλευρικό προσάρτημα για προσκόλληση πάνω στο ξύλο. Το χρώμα του είναι λευκό έως κρεμώδες, ανοιχτό τεφρό έως έντονα τεφρό. Τα ελάσματα του μανιταριού είναι λευκά έως κρεμώδη και φτάνουν μέχρι το στύπο (όταν υπάρχει). Το μυκήλιο είναι λευκό, βαμβακώδες με πληθώρα εναέριων υφών. Το ίχνος το σπορίων είναι λευκό έως λιλά-γκρι και εμφανίζεται καλύτερα σε σκοτεινές επιφάνειες (Zervakis and Balis 1991, 1996, Menolli *et al.* 2010, Hassen *et al.* 2011).

1.8.3 Διατροφική αξία

Τα μανιτάρια χαρακτηρίζονται από υψηλή διατροφική αξία, αφού αποτελούν σημαντική πηγή πρωτεϊνών, βασικών αμινοξέων, ινών, ενώ παρουσιάζουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος. Τα εδώδιμα μανιτάρια περιέχουν επίσης μια σημαντική περιεκτικότητα σε βιταμίνες (B1, B2, B12, C και D) (Mattila *et al.* 2001, Heleno *et al.* 2010). Γενικά, αποτελούνται από 57% υδατάνθρακες, 25% πρωτεΐνη, 5.7% λίπος και 12.5 % τέφρα (Kalac 2009). Το συνολικό λιπιδιακό περιεχόμενο των μανιταριών

είναι χαμηλό και παρουσιάζει υψηλό ποσοστό σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που κυμαίνεται μεταξύ 72 έως 85% (Kalac 2012).

Τα μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* συνιστούν πλούσια πηγή μακροθρεπτικών συστατικών (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, διαιτητικές ίνες, μεταλλικά στοιχεία και βιταμίνες), ενώ περιεκτικότητά τους σε λίπος είναι χαμηλή (Herndndez *et al.* 2003, Kalmis *et al.* 2008). Επίσης, τα φρέσκα μανιτάρια του είδους αυτού παρουσιάζουν υψηλό υδατικό περιεχόμενο (85-95%) (Khan 2010). Οι κύριοι υδατάνθρακες που απαντώνται στα μανιτάρια *P. ostreatus* αντιπροσωπεύονται από πολυσακχαρίτες όπως το γλυκογόνο, από μη πέψιμες διαιτητικές ίνες όπως την χιτίνη, την κυτταρίνη και τις α- και β- γλυκάνες (πλευρίνες) (Mazni *et al.* 2001, Hossain *et al.* 2007, Synytsya *et al.* 2008). Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο των μανιταριών αυτών ποικίλει ανάλογα με το στέλεχος και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μέσου καλλιέργειας (Akyuz and Kirbag 2010). Ορισμένα από τα μέλη του γένους *Pleurotus* περιέχουν πλήρεις πρωτεΐνες υψηλής ποιότητας με πολύ καλή κατανομή σε απαραίτητα αμινοξέα (Wang *et al.* 2001). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η περιεκτικότητα των μανιταριών αυτών σε λίπος είναι χαμηλή. Το ελαϊκό οξύ (μονοακόρεστο) και το λινολεϊκό οξύ (πολυακόρεστο) είναι τα κυριότερα λιπαρά οξέα που εντοπίζονται στο είδος *P. ostreatus* (Hossain *et al.* 2007). Από άποψη βιταμινών, το είδος *P. ostreatus* χαρακτηρίζεται από υψηλό περιεχόμενο σε φολικό οξύ, βιταμίνη B1 και B3 και λιγότερο σε B12 σε σχέση με άλλα είδη μανιταριών (Deepalakshmi and Mirunalini 2014). Τέλος, όσον αφορά στο επίπεδο των μεταλλικών στοιχείων, αυτό εξαρτάται από το είδος και την ηλικία του μανιταριού, τη διάμετρο του πύλου και το υπόστρωμα (Demirbas 2001). Ο πύλος του *P. ostreatus* έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε χαλκό, σίδηρο, κάλιο, μαγνήσιο, φώσφορο και ψευδάργυρο, ενώ ο στύπος εμφανίζει μεγάλη περιεκτικότητα σε νάτριο (Vetter *et al.* 1994, Watanable *et al.* 1994).

Η διακύμανση των θρεπτικών συστατικών σε σχέση με τα διαφορετικά μέρη του σώματος των μανιταριών του γένους *Pleurotus* έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών μελετών. Έχει βρεθεί ότι ο πύλος και τα ελάσματα παρουσιάζουν υψηλότερη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες (40-60%), λιπίδια (30-60%) και τέφρα (5-10%) σε σχέση με τον στύπο. Ο στύπος από την πλευρά του παρουσιάζει υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (10-15%) και διαιτητικές ίνες (40-50%) (Watanable *et al.* 1994, Justo *et al.* 1999, Shin *et al.* 2007, Alam *et al.* 2008, Dundar *et al.* 2008).

Η χαρακτηριστική γεύση των μανιταριών που αναφέρεται ως “ουμάμι” οφείλεται στην παρουσία των ελεύθερων αμινοξέων, του ασπαρτικού, του γλουταμινικού και των 5'-νουκλεοτιδίων (5'-μονοφωσφορική ινοσίνη και γουανοσίνη) (Yamaguchi 1991, Li *et al.* 2014). Το άρωμα των μανιταριών εξαρτάται από την περιεκτικότητά τους σε αμινοξέα, νουκλεοτιδία, μεταλλικά στοιχεία (N, P, K, S, Fe και Zn) και την αυτοξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Bernas *et al.* 2006). Η 1-οκτυνολ-3-όλη είναι η κυρίαρχη αρωματική ένωση στα μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* (Beltran-Garacia *et al.* 1997).

Τα μανιτάρια του είδους *P. ostreatus* περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό (περίπου 100) βιολογικά ενεργών ουσιών (β-γλυκάνες, τοκοφερόλες, ασκοβικό οξύ, β-καροτένιο κ.α.) με θεραπευτικές ιδιότητες (Wang *et al.* 2001, Ferreira *et al.* 2009). Οι βιοενεργές αυτές ουσίες έχει παρατηρηθεί ότι λειτουργούν ως αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιαρθριτικές, ενώ επίσης βοηθούν στην μείωση της χοληστερίνης και του διαβήτη (Deeralakshmi and Mirunalini 2014).

Η χημική σύσταση του είδους *P.ostreatus* (Πίνακας 4) είναι μεταβλητή τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά και εξαρτάται από την προέλευση του στελέχους, από την διαδικασία της εκχύλισης και τις συνθήκες της καλλιέργειας (Wang *et al.* 2001). Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τον προσδιορισμό της χημικής σύνθεσης του *P. ostreatus*, με τις περισσότερες από αυτές τις μελέτες να αφορούν στον προσδιορισμό της διατροφικής αξίας αποξηραμένων μανιτάρων (Khan 2010).

Πίνακας 4: Χημική σύσταση νωπών και αποξηραμένων μανιταριών του είδους *P. ostreatus*

Χημική σύσταση	Νωπό μανιτάρι (g/100g NB)	Βιβλιογραφία
Υγρασία (%)	86	Alam <i>et al.</i> 2008
Πρωτεΐνες	3-3.8	
Λιπίδια	0.63-0.73	
Ίνες	3.2-3.6	
Τέφρα	1.08-1.28	
Υδατάνθρακες	5.0-5.4	
Χημική σύσταση	Αποξηραμένο μανιτάρι	
	(g/100g ΞΒ)	
Υγρασία (%)	85-87	Khan 2010
Πρωτεΐνες	17-42	
Λιπίδια	0.5-5	
Ίνες	24-31	
Μεταλλικά στοιχεία	4-10	
Υδατάνθρακες	37-48	
Βιταμίνες	Αποξηραμένο μανιτάρι	
	(mg/100g ΞΒ)	
B1-Θειαμίνη	1.9-2.0	Wang and Ng 2000 Mattila <i>et al.</i> 2006
B2-Ριβοφλαβίνη	1.8-5.1	
B3-Νιασίνη	30-65	
B9-Φολικό οξύ	0.3-0.7	
C-Ασκορβικό οξύ	28-35	
Αμινοξέα	Αποξηραμένο μανιτάρι	
	(g/100g ΞΒ)	
Ασπαρτικό οξύ	31.4	Wang <i>et al.</i> 2001
Θρεονίνη*	17.1	
Σερίνη	18.1	
Γλουταμινικό οξύ	53.3	
Γλυκίνη	17.1	
Αλανίνη	28.6	
Βαλίνη*	21.0	
Κυστεΐνη	3.8	
Μεθειονίνη*	3.8	
Ισολευκίνη*	16.2	
Λευκίνη	25.7	

Τυροσίνη	13.3	
Φαινυλαλανίνη*	15.2	
Λυσίνη*	22.9	
Ιστιδίνη	12.4	
Αργινίνη	27.6	
Τρυπτοφάνη*	4.8	
Προλίνη	15.2	
Συνολική περιεκτικότητα βασικών αμινοξέων	126.7	
Συνολική περιεκτικότητα σε αμινοξέα	347.5	
*Απαραίτητα αμινοξέα		
Μεταλλικά στοιχεία	Αποξηραμένο μανιτάρι (mg/100g ΞΒ)	
Κάλιο (K)	1400	
Ασβέστιο (Ca)	2-36	Chihara <i>et al.</i> 1992
Νάτριο (Na)	3	Khan <i>et al.</i> 2008
Μαγνήσιο (Mg)	9-17	
Ψευδάργυρος (Zn)	3-27	
Σίδηρος (Fe)	55-65	
Μαγγάνιο (Mn)	0.5-3.0	
Χαλκός (Cu)	0.65	
Σελήνιο (Se)	0.011	

1.9 Γρήγορες και μη παρεμβατικές μέθοδοι ανάλυσης της ποιότητας των νωπών φρούτων και λαχανικών

Η έρευνα στον τομέα των προϊόντων διατροφής έχει πρόσφατα επικεντρωθεί στην βελτίωση της αξιολόγησης της ποιότητας, μέσω της ανάπτυξης μη παρεμβατικών τεχνολογιών που επιτρέπουν τη συλλογή (χρήσιμων πληροφοριών) και την αξιολόγηση ποιοτικών παραμέτρων σε πραγματικό χρόνο (Adebayo *et al.* 2017). Η ποιότητα των νωπών φρούτων και λαχανικών πρέπει να διατηρείται κατά το στάδιο των καλλιεργητικών χειρισμών, της επεξεργασίας και της συντήρησης. Η παρακολούθηση και η εκτίμηση της ποιότητας σε όλα τα στάδια παραγωγής έχει επιτευχθεί μέσα από την ανάπτυξη και την εφαρμογή ταχέων και μη παρεμβατικών μεθόδων. Αυτές οι μη παρεμβατικές μέθοδοι περιλαμβάνουν τεχνικές φασματοσκοπίας (streptoscopy) και απεικόνισης (imaging) (Giovenzana *et al.* 2015). Η ανάπτυξη των μεθόδων αυτών έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία 20 χρόνια (Guidetti *et al.* 2012). Παραδείγματα τεχνικών μη επεμβατικής αξιολόγησης της ποιότητας σε νωπά φρούτα και λαχανικά αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Φασματοσκοπικές και απεικονιστικές μέθοδοι αξιολόγησης ποιοτικών παραμέτρων σε νωπά φυτικά προϊόντα (Mahaajan *et al.* 2017)

Μέθοδοι/Τεχνικές	Ποιοτικοί παράμετροι
	Περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά
	Περιεκτικότητα σε υγρασία

Απεικόνιση με την χρήση οπίσθιου φωτισμού λέιζερ (Laser light backscattering imaging, LLBI)	Σκληρότητα Έλεγχος της πρόωρης αποσύνθεσης Τραυματισμοί λόγω ψύξης
Υπερφασματική απεικόνιση (Hyperspectral imaging, HSI)	Περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά Σταθερότητα Ανίχνευση μυκητιακής σήψης (<i>Penicillium digitatum</i>) Δράση της πολυφαινολικής οξειδάσης (PPO)
Μαγνητική τομογραφία (Magnetic resonance imaging, MRI)	Το προφίλ της υψής Περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά οξύτητα, ξηρά ουσία και σταθερότητα Ανάπτυξη πυρήνων νερού Προσδιορισμός του σταδίου ωριμότητας
Φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρου (Near-infrared streptoscopy, NIR)	Περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά Οξύτητα, οργανικά οξέα, συνολικό περιεχόμενο σε πολυφαινολικές ενώσεις Σταθερότητα Περιεκτικότητα σε βιταμίνη C
Αξονική τομογραφία (X-ray computed tomography, X-ray CT)	Τραγανότητα και στάδιο ωριμότητας φρούτων
Φασματοσκοπία Raman (Raman streptoscopy)	Περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά Σύνθεση αιθέριων ελαίων Εσωτερική ποιότητα (παραγωγή σκοτεινών χρωστικών) Περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες και καροτενοειδή

1.9.1 Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Η φασματοσκοπία στην περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (Near-Infrared region streptoscopy-NIR) ή/και του ορατού (Visible region streptoscopy-VIS) χρησιμοποιούνται για την απόκτηση πληροφοριών σχετικά με την φύση των λειτουργικών ομάδων (δεσμών) που υφίστανται σε ένα μόριο, μέσω της αλληλεπίδρασης του φωτός και της επιφανειακής δομής ενός δείγματος. Το εύρος των φασματικών περιοχών κυμαίνεται για την NIR από 780 έως 2500 nm και για την VIS/NIR από 400 έως 780 nm. Οι μέθοδοι NIR και VIS/NIR μαζί με την χρήση κατάλληλων αλγορίθμων για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, συνιστούν εξαιρετικά εργαλεία ποσοτική ανάλυσης (Cabeddu *et al.* 2002). Επίσης, η φασματοσκοπία NIR επιτρέπει την ταχεία και ταυτόχρονη μέτρηση πολλών

ποιοτικών χαρακτηριστικών, ενώ η προετοιμασία του υπό εξέταση δείγματος είναι μηδαμινή (Nicolai *et al.* 2007, Sanchez *et al.* 2012). Τα βασικά μειονεκτήματα για την εφαρμογή της μεθόδου αυτής είναι η μεγάλη διακύμανση των χαρακτηριστικών σκέδασης/αντανάκλασης των φυτικών ιστών (Cabeddu *et al.* 2002) και η δυνατότητα ανίχνευσης μόνο ενός μικρού μέρους της φυτικής επιφάνειας του νωπού προϊόντος. Συνεπώς, τα φασματικά δεδομένα που λαμβάνονται σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι αντιπροσωπευτικά για ολόκληρο το φρούτο ή το λαχανικό (Liu *et al.* 2014).

Τα κύρια συστατικά των τροφίμων (πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη και νερό) σχετίζονται σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό με τα φάσματα στην περιοχή του υπερύθρου, τόσο στην περιοχή του εγγύς (NIR) όσο και του μέσου (Mid infrared region-MIR) υπερύθρου φάσματος. Πιο συγκεκριμένα, στην περιοχή NIR τα βασικά φαινόμενα καταγραφής είναι οι δονήσεις από τους δεσμούς O-H, C-H και N-H (Williams and Norris 2001), ενώ οι φασματικές μετρήσεις στην περιοχή MIR (2500 έως 50000 nm) παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις βασικές συχνότητες των χημικών δεσμών στις λειτουργικές ομάδες C-C, C-H, O-H, CO και N-H (Colthup *et al.* 1990, Coates 2000).

1.9.2 Απεικονιστικές μέθοδοι

Τις τελευταίες δεκαετίες, η βιομηχανία γεωργικών προϊόντων έχει δείξει έντονο ενδιαφέρον για τις απεικονιστικές μεθόδους ανάλυσης. Οι μέθοδοι αυτές είναι γρήγορες, μη παρεμβατικές και επιτρέπουν την παρακολούθηση και την εκτίμηση των ποιοτικών παραμέτρων σε όλα τα στάδια παραγωγής σε πραγματικό χρόνο, συμβάλλοντας έτσι στην αυτοματοποίηση των διαδικασιών. Επίσης, παρέχουν αντικειμενικά δεδομένα που μπορούν να καταγραφούν σε ένα υπολογιστικό σύστημα και να υποβληθούν σε στατιστική ανάλυση. Η πολυφασματική (Multispectral imaging-MSI) και η υπερφασματική απεικόνιση (Hyperspectral imaging-HSI) είναι οι κύριες οπτικές μέθοδοι που συνδυάζουν την τεχνική της φασματοσκοπίας και την τεχνολογία ανάλυσης εικόνας (Liu *et al.* 2014) και έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της ποιότητας των νωπών φρούτων και λαχανικών (Giovaneza *et al.* 2015). Η ειδοποιός διάφορα των δύο τεχνικών έγκειται στο γεγονός ότι στην HSI επιτυγχάνεται απόκτηση μιας συνεχούς φασματικής περιοχής, ενώ στην MSI τα φασματικά δεδομένα λαμβάνονται σε διακριτές ζώνες (Mehl *et al.* 2004). Το κύριο πλεονέκτημα της MSI ανάλυσης έχει να κάνει με το χαμηλό κόστος εφαρμογής της, γεγονός που επιτρέπει την χρησιμοποίησή της σε πιο πρακτικές εφαρμογές (Liu *et al.* 2014).

Οι απεικονιστικές μέθοδοι στηρίζονται στην ανάκλαση του φωτός από την επιφάνεια του υπό εξέταση δείγματος, παρέχοντας έτσι πληροφορίες σχετικές με τα χημικά συστατικά που υφίστανται πάνω στη επιφάνεια του τροφίμου. Οι κλασικές φασματοσκοπικές μέθοδοι (π.χ. NIR, VIS/NIR) μπορούν να παρέχουν χρήσιμα δεδομένα σχετικά με τη φύση των χημικών στοιχείων του αντικείμενου που αναλύθηκε, χωρίς όμως να μπορούν να προσδιορίσουν την ακριβή θέση των στοιχείων αυτών. Η ανάπτυξη και η εφαρμογή υβριδικών τεχνολογιών που συνδυάζουν φασματοσκοπικές τεχνικές και τεχνικές ανάλυσης εικόνας (π.χ. MSI,

HSI) επιτρέπουν την ταυτόχρονη λήψη χωρικών και φασματικών δεδομένων για κάθε ένα εικονοστοιχείο (pixel) του υπό εξέταση δείγματος (μέσα από την λήψη φωτογραφιών), δίνοντας έτσι την ακριβή θέση κάθε χημικού συστατικού πάνω στην σαρωμένη εικόνα (Giovenzana *et al.* 2015).

Ένα χρήσιμο όργανο που στηρίζεται στην τεχνολογία της πολυφασματικής ανάλυσης και δίνει την δυνατότητα αυτοματοποίησης της επεξεργασίας και απόκτησης χρήσιμων πληροφοριών είναι το σύστημα VideometerLab (Lu 2004). Το όργανο αυτό αποτελεί ένα πολύ κοινό εργαλείο για την παρακολούθηση και την εκτίμηση πολλών ιδιοτήτων σε διαφόρους τύπους τροφίμων (Dissing *et al.* 2011, Andresen *et al.* 2013). Τα τεχνικά χαρακτηριστικά καθώς και ο τρόπος λειτουργίας του VideoMeterLab θα περιγραφούν αναλυτικά στο πειραματικό μέρος της παρούσας μελέτης.

1.9.3 Χημειομετρία

Η χημειομετρία (chemometrics) αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι τόσο των φασματοσκοπικών όσο και των απεικονιστικών μεθόδων. Είναι απαραίτητη για την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών που απορρέουν μέσα από τα φασματικά δεδομένα, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει την απόρριψη των μη χρήσιμων πληροφοριών και του φασματικού θορύβου. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές της χημειομετρίας είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principle Component Analysis-PCA) για μία αρχική συσχέτιση των δεδομένων και η γραμμική παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares regression-PLS) για τη δημιουργία μοντέλων πρόβλεψης (ποσοτική ανάλυση) των εξεταζόμενων παραμέτρων ενδιαφέροντος (Sjostrom and Eriksson 2001, Naes *et al.* 2002, Cen and He 2007, Nicolai *et al.* 2007).

1.10 Προβλεπτική μικροβιολογία

Η προβλεπτική μικροβιολογία έχει ως σκοπό την εκτίμηση της μικροβιακής ανάπτυξης μέσα από την χρήση μαθηματικών μοντέλων κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Αυτά τα μαθηματικά μοντέλα μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες όπως πρωτογενή, δευτερογενή και τριτογενή (Whiting 1995).

Τα πρωτογενή μοντέλα περιγράφουν τα δεδομένα της μικροβιακής ανάπτυξης ως συνάρτηση του χρόνου κάτω από μία σταθερή περιβαλλοντική κατάσταση. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα πρωτογενή μαθηματικά μοντέλα είναι τα σιγμοειδή και σε αυτά συμπεριλαμβάνονται το μοντέλο όπως του Baranyi, το τροποποιημένου Gompertz και τα λογιστικά μοντέλα. Τα δευτερογενή μοντέλα περιγράφουν τις επιδράσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως της θερμοκρασίας, του pH και της ενεργότητας ύδατος (a_w) πάνω στις παραμέτρους που εξάγονται από τα πρωτογενή μοντέλα, συμπεριλαμβανομένου του μέγιστου ειδικού ρυθμού της αύξησης (maximum specific growth rate, μ_{max}) και την διάρκεια της φάσης υστέρησης (lag phase duration, λ). Το μοντέλο του Ratkowsky είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο δευτερογενές μοντέλο για τον προσδιορισμό της σχέσης θερμοκρασίας και κινητικών παραμέτρων μικροβιακής αύξησης (μ_{max} και λ) (Ratkowsky *et al.* 1982). Τέλος, τα τριτογενή μοντέλα συνιστούν την συνδυασμένη

χρήση πρωτογενών και δευτερογενών μοντέλων μέσω της χρησιμοποίησης ειδικού λογισμικού για να αξιολογήσουν την μικροβιακή συμπεριφορά κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Wang *et al.* 2013, Whiting, 1995).

Τα μοντέλα πρόβλεψης θεωρούνται σημαντικά εργαλεία για τον προσδιορισμό της διάρκειας ζωής και της ασφάλειας των τροφίμων. Η χρήση τους απορρέει από το γεγονός ότι αποτελούν εξαιρετικά γρήγορα, αποτελεσματικά και οικονομικά μέσα για την αξιολόγηση του δυναμικού ή της πρόβλεψης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, χωρίς να απαιτούνται χρονοβόρες και δαπανηρές τεχνικές ανάλυσης καθώς και εξειδικευμένα άτομα. Οι παραδοσιακές μικροβιολογικές τεχνικές δίνουν πληροφορίες μόνο για τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διεξήχθη η ανάλυση και είναι πρακτικά αδύνατο να καθορίσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών κάτω από μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Τέλος, τα μοντέλα πρόβλεψης παρέχουν την δυνατότητα εκτίμησης της ανάπτυξης των μικροοργανισμών στα τρόφιμα κατά την διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης σε πραγματικό χρόνο (Bo vill *et al.* 2001).

1.11 Μοριακές μέθοδοι ταυτοποίησης μικροοργανισμών

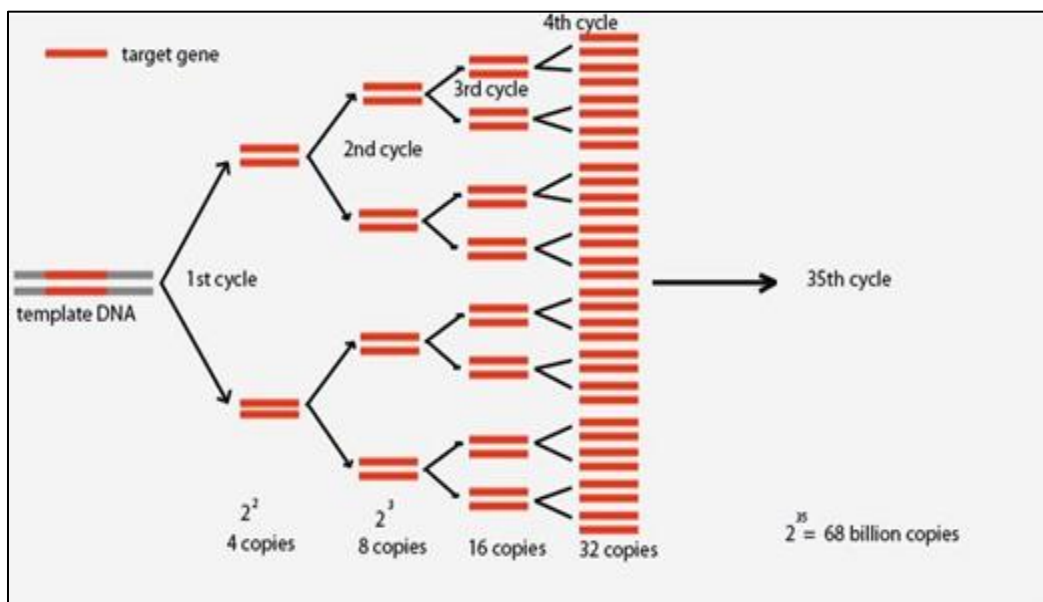
Η δυνατότητα της απευθείας αλληλούχισης, αρχικά του ριβοσωμικού RNA και ενισχυμένων τμημάτων DNA μετά από την ανακάλυψη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR), έδωσε τεράστια ώθηση στις μοριακές φυλογενετικές μελέτες. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (Mullis and Falouna 1987) αποτέλεσε μια επανάσταση στον κλάδο της μοριακής συστηματικής, αλλά και της μοριακής βιολογίας γενικότερα. Η συγκεκριμένη τεχνική επιτρέπει την *in vitro* ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να πολλαπλασιαστούν τμήματα DNA που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στα υπό μελέτη δείγματα, χωρίς απαραίτητα την μεσολάβηση της χρονοβόρας διαδικασίας της κλωνοποίησης τους σε βακτηριακά κύτταρα (Bruns *et al.* 1991).

Η βασική τεχνική της PCR αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδος που παρέχει την δυνατότητα της γρηγορότερης ταυτοποίησης μικροοργανισμών σε σχέση με τις κλασικές μεθόδους καλλιέργειας (Postoleec *et al.* 2011). Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει την χρήση ειδικών εκκινητών (ολιγονουκλεοτιδίων), που έχουν σχεδιαστεί να στοχεύουν εξειδικευμένα σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος του μικροοργανισμού που μας ενδιαφέρει να ταυτοποιηθεί κατευθείαν από ένα δείγμα (τροφίμου, νερού κ.α.) (Josefsen *et al.* 2004, Abulreesh *et al.* 2006). Η συμβατική PCR καθώς και οι εφαρμογές της (όπως η RT-PCR, nested PCR, RAPD, RFLP, AFLP κ.α.), η ηλεκτοφόρηση σε πηκτική παλλόμενου πεδίου (PEGE) και η τυποποίηση μέσω αλληλούχισης έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση και την ταυτοποίηση παθογόνων και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που απαντώνται στα τρόφιμα (Scheu *et al.* 1998, Adzitey *et al.* 2013).

Τα βασικά βήματα για τον πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA με την χρήση της μεθόδου της PCR είναι τα εξής (Madigan and Martinko 2006):

1. Δύο εκκινήτες μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων με αλληλουχίες συμπληρωματικές των άκρων του DNA-στόχου προστίθενται σε μεγάλη ποσότητα στο DNA που έχει αποδιαταχθεί με θέρμανση (μετατροπής της δίκλωνης μήτρας του DNA σε μονόκλινα τμήματα).
2. Όταν η θερμοκρασία του μείγματος (DNA και εκκινήτων) πέσει, η περίσσεια των εκκινήτων που μπορεί να υβριδιστεί με το DNA-στόχο, εξασφαλίζει ότι η επαναδιάταξη των περισσότερων αλυσίδων του στόχου θα γίνει σε κάποιον εκκινήτη και όχι μεταξύ τους.
3. Επιμήκυνση των εκκινήτων με την χρήση της DNA πολυμεράσης.
4. Μετά το πέρας κατάλληλης χρονικής περιόδου επώασης, το μείγμα θερμαίνεται πάλι, με σκοπό την αποδιάταξη των δίκλωνων αλυσίδων DNA που έχουν δημιουργηθεί. Κατόπιν ξανά ψύχεται, για να δοθεί η δυνατότητα στους εκκινήτες να υβριδίσουν με τις νέες συμπληρωματικές περιοχές των μονόκλωνων τμημάτων DNA που συντέθηκαν. Η όλη διαδικασία επαναλαμβάνεται συνέχεια.

Επομένως, κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια: (α) Την αποδιάταξη με θέρμανση του δίκλωνου DNA-στόχου (denaturation), (β) Την μείωση της θερμοκρασίας για να δοθεί η δυνατότητα στους εκκινήτες να υβριδίσουν με το DNA-στόχο (annealing) (γ) Την επιμήκυνση των εκκινήτων με την χρήση της DNA πολυμεράσης (extension).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της Αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Randomly amplified polymorphism DNA based PCR (RAPD-PCR)

Η μέθοδος των τυχαίων ενισχυόμενων αλληλουχιών πολυμορφικού DNA (Randomly Amplified Polymorphism DNA-RAPD) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Williams *et al.* (1990). Στην ουσία πρόκειται για έναν μοριακό δείκτη που μαζί με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) συμβάλλουν στο διαφορικό

πολλαπλασιασμό τυχαίων αλληλουχιών/τμημάτων DNA από το υπό μελέτη δείγμα με την χρήση ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών.

Η μέθοδος της RAPD-PCR περιλαμβάνει τα στάδια των αντιδράσεων της PCR αλλά χρησιμοποιεί απλούς μικρού μεγέθους εκκινητές (8-12 νουκλεοτίδια), οι οποίοι ενισχύουν τυχαίες αλληλουχίες DNA που υφίστανται στο βακτηριακό γονιδίωμα, δημιουργώντας έτσι επαναλαμβανόμενα μοτίβα ηλεκτροφόρησης, τα οποία χρησιμοποιούνται για γονοτυπική διαφοροποίηση. Μία διαφορά της τεχνικής αυτής από την συμβατική PCR είναι ότι χρησιμοποιεί δύο διαφορετικές θερμοκρασίες υβριδοποίησης (annealing) (Tazumi *et al.* 2009, Abou-Dobara *et al.* 2010). Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία αυτή οδηγεί στην ενίσχυση μιας ή περισσότερων αλληλουχιών DNA συμβάλλοντας έτσι στην δημιουργία ενός συνόλου γενετικών αποτυπωμάτων διαφορετικού μεγέθους που είναι χαρακτηριστικά για το κάθε στέλεχος μικροοργανισμού (Farber 1996, Trindade *et al.* 2003).

Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι ότι είναι σχετικά φθηνή, γρήγορη και εύκολη στην εφαρμογή (Shi *et al.* 2010, Rezk *et al.* 2012). Ωστόσο, το βασικό της μειονέκτημα είναι η χαμηλή διακριτική της ικανότητα, η οποία προσεγγίζει το 80% (Wassenaar and Newell 2000) και μπορεί να βελτιωθεί μέσα από την χρήση δύο ή περισσότερων εκκινητών (Triandade *et al.* 2003). Η RAPD-PCR είναι η πλέον αξιόπιστη μέθοδος για τον μοριακό χαρακτηρισμό των βακτηρίων (Tang and Stratton 2006, Thangaraj *et al.* 2013).

1.12 Σκοπός της μελέτης

Η χημική σύσταση των φρούτων και των λαχανικών τα καθίστα μια άριστη οικολογική θέση για την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροβιακών ομάδων. Η παρούσα μελέτη είχε ως βασικό σκοπό την παρακολούθηση, τον χαρακτηρισμό και την εκτίμηση της μικροβιακής αλλοίωσης προϊόντων φυτικής προέλευσης, κάνοντας χρήση κλασικών και ταχέων μεθόδων ανάλυσης καθώς και κατάλληλων μοριακών τεχνικών. Τα υπό μελέτη προϊόντα φυτικής προέλευσης ήταν δείγματα φρέσκου ανανά και νωπών μανιταριών του είδους *P. ostreatus*. Η μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα και προετοιμασία

Τα δείγματα του ανανά (*A. comosus*) που εξετάστηκαν ήταν έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες φρεσκοκομμένου (σε φέτες) ανανά, συσκευασμένου σε αέρα εντός πλαστικών κυπέλλων. Τα δείγματα ανανά παρελήφθησαν απευθείας από βιομηχανία επεξεργασίας νωπών φυτικών προϊόντων στη περιοχή της Αττικής εντός της ημέρας παραγωγής τους, και στα πλαίσια των πειραμάτων της παρούσας διατριβής αξιολογήθηκαν δείγματα δύο ανεξάρτητων παρτίδων του προϊόντος (διαφορετικές ημερομηνίες παραγωγής).

Τα δείγματα μανιταριού (*P. ostreatus*) τα οποία εξετάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης στάλθηκαν από μονάδα παραγωγής στην περιοχή της Ευβοίας υπό την μορφή νωπού προϊόντος. Τα νωπά μανιτάρια τοποθετήθηκαν σε δίσκους διογκωμένου πολυστυρενίου (styrofoam trays) και καλύφθηκαν με μεμβράνη τροφίμων στην οποία δημιουργήθηκαν οπές για τον σωστό αερισμό του προϊόντος. Συνολικά, έγινε παραλαβή και χρήση στις πειραματικές δοκιμές συντήρησης/αλλοίωσης τριών ανεξάρτητων παρτίδων νωπών μανιταριών. Κατά την παραλαβή της δεύτερης παρτίδας μανιταριών, στάλθηκε για ανάλυση μια ανεξάρτητη παρτίδα προσβεβλημένων μανιταριών *P. ostreatus*, πιθανώς από βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, με στόχο τον χαρακτηρισμό του αιτιολογικού παράγοντα της προσβολής.

2.2 Πειράματα συντήρησης ανανά και μανιταριών

2.2.1 Συνθήκες συντήρησης και δειγματοληψίες

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων ακολούθησε η αποθήκευση τους σε αερόβιες συνθήκες κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης. Πιο συγκεκριμένα, τα

δείγματα του ανανά αποθηκεύτηκαν τόσο σε ισόθερμες συνθήκες (4, 8 και 12 °C) όσο και σε περιοδικά μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (Dynamic (D), 8 h στους 4 °C, 8 h στους 8°C και και 8 h στους 12 °C) για ένα μέγιστο χρονικό διάστημα 11 ημερών. Ομοίως, τα δείγματα των μανιταριών αποθηκεύτηκαν σε τρεις διαφορετικές ισόθερμες συνθήκες (4, 10 και 16 °C) καθώς και σε ένα περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (12 h στους 7 °C και 12 h στους 13 °C) για ένα μέγιστο χρονικό διάστημα 12 ημερών.

Ανά τακτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων, ανάλογα με τη θερμοκρασία συντήρησης, διπλά δείγματα από κάθε προϊόν και για κάθε θερμοκρασία, λαμβάνονταν με στόχο την ανάλυση τους τόσο με μικροβιολογικές μεθόδους (δείγματα ανανά και μανιταριών) όσο και με την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (δείγματα ανανά). Οι δειγματοληψίες οι οποίες πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων ανανά και μανιταριών στις διαφορετικές θερμοκρασίες συνοψίζονται στους Πίνακες 6 και 7.

Πίνακας 6: Συχνότητα διενέργειας δειγματοληψιών κατά τη συντήρηση ανανά σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Θερμοκρασία συντήρησης (°C)	Συντήρηση (h)
Κοινά δείγματα για όλες τις θερμοκρασίες (time-zero)	0
4, 8, 12 και D	14
4, 8, 12 και D	24
4, 8, 12 και D	38
4, 8, 12 και D	48
4, 8, 12 και D	62
4, 8, 12 και D	72
4, 8, 12 και D	86
4, 8, 12 και D	96
4, 8, 12 και D	110
4, 8, 12 και D	134
4, 8 και D	158
4, 8 και D	182
4, 8 και D	206
4, 8 και D	230

Πίνακας 7: Συχνότητα διενέργειας δειγματοληψιών κατά τη συντήρηση μανιταριών σε διαφορετικές θερμοκρασίες

Θερμοκρασία συντήρησης (°C)	Συντήρηση (h)
Κοινά δείγματα για όλες τις θερμοκρασίες (time-zero)	0
10, 16 και D	14
10, 16 και D	24
4, 10, 16 και D	38
10, 16 και D	48
4, 10, 16 και D	62
10, 16 και D	72
4, 10, 16 και D	86

10, 16 και D	96
4, 10, 16 και D	110
10, 16 και D	120
4	134
4	158
4	182
4	206
4	230
4	254

2.2.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις

Για την πραγματοποίηση των μικροβιολογικών αναλύσεων, 25 g από κάθε δείγμα (μανιταριού και ανανά) λαμβάνονταν κάτω από ασηπτικές συνθήκες και τοποθετούνταν σε πλαστική σακούλα ομογενοποίησης (stomacher), στην οποία προσθέτονταν 225 ml του αραιωτικού μέσου Ringer (Lab M Limited, Lanchashire, UK). Η πλαστική σακούλα τοποθετούνταν στη συνέχεια στην συσκευή stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ομογενοποίηση του δείγματος σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 60 sec. Στη συνέχεια πραγματοποιούνταν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες με διάλυμα Ringer και επίστρωση (επιφανειακή επίστρωση ή ενσωμάτωση) επιλεγμένων αραιώσεων σε κατάλληλα στερεά θρεπτικά υποστρώματα, με στόχο την απαρίθμηση τόσο της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας όσο και επιλεγμένων μικροβιακών ομάδων. Η μικροβιακή απαρίθμηση λάμβανε χώρα μετά από επώαση των τρυβλίων σε κατάλληλη θερμοκρασία και το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα ανάλογα με το είδος του υποστρώματος.

Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν με βάση την κατηγορία των μικροοργανισμών που ανιχνεύουν καθώς και οι συνθήκες επώασης τους περιγράφονται ακολούθως:

1. Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (OMX): Χρησιμοποιήθηκε το μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Tryptic Glucose Yeast Agar (Plate Count Agar, Biolife, Italy). Ενοφθαλμίστηκε ποσότητα 0.1 ml από κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις του υπό μελέτη ομογενοποιημένου δείγματος με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 72 h.
2. Ζύμες-Μύκητες: Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Rose Bengal Chloramphenicol Agar Base (RBC, Lab M Limited) αφού έγινε προσθήκη του αντιβιοτικού της χλωραμφενικόλης (Chloramphenicol, Lab M Limited). Ενοφθαλμίστηκε ποσότητα 0.1 ml από κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις του υπό μελέτη ομογενοποιημένου δείγματος με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 3 έως 5 ημέρες.
3. Ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.): Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Pseudomonas Agar Base (CFC, Lab M Limited) αφού

έγινε προσθήκη του αντιβιοτικού Modified C.F.C. (Lab M Limited). Ενοφθαλμίστηκε ποσότητα 0.1 ml από κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις του υπό μελέτη ομογενοποιημένου δείγματος με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 25 °C για 48 h.

4. Βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae: Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Biolife). Ενοφθαλμίστηκε ποσότητα 1 ml από κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις του υπό μελέτη ομογενοποιημένου δείγματος με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε κενά τρυβλία και ακολούθησε η απόχυση του θρεπτικού υποστρώματος μέχρι επικάλυψης του εμβολίου, συνοδευόμενη από ήπια ανάδευση. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 24 h.
5. Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria-LAB): Χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα de Man Rogosa & Sharpe agar ISO Formulation (MRS, Biolife). Ενοφθαλμίστηκε ποσότητα 1 ml από την κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις του υπό μελέτη ομογενοποιημένου δείγματος με την τεχνική της ενσωμάτωσης σε τρυβλία και ακολούθησε η απόχυση του θρεπτικού υποστρώματος μέχρι επικάλυψης του εμβολίου, συνοδευόμενη από ήπια ανάδευση. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 72 h.

Με βάση την αναμενόμενη σχετική συνεισφορά της κάθε μικροβιακής ομάδας στην αλλοίωση (όπως αυτή στοιχειοθετείται από βιβλιογραφικά δεδομένα), στα δείγματα του ανανά τα κύρια θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα PCA και RBC, ενώ γινόταν εφαρμογή των υπόλοιπων υποστρωμάτων μόνο στην αρχή, στη μέση και στο τέλος της συντήρησης. Κατά αντιστοιχία, στα δείγματα του μανιταριού τα κύρια θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα PCA, CFC, RBC και VRBG, ενώ η εφαρμογή του υποστρώματος MRS γινόταν μόνο στην αρχή και στο τέλος της συντήρησης.

Μετά την επώαση των τρυβλίων στις κατάλληλες συνθήκες (θερμοκρασία και χρόνος) πραγματοποιήθηκε απαρίθμηση των αποικιών και έκφραση των αποτελεσμάτων σε log colony forming units/g δείγματος (log CFU/g).

Σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας και μετά την ολοκλήρωση της μικροβιολογικής ανάλυσης, πραγματοποιούνταν επίσης μέτρηση του pH του εκάστοτε δείγματος (δείγμα τροφίμου ομογενοποιημένου εντός αλατούχου διαλύματος Ringer) με τη χρήση ψηφιακού pHμέτρου (RL150, Russell pH, Cork, Ireland) με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metrohm AG, Herisau, Switzerland), μετά από κατάλληλη βαθμονόμηση του οργάνου σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στα δείγματα των μανιταριών, στις μικροβιακές αποικίες που αναπτύχθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα RBC και καταμετρήθηκαν ως ζύμες, πραγματοποιήθηκε χρώση Gram καθώς και δόκιμες καταλάσης και οξειδάσης (βιοχημικές δοκιμές) για μία αρχική ταξινόμηση/ταυτοποίηση των αποικιών που απομονώθηκαν.

2.2.3 Πολυφασματική ανάλυση (Multispectral imaging)

Η πολυφασματική ανάλυση εικόνων που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα του ανανά έγινε με την χρήση του οργάνου VideometerLab (Εικόνα 6). Το όργανο αυτό είναι εξαιρετικά εύχρηστο, ενσωματώνοντας πηγές φωτισμού, φωτογραφική κάμερα και την τεχνολογία των υπολογιστών μαζί με την προηγμένη ψηφιακή ανάλυση εικόνας καθώς και διαφορές στατιστικές προσεγγίσεις. Η τεχνολογία αυτή είναι εξαιρετικά χρήσιμη γιατί επιτρέπει τη λήψη ποσοτικών μετρήσεων των χημικών και των οπτικών ιδιοτήτων δειγμάτων ή επιφανειών (www.videometer.com). Επιπλέον, δεν απαιτεί τη χρονοβόρα διαδικασία της προετοιμασίας των δειγμάτων και το δείγμα παραμένει άθικτο ακόμα και μετά την εξαγωγή του από την συσκευή (www.analytik.co.uk). Οι δίοδοι εκπομπής φωτός LED που περιέχει συνδυάζουν τις μετρήσεις από 18 ανομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος που κυμαίνονται από την περιοχή του υπεριώδους (405 nm) έως τη περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (970 nm), σε μία υψηλής ανάλυσης πολυφασματικής εικόνα της οποίας κάθε εικονοστοιχείο (pixel) αντιστοιχεί σε ένα φάσμα. Το VideometerLab πρώτοαναπτύχθηκε από το Τεχνικό Πανεπιστήμιο της Δανίας και τέθηκε στην αγορά από την εταιρεία Videometer A/S (Carstensen and Hansen 2003, www.videometer.com).

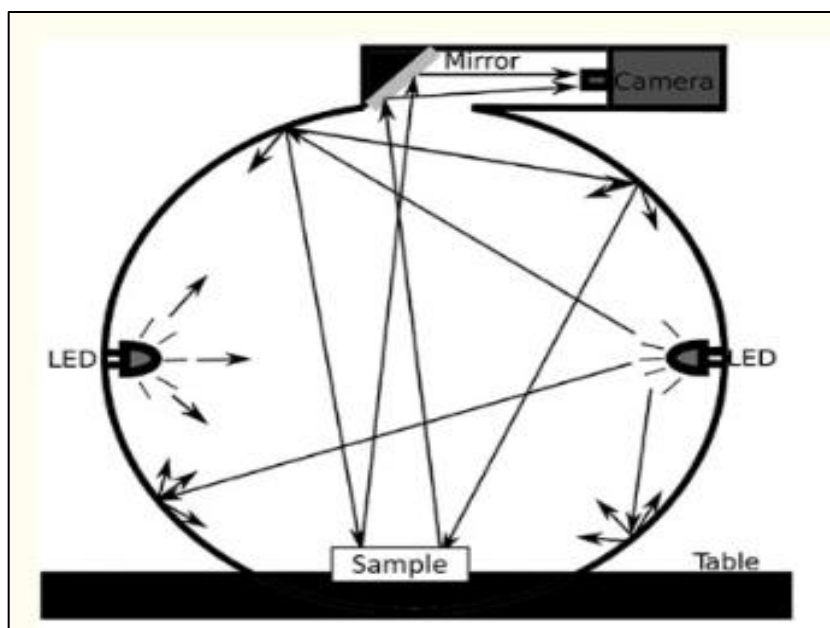
Τα τεχνικά χαρακτηριστικά του οργάνου VideometerLab είναι τα εξής (www.analytik.co.uk , www.videometer.com):

- Ομοιογενής και διάχυτος φωτισμός μέσα από τη σφαίρα ενσωμάτωσης που περιέχει.
- Διενέργεια πολυφασματικής ανάλυσης σε λιγότερο από 6 δευτερόλεπτα.
- Δυνατότητα απόκτησης 18 φασματικών ζωνών με μήκος κύματος από 405 έως 970 nm.
- Διαθέσιμη επιλογή φθορισμού.
- 18 δίοδοι φωτισμού LED και μία εξωτερική πηγή φωτός. Η τεχνολογία LED προσφέρει αυξημένη σταθερότητα.
- Καλύτερη αναλογία σήματος-θορύβου μέσω ατομικών και αυτοματοποιημένων προσαρμογών της έντασης του φωτός σε κάθε φασματική ζώνη.
- Το βάρος της συσκευής είναι 16.7 kg
- Καλύτερος προσδιορισμός του χρώματος σε σχέση με την παραδοσιακή τεχνολογία RGB.
- Κάμερα με αισθητήρα CCD ανάλυσης 1600 x 1200 pixels και δυνατότητα προσαρμογής για αύξηση της ανάλυσης (2056 x 2056 ή υψηλότερη)



Εικόνα 6: Συσκευή VideometerLab system (Tsakanikas *et al.* 2016)

Το VideometerLab έχει την δυνατότητα να καταγράφει τις ανακλάσεις από την επιφάνεια ενός δείγματος μέσω μιας μονοχρωματικής συσκευής (CCD). Το εξεταζόμενο δείγμα τροφίμου τοποθετείται μέσα σε μια σφαίρα Ulbricht, η οποία είναι λευκού χρώματος ώστε να διασφαλίζεται ο ομοιογενής και διάχυτος φωτισμός του δείγματος, με την κάμερα καταγραφής να είναι τοποθετημένη πάνω από το υπό εξέταση δείγμα. Η καμπυλότητα και η επικάλυψη (λευκή) της σφαίρας επιτρέπουν την ομοιομορφία της ανάκλασης του φωτός σε όλο το περιβάλλον της σφαίρας. Στα άκρα της σφαίρας και αντιδιαμετρικά είναι τοποθετημένοι ο ένας δίπλα στον άλλον, οι δύο εκπομπές φωτισμού LED οι οποίοι εκπέμπουν ακτινοβολία σε μία στενή φασματική ζώνη. Μετά τη λήψη της φωτογραφίας, οι δύο στροβιλίζονται και εκπέμπουν διαδοχικά μονοχρωματική ακτινοβολία. Η ανάκλαση της προσπίπτουσας πάνω στην επιφάνεια του δείγματος ακτινοβολίας καταγράφεται από την κάμερα που είναι τοποθετημένη στην κορυφή. Το αποτέλεσμα όλης αυτής της διαδικασίας είναι η απόκτηση μιας μονοχρωματικής εικόνας, η οποία αποτελεί έναν κύβο φασματικών και χωρικών δεδομένων με διαστάσεις $1280 \times 960 \times 18$ ($m \times n \times 18$, όπου $m \times n$ είναι το μέγεθος της εικόνας σε pixels). Η βαθμονόμηση της συσκευής γίνεται με τη χρήση ραδιομετρικών και γεωμετρικών πλακετών ακριβείας (Folm-Hansen 1999). Η ομοιογένεια του φωτός και η βαθμονόμηση του οργάνου έχουν ως στόχο την διασφάλιση ενός βέλτιστου δυναμικού εύρους και την ελαχιστοποίηση των σκιάσεων που μπορούν να δημιουργηθούν καθώς και τις όποιες κατοπτρικές αντανακλάσεις ή αντανακλάσεις λόγω στυλπνότητας (Panagou *et al.* 2014).



Εικόνα 7: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας της συσκευής VideometerLab (Tsakanikas *et al.* 2015)

Σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας, και παράλληλα με τις μικροβιολογικές αναλύσεις, αντίστοιχα δείγματα ανανά μεταφέρονταν σε τρυβλία Petri τα οποία τοποθετούνταν στην συσκευή του VideometerLab προκειμένου να συλλεχθούν πολυφασματικές εικόνες. Αρχικά πραγματοποιούνταν η ρύθμιση του κατάλληλου light setup για τα δείγματα του ανανά και η αναμονή για περίπου 30 min προκειμένου να προθερμανθούν οι δίοδοι του οργάνου. Στην συνέχεια ακολουθούσε η βαθμονόμηση της συσκευής. Κάθε δείγμα τοποθετούταν κάτω από την σφαίρα Ulbricht σε δίσκο κατάλληλου χρωματισμού και γινόταν λήψη της εικόνας του. Η εικόνα που λαμβανόταν αποτελούσε μια πολυφασματική εικόνα από 18 στιγμιότυπα (μήκη κύματος).

2.3 Ανάλυση δεδομένων

2.3.1 Ανάλυση μικροβιολογικών δεδομένων

Το πρωτογενές μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) προσαρμόστηκε στα μικροβιολογικά δεδομένα τα οποία ελήφθησαν από τις αναλύσεις των δειγμάτων του ανανά και του μανιταριού, με σκοπό τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων αύξησης των μικροβιακών πληθυσμών στην αντίστοιχη θερμοκρασία συντήρησης. Πιο συγκεκριμένα, οι παράμετροι αύξησης οι οποίες προσδιορίστηκαν ήταν οι εξής:

- Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (maximum specific growth rate, μ_{max})
- Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής (lag phase duration, λ)
- Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός (y_0)
- Ο μέγιστος (τελικός) μικροβιακός πληθυσμός (y_{end})

Η προσαρμογή του πρωτογενούς μοντέλου στα μικροβιολογικά δεδομένα με μη γραμμική παλινδρόμηση μέσω της χρήσης του πρόσθετου προγράμματος DMFit του Excel (IFR, Norwich, UK). Για τον υπολογισμό των κινητικών παραμέτρων σε κάθε μια από τις εξεταζόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες, χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες αύξησης οι οποίες προέκυψαν από τους μέσους όρους των μικροβιολογικών δεδομένων (4 και 6 δειγμάτων για τον ανανά και τα μανιτάρια, αντίστοιχα).

2.3.2 Απόκτηση δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης από το VideometeLab

Οι πολυφασματικές απεικονίσεις που λαμβανόταν περιείχαν πληροφορίες που δεν σχετίζονταν με το εξεταζόμενο δείγμα τροφίμου (ανανάς), όπως το τρυβλίο Petri. Για να διασφαλιστεί ότι αυτές οι μη χρήσιμες πληροφορίες δεν θα επηρεάσουν την ανάλυση πραγματοποιήθηκαν δύο στάδια επεξεργασίας τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

Η απόκτηση των φασματικών δεδομένων προϋποθέτει μια διαδικασία επεξεργασίας των εικόνων για την εξαγωγή μόνο των χρήσιμων πληροφοριών, μέσω της δημιουργίας масκών που επιτρέπουν τη συγκράτηση πληροφοριών μόνο από την περιοχή ενδιαφέροντος (σάρκα του ανανά). Η δημιουργία масκών πραγματοποιήθηκε μέσα από την μεγιστοποίηση της αντίθεσης μεταξύ των περιοχών που περιέχουν χρήσιμες και άχρηστες πληροφορίες, θέτοντας έτσι ένα όριο λειτουργίας (Daugaard *et al.* 2010). Με βάση το όριο αυτό, έγινε ένας διαχωρισμός των περιοχών του ανανά σε δύο ομάδες, σε περιοχές κύριου και μη κύριου ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε μια διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminant Analysis-CDA) προκειμένου να γίνει ένταξη της κάθε περιοχής του δείγματος σε μία από τις δύο παραπάνω ομάδες (Panagou *et al.* 2014). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής ήταν η απόκτηση φασματικών δεδομένων μόνο από την περιοχή κύριου ενδιαφέροντος (Region Of Interest-ROI). Για κάθε εικόνα λήφθηκε ένα φάσμα με τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση της ανάκλασης όλων των εικονοστοιχείων (pixels) της περιοχής κύριου ενδιαφέροντος σε κάθε προσπίπτων μήκος κύματος. Οι διαδικασίες του μετασχηματισμού (transformation) και διαχωρισμού (segmentation) για την απόκτηση των φασματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκαν με την χρήση του λογισμικού VideometerLab (έκδοση 2.12.39).

2.3.3 Συσχέτιση μικροβιολογικών και φασματοσκοπικών δεδομένων

Τα δεδομένα της μικροβιολογικής και της πολυφασματικής ανάλυσης του ανανά, συσχετιστήκαν με την μέθοδο της γραμμικής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLSR). Σκοπός αυτής της συσχέτισης ήταν η ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού (OMX) του εξεταζόμενου τροφίμου μέσω των δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης. Το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης PLSR ήταν το λογισμικό χημειομετρίας “The Unscrambler” (έκδοση 9.7, CAMO Software AS, Oslo, Norway).

2.4 Μελέτη προσβεβλημένων μανιταριών

Επιπλέον των τριών παρτίδων μανιταριών που αξιολογήθηκαν ως προς τη μικροβιολογική τους αλλοίωση κατά τη διάρκεια συντήρησής τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες, μελετήθηκε και μια παρτίδα προσβεβλημένων μανιταριών με στόχο το χαρακτηρισμό του αιτιολογικού παράγοντα της προσβολής. Στα μανιτάρια αυτά πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και κλασική μικροβιακή ανάλυση (σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα με την διαδικασία που περιγράφηκε στις παραγράφους 2.2.1 και 2.2.2) χωρίς να λάβει χώρα αποθήκευση σε διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης, όπως επίσης και μοριακή ανάλυση των αποκτηθέντων απομονώσεων.

2.4.1 Απομόνωση αποικιών από προσβεβλημένα μανιτάρια

Οι αποικίες οι οποίες αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό CFC ύστερα από μικροβιολογική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στα προσβεβλημένα μανιτάρια (και που πιθανώς αφορούν σε βακτηριακές απομονώσεις του γένους *Pseudomonas*) μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία που περιείχαν το μη επιλεκτικό υπόστρωμα Tryptone Soya Agar (TSA, Biolife) με την μέθοδο της γραμμικής εξάπλωσης (streaking). Αφού ελέγχθηκε η καθαρότητα των αποικιών έγινε νέα μεταφορά πάλι με την μέθοδο της γραμμικής εξάπλωσης σε νέα τρυβλία με TSA. Κατόπιν, μετά από εκ νέου έλεγχο της καθαρότητας των αποικιών, πραγματοποιήθηκε μεταφορά τους σε ειδικά φιαλίδια με υγρό θρεπτικό υλικό Tryptone Soy Broth (TSB, Lab M Limited) και 20% γλυκερόλη και αποθήκευση στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι να πραγματοποιηθεί η μοριακή ανάλυση. Με στόχο την εξέταση ενός αντιπροσωπευτικού αριθμού απομονώσεων από τα προσβεβλημένα μανιτάρια, πραγματοποιήθηκε συλλογή και αποθήκευση συνολικά 49 απομονώσεων.

2.4.2 Μοριακή ανάλυση

Για κάθε εξεταζόμενη απομόνωση, πραγματοποιήθηκε μεταφορά 50 μl βιομάζας από υγρή καλλιέργεια (κατεψυγμένη stock καλλιέργεια στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) σε 5 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (1^η ανανέωση) για 24 h, γραμμική εξάπλωση (streaking) σε τρυβλίο που περιείχε ως θρεπτικό υπόστρωμα TSA για τον έλεγχο της καθαρότητας. Με το πέρας των 24 ωρών μεταφέρθηκαν 100 μl σε 10 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB (2^η ανανέωση) και επώαση για 18 h. Μετά από επώαση των υγρών καλλιεργειών των απομονώσεων, μεταφέρθηκε όλη η ποσότητα των υγρών καλλιεργειών σε αποστειρωμένους σωλήνες (Falcon) των 25 ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα $5000 \times g$ για 10 min στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Αφού ακολούθησε η απομάκρυνση του υπερκειμένου, τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 10 ml αραιωτικού μέσου Ringer και πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου, η συλλεχθείσα βιομάζα των εξεταζόμενων απομονώσεων αποθηκεύτηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ μέχρι την πραγματοποίηση της απομόνωσης του γενωμικού DNA.

2.4.2.1 Απομόνωση γενωμικού DNA (DNA extraction)

Για την απομόνωση γενωμικού DNA χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω πρωτόκολλο που αποτελεί μια τροποποίηση του πρωτοκόλλου που περιγράφηκε από τους Queiro *et al.* (1992).

1. Επαναδιάλυση της βιομάζας (από τους -80 °C) σε 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης που αποτελείται από 1M sorbitol και 0.1 M EDTA (pH: 7.5) και περιέχει 25 mg/ml λυσοζύμης.
2. Ελαφριά ανάδευση μέσω vortex και επώαση στους 37 °C για 2 h (κάθε 30 min ελαφριά ανάδευση και μετά το πέρας της επώασης έντονη ανακίνηση μέσω vortex για 15 sec).
3. Φυγοκέντρηση για 10 min στα 14000 rpm/17000 × g στους 4 °C.
4. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε διαλύμα λύσης που αποτελείται από 50 mM Tris και 20 mM EDTA (pH: 7.4).
5. Προσθήκη 50 μl 10% SDS και επώαση στους 65 °C για 30 min.
6. Προσθήκη 0.2 ml οξικού καλίου και τοποθέτηση σε πάγο για 30 min.
7. Φυγοκέντρηση για 10 min στα 14000 rpm/17000 × g στους 4 °C.
8. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf και φυγοκέντρηση για 10 min.
9. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο eppendorf και προσθήκη 0.7 ml ισοπροπανόλης (-20 °C).
10. Ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Φυγοκέντρηση για 10 min στα 14000 rpm/17000 × g στους 4 °C.
12. Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 0.5 ml 70% αιθανόλης (-20 °C) × 2-3 πλυσίματα.
13. Στέγνωμα του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι ολικής εξάτμισης της αιθανόλης και επαναδιάλυση σε 50 μl buffer Elution.

2.4.2.2 Προσδιορισμός συγκέντρωσης και καθαρότητας νουκλεϊκών οξέων

Η ποσοτικοποίηση (ng/μl) του γενωμικού DNA κάθε υπό εξέταση απομόνωσης, πραγματοποιήθηκε με το φωτόμετρο της εταιρείας IMPLEN (Implen GmbH, Munich, Germany). Η βαθμονόμηση της συσκευής γινόταν με 4 μl buffer Elution και έπειτα τοποθετούνταν ποσότητα 4 μl από κάθε δείγμα.

2.4.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της RAPD-PCR (Williams *et al.* 1990) με σκοπό την αναγνώριση και την διαφοροποίηση όλων των ευδιάκριτων προφίλ των στελεχών του γένους *Pseudomonas* που απομονώθηκαν από τα προσβεβλημένα μανιτάρια. Η οπτική απεικόνιση των διαφορετικών προφίλ που προέκυψαν μέσω της RAPD-PCR έγινε μέσω της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης. Για την RAPD-PCR χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής UBC155 (5'-CTGGCGGCTG-3') (Paramithiotis *et al.* 2010)

Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 20 μl και περιείχε 4μl 5× KAPA Taq Mg-free Buffer D (KAPA BIOSYSTEMS, Wilmington, MA, USA), 2.5 mM MgCl₂ (KAPA BIOSYSTEMS, Wilmington, MA, USA), 0.2 mM dNTPs (H T Biotechnology Ltd., Cambridge, United Kingdom), 1.5 mM UBC155 primer (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany), 1 U Taq DNA πολυμεράση (KAPA BIOSYSTEMS, Wilmington, MA, USA) και 50-100 ng/μl DNA.

Για την επίτευξη των αντιδράσεων της PCR για όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Proflex PCR System (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) και το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής: 5 min σε θερμοκρασία 94°C, ακολούθησαν 30 κύκλοι από: 30 sec σε θερμοκρασία 94°C, 1 min σε θερμοκρασία 40°C, 8 min σε θερμοκρασία 72°C και 16 min σε θερμοκρασία 72°C. Μετά την ολοκλήρωση 30 κύκλων ακολούθησαν 16 min σε θερμοκρασία 72°C.

2.4.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Μετά την ολοκλήρωση της RAPD-PCR, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του ενισχυμένου προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης 1.5 % (w/v) (Nippon Genetics-Europe GmbH, Dueren, Germany). Η πηκτή αγαρόζης ηλεκτοφορήθηκε σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1×TAE με παροχή τάσης 100 V για 75 min. Για την εκτίμηση του αριθμού ζευγών βάσεων που αντιστοιχούν στην επιθυμητή ζώνη χρησιμοποιήθηκε ο 1kb DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts, United States). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή μεταφέρθηκε σε ένα πλαστικό δοχείο που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο (40 μVl dH₂O) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) και αφέθηκε εκεί για 30 min.

2.4.2.5 Συσκευή UV

Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα επίπεδα που ορίζουν οι αζωτούχες βάσεις των νουκλεοτιδίων και μας δίνει την δυνατότητα να παρατηρήσουμε τις ζώνες του DNA στην πηκτή υπό φωτισμό υπεριώδους ακτινοβολίας (συσκευή UV). Η πηκτή αγαρόζης αφού αφέθηκε για 30 min σε πλαστικό δοχείο που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο ξεπλύθηκε με νερό και μεταφέρθηκε στην συσκευή UV (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Η συσκευή UV είναι συνδεδεμένη με μια φωτογραφική μηχανή και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η πηκτή τοποθετήθηκε μέσα στην συσκευή και μέσω του ειδικού λογισμικού προγράμματος (Quantity One, BIO-RAD) επεξεργάστηκε και αποθηκεύτηκε η φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης.

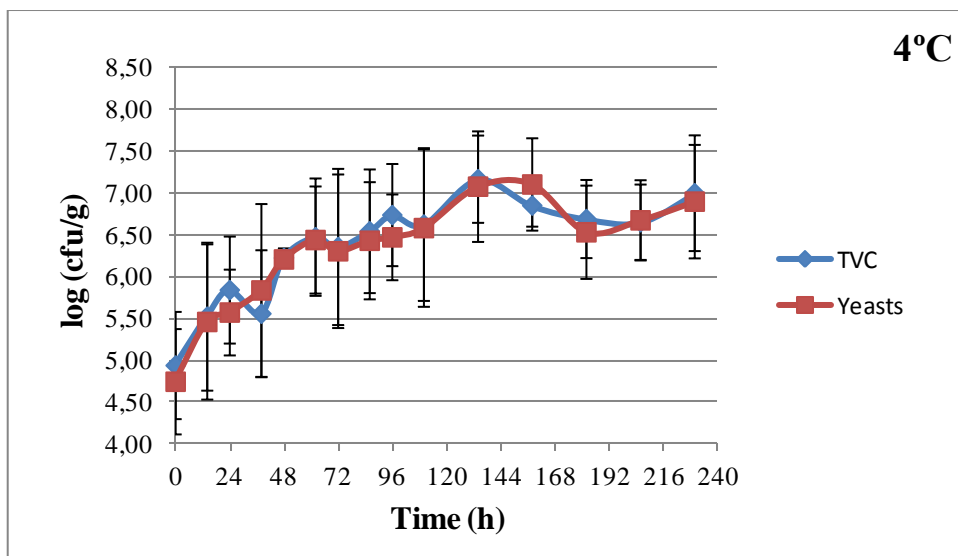
Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν με στόχο την ομαδοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν με την χρήση του προγράμματος Bionumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium). Μέσω του προγράμματος αυτού, συγκρίνονται οι ζώνες των ηλεκτροφορητικών προφίλ των εξεταζόμενων απομονώσεων αλλά και του δείκτη μεγέθους μοριακών μαζών (1kb DNA Ladder). Μέσα από αυτή την επεξεργασία προκύπτει ένα δενδρόγραμμα (φυλογενετικό δένδρο), στο οποίο παρουσιάζονται ομαδοποιημένες οι απομονώσεις με βάση το ποσοστό ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ.

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

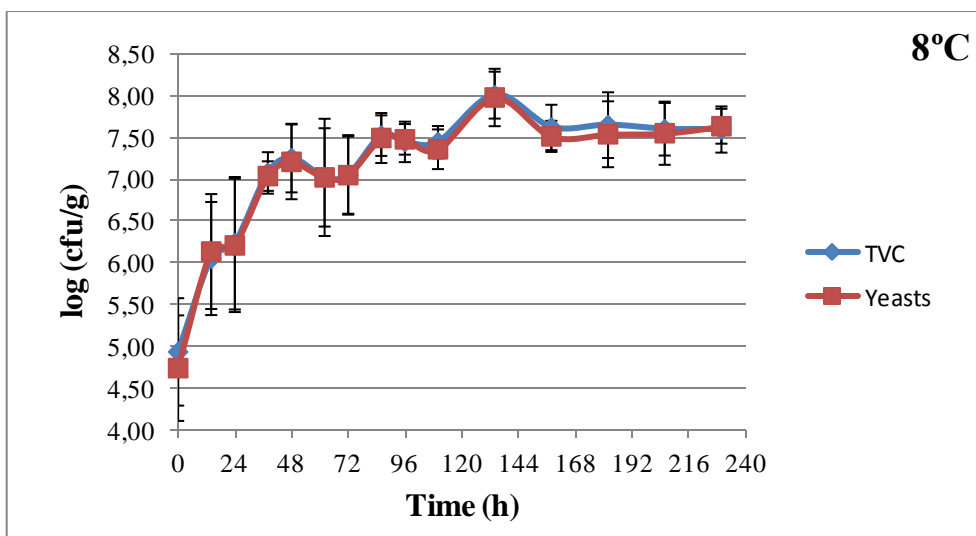
3.A Αποτελέσματα

3.1 Μικροβιολογικές αναλύσεις στον ανανά

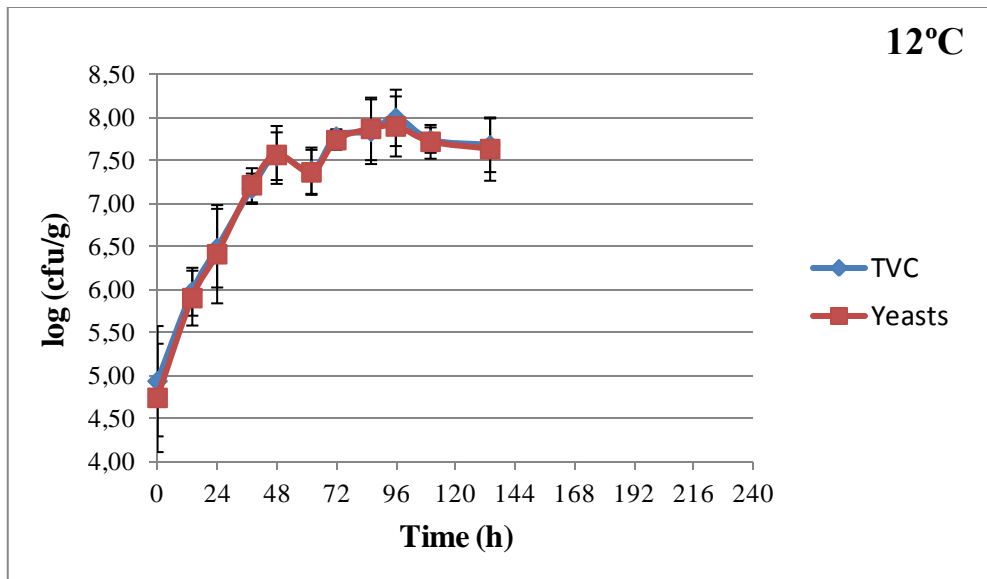
Για την κατασκευή των καμπυλών αύξησης στις ισόθερμες συνθήκες (4, 8 και 12 °C) καθώς και στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (Dynamic) στα δείγματα του ανανά, τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων από τις δύο ανεξάρτητες παρτίδες εκφράστηκαν σε log colony forming units/g και χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση 4 δειγμάτων. Στην συνέχεια, παρουσιάζονται οι καμπύλες αύξησης της κυρίαρχης μικροβιακής ομάδας που συνείσφερε στην αλλοίωση του ανανά στις αντίστοιχες θερμοκρασίες συντήρησης:



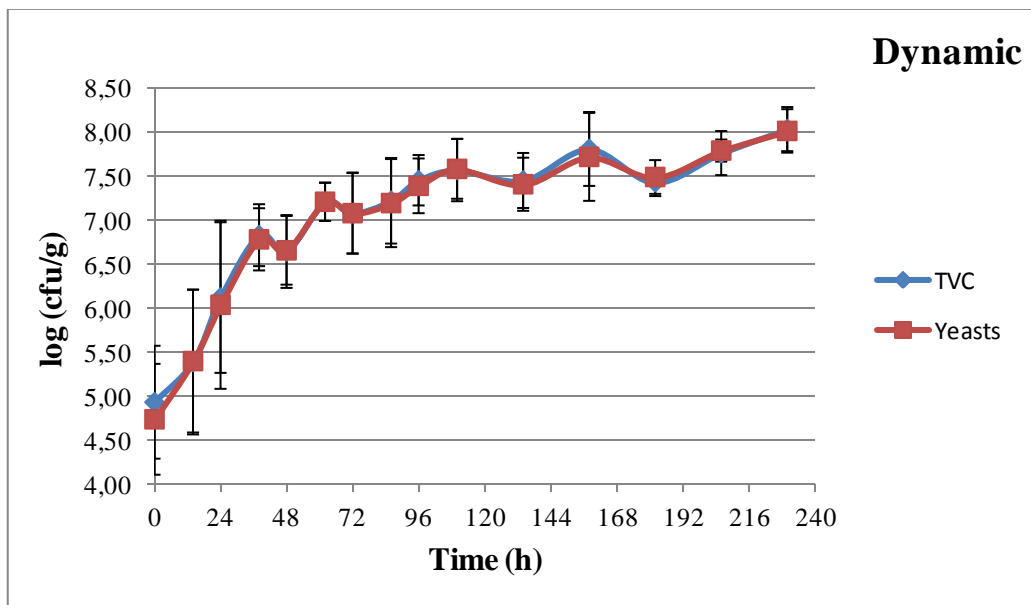
Διάγραμμα 1: Η πορεία της αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Total Viable Count-TVC) και των Ζυμών (Yeasts) στους 4°C.



Διάγραμμα 2: Η πορεία της αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC) και των Ζυμών (Yeasts) στους 8°C.



Διάγραμμα 3: Η πορεία της αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC) και των Ζυμών (Yeasts) στους 12°C.



Διάγραμμα 4: Η πορεία της αύξησης πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC) και των Ζυμών (Yeasts) στις περιοδικά μεταβαλλόμενες συνθήκες θερμοκρασίας (Dynamic).

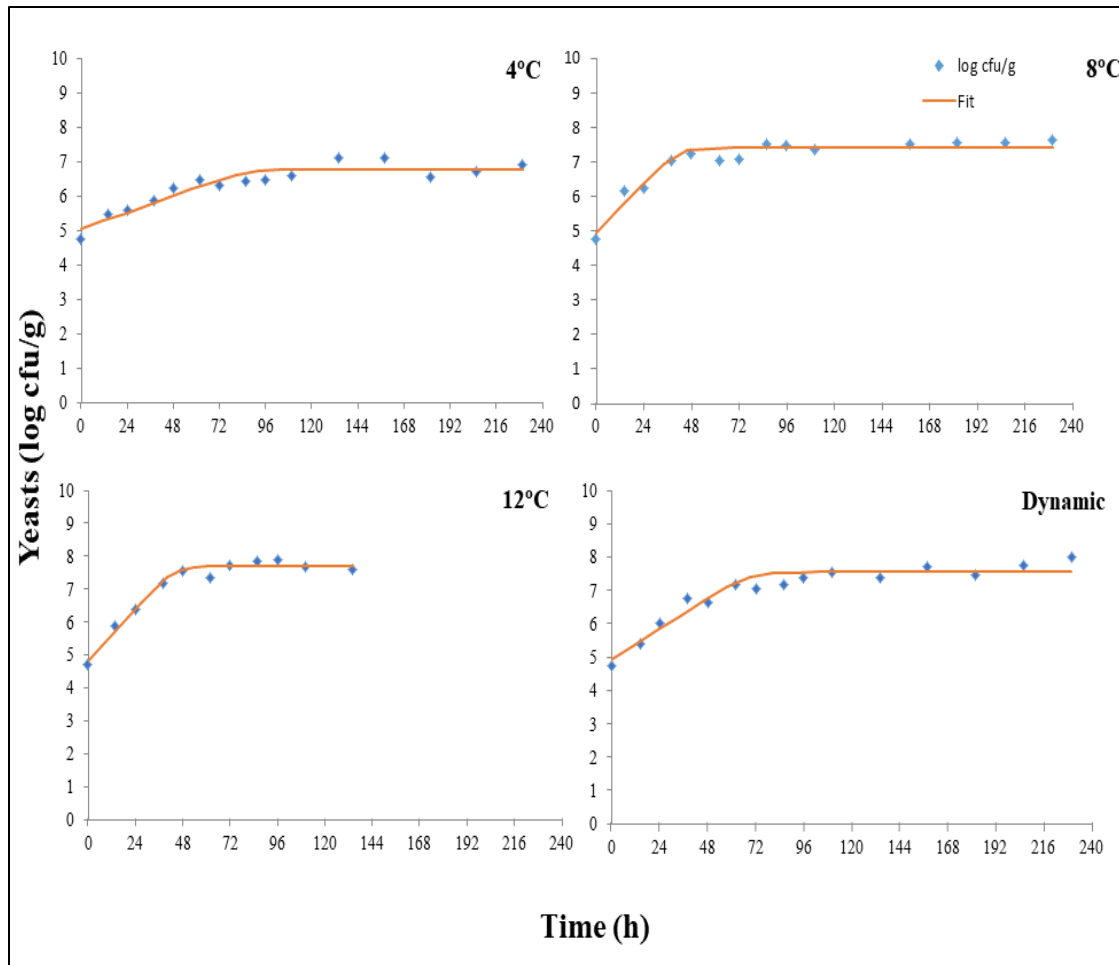
Η κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα της αλλοίωσης στον ανανά ήταν οι ζύμες (Yeasts). Ο πληθυσμός των ζυμών σε όλες τις ισόθερμες συνθήκες (4, 8, και 12 °C) καθώς και στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (Dynamic) προσέγγιζε σε μεγάλο βαθμό αυτόν της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (Total Viable Count-TVC). Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) και των εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteriaceae*) ήταν κάτω από 2 log cfu/g σε όλες τις υπό μελέτη θερμοκρασίες. Επιπλέον, ο πληθυσμός των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Lactic Acid Bacteria-LAB) ήταν πολύ χαμηλός και δεν μπορούσε εύκολα να ανιχνευθεί με τις κοινές μικροβιολογικές αναλύσεις εξαιτίας της κυριαρχίας των ζυμών. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των ζυμών (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, n=4) ήταν 4.74 ± 0.60 log cfu/g, ενώ οι τελικοί πληθυσμοί έφτασαν τους 6.90 ± 0.70, 7.63 ± 0.20, 7.64 ± 0.40 και 8.02 ± 0.20 κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C, 8 °C, 12 °C και Dynamic αντίστοιχα. Ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού των ζυμών ήταν υψηλότερος και ταχύτερος στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Στους 4 °C παρατηρήθηκε μία αρκετά μεγάλη παραλλακτικότητα αφού ο πληθυσμός των ζυμών της δεύτερης παρτίδας ξεκίνησε πιο χαμηλά (1 – 1.5 λογάριθμους) σε σχέση με αυτόν της πρώτης παρτίδας προϊόντος. Σε γενικές γραμμές, ο πληθυσμός των ζυμομυκήτων εμφάνισε μία μικρή παραλλακτικότητα ανάμεσα στις δύο παρτίδες (Διάγραμμα 1, 2, 3 και 4).

Η καλή προσαρμογή των μικροβιολογικών δεδομένων στο μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) αναδεικνύεται από τις χαμηλές τιμές του τυπικού σφάλματος της προσαρμογής (Standard error) και τις υψηλές τιμές του R². Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (maximum specific growth rate, μ_{max}) του πληθυσμού των ζυμών παρουσίασε μια προοδευτική αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης και η τιμή του δε εκτιμήθηκε ότι είναι 0.046, 0.134, 0.151 και 0.090 h⁻¹, αντίστοιχα, δεν εκτιμήθηκε φάση υστέρησης ((lag phase duration, λ) σε καμία από τις μελετηθείσες θερμοκρασίες (Πίνακας 8). Η γραφική αναπαράσταση της προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο ανέδειξε και αυτή την απουσία της φάσης υστέρησης, ενώ επίσης παρατηρήθηκε ότι η πορεία της ανάπτυξης του πληθυσμού των ζυμών κατά την διάρκεια της συντήρησης στις περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες φαίνεται ότι μοιάζει με αυτή των 8 °C (Σχήμα 1).

Πίνακας 8: Οι εκτιμώμενοι παράμετροι κινητικής αύξησης του πληθυσμού των Ζυμών (Yeasts) στις αντίστοιχες θεοκρασίες συντήρησης .

Μικροβιακή ομάδα	Θερμοκρασία συντήρησης (°C)	Rate (h ⁻¹)	Lag phase- λ (h)	Y ₀ (logcfu/g)	Y _{end} (logcfu/g)	Se(fit)	μ_{max} (h ⁻¹)	R ²
Yeasts	4	0.020	-	5.03	6.77	0.229	0.046	0.873
	8	0.058	-	4.94	7.39	0.235	0.134	0.914
	12	0.066	-	4.84	7.70	0.165	0.151	0.973
	Dynamic	0.039	-	4.92	7.56	0.263	0.090	0.919

(-): Δεν εκτιμήθηκε

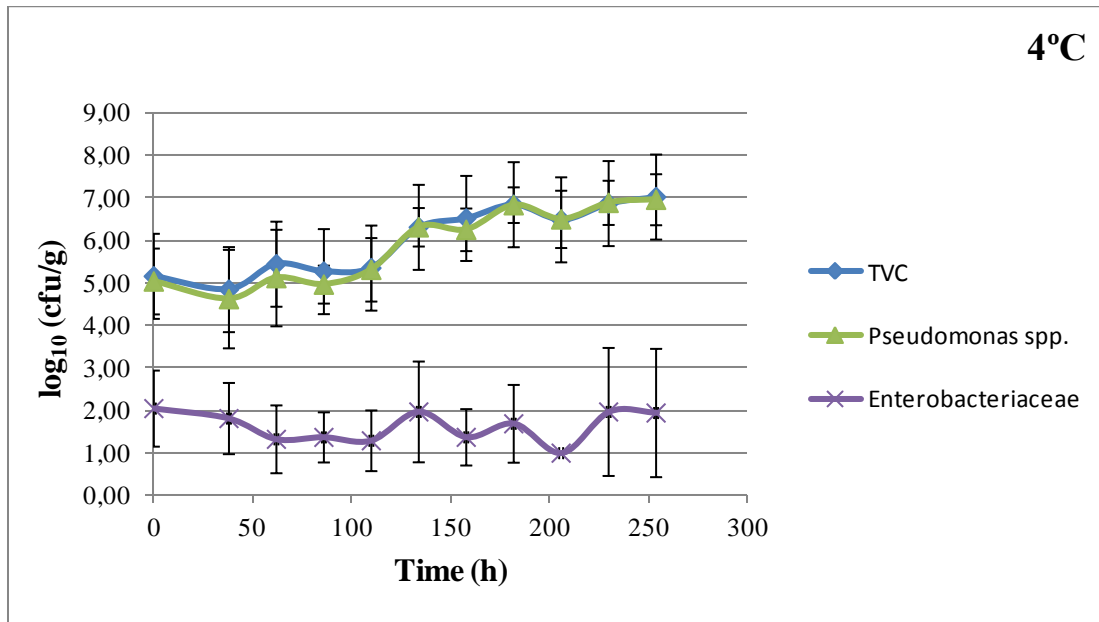


Σχήμα 1: Οι καμπύλες αύξησης του πληθυσμού των Ζυμών (Yeasts) στις αντίστοιχες θερμοκρασίες συντήρησης, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή των μικροβιολογικών δεδομένων στο πρωτογενές μοντέλο του Baranyi and Roberts (1994) μέσω του προγράμματος DMFit.

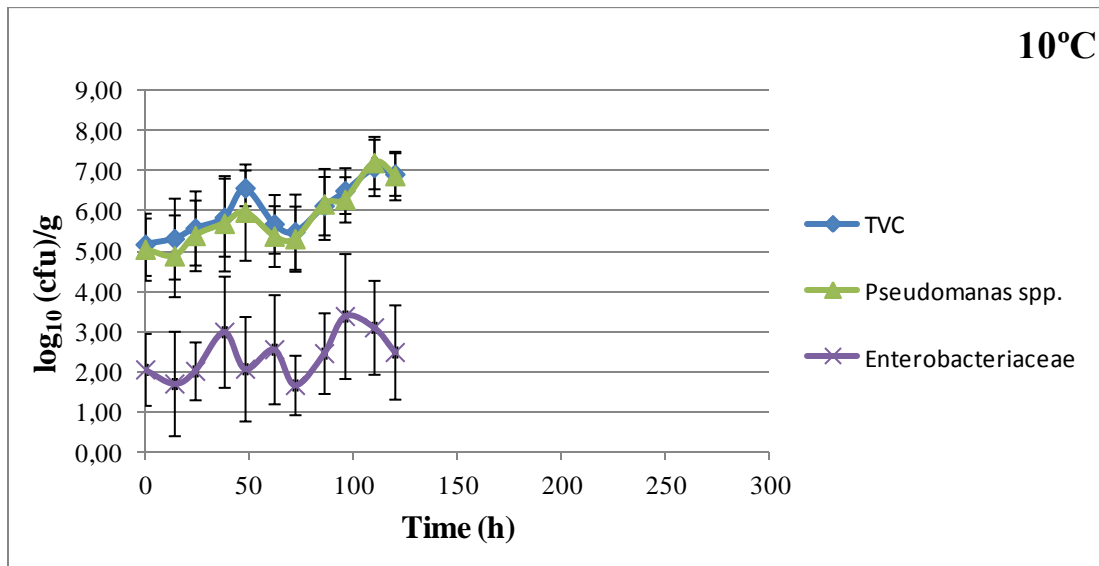
3.2 Μικροβιολογικές αναλύσεις στο μανιτάρι

Για την κατασκευή των καμπυλών αύξησης στις ισόθερμες συνθήκες (4, 10 και 16 °C) καθώς και στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (Dynamic) στα δείγματα του μανιταριού, τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων από τις

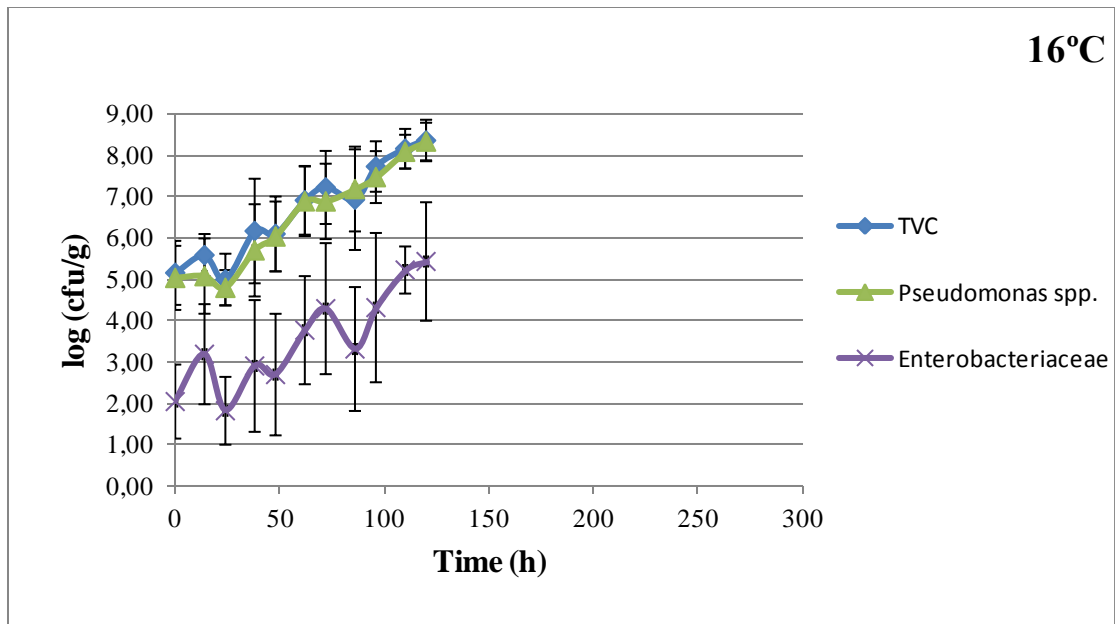
τρεις ανεξάρτητες παρτίδες εκφράστηκαν σε log colony forming units/g και χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση 6 δειγμάτων. Στην συνέχεια, παρουσιάζονται οι καμπύλες αύξησης των κυριότερων μικροβιακών ομάδων που συνεισφέρουν στην αλλοίωση του μανιταριού στις αντίστοιχες θερμοκρασίες συντήρησης:



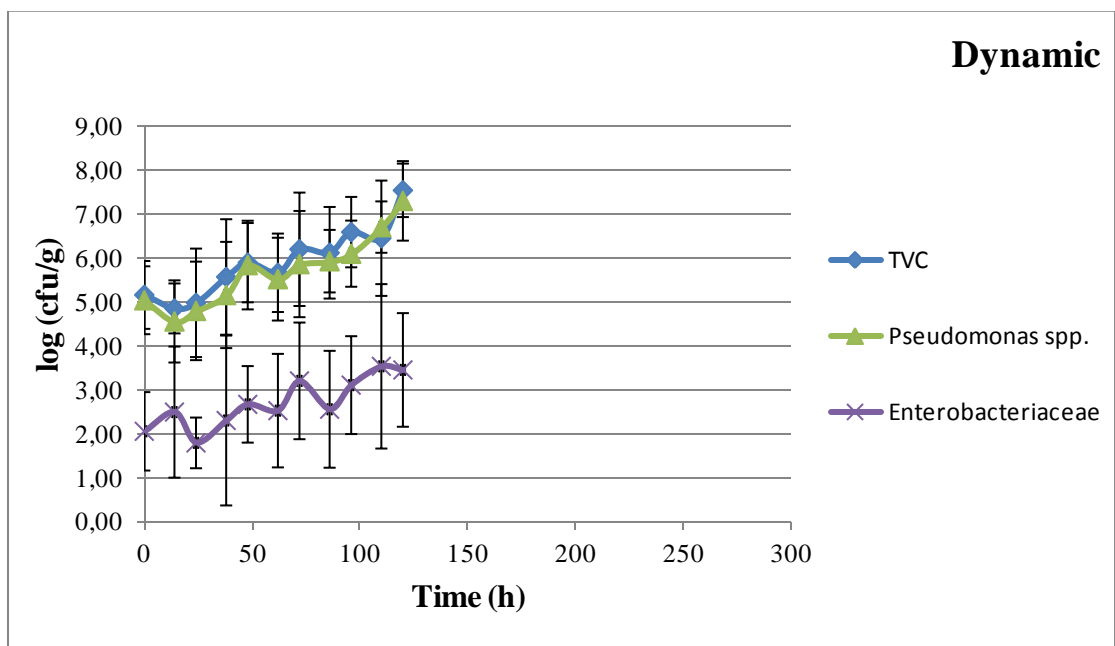
Διάγραμμα 5: Η πορεία της αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC), των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) και των Εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteriaceae*) στους 4°C.



Διάγραμμα 6: Η πορεία της αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC), των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) και των Εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteriaceae*) στους 10°C



Διάγραμμα 7: Η πορεία της αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC), των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) και των Εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteriaceae*) στους 16°C.



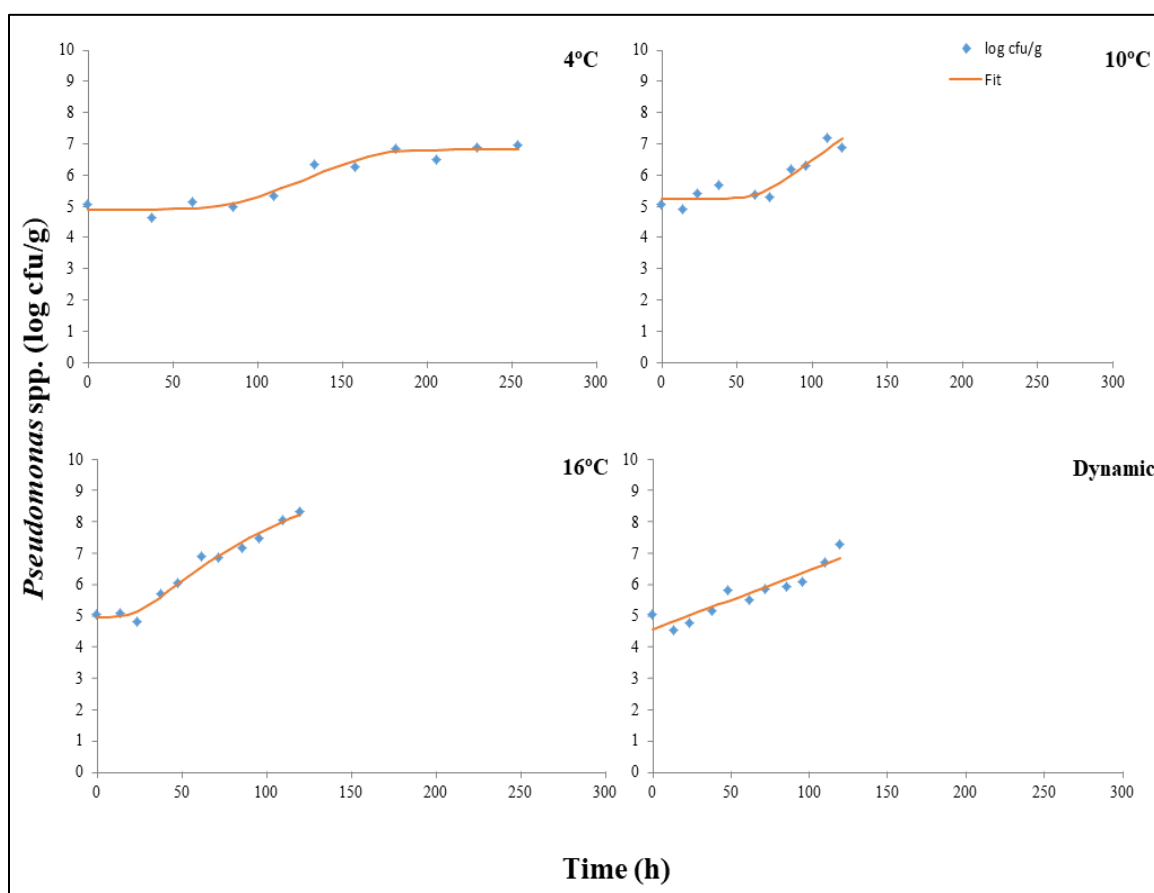
Διάγραμμα 8: Η πορεία της αύξησης του πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC), των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) και των Εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteriaceae*) στις περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (Dynamic).

Η κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα της αλλοίωσης στο μανιτάρι ήταν οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.). Ο πληθυσμός των ψευδομονάδων σε όλες τις ίσοθερμες συνθήκες (4, 10 και 16 °C) καθώς και περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (Dynamic) προσέγγιζε σε μεγάλο βαθμό την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα (TVC). Η παρουσία του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν σχεδόν μηδενική. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των ψευδομονάδων (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, n=6) ήταν $5.04 \pm 0.80 \log \text{ cfu/g}$, ενώ οι τελικοί πληθυσμοί έφτασαν τους 6.96 ± 0.60 , 6.87 ± 0.60 , 8.33 ± 0.50 και $7.30 \pm 0.90 \log \text{ cfu/g}$ κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C, 10 °C, 16 °C και Dynamic αντίστοιχα. Ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού των ψευδομονάδων ήταν υψηλότερος και ταχύτερος στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες. Στην αλλοίωση των μανιταριών συνέσφερε σε μικρότερο βαθμό και ο πλυθυσμός των εντεροβακτηριδίων (*Enterobacteriaceae*). Το αρχικό μικροβιακό φορτίο του πληθυσμού των εντεροβακτηριδίων ήταν $2.05 \pm 0.90 \log \text{ cfu/g}$, ενώ οι τελικοί πληθυσμοί έφτασαν τους 1.94 ± 1.50 , 2.48 ± 1.20 , 5.43 ± 1.40 και $3.45 \pm 1.30 \log \text{ cfu/g}$ κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C, 10 °C, 16 °C και Dynamic αντίστοιχα. Οι πληθυσμοί των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηριδίων παρουσίασαν αρκετά μεγάλη παραλλακτικότητα και στις τρεις παρτίδες προϊόντος, όμως ο πληθυσμός των εντεροβακτηριδίων εμφάνισε την υψηλότερη παραλλακτικότητα όχι μόνο μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων αλλά και μεταξύ των δειγμάτων της ίδιας βιολογικής επανάληψης (Διαγράμματα 5, 6, 7, 8).

Η καλή προσαρμογή των μικροβιολογικών δεδομένων στο μοντέλο των Baranyi και Roberts (1994) αναδεικνύεται από τις χαμηλές τιμές του τυπικού σφάλματος της προσαρμογής (Standard error) και τις υψηλές τιμές του R^2 . Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (maximum specific growth rate, μ_{\max}) του πληθυσμού των ψευδομονάδων παρουσίασε μια προοδευτική αύξηση με την αύξηση της θερμοκρασίας συντήρησης. Ο μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης (maximum specific growth rate, μ_{\max}) του πληθυσμού των ψευδομονάδων εκτιμήθηκε ότι είναι 0.051, 0.080, 0.174 και 0.044 h^{-1} , αντίστοιχα. Στους 4 °C παρατηρήθηκε μια εκτεταμένη φάση υστέρησης (lag phase duration, λ) γύρω στις 85 h, στους 10 °C γύρω στις 64 h και στους 16 °C γύρω στις 23 h, ενώ στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (Dynamic) δεν εκτιμήθηκε φάση υστέρησης (Πίνακας 9). Οι καμπύλες αύξησης που προέκυψαν από την προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο αναδεικνύουν και αυτές μία εκτεταμένη φάση προσαρμογής στους 4 °C, η οποία όμως μειώνεται προοδευτικά στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Η πορεία της ανάπτυξης του πληθυσμού των ψευδομονάδων κατά την διάρκεια της συντήρησης στις περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες δεν φαίνεται να μοιάζει με κάποια από τις υπόλοιπες θερμοκρασίες (Σχήμα 2).

Στην αλλοίωση του μανιταριού συμμετείχε και μία τρίτη μικροβιακή ομάδα η οποία αρχικά εκτιμήθηκε ότι αντιπροσώπευε αυτή των ζυμών αφού η καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε από τρυβλία που περιείχαν ως θρεπτικό υπόστρωμα

RBC. Ο πληθυσμός της συγκεκριμένης μικροβιακής ομάδας ήταν και αυτός αρκετά κοντά σε αυτόν της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (TVC). Η αρχική τιμή του πληθυσμού ήταν $4.81 \pm 0.6 \log \text{ cfu/g}$, ενώ οι τελικοί πληθυσμοί έφτασαν τους 5.95 ± 0.8 , 6.04 ± 0.6 , 6.55 ± 0.8 και $6.46 \pm 0.7 \log \text{ cfu/g}$ κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 4°C , 10°C , 16°C και Dynamic. Οι αποικίες που απομονώθηκαν και υποβλήθηκαν σε χρώση Gram καθώς και σε δοκιμές καταλάσης και οξειδάσης αποκάλυψαν την ύπαρξη σχεδόν στην πλειοψηφία των απομονώσεων αρνητικών κατά Gram βακίλων με αρνητική αντίδραση στην οξειδάση και θετική στην καταλάση, ενώ υπήρχε και ένας μικρός αριθμός αρνητικών κατά Gram βακίλων με θετική αντίδραση και στην οξειδάση και στην καταλάση.



Σχήμα 2: Οι καμπύλες αύξησης του πληθυσμού των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) στις αντίστοιχες θερμοκρασίες συντήρησης, όπως προέκυψαν από την προσεμογή (Fit) των μικροβιολογικών δεδομένων στο πρωτογενές μοντέλο του Baranyi and Roberts (1994) μέσω του προγράμματος DMFit.

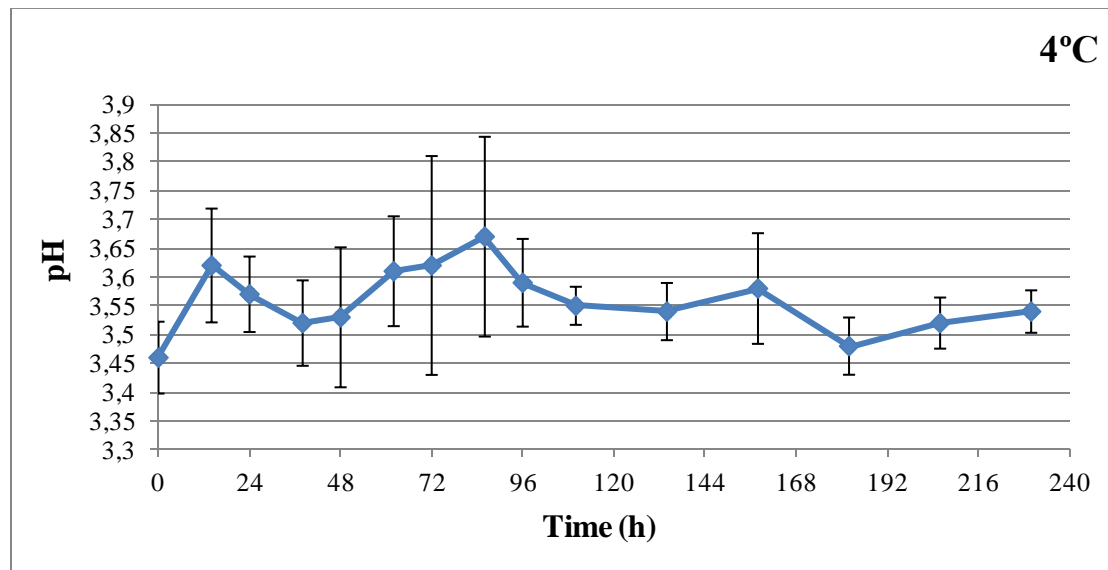
Πίνακας 9: Οι εκτιμώμενοι παράμετροι κινητικής αύξησης του πληθυσμού των Ψευδομονάδων (*Pseudomonas* spp.) στις αντίστοιχες θερμοκρασίες συντήρησης.

Μικροβιακή ομάδα	Θερμοκρασία συντήρησης ($^\circ\text{C}$)	Rate (h^{-1})	Lag phase- λ (h)	Y_0 (logcfu/g)	Y_{end} (logcfu/g)	Se(fit)	μ_{max} (h^{-1})	R^2
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	0.022	85.19	4.88	6.79	0.256	0.051	0.916
	10	0.035	64.16	5.22	-	0.320	0.080	0.832
	16	0.076	23.58	4.95	9.83	0.213	0.174	0.971
	Dynamic	0.019	-	4.54	-	0.320	0.044	0.848

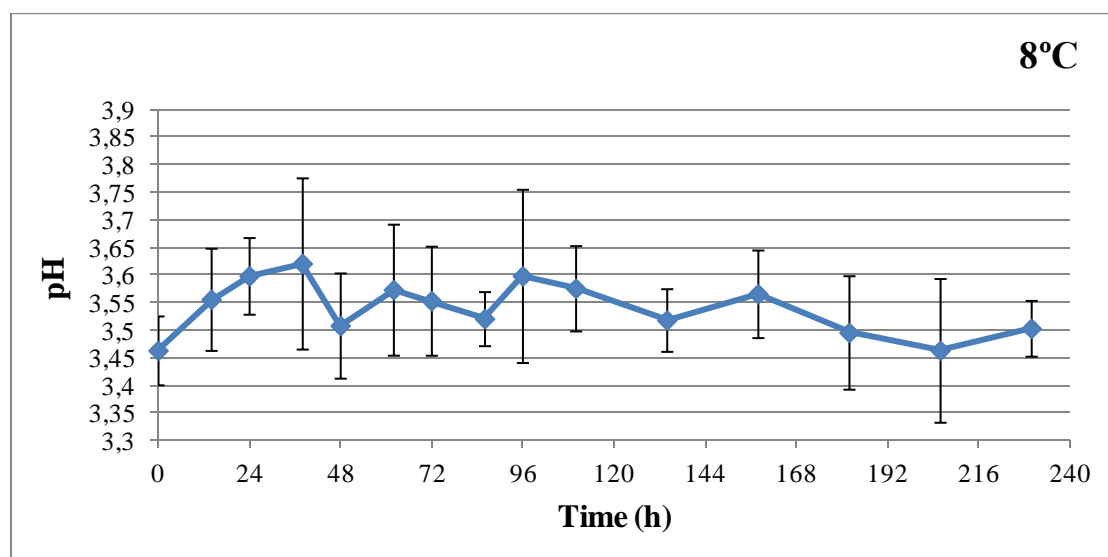
(-): Δεν εκτιμήθηκε

3.3 Μέτρηση του pH στον ανανά

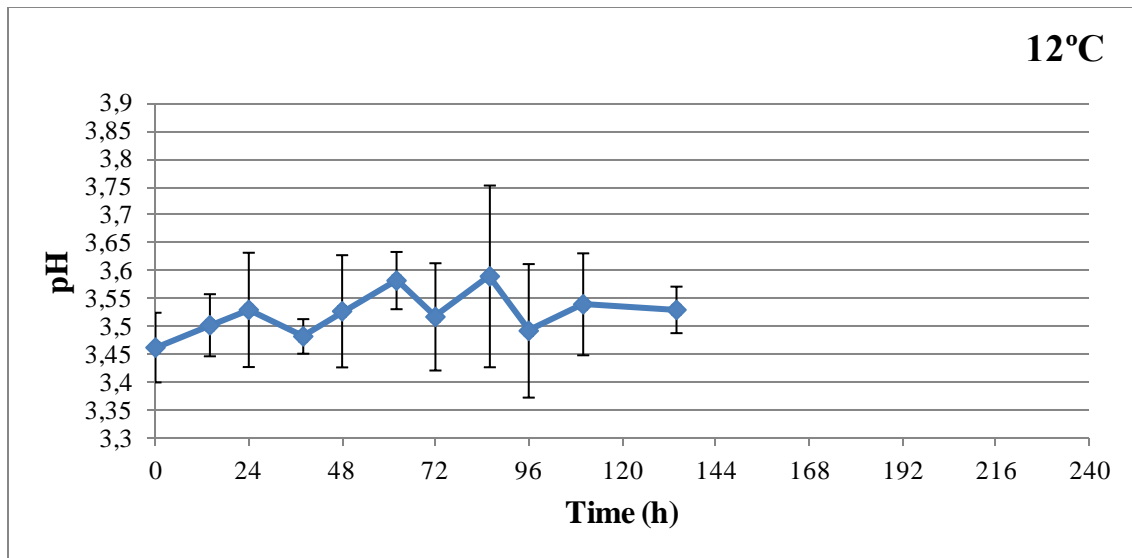
Η κατασκευή των καμπυλών μεταβολής της τιμής του pH στον ανανά κατά την διάρκεια της συντήρησης στις ισόθερμές συνθήκες (4, 8 και 12 °C) και στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (Dynamic) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση 4 δειγμάτων. Η αρχική τιμή του pH (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, $n=4$) στον ανανά ήταν 3.46 ± 0.06 , ενώ η τελική τιμή έφτασε 3.54 ± 0.04 , 3.50 ± 0.05 , 3.53 ± 0.04 και 3.46 ± 0.07 κατά την διάρκεια της συντήρησης κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C, 8 °C, 12 °C και Dynamic αντίστοιχα (Διαγράμματα 9, 10, 11 και 12).



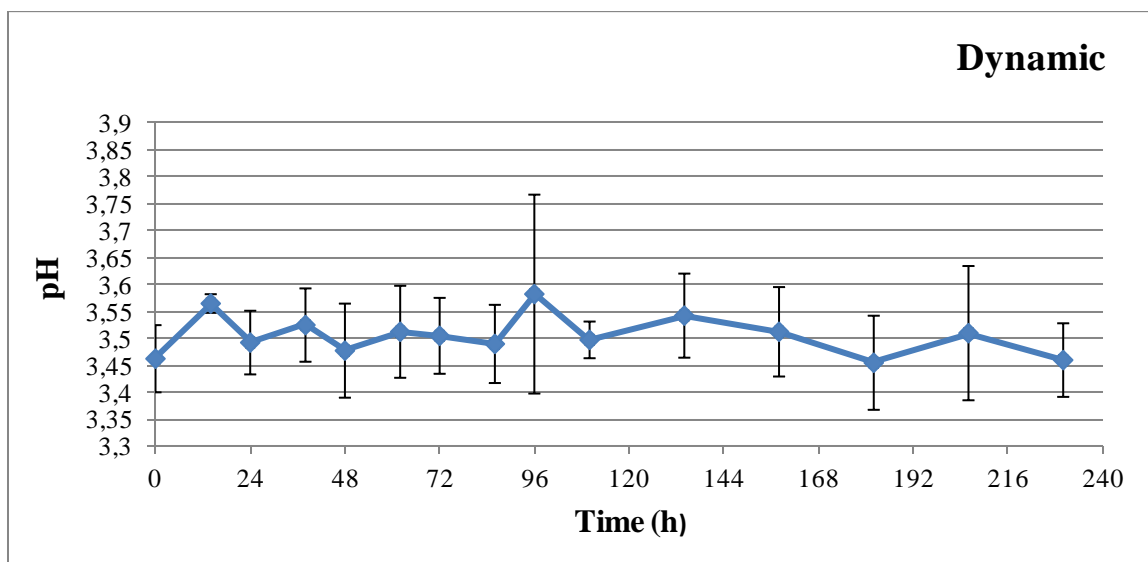
Διάγραμμα 9: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 4°C



Διάγραμμα 10: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 8°C.



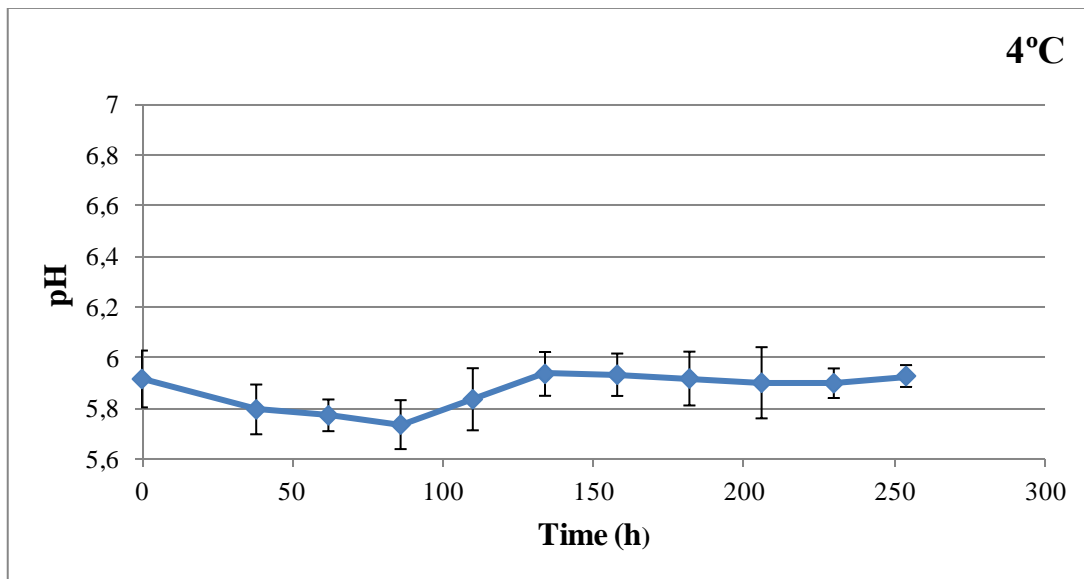
Διάγραμμα 11: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια συντήρησης στους 12°C.



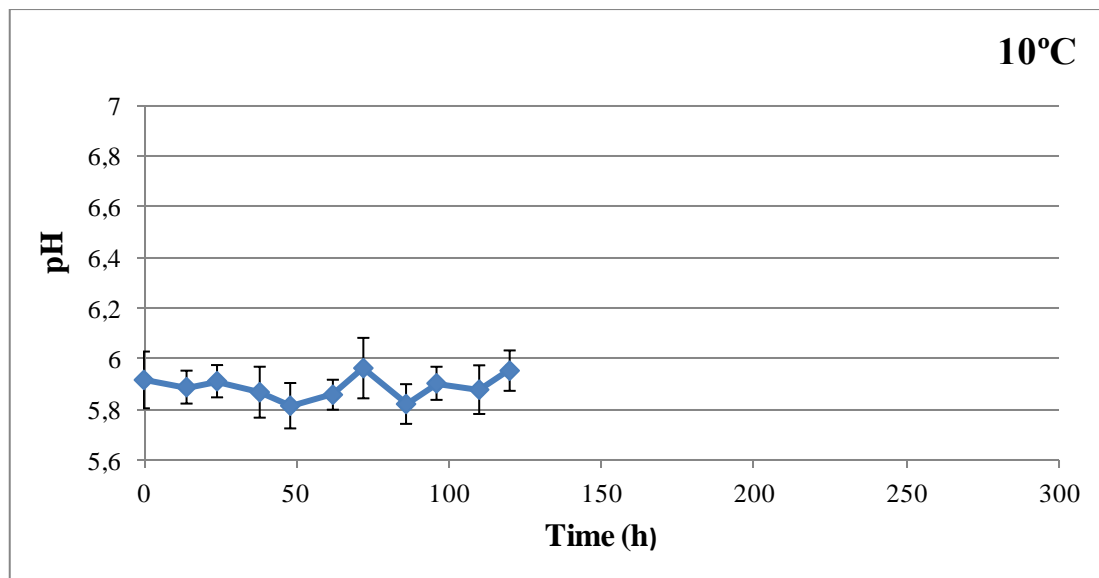
Διάγραμμα 12: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια της συντήρησης στις περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (Dynamic).

3.4 Μέτρηση του pH στο μανιτάρι

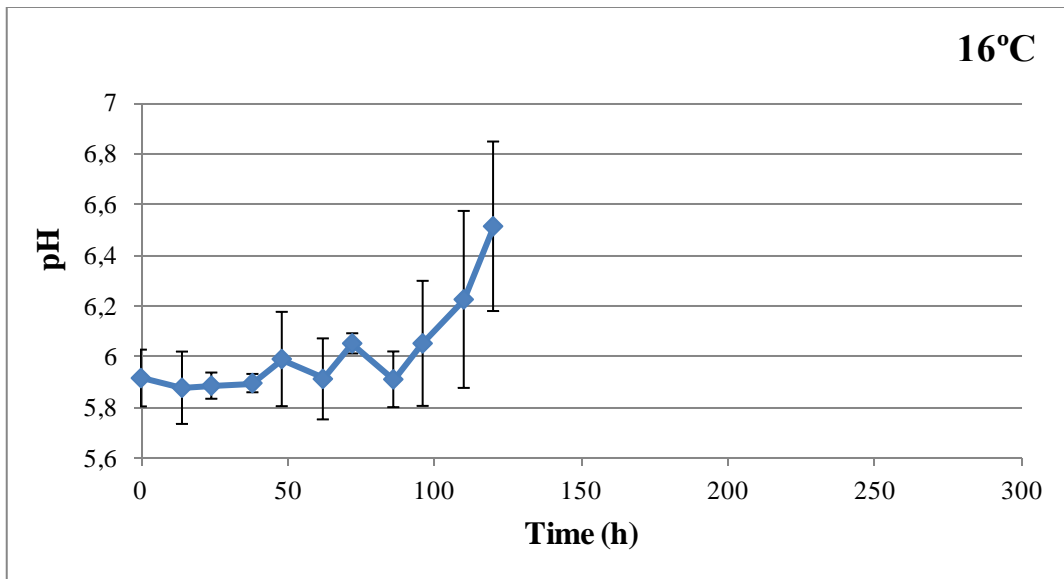
Η κατασκευή των καμπυλών μεταβολής της τιμής του pH στο μανιτάρι κατά την διάρκεια της συντήρησης στις ισόθερμές συνθήκες (4, 10 και 16 °C) και στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (Dynamic) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον μέσο όρο και την τυπική απόκλιση 4 δειγμάτων. Η αρχική τιμή του pH (μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση, n=6) στο μανιτάρι ήταν 5.92 ± 0.11 , ενώ η τελική τιμή έφτασε 5.93 ± 0.04 , 5.95 ± 0.08 , 6.52 ± 0.33 και 5.91 ± 0.08 κατά την διάρκεια της συντήρησης κατά την διάρκεια της συντήρησης στους 4 °C, 10 °C, 16 °C και Dynamic αντίστοιχα (Διαγράμματα 13, 14, 15 και 16).



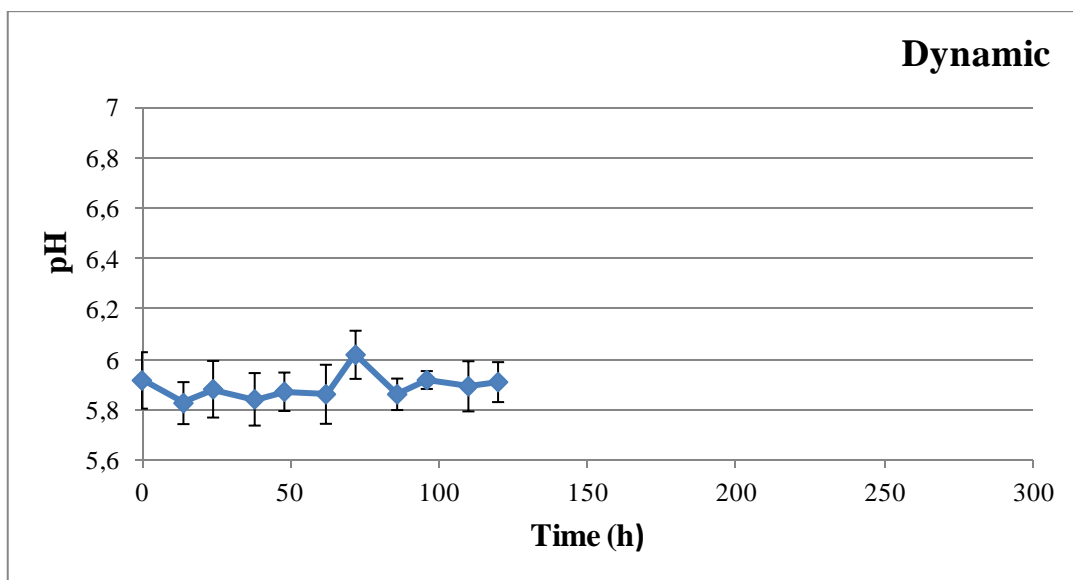
Διάγραμμα 13: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια συντήρησης στους 4°C.



Διάγραμμα 14: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια συντήρησης στους 10°C.



Διάγραμμα 15: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια συντήρησης στους 16°C.



Διάγραμμα 16: Μεταβολή της τιμής του pH κατά την διάρκεια συντήρησης στις περιοδικά μεταβαλλόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες (Dynamic).

3.5 Συσχέτιση μικροβιολογικών και φασματοκοπικών δεδομένων

Για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού (OMX) του εξεταζόμενου τροφίμου με βάση τα δεδομένα που πήραμε από την πολυφασματική απεικόνιση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γραμμικής παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLSR). Η PLS-R είναι ένας τύπος γραμμικής πολυμεταβλητής ανάλυσης ο οποίος προσπαθεί να συσχετίσει/μοντελοποιήσει τα δεδομένα από δύο μήτρες X (ανεξάρτητες μεταβλητές) και Y (εξαρτημένες μεταβλητές ή μεταβλητές απόκρισης). Η χρησιμότητα της μεθόδου έγκειται από το γεγονός ότι μπορεί να αναλύει δεδομένα με θόρυβο, με συγγραμμικότητα (έντονα συσχετισμένα) ακόμα και με ελλειπής μεταβλητές από τις δύο μήτρες X και Y (Wold *et al.* 2001). Στη παρούσα μελέτη τα δεδομένα από τις μικροβιολογικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές (Y) ενώ τα φασματικά δεδομένα ως ανεξάρτητες (X). Το πρόγραμμα στατιστικής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ανάλυσης PLSR ήταν το λογισμικό χημειομετρίας “The Unscrambler” (έκδοση 9.7, CAMO Software AS, Oslo, Norway).

3.5.1 Προεπεξεργασία φασματικών δεδομένων

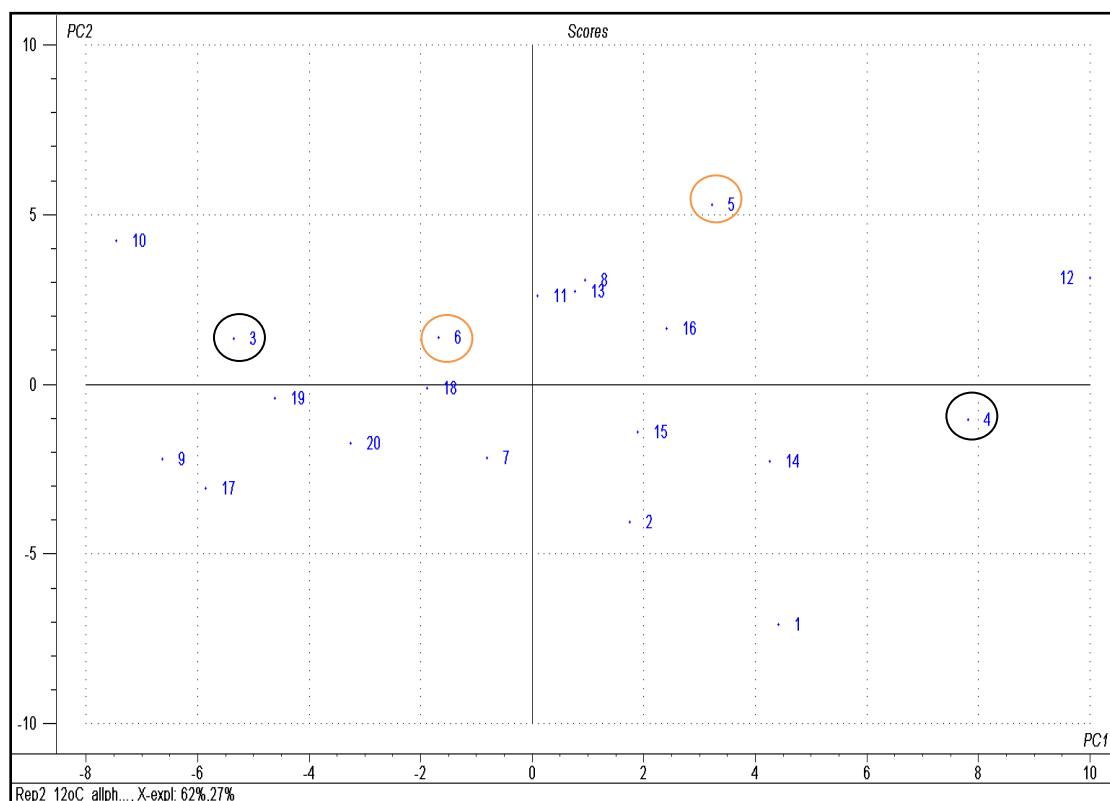
Τα φασματικά δεδομένα αποτελούσαν ένα φάσμα ανάκλασης 18 μηκών κύματος (405, 435, 450, 470, 505, 525, 570, 590, 630, 645, 660, 700, 850, 870, 890, 910, 940 και 970 nm) με την μέση τιμή και την τυπική απόκλιση αυτών. Οι προσπάθειες που έγιναν για την ανάπτυξη του μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης με την χρήση των δεδομένων αυτών δεν ήταν ικανοποιητικές εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας τους. Για τον σκοπό αυτό, τα φασματικά δεδομένα ανάκλασης (Reflectance) μετατράπηκαν σε φασματικά δεδομένα απορρόφησης (Absorbance) σε μία προσπάθεια να μειωθεί η αρχική παραλλακτικότητα και να επιτευχθεί η ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης. Ο μετασχηματισμός αυτός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την σχέση:

$$(1)$$

Εφαρμόζοντας την ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principle Component Analysis-PCA) (Jolliffe 2002) και για τις δύο ανεξάρτητες παρτίδες σε όλες τις ισόθερμες συνθήκες και στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ για έξι μήκη κύματος, για δεκαοχτώ αλλά και για όλο το φάσμα (μέση τιμή και τυπική απόκλιση) διαπιστώσαμε ότι υπάρχει μία παραλλακτικότητα στις φασματικές μετρήσεις απορρόφησης των δειγμάτων μας. Η παραλλακτικότητα αυτή ήταν εμφανής ακόμα και μέσα στην ίδια βιολογική επανάληψη κάθε δείγματος (Σχήμα 3). Αφού λοιπόν ακόμα και η ίδια βιολογική επανάληψη κάθε δείγματος ήταν διαφορετική και γνωρίζοντας εκ των πρότερον ότι το υπό μελέτη προϊόν είχε αρκετά μεγάλη παραλλακτικότητα αφού κατά την διενέργεια της πολυφασματικής ανάλυσης παίρναμε δείγματα από διαφορετικά κομμάτια ανανά, προχωρήσαμε στην διενέργεια ενός ακόμα μετασχηματισμού των δεδομένων με σκοπό της μείωση της αρχικής

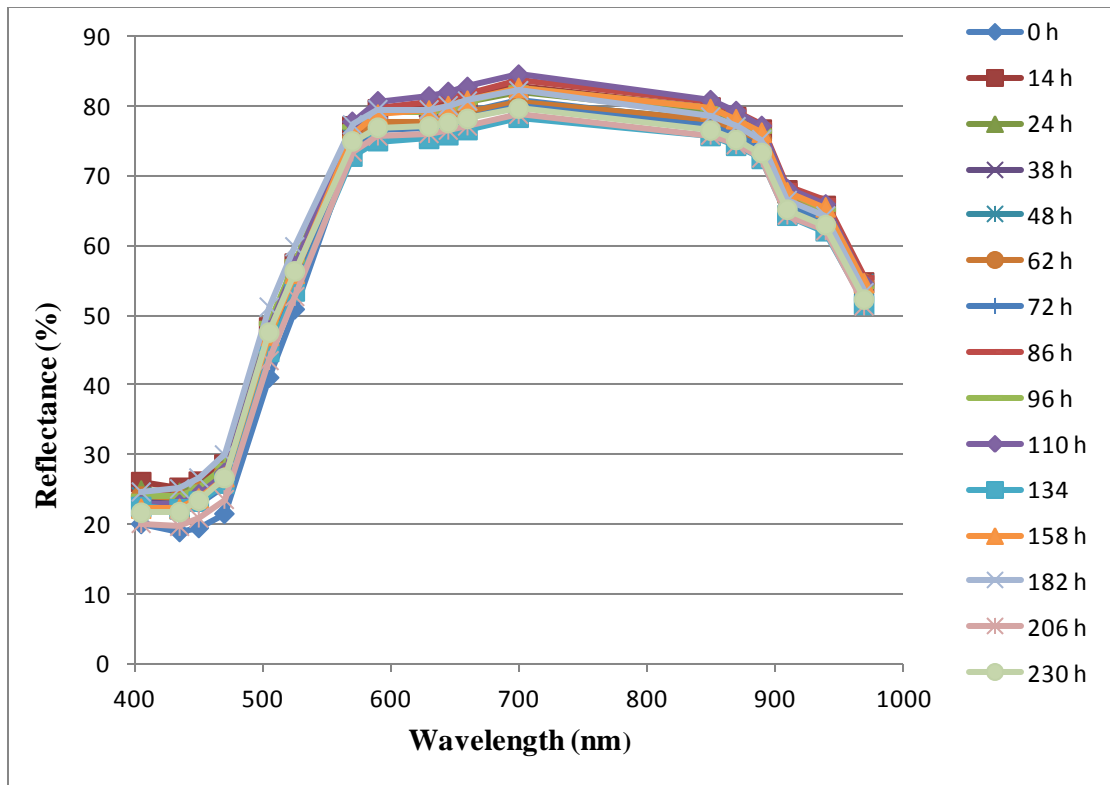
παραλλακτικότητας ώστε να επιτευχθεί η ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης του μικροβιακού πληθυσμού.

Το επιπλέον στάδιο προεπεξεργασίας των φασματικών δεδομένων απορρόφησης που ακολούθησε ήταν ο υπολογισμός της μέσης τιμής της μέσης απορρόφησης στα 18 μήκη κύματος και τυπικής απόκλισης αυτών των δύο βιολογικών επαναλήψεων κάθε δείγματος στην αντίστοιχη θερμοκρασία και χρόνο συντήρησης και για τις δύο ανεξάρτητες παρτίδες του προϊόντος.

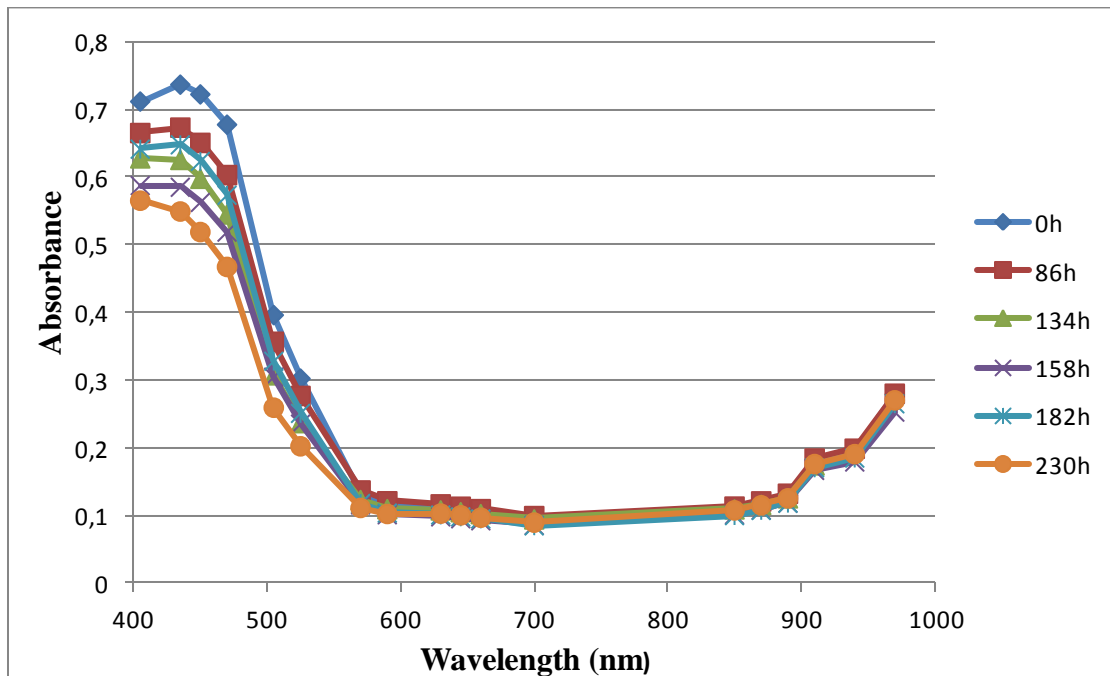


Σχήμα 3: PCA ανάλυση σε όλο το φάσμα στους 12^oC. Ο κύκλος χαρακτηριστικού χρωματισμού αντιπροσωπεύει δείγματα της ίδιας βιολογικής επανάληψης.

Η πορεία των φασμάτων ανάκλασης (Reflectance) και απορρόφησης (Absorbance) και για τα 18 μήκη κύματος σε διαφορετικούς χρόνους συντήρησης αναπαραστάθηκε γραφικά στα διαγράμματα που ακολουθούν. Πιο συγκεκριμένα, στο διάγραμμα 17 παρατηρούμε ότι και στα 18 μήκη κύματος υπάρχει μία διαφορά στην ανάκλαση σε σύγκριση με τον χρόνο συντήρησης, ενώ στο διάγραμμα 18 φαίνεται μια εμφανής διαφορά στην απορρόφηση στα 4 πρώτα μήκη κύματος σε κάποιους ενδεικτικούς χρόνους συντήρησης. Ωστόσο δεν μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα λαμβάνοντας υπόψη τις διαφορές αυτές, εξαιτίας της μεγάλης παραλλακτικότητας του τροφίμου και πιθανών σφαλμάτων κατά την διενέργεια της πειραματικής διαδικασίας.



Διάγραμμα 17: Σύγκριση των μέσων όρων των φασμάτων ανάκλασης σε διαφορετικούς χρόνους συντήρησης



Διάγραμμα 18: Σύγκριση των μέσων όρων των φασμάτων απορρόφησης σε διαφορετικούς χρόνους συντήρησης

3.5.2 Ανάπτυξη μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης

Η ανάπτυξη ενός PLS-R μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης προϋποθέτει δύο βασικά στάδια, την εκπαίδευση (training) του από ένα σετ δεδομένων εκπαίδευσης (training set) και την επικύρωση από ένα άλλο ανεξάρτητο σετ δεδομένων επικύρωσης (test set). Κάθε λογισμικό που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη PLS-R μοντέλων διαθέτει ένα πρακτικό τρόπο για την εκπαίδευση και την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου, την διασταυρούμενη επικύρωση (Cross validation-CV). Με την επιλογή του CV τα δεδομένα κατηγοριοποιούνται σε ομάδες από τις οποίες χρησιμοποιώντας την μία μετά την άλλη δημιουργούνται εσωτερικά μοντέλα με τα δεδομένα που απομένουν κάθε φορά. Το CV συνεισφέρει στο να απαλλαχτούμε από τις έντονα συσχετιζόμενες (συγγραμικότητα) και πολυάριθμες ανεξάρτητες μεταβλητές που είναι ικανές να οδηγήσουν σε overfitting. Κάθε μοντέλο που δημιουργείται πριν χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του βιολογικού παράγοντα που μας ενδιαφέρει (π.χ. εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού) θα πρέπει να επικυρώνεται. Η επικύρωση πραγματοποιείται μέσα από ένα ανεξάρτητο αριθμό αντιπροσωπευτικών δειγμάτων εφόσον υφίστανται. Η έλλειψη ενός τέτοιου σετ δεδομένων μπορεί να αντιμετωπιστεί με δύο στρατηγικές είτε με το CV, είτε με την επανεκτίμηση του μοντέλου εφόσον τα δεδομένα τυχαιοποιηθούν (Wold et al. 2001).

Τα φασματικά και τα μικροβιολογικά δεδομένα από τις δύο ανεξάρτητες παρτίδες του προϊόντος (ανανά) εισήχθησαν στο περιβάλλον του λογισμικού Unscrambler. Η φασματική πληροφορία χρησιμοποιήθηκε ως μεταβλήτη εισόδου στο λογισμικό ενώ οι μικροβιολογικές μετρήσεις ως μεταβλήτη εξόδου. Για την ανάλυση PLS τα φασματικά δεδομένα απορρόφησης ρυθμίστηκαν πρώτα σε μία μήτρα 2D (X) όπου οι γραμμές αντιπροσώπευαν τα δείγματα του ανανά στις διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους συντήρησης από τις δύο ανεξάρτητες παρτίδες και οι στήλες αντιπροσώπευαν την μέση τιμή και τυπική απόκλιση 18 μηκών κύματος (ανεξάρτητη μεταβλήτη). Επίσης, υπήρχε και μία επιπλέον στήλη (Y) όπου περιείχε την εξαρτημένη μεταβλήτη δηλαδή ο βιολογικός παράγοντας (οι μικροβιολογικές μετρήσεις του πληθυσμού της OMX από κάθε δείγμα ανανά) που θέλαμε να εκτιμηθεί. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε κατάτμηση των δεδομένων σε σετ εκπαίδευσης και σετ επικύρωσης. Οι ισόθερμες συνθήκες των δύο παρτίδων (4, 8 και 12 °C) ορίστηκαν ως σετ εκπαίδευσης (78 δείγματα-training samples) ενώ οι δυναμικές συνθήκες (28 δείγματα-validate samples) πάλι από τις δύο παρτίδες χρησιμοποιήθηκαν για την ανεξάρτητη εξωτερική επικύρωση (external validation) του μοντέλου. Τέλος, δεν εφαρμόστηκε κάποιος από τους διαθέσιμους μετασχηματισμούς που προσφέρει το λογισμικό στα φασματικά δεδομένα.

Κατά την ανάλυση παλινδρόμησης για την ανάπτυξη και την εκπαίδευση του μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν κάποιες διαθέσιμες επιλογές που παρέχονται από το λογισμικό σαν ένα στάδιο προεπεξεργασίας των φασματικών δεδομένων του σετ εκπαίδευσης. Οι επιλογές αυτές ήταν οι εξής:

- **Δοκιμασία αβεβαιότητας (Uncertainty test):** Είναι μία μέθοδος εσωτερικής επικύρωσης που εφαρμόζει το λογισμικό προκειμένου να αξιολογήσει την σταθερότητα του μοντέλου και να ταυτοποιήσει παράγοντες που διαταράσσουν την επιλογή σημαντικών X-μεταβλητών. Η δοκιμή αυτή εκτελείται μαζί με την επιλογή της διασταυρούμενης επικύρωσης (Cross-validation) και βασίζεται στην αρχή του Jack-knifng.
- **Διασταυρούμενη επικύρωση (Cross-validation):** Η επιλογή CV είναι και αυτή μία μέθοδος εσωτερικής επικύρωσης όπου ο ίδιος αριθμός δειγμάτων χρησιμοποιείται τόσο για την εκπαίδευση όσο και για την εκτίμηση της πρόβλεψης του μοντέλου. Πιο συγκεκριμένα, από το σύνολο των δεδομένων βαθμονόμησης (σετ εκπαίδευσης) εξέρχεται ένας μικρός αριθμός δειγμάτων και το μοντέλο βαθμονομείται με βάση τα δεδομένα που απομένουν. Η επιλογή αυτή παρέχει την δοκιμή του Full Cross Validation όπου από ένα σύνολο δεδομένων n , τα $n-1$ χρησιμοποιούνται για την εκπαίδευση του μοντέλου και το 1 δείγμα που απομένει για την επικύρωση του. Η δοκιμή αυτή βελτιώνει την συνάφεια και την δύναμη της ανάλυσης παλινδρόμησης.
- **Κεντράρισμα δεδομένων (Center data):** Με την επιλογή αυτή πραγματοποιείται το κεντράρισμα των δεδομένων, δηλαδή τα δεδομένα μπορούν να ερμηνευθούν με απόκλιση από την μέση τιμή (ο μέσος όρος αφαιρείται από την τιμή της μεταβλητής).
- **Στάθμιση (Weights):** Το βάρος $A/(SDev + B)$ με $A=1.00$ και $B=0$ (δηλαδή $1/SDev$ ονομάζεται τυποποίηση (standardization) και χρησιμοποιείται για να δώσει σε όλες τις μεταβλητές X (18 μήκη κύματος) την ίδια διακύμανση ($=1$). Αν χρησιμοποιηθεί η επιλογή αυτή, όλες οι μεταβλητές έχουν την ίδια πιθανότητα να επηρεάσουν την εκτίμηση του μοντέλου.

Με την διαδικασία της βαθμονόμησης (Calibration) που αποτελεί στάδιο της μοντελοποιημένης διαδικασίας παλινδρόμησης, το κύριο σύνολο των δεδομένων όπου περιέχει μόνο το σύνολο των δειγμάτων βαθμονόμησης χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό παραμέτρων του μοντέλου (π.χ. κύρια συστατικά-principal components και συντελεστές παλινδρόμησης- B_w). Ενώ με την διαδικασία της εσωτερικής επικύρωσης (Cross validation) αποκτάμε μία αρχική εικόνα για την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου.

3.5.3 Επικύρωση μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης

Μετά την ανάπτυξη ενός μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης ακολουθεί η αξιολόγηση του με βάσει ορισμένους στατιστικούς δείκτες επίδοσης ώστε να αξιολογηθεί η ακρίβεια, η αξιοπιστία και η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου (Feng et al. 2018). Η επικύρωση του μοντέλου που κατασκευάζεται είναι πολύ χρήσιμη διότι παρέχει μια αρχική ιδέα για το πόσο καλά θα μπορέσει λειτουργήσει και να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη νέων άγνωστων δειγμάτων. Μόνο οι μεταβλητές X τροφοδοτούνται στο μοντέλο από το οποίο προβλέπονται οι τιμές απόκρισης (Y μεταβλητή) που συγκρίνονται με τις ήδη υπάρχουσες τιμές απόκρισης. Στη συνέχεια

παρουσιάζονται ορισμένοι δείκτες επίδοσης που χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της προβλεπτικής ικανότητας του μοντέλου.

Για την μέτρηση του βαθμού συσχέτισης των μεταβλητών X και Y χρησιμοποιήθηκε ο δειγματικός συντελεστής γραμμικής συσχέτισης (correlation coefficient) του Pearson που συμβολίζεται με r και ορίζεται από τον τύπο:

$$r = \frac{S_{XY}}{S_X S_Y} \quad (2)$$

Όπου:

S_X και S_Y οι διασπορές των X και Y και

S_{XY} η συνδιασπορά τους.

Ο συντελεστής συσχέτισης r παίρνει τιμές στο διάστημα $[-1, 1]$. Όταν $r = 1$ υπάρχει τέλεια θετική συσχέτιση μεταξύ X και Y , όταν $r = 0$ δεν υφίσταται καμία συσχέτιση μεταξύ X και Y , ενώ όταν $r = -1$ υπάρχει τέλεια αρνητική συσχέτιση μεταξύ X και Y (Παπαδόπουλος 2009). Ενδεικτικά οι τιμές του r μπορεί να συνοψιστούν στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 10: Τιμή και ερμηνεία του συντελεστή συσχέτισης (Hinkle *et al.* 2003)

Μέγεθος συσχέτισης	Ερμηνεία συσχετισμού
0.90 σε 1.00 (-0.90 σε -1.00)	Πολύ υψηλή θετική (αρνητική) συσχέτιση
0.70 σε 0.90 (-0.70 σε -0.90)	Υψηλή θετική (αρνητική) συσχέτιση
0.50 σε 0.70 (-0.50 σε -0.70)	Μέτρια θετική (αρνητική) συσχέτιση
0.30 σε 0.50 (-0.30 σε -0.50)	Χαμηλή θετική (αρνητική) συσχέτιση
0.00 σε 0.30 (0.00 σε -0.30)	Αμελητέα συσχέτιση

Για την εκτίμηση των διαφορών μεταξύ των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών υπολογίστηκε η απόκλιση της μέσης τετραγωνικής ρίζας (Root Mean Square Error-RMSE). Το RMSE εκφράζει την μέση απόκλιση (σφάλμα) μεταξύ προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών. Επομένως όσο μικρότερη είναι η τιμή του (κοντά στο 1 χειρότερο) τόσο ελαχιστοποιούνται οι διαφορές και τα δεδομένα μας περιγράφονται καλύτερα από το μοντέλο (καλύτερη προβλεψιμότητα). Η απόκλιση της μέσης τετραγωνικής ρίζας της βαθμονόμησης (RMSEC), της διασταυρούμενης επικύρωσης (RMSECV) και της πρόβλεψης (RMSEP) είναι

σημαντικοί στατιστικοί δείκτες για την αξιολόγηση της ακρίβειας ενός μοντέλου πρόβλεψης (Feng *et al.* 2018). Το RMSE είναι μέτρο της ακρίβειας ενός μοντέλου πρόβλεψης (Sant'Ana *et al.* 2012) και η χαμηλή τιμή του υποδηλώνει την υψηλή ακρίβεια του μοντέλου που χρησιμοποιείται για την περιγραφή (ή την πρόβλεψη) των πειραματικών δεδομένων (Feng *et al.* 2014c). Υπολογισμός του πραγματοποιείται σύμφωνα με την σχέση:

$$\frac{\sum_{i=1}^n (O_i - P_i)^2}{n}$$

(3)

Όπου:

O_i οι παρατηρούμενες τιμές ($\log_{10}\text{cfu/g}$)

P_i οι προβλεπόμενες τιμές ($\log_{10}\text{cfu/g}$)

n το πλήθος των παρατηρήσεων

Για την εκτίμηση της απόδοσης/αξιοπιστίας του μοντέλου πρόβλεψης υπολογίστηκαν κάποιοι δείκτες επίδοσης. Ο Ross (1996) εισήγαγε το παράγοντα μεροληψίας (Bias Factor- B_f) και τον συντελεστή ακρίβειας (Accuracy Factor- A_f) ως ερμηνεύσιμους δείκτες σχετικά με την πρόβλεψη του μοντέλου. Ο παράγοντας μεροληψίας (B_f) είναι μέτρο της μέσης διακύμανσης μεταξύ παρατηρούμενων και προβλεπόμενων τιμών. Αν $B_f = 1$ υπάρχει τέλεια συμφωνία μεταξύ παρατηρήσεων και προβλέψεων και το μοντέλο δεν υπερεκτιμά ($B_f > 1$) ή υποεκτιμά ($B_f < 1$) τον πληθυσμό του αλλοιογόνου μικροοργανισμού (Panagou *et al.* 2014). Υπολογίζεται ως εξής:

(4)

Ο συντελεστής ακρίβειας (A_f) είναι ο δεύτερος δείκτης επίδοσης ο οποίος μετρά την μέση απόκλιση μεταξύ προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών, δηλαδή πόσο κοντά είναι οι προβλέψεις στις παρατηρήσεις, αγνοώντας αν η απόκλιση αυτή είναι θετική ή αρνητική και λαμβάνει τιμές ίσες ή μεγαλύτερες της μονάδας. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του τόσο ακριβέστερη είναι η εκτίμησης του μοντέλου (Panagou *et al.* 2014). Υπολογίζεται ως εξής:

(5)

Όπου:

O_i οι παρατηρούμενες τιμές ($\log_{10}\text{cfu/g}$)

P_i οι προβλεπόμενες τιμές ($\log_{10}\text{cfu/g}$)

Το γραμμικό μαθηματικό μοντέλο που δημιουργήθηκε μέσα από την εφαρμογή της μεθόδου PLS-R μπορεί να περιγραφεί σε μία ευθεία ελαχίστων τετραγώνων με εξίσωση της μορφής:

(6)

Όπου:

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

B_0 είναι ο σταθερός όρος (η τιμή του Y όταν $X=0$)

e_j το σφάλμα που αντιπροσωπεύει την διαφορά ανάμεσα στην τιμή που προβλέπει η ευθεία παλινδρόμησης για το δείγμα i και την πραγματική τιμή του συγκεκριμένου δείγματος.

Οι συντελεστές παλινδρόμησης της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων δηλώνουν την αναμενόμενη μεταβολή της εξαρτημένης μεταβλητής Y_i , όταν η ανεξάρτητη μεταβλητή X_i , αυξηθεί κατά μία μονάδα και οι υπόλοιπες μεταβλητές X παραμείνουν σταθερές, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι συντελεστές παλινδρόμησης είναι ανεξάρτητοι μεταξύ τους. Το B_0 της ευθείας ελαχίστων τετραγώνων εκφράζει την αναμενόμενη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής Y_i , όταν η ανεξάρτητη μεταβλητή X_i πάρει την τιμή 0.

Ο συντελεστής προσδιορισμού (coefficient of determination) R^2 αποτελεί δείκτη του πόσο κοντά ή μακριά βρίσκονται τα σημεία πάνω στην ευθεία ελαχίστων τετραγώνων και παίρνει τιμές στο κλειστό $[0,1]$. Όταν το $R^2 = 1$ όλα τα σημεία βρίσκονται πάνω στην ευθεία ελαχίστων τετραγώνων και το μοντέλο μας είναι πλήρες γραμμικό δηλαδή υπάρχει πλήρης γραμμική συσχέτιση μεταξύ εξαρτημένης (Y) και ανεξάρτητης μεταβλητής (X). Πρακτικά, όσο πλησιέστερα βρίσκεται προς την μονάδα τόσο καλύτερη είναι η ευθεία ελαχίστων τετραγώνων ως εκτίμηση της ευθείας παλινδρόμησης και τόσο περισσότερο γραμμικό είναι το μοντέλο μας (Παπαδόπουλος 2009) . Όταν παρουσιάζεται στα αποτελέσματα της βαθμονόμησης μας ενημερώνει για την ποιότητα της προσαρμογής των δεδομένων στο μοντέλο, ενώ όταν εμφανίζεται στα αποτελέσματα της διασταυρούμενης επικύρωσης μας δείχνει την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Ο συντελεστής προσδιορισμού της

βαθμονόμησης (R^2_C), της διασταυρούμενης επικύρωσης (R^2_{CV}) και της πρόβλεψης (R^2_P) αποτελούν σημαντικούς στατιστικούς δείκτες αξιολόγησης (Feng *et al.* 2018) και πιστεύεται ότι ένα ικανοποιητικό μοντέλο θα πρέπει να διαθέτει υψηλή τιμή R^2 , με το εύρος των τιμών μεταξύ του 0.66 και 0.81 να είναι αποδεκτό, ενώ τιμές μεταξύ του 0.82 και 0.90 και πάνω να είναι καλές και εξαιρετικές αντίστοιχα (Karoui *et al.* 2006).

Το τυπικό σφάλμα της πρόβλεψης (Standard Error of Prediction-SEP) είναι το μέτρο της διασποράς των δεδομένων γύρω από την ευθεία ελαχίστων τετραγώνων. Εάν το τυπικό σφάλμα της πρόβλεψης είναι μικρό τότε οι παρατηρούμενες και οι προβλεπόμενες τιμές δεν διαφέρουν πολύ και η ευθεία παλινδρόμησης μας δίνει μια καλή περιγραφή της σχέσης μεταξύ του X και Y. Αν το τυπικό σφάλμα είναι μεγάλο (κοντά στο 1) τότε δεν μπορούμε να ισχυριστούμε ότι έχουμε μια καλή περιγραφή της σχέσης (Παπαδόπουλος 2009).

Η ανάλυση PLS εισάγει τα αρχικά δεδομένα εισόδου και εξόδου σε ένα λανθάνοντα χώρο, εξάγοντας έναν αριθμό από κύρια συστατικά (principal components) γνωστά ως λανθάνουσες μεταβλητές (latent variables) σε μία ορθογωνική δομή που περιγράφουν την μέγιστη διακύμανση των δεδομένων. Ο μέγιστος αριθμός λανθάνουσων μεταβλητών προσδιορίζεται με βάση τις υπολειπόμενες διακυμάνσεις (residual variances) μετά την διασταυρούμενη επικύρωση χρησιμοποιώντας την μέθοδο “leave-one-out” κατά την διάρκεια του σταδίου της βαθμονόμησης για την εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών και την αποφυγή της υπερβολικής προσαρμογής (over-fitting) των δεδομένων (Brereton 2000, Barbin). Ένα καλό μοντέλο πρόβλεψης θα πρέπει να έχει χαμηλό αριθμό λανθάνουσων μεταβλητών (Williams 1987)

3.5.4 Επίδοση μαθηματικού μοντέλου πρόβλεψης

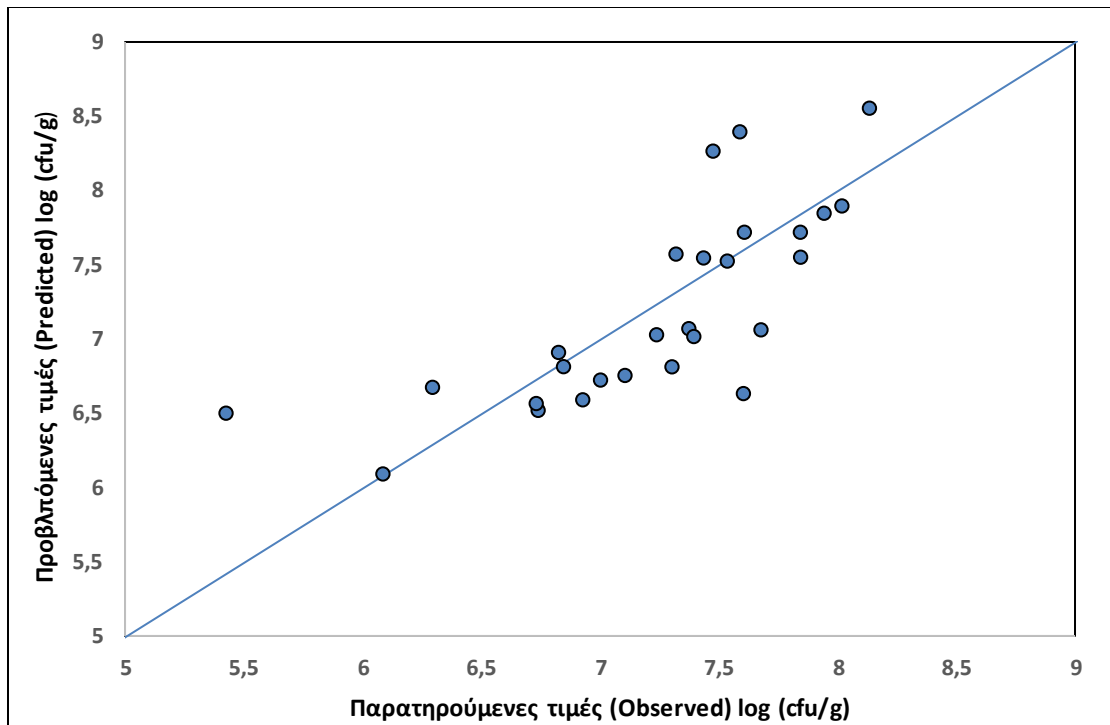
Η επίδοση της εξωτερικής επικύρωσης του ποσοτικού PLS-R μοντέλου που κατασκευάστηκε με σκοπό την πρόβλεψη του μικροβιακού πληθυσμού (OMX) αξιολογήθηκε με βάση τον υπολογισμό ορισμένων στατιστικών δεικτών. Στον πίνακα 10 παρουσιάζονται οι δείκτες επίδοσης του μοντέλου που αναπτύχθηκε για την βαθμονόμηση και την πρόβλεψη.

Μικροοργανισμός	Λανθάνουσες Μεταβλητές (LV)		
OMX	9	Βαθμονόμηση (Calibration)	
		RMSEC	0.442
		r_c	0.843
		R^2_C	0.711
		SEC	0.445
		Slope	0.711
		Πρόβλεψη (Prediction)	
		RMSEP	0.460
		r_p	0.802
		B_f	1.001
		A_f	1.052

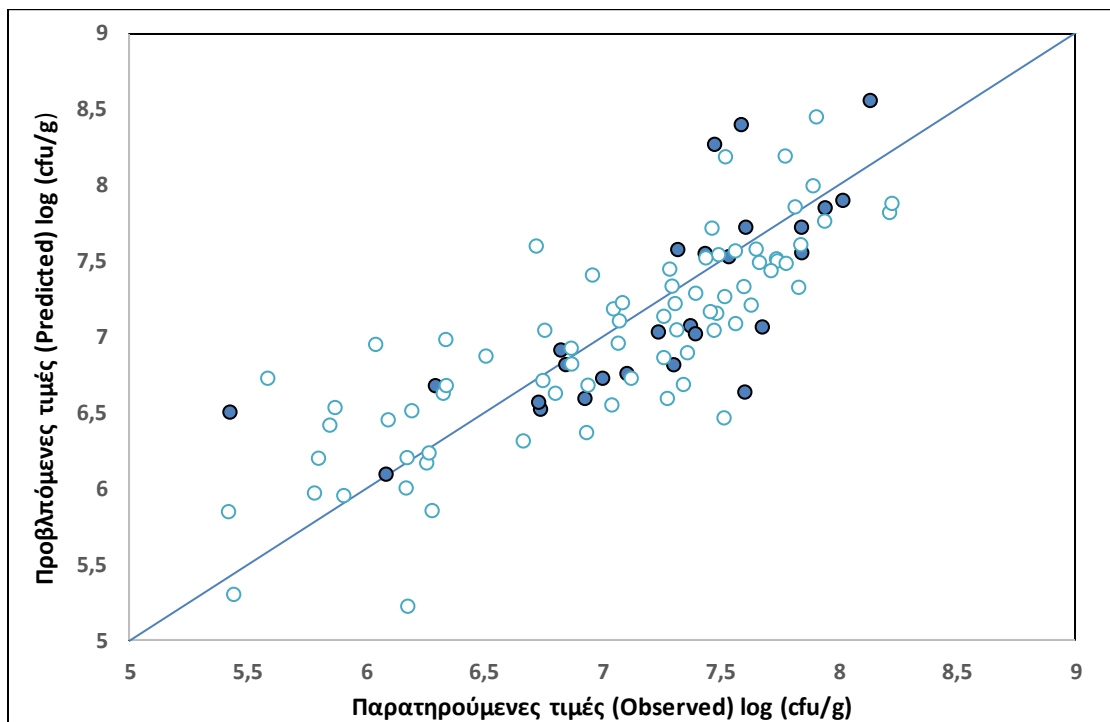
R^2_p	0.632
SEP	0.584
Slope	0.642

Ο κατάλληλος αριθμός των λανθάνουσων μεταβλητών που προσδιορίζουν την μέγιστη διακύμανση των δεδομένων ήταν 9. Ο συντελεστής συσχέτισης ($r_c = 0.843$, και $r_p = 0.802$) υποδηλώνει ότι υπάρχει μια υψηλή συσχέτιση μεταξύ μικροβιολογικών και φασματικών δεδομένων. Συντελεστής συσχέτισης με τιμές από 0.70 έως 0.90 υποδεικνύει την ύπαρξη υψηλής συσχέτισης μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής Y και της ανεξάρτητης μεταβλητής X (Hinkle *et al.* 2003). Η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού ($R^2_c = 0.711$ και $R^2_p = 0.632$) στην βαθμονόμηση δείχνει ότι υπάρχει μια πολύ καλή προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο μας αφού η τιμή του είναι πολύ κοντά στην μονάδα, ενώ για την πρόβλεψη μας πληροφορεί ότι υφίσταται μια γραμμική σχέση μεταξύ των μεταβλητών X και Y και το μοντέλο που αναπτύχθηκε είναι αρκετά γραμμικό. Το εύρος των τιμών του μεταξύ 0.66-0.81 κρίνεται γενικά ως αποδεκτό (Karoui *et al.* 2006). Οι χαμηλές τιμές του RMSE (RMSEC = 0.442 και RMSEP = 0.460) υποδηλώνουν ότι οι τιμές του πληθυσμού της OMX που προβλέπει το μοντέλο δεν έχουν μεγάλη διαφορά σε σχέση με τις υπάρχουσες πειραματικές τιμές και το μοντέλο χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια. Ο παράγοντας μεροληψίας ($B_f = 1.001$) είναι κοντά στην μονάδα γεγονός που καταδεικνύει ότι δεν υφίσταται συστηματική υπό- ή υπέρ- εκτίμηση του πληθυσμού της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX). Η τιμή του συντελεστή ακρίβειας ($A_f = 1.052$) δείχνει ότι η μέση απόκλιση των προβλεπόμενων τιμών σε σχέση με τις παρατηρούμενες τιμές είναι της τάξης του 5.2 % για την OMX. Οι χαμηλές του τυπικού σφάλματος (SEC = 0.445 και SEP = 0.584) τόσο για την βαθμονόμηση όσο και για την πρόβλεψη καταδεικνύουν ότι οι προβλεπόμενες και οι παρατηρούμενες τιμές δεν διαφέρουν σημαντικά (μικρή διασπορά των δεδομένων γύρω από την ευθεία ελαχίστων τετραγώνων) και η ευθεία παλινδρόμησης μας δίνει μια καλή περιγραφή της σχέσης μεταξύ του X και Y.

Η επίδοση του μοντέλου αναπαραστάθηκε επίσης γραφικά μέσα από την κατασκευή της ευθείας παλινδρόμησης για την OMX που παρουσιάζει την κατανομή των δεδομένων βαθμονόμησης (calibration) και πρόβλεψης (External validation) γύρω από την ευθεία $y=x$ με ορατή την γραμμική τάση των δύο σετ δεδομένων (Σχήμα 4, 5).

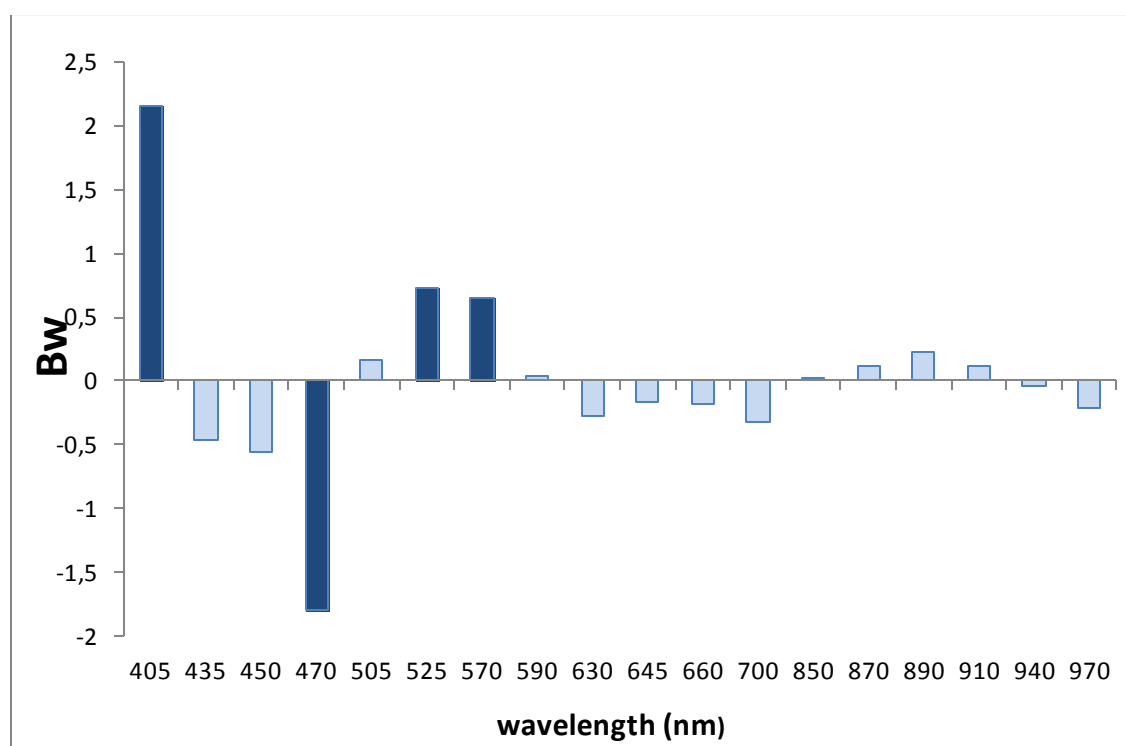


Σχήμα 4: Ευθεία παλινδρόμησης για την OMX



Σχήμα5: Σχέση μεταξύ προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών της OMX για τα δείγματα βαθμονόμησης (78 δείγματα, ανοιχτό χρώμα) και πρόβλεψης (28 δείγματα, μπλε χρώμα)

Στα μοντέλα PLS-R είναι πολύ συχνά επιθυμητή η διερεύνηση του πώς τα μεμονωμένα μήκη κύματος σχετίζονται με τα χαρακτηριστικά που πρέπει να προβλεφθούν. Τα σημαντικά μήκη κύματος αποτελούν το μέρος των φασματικών δεδομένων που είναι υπεύθυνα για την εκτίμηση του μικροβιακού πληθυσμού παρατηρήθηκαν με βάση τους σταθμισμένους συντελεστές παλινδρόμησης (regression coefficients, B_w). Τα μήκη κύματος με υψηλές θετικές ή αρνητικές τιμές συντελεστή παλινδρόμησης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καλύτερη επίδοση του μοντέλου και μεταφέρουν χρήσιμες πληροφορίες, ενώ μήκη κύματος με μικρούς συντελεστές παλινδρόμησης έχουν μικρή συμβολή σχετικά με την απόδοση του μοντέλου (EIMarsy *et al.* 2012 b). Η επιλογή των σημαντικών μηκών κύματος βασίζεται σε μια τροποποιημένη μορφή της αρχής Jack-knife (Martens and Martens, 2000) η οποία αποτελεί μια επιλογή του λογισμικού Unscrambler. Με βάση το γεγονός αυτό τα μήκη κύματος 405, 450, 470 και 525 ταυτοποιήθηκαν ως σημαντικά για την εκτίμηση των μετρήσεων της OMX (Σχήμα 3).



Σχήμα 6: Συντελεστές παλινδρόμησης για την OMX. Οι μπάρες με έντονο μπλε χρώμα αντιπροσωπεύουν τα σημαντικά μήκη κύματος απορρόφησης.

Από τα μήκη κύματος που διερευνήθηκε ότι είναι πιο σημαντικά και τους συντελεστές παλινδρόμησης αυτών κατασκευάστηκε μία ποσοτική εξίσωση που θα προβλέπει τον πληθυσμό της OMX:

$$Y_{OMX} = 10.70 + 2.157 \cdot X_{405nm} - 1.802 \cdot X_{470nm} - 0.730 \cdot X_{525nm} - 0.651 \cdot X_{570nm}$$

(7)

Όπου:

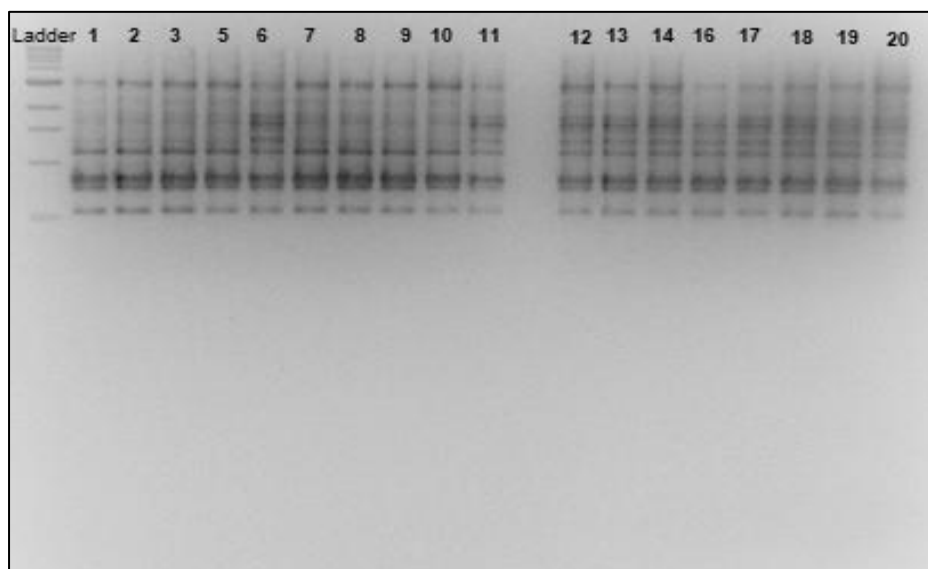
X_{nm} είναι απορρόφηση στο αντίστοιχο μήκος κύματος

Y_{OMX} είναι η προβλεπόμενη τιμή της OMX ($\log_{10}cfu/g$)

Πέρα από την εφαρμογή της PLS-R ανάλυσης έγινε προσπάθεια συσχέτισης των φασματικών δεδομένων ανάκλασης και των δεδομένων της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης με την χρήση της ανάλυσης διαχωρισμού PLS-DA με σκοπό την ανάπτυξη ενός ποιοτικού μοντέλου πρόβλεψης. Το μοντέλο αυτό θα επέτρεπε την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων του ανανά σε δύο ομάδες (φρέσκα ή αλλοιωμένα) με βάση τα όρια του αριθμού των μικροοργανισμών που θέτει η κοινοτική νομοθεσία (Υγειονομικός κανονισμός της Γαλλίας) για τον χαρακτηρισμό ενός τροφίμου ως αλλοιωμένου. Ωστόσο η προσπάθεια αυτή δεν κατέστη δυνατή γιατί τα όρια που έθετε ο κανονισμός και τα μικροβιολογικά δεδομένα που είχαμε στην διάθεση μας δεν επέτρεπαν την σωστή αναλογία φρέσκων προς αλλοιωμένων (1 φρέσκο: 2 αλλοιωμένα).

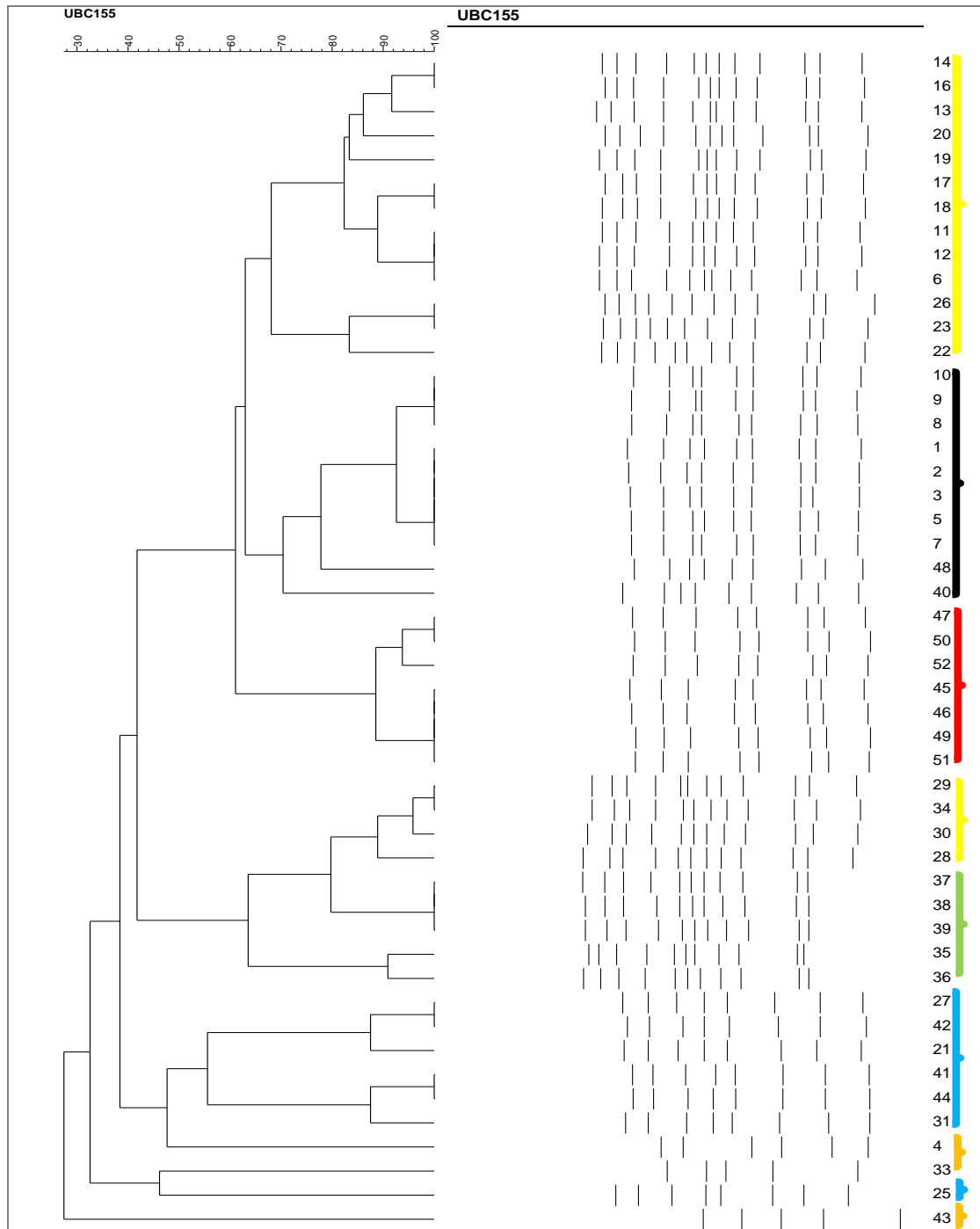
3.6 Μοριακή ανάλυση

Η αναγνώριση και η διαφοροποίηση όλων των ευδιάκριτων προφίλ των στελεχών του γένους *Pseudomonas* πραγματοποιήθηκε μέσα από την χρήση της μεθόδου της RAPD-PCR και οπτικοποιήθηκε μέσα από την διενέργεια της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης. Παρακάτω παρουσιάζεται μια ενδεικτική φωτογραφία ηλεκτροφόρησης των υπό μελέτη στελεχών (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Ενδεικτική φωτογραφία ηλεκτροφόρησης στην οποία παρουσιάζονται τα ηλεκτροφορητικά προφίλ 18 υπό εξέταση απομονώσεων.

Οι 49 απομονώσεις που ελήφθησαν από τα προσβεβλημένα μανιτάρια ομοδοποιήθηκαν με βάση το ποσοστό ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ που πάρθηκαν μέσα από την χρήση της μεθόδου της RAPD-PCR. Η ομαδοποίηση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσα από την εφαρμογή του προγράμματος Bionumerics (Applied Maths, Keistraat, Belgium) αλλά και μέσω χειροκίνητων προσαρμογών μέσα από την παρατήρηση των φωτογραφιών ηλεκτροφόρησης. Η τελική ανάλυση κατά συστάδες δημιούργησε (cluster analysis) ένα δένδrogramma το οποίο αποκάλυψε την ύπαρξη 6 διαφορετικών ομάδων (Σχήμα 4). Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται η ποικιλότητα των ηλεκτροφορητικών προφίλ των απομονώσεων των Ψευδομονάδων και η ομαδοποίηση αυτών με πλαίσιο χαρακτηριστικού χρωματισμού. Πιο συγκεκριμένα, επί του συνόλου των απομονώσεων (49) τα δείγματα 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 40 και 48 κατηγοριοποιούνται στην Ομάδα 1, τα 6, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 26, 28, 29 και 30 στην Ομάδα 2, τα 21, 25, 27, 31, 41, 42 και 44 στην Ομάδα 3, τα 35, 36, 37, 38, 39 στην Ομάδα 4, τα 45, 46, 47, 49, 50, 51 και 52 στην Ομάδα 5 και τα 4, 33, 43 στην Ομάδα 6.



Σχήμα 7: Δενδρόγραμμα κατά την ανάλυση κατά συστάδες μέσω του προγράμματος **Bionumerics** των απομονώσεων με βάση το ποσοστό ομοιότητας των ηλεκτροφορητικών τους προφίλ που πάρθηκαν με την μέθοδο της **RAPD-PCR**. Τα δείγματα 4, 33 και 43 δεν ανήκουν σε κάποια από τις υπόλοιπες ομάδες και έχοντας διαφορετικά ηλεκτροφορητικά προφίλ μεταξύ τους συγκροτούν μία ξεχωριστή ομάδα

3.B Συζήτηση

Τα νωπά προϊόντα φυτικής προέλευσης, όπως τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν βασικά συστατικά για μια ισορροπημένη διατροφή και ενός υγιεινού τρόπου ζωής και η κατανάλωση τους ενθαρρύνεται από πολλές κυβερνητικές αρχές για την υγεία παγκόσμια. Η τάση αυτή είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ζήτησης των νωπών φρούτων και λαχανικών με άμεση συνέπεια την ταχεία ανάπτυξη της βιομηχανίας των νωπών φυτικών προϊόντων. Τα ελάχιστα επεξεργασμένα φρούτα και λαχανικά παρέχουν πολλά πλεονεκτήματα, καθώς απαιτούν ελάχιστο χρόνο προετοιμασίας συνιστώντας έτσι ένα πλήρες γεύμα που χαρακτηρίζεται από υψηλή διατροφική αξία και αυξημένα αισθητηριακά κριτήρια ποιότητας (Berger *et al.* 2010, Francis *et al.* 2012, Olaimat and Holley 2012).

Η διάρκεια ζωής των προϊόντων αυτών είναι σχετικά μικρή, 5-7 ημέρες στους 4 °C (Cliffe-Byrnes and O'Beirne 2002, Allende *et al.* 2006b, Di Egidio *et al.* 2009). Η κυριότερη αιτία του περιορισμένου χρόνου ζωής των φρέσκων φρούτων και λαχανικών είναι η διαδικασία της αλλοίωσης η οποία μπορεί να προκληθεί μέσα από φυσιολογικές διαδικασίες αλλά και από την δράση μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανεπιθύμητων αλλαγών όπως καφέτιασμα, χαλάρωση των φυτικών ιστών και εμφάνιση ανεπιθύμητων οσμών και γεύσεων (Bierhals *et al.* 2011, Oms-Oliu *et al.* 2009). Η μόλυνση των νωπών φυτικών προϊόντων από αλλοιογόνους μικροοργανισμούς μπορεί να λάβει χώρα κατά την διάρκεια της επεξεργασίας, όπου το προϊόν εκτίθεται στο ατμοσφαιρικό αέρα και σε συνδυασμό με την απουσία του προστατευτικού φλοιού (φλούδα) να επιτρέψει την εγκαθίδρυση και την ανάπτυξη των μικροοργανισμών πάνω στην φυτική επιφάνεια, προσφέροντας τους μία πληθώρα θρεπτικών συστατικών (DeI Nobile *et al.* 2007, Conte *et al.* 2009, Muriel-Galet *et al.* 2013).

Η παρούσα μελέτη είχε ως βασικό σκοπό την παρακολούθηση, τον χαρακτηρισμό και την εκτίμηση της μικροβιακής αλλοίωσης προϊόντων φυτικής προέλευσης, κάνοντας χρήση κλασικών και ταχέων μεθόδων ανάλυσης καθώς και κατάλληλων μοριακών τεχνικών. Τα υπό μελέτη προϊόντα φυτικής προέλευσης ήταν δείγματα φρέσκου ανανά και νωπών μανιταριών του είδους *P. ostreatus*. Η μελέτη διεξήχθη στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η διενέργεια της κλασικής μικροβιολογικής ανάλυσης στα δείγματα του φρέσκου ανανά αποκάλυψε ότι η κυρίαρχη μικροβιακή ομάδα της αλλοίωσης σε όλες τις ισόθερμες συνθήκες (4, 8 και 12°C) και στο περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ (8 h στους 4°C, 8 h στους 8°C και 8 h στους 12°C) ήταν οι ζύμες. Το αρχικό μικροβιακό φορτίο των ζυμομυκήτων στον ανανά ήταν της τάξης 4.74 log₁₀cfu/g. Πιο συγκεκριμένα, στους 4 °C είχαμε μία μικροβιακή αύξηση της τάξης των 2 λογαρίθμων (6.90 log₁₀cfu/g), στους 8 °C και στους 12 °C μια αύξηση πάνω από 2.5 λογάριθμούς (7.63 και 7.64 log₁₀cfu/g ατίστοιχα) ενώ στο μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ η αύξηση του πληθυσμού των ζυμομυκήτων ήταν της τάξης των 3 λογαρίθμων (8.02 log₁₀cfu/g). Ο πληθυσμός των ζυμών και οι

κινητικοί παράμετροι αυτού επηρεάστηκαν σημαντικά από την θερμοκρασία συντήρησης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, η μικροβιακή αύξηση έγινε ταχύτερη και υψηλότερη με χαρακτηριστικό παράδειγμα την θερμοκρασία συντήρησης στους 12 °C όπου ο πληθυσμός των ζυμών έφτασε το κατώφλι των δυο λογαρίθμων σε λιγότερο χρόνο συντήρησης σε σχέση με τις υπόλοιπες ισόθερμες συνθήκες και το περιοδικά μεταβαλλόμενο θερμοκρασιακό προφίλ, συμβάλλοντας έτσι στην ταχύτερη αλλοίωση των δειγμάτων του ανανά.

Η αρχική τιμή του pH του ανανά ήταν 3.46 παρουσιάζοντας ελάχιστες αυξομειώσεις κατά την διάρκεια της συντήρησης των δειγμάτων στις διαφορετικές θερμοκρασίες.